

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

**Charakterisierung transkriptioneller und nicht-transkriptioneller Funktionen der  
Faktoren Miz1 und c-Myc in der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort**

und

**Die Inhibition der Miz1-Funktion durch den Tumorsuppressor Arf führt zum  
Verlust der Zelladhäsion und induziert Apoptose**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin der



vorgelegt von

**Barbara Herkert**

aus Miltenberg

Marburg, Februar 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
11.02.2011.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Martin Eilers

1. Korreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

Wesentliche Teile der hier vorliegenden Arbeit wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

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

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

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

# Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung .....	1
1.1	Der Transkriptionsfaktor c-Myc .....	2
1.1.1	Die Familie der Myc-Onkoproteine .....	2
1.1.2	Strukturelle Eigenschaften der Myc-Onkoproteine .....	3
1.1.3	Transkriptionelle Regulation durch c-Myc .....	4
1.1.4	Transkriptions-unabhängige Funktion von c-Myc .....	7
1.1.5	c-Myc in der DNA-Schadensantwort .....	8
1.2	Der Transkriptionsfaktor Miz1 .....	10
1.2.1	Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Miz1 .....	10
1.2.2	Regulation der Transkription durch Miz1 .....	11
1.2.2.1	Regulation der transkriptionellen Aktivität von Miz1 durch L23 und Nukleophosmin .....	11
1.2.2.2	c-Myc als Repressor der Miz1-abhängigen Genexpression .....	13
1.2.2.3	TopBP1 als negativer Regulator der Miz1-Funktion .....	14
1.2.3	Transkriptions-unabhängige Funktionen von Miz1 .....	15
1.2.3.1	Hemmung der HectH9-vermittelten Ubiquitinierung von c-Myc .....	15
1.2.3.2	Inhibition des TNF- $\alpha$ /JNK1-Signalweges durch Miz1 .....	16
1.2.4	Biologische und physiologische Relevanz der Genregulation durch den Transkriptionsfaktor Miz1 .....	17
1.2.4.1	Beschreibung der Funktion von Miz1 anhand von Mausmodellen .....	17
1.2.4.2	Interferenz mit dem TGF $\beta$ -Signalweg .....	18
1.2.4.3	Regulation der Myc-induzierten Apoptose durch den c-Myc/Miz1-Komplex ..	19
1.2.4.4	Die Rolle von Miz1 in der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort .....	20
1.3	Zielsetzung der Arbeit .....	25
2	Materialien .....	26
2.1	Stämme und Zelllinien .....	26
2.1.1	Bakterienstämme .....	26
2.1.2	Säugerzelllinien .....	26
2.1.3	Transgener Mausstamm .....	27
2.2	Nukleinsäuren .....	27
2.2.1	Primer .....	27
2.2.2	Oligonukleotide .....	28
2.2.3	Plasmide .....	30
2.3	Antikörper .....	31
2.3.1	Primärantikörper .....	31

## Inhaltsverzeichnis

---

2.3.2	Sekundärantikörper .....	32
2.4	Chemikalien .....	33
2.5	Medien .....	33
2.5.1	Medien für die Bakterienkultivierung .....	33
2.5.2	Medien und Chemikalien für die Säugerzellkultivierung .....	34
2.6	Puffer und Lösungen .....	35
2.7	Gebrauchsmaterialien .....	40
2.8	Geräte, Membranen und Filme .....	41
3	Methoden .....	42
3.1	Molekularbiologische Methoden .....	42
3.1.1	Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation.....	42
3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	42
3.1.3	Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben und Zellkulturzellen.....	43
3.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	43
3.1.5	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel.....	43
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	44
3.1.7	Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion).....	44
3.1.8	Hybridisierung von Einzelstrang-DNA.....	44
3.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten .....	45
3.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	45
3.1.11	RNA-Isolation .....	46
3.1.12	cDNA-Synthese.....	46
3.1.13	Quantitative reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) .....	47
3.2	Zellbiologische Methoden .....	48
3.2.1	Auftauen von Zellen.....	48
3.2.2	Passagieren von Zellen.....	48
3.2.3	Einfrieren von Zellen.....	49
3.2.4	Transfektion von siRNA in Säugerzellen.....	49
3.2.5	Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen .....	49
3.2.6	Stabile retrovirale Infektion.....	50
3.2.7	Wachstumskurve .....	51
3.2.8	Etablierung immortalen 3T3 Zelllinien.....	51
3.2.9	Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS) .....	52
3.2.10	Untersuchung der Schweißbildung zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen	

	(Comet Assay).....	52
3.3	Proteinbiochemische Methoden.....	53
3.3.1	Herstellen von Proteinlysaten für Immunoblot .....	53
3.3.2	Chromatin-Fraktionierung.....	54
3.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	54
3.3.4	Immunpräzipitation (IP).....	54
3.3.5	<i>In vivo</i> -SUMOylierungs-Untersuchung .....	56
3.3.6	GST-Pulldown.....	57
3.3.7	Gelfiltration .....	58
3.3.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
3.3.9	Immunoblot .....	59
3.3.10	Strippen von PVDF-Membranen.....	59
3.3.11	Bestimmung der Luziferase-Aktivität .....	60
3.3.12	Indirekte Immunfluoreszenz.....	60
3.4	Tierexperimentelle Methoden .....	61
3.4.1	Zucht von Mäusen .....	61
3.4.2	Entnahme von Embryonen und Isolierung von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs).....	61
4	Ergebnisse .....	62
4.1	Funktionsanalyse der BTB/POZ-Domäne des Transkriptionsfaktors Miz1 in murinen embryonalen Fibroblasten.....	62
4.1.1	Beschreibung des konstitutiven und konditionellen <i>Miz1</i> <sup>ΔPOZ</sup> Mausmodells.....	62
4.1.2	Die Deletion von Exon 3 und 4 des murinen <i>Miz1</i> Gens führt zur Expression eines trunkierten Miz1 Proteins (Miz1ΔPOZ).....	64
4.1.3	Die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation, Zellzyklusverteilung und spontane Immortalisierungsrate von MEFs.....	66
4.1.4	Die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 beeinträchtigt nicht die Aktivierung der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort.....	68
4.1.5	<i>Miz1</i> <sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus nach DNA-Schaden .....	70
4.1.6	Miz1 spielt keine essentielle Rolle während der UVB-induzierten Expression von <i>Cdkn1a</i> in immortalen MEFs .....	71
4.2	Nicht-transkriptionelle Funktionen von Miz1 und c-Myc in der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort .....	74

4.2.1	Identifikation neuer Interaktionspartner des Miz1/c-Myc-Netzwerks in Abhängigkeit von DNA-Schäden.....	74
4.2.2	Die Aktivierung der ATR-abhängigen Signaltransduktion durch Miz1 basiert nicht auf der Einführung von DNA-Schäden .....	78
4.2.3	Lösliches TopBP1 unterliegt einer proteasomaler Degradation.....	81
4.2.4	HectH9 reguliert spezifisch die ATR-induzierte DNA-Schadensantwort .....	82
4.2.5	c-Myc antagonisiert die Stabilisierung von TopBP1 durch Miz1 .....	83
4.3	Der Tumorsuppressor Arf antagonisiert die Funktion von Miz1 .....	86
4.3.1	Arf interagiert mit Miz1 im Nukleoplasma .....	86
4.3.2	Nukleophosmin antagonisiert die Interaktion von Miz1 und p14Arf und damit die Sequestrierung von Miz1 in subnukleäre Foci .....	89
4.3.3	Arf inhibiert die Transaktivierung durch Miz1 .....	90
4.3.4	Arf reduziert die Löslichkeit des Miz1-Proteins .....	92
4.3.5	Die Rekrutierung von c-Myc ist notwendig für die Repression von Miz1 durch Arf .....	93
4.3.6	Der Tumorsuppressor Arf induziert die SUMOylierung von Miz1 .....	95
4.3.7	c-Myc interagiert mit SUMO-Spezies.....	97
4.3.8	Arf induziert die Ausbildung des repressorischen c-Myc/Miz1/SUMO-Komplexes in zwei unabhängigen Schritten .....	98
5	Diskussion.....	101
5.1	Miz1 ist nicht essentiell für die Expression von <i>Cdkn1a</i> und die Einleitung der DNA-Schadensantwort in MEFs.....	101
5.1.1	Die POZ-Domäne von Miz1 ist nicht essentiell für die Aktivierung der <i>Cdkn1a</i> -Expression .....	101
5.1.2	<i>Miz1</i> <sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs weisen keine Veränderungen in der Induktion der DNA-Schadensantwort auf.....	104
5.2	c-Myc antagonisiert die TopBP1-stabilisierende Funktion von Miz1 .....	106
5.2.1	Das Auftreten von DNA-Schäden induziert die Freisetzung von Miz1 aus einem repressorischen Komplex mit TopBP1 und einem Komplex mit dem Tumorsuppressor BRCA1 .....	106
5.2.2	Die Aktivierung der ATR-Signalkaskade durch erhöhte Miz1-Mengen ist nicht auf vermehrt auftretende DNA-Schäden zurückzuführen.....	107
5.2.3	Die E3-Ubiquitin-Ligase HectH9 reguliert während der UVB-induzierten Signalantwort die Stabilität von löslichem TopBP1 .....	108

## Inhaltsverzeichnis

---

5.2.4	Die Ausbildung eines c-Myc/Miz1-Komplexes induziert die Degradierung von TopBP1 und blockiert dadurch die Aktivierung der ATR-Signalkaskade.....	111
5.2.5	Relevanz der nicht-transkriptionellen Regulation der ATR-Signalkaskade durch Miz1 und c-Myc .....	112
5.3	Die Inhibition der Miz1-Funktion durch den Tumorsuppressor Arf führt zum Verlust der Zelladhäsion und induziert Apoptose .....	115
5.3.1	Die Interaktion von Miz1 und Arf führt zur Relokalisierung von Arf aus den Nucleoli in das Nucleoplasma .....	115
5.3.2	Arf blockiert die transkriptionelle Aktivierung Miz1-abhängiger Zielgene .....	117
5.3.3	Arf induziert die Bildung von Heterochromatin im Bereich von Miz1-Bindestellen .....	118
5.3.4	Die Ausbildung eines trimeren Komplexes bestehend aus Miz1, c-Myc und Arf bildet die Grundlage der Arf-induzierten Repression von Miz1 .....	118
5.3.5	Arf induziert die SUMOylierung von Miz1 .....	121
5.3.6	c-Myc enthält einen hochkonservierten Bereich, der möglicherweise die Bindung von SUMO1 vermittelt .....	124
5.3.7	Der Arf-induzierte Repressionsmechanismus verläuft in zwei unabhängigen Schritten.....	125
5.3.8	Potentielle Relevanz der Regulation der Miz1-Funktion durch den Tumorsuppressor Arf .....	126
6	Zusammenfassung.....	130
6.1	Deutsche Zusammenfassung.....	130
6.2	English Summary.....	132
7	Literaturverzeichnis .....	134
8	Anhang .....	155
8.1	Abkürzungen.....	155
8.2	Lebenslauf.....	159
8.3	Danksagung.....	160
8.4	Akademische Lehrer .....	161
8.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	162

## 1 Einleitung

Krebs ist nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems mit mehr als 25% die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2006 wurden ca. 426.800 Krebsneuerkrankungen diagnostiziert sowie 211.000 damit verbundene Todesfälle registriert (Quelle: Robert-Koch-Institut). Die Häufigkeit der meisten Krebserkrankungen nimmt mit dem Alter deutlich zu, wobei der Kontakt mit karzinogenen Substanzen (z.B. Tabakrauch), chronische Infektionen (z.B. humanes Papillomavirus) aber auch eine familiäre Disposition als Hauptursachen für eine Krebserkrankung angesehen werden.

Eine Voraussetzung für die Entstehung eines malignen Tumors ist die Akkumulation von Mutationen, die ein unkontrolliertes Zellwachstum ermöglichen. Anhand ihrer Eigenschaften werden die daran beteiligten Gene in zwei Gruppen unterteilt, Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene. Als Tumorsuppressoren werden Proteine bezeichnet, die beispielsweise an der negativen Regulation des Zellzyklus und der Zellteilung sowie der Einleitung der Apoptose beteiligt sind. Meist wirken Tumorsuppressoren rezessiv, weshalb der Verlust bzw. die Inaktivierung beider Allele des betroffenen Gens eine Tumor-initiiierende Wirkung hat. Das bekannteste Beispiel ist der Tumorsuppressor p53, der sowohl die Expression von proapoptotischen Genen wie *PUMA* und *NOXA* als auch von Zellzyklusinhibitoren wie *CDKN1A* aktiviert. Onkogene entstehen durch Mutationen, Amplifikationen oder Translokationen aus sogenannten Proto-Onkogenen, die in nicht-transformierten Zellen in diversen Prozessen wie Zellwachstum, Zellteilung oder Differenzierung eine Rolle spielen. Aufgrund der Veränderungen in einem Proto-Onkogen erhält das dadurch kodierte Protein jedoch veränderte biologische qualitative oder quantitative Eigenschaften. Neben *HRAS*, das 1982 als Proto-Onkogen im humanen Genom identifiziert und charakterisiert wurde (Shih und Weinberg, 1982), gehören die Mitglieder der *MYC*-Familie zu den potentesten Onkogenen.

## 1.1 Der Transkriptionsfaktor c-Myc

### 1.1.1 Die Familie der Myc-Onkoproteine

Das am besten charakterisierte Mitglied der Familie der Myc-Onkogene, *MYC*, wurde 1979 als zelluläres Homolog des transformierenden Onkogens *v-myc* der Retroviren MC29, OK10, MH2 und FH3 identifiziert, die bei Hühnern Myelocytomatose hervorrufen, worauf die Namensgebung der entsprechenden Gene bzw. Genprodukte zurückzuführen ist (Coffin et al., 1981; Sheiness und Bishop, 1979; Sheiness et al., 1980). Die onkogene Wirkung des zellulären Homologs c-Myc konnte ebenfalls in den folgenden Jahren beobachtet werden. Dabei sind die erhöhten Mengen von aktivem c-Myc in etwa 70% der humanen Tumore auf unterschiedliche, im Folgenden beschriebene Mechanismen zurückzuführen (Cole, 1986). Die erhöhten Proteinmengen in mehr als 80% der humanen Kolontumore basieren beispielsweise auf einer Mutation des *APC*-Gens, was zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und dadurch zu einer verstärkten *MYC*-Expression führt (He et al., 1998). Des Weiteren führt die Amplifikation von *MYC* zur Entstehung verschiedener solider Tumore wie Mammakarzinomen (Park et al., 2005), kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Yamada et al., 2000) oder nodulären malignen Melanomen (Treszl et al., 2004). Bei Lymphomen und Leukämien sind dagegen häufig Translokationen des *MYC*-Gens zu beobachten, die dessen Überexpression verursachen (Vita und Henriksson, 2006). In 80% der Burkitt Lymphome tritt beispielsweise die chromosomale Translokation t(8;14)(q24;q32) auf, was zur Integration der kodierenden Region von *MYC* in den Enhancer-Bereich der schweren Immunglobulinkette und dadurch zu einer Überexpression spezifisch in den B-Zellen führt (Dalla-Favera et al., 1982).

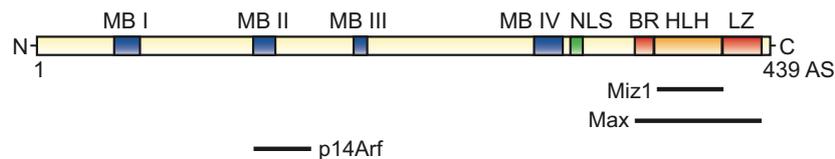
Zusätzlich zu c-Myc beinhaltet die Familie der Myc-Onkoproteine N- und L-Myc sowie B-Myc und S-Myc, wobei die beiden letzteren ursprünglich aus einer genomischen Bibliothek von *Rattus norvegicus* isoliert werden konnten und keine humanen Homologe aufweisen (Sugiyama et al., 1989). Darüber hinaus ist *MYC* evolutionär hoch konserviert, was durch dessen Vorkommen in allen Vertebraten sowie entfernt verwandter Spezies wie beispielsweise *Drosophila melanogaster* (*dMyc*) belegt wird (Gallant et al., 1996). Obwohl die verschiedenen Myc-Proteine einer Spezies eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, wurde bereits 1993 von Davis und Kollegen anhand eines konstitutiven Knockouts von *c-Myc* deren spezifische Funktionen belegt, da keine vollständige Kompensation durch die weiteren Mitglieder dieser Proteinfamilie vorlag. Die homozygote Deletion von *c-Myc* führt daher zur embryonalen Lethalität zwischen Tag 8,5 und 9,5 der Embryonalentwicklung. Pathologische Auffälligkeiten

umfassen eine generelle Entwicklungsverzögerung sowie Entwicklungsdefekte des Herzens, des Perikardiums und des Neuralrohrs (Davis et al., 1993).

### 1.1.2 Strukturelle Eigenschaften der Myc-Onkoproteine

Aufgrund der Präsenz eines Kernlokalisierungssignals weisen die Myc-Onkoproteine eine nukleäre Lokalisation auf (Abrams et al., 1982; Dang und Lee, 1988). Das *MYC*-Transkript wird von zwei alternativen Startstellen des zweiten Exons im gleichen Leserahmen translatiert, was zur Bildung der längeren Isoform I, bestehend aus 454 Aminosäuren, und der 439 Aminosäuren langen, prädominanten Isoform II führt (Hann et al., 1988; Hann et al., 1992). Zudem wurde eine weitere, aminoterminal verkürzte Isoform, Myc-S, beschrieben, die auf die Translation der *MYC*-mRNA von einem weiteren, internen AUG-Kodon ausgehend zurückzuführen ist (Spotts et al., 1997). Aufgrund der fehlenden aminoterminalen Transaktivierungsdomäne stimuliert Myc-S nicht die Expression von Myc-Zielgenen und übt diesbezüglich eine dominant-negative Funktion auf Myc voller Länge aus, während die Repression durch diese Verkürzung nicht beeinträchtigt wird. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Myc-S den Proliferationsdefekt von Myc-defizienten Fibroblasten aufhebt (Cowling und Cole, 2008). In aktuellen Studien wurde außerdem eine carboxyterminal trunktierte Form von Myc, Myc-nick, identifiziert, die aus der Calpain-vermittelten Spaltung von Myc entsteht und aufgrund des fehlenden nukleären Lokalisierungssignals (NLS, *nuclear localisation signal*) ausschließlich zytoplasmatisch vorliegt (Conacci-Sorrell et al., 2010). Auf molekularer Ebene wurde eine Stimulation der Acetylierung und damit verbunden eine Stabilisierung von  $\alpha$ -Tubulin durch Myc-nick beobachtet. Darüber hinaus wurde auf zellulärer Ebene eine veränderte, spindelförmige Morphologie beobachtet, die auf die Rekrutierung der Histonacetyltransferase GCN5 an Mikrotubuli zurückzuführen war. Myc-nick akkumuliert während der Muskeldifferenzierung wohingegen die Proteinmengen von Myc voller Länge parallel dazu deutlich abnehmen. Dies deutet darauf hin, dass die Calpain-vermittelte Spaltung die transkriptionelle Inhibition der Differenzierung durch Myc aufhebt und außerdem die zytoplasmatische Umstrukturierung und Differenzierung durch Myc-nick ermöglicht. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass ektopisches Myc-nick die MyoD-vermittelte Transdifferenzierung von Myc-defizienten Rat1-Zellen zu Muskelzellen stimuliert. Weitere zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellwachstum und Apoptose, die durch die prädominante Isoform II induziert werden, werden durch Myc-nick dagegen nicht reguliert.

Strukturell sind die Myc-Proteine in die Familie der basischen helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH/LZ)-Transkriptionsfaktoren einzuordnen und besitzen neben der carboxyterminal lokalisierten bHLH/LZ-Domäne weitere konservierte Bereiche in der aminoterminalen Domäne, die als Myc-Box I – IV bezeichnet werden (Abb. 1). Die Bereiche Myc-Box I und II sind auch in dMyc von *Drosophila melanogaster* konserviert und vermitteln essentielle Funktionen während der c-Myc-induzierten Apoptose (Evan et al., 1992), Transformation (Stone et al., 1987) und Hemmung der Differenzierung (Freytag et al., 1990). Da die Myc-Box I die Phosphorylierungsstellen Thr58 und Ser62 enthält, welche die Bindung der Ubiquitinligase Fbw7 vermitteln, ist dieser Abschnitt zudem von Bedeutung für die Stabilität der Myc-Proteine (Welcker et al., 2004; Yada et al., 2004). Die Rekrutierung von Kofaktoren, wie beispielsweise Tip48/Tip49 (Wood et al., 2000) und Trrap (McMahon et al., 1998), zur Regulation der Transkription von Zielgenen erfolgt durch die Myc-Box II. Eine Bedeutung bei der Transformation durch c-Myc konnte ebenfalls der Myc-Box III zugeschrieben werden, wobei deren Deletion überraschenderweise die Myc-induzierte Apoptose stimuliert (Herbst et al., 2005). Der Bereich Myc-Box IV ist ebenfalls an der c-Myc-induzierten Apoptose und Transformation von Zellen beteiligt (Cowling et al., 2006). Die hochkonservierte, carboxyterminale bHLH/LZ-Domäne vermittelt die Heterodimerisierung mit dem bHLH/LZ-Protein Max (Myc-associated factor-X) (Blackwood und Eisenman, 1991). Des Weiteren findet in diesem Bereich die Interaktion mit den Kofaktoren p300 und CBP sowie Miz1 statt (Peukert et al., 1997; Vervoorts et al., 2003).



**Abb. 1: Struktur des humanen c-Myc Proteins.**

Die schematische Darstellung zeigt das humane c-Myc Protein, das 439 Aminosäuren (AS) umfasst und mehrere konservierte Bereiche aufweist: Myc-Box (MB) I und II (Grandori et al., 2000), MB III (Herbst et al., 2005) und MB IV (Cowling et al., 2006) sowie ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS), basische Region (BR), Helix-Loop-Helix-Motiv (HLH) und Leuzin-Zipper (LZ). Die schwarzen Querstriche repräsentieren die Bereiche der Max, Miz1 bzw. p14Arf-Interaktion.

### 1.1.3 Transkriptionelle Regulation durch c-Myc

c-Myc reguliert als Transkriptionsaktivator und -repressor etwa 10% des humanen Genoms. Da c-Myc jedoch ein relativ schwacher Transkriptionsfaktor ist, wird die Expression der Zielgene

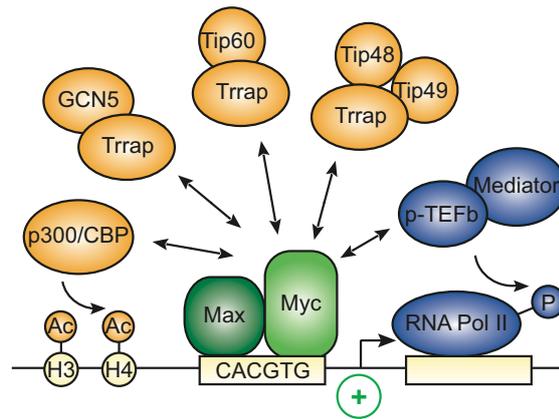
vorwiegend lediglich um den Faktor 2 verändert (Cole und Cowling, 2008). Aufgrund des breiten Spektrums an Zielgenen beeinflusst c-Myc eine Vielzahl biologischer Prozesse. Dazu gehören beispielsweise Proliferation und Differenzierung, Ribosomenbiogenese und Proteinsynthese, Metabolismus und Zellgrößenwachstum, genomische Stabilität, Zelltransformation, Zelladhäsion, Angiogenese sowie Apoptose.

Im Fall von RNA-Polymerase I und II-abhängigen Zielgenen erfordert die transkriptionelle Aktivierung die Interaktion von c-Myc mit Max und erfolgt durch die Bindung des Myc/Max-Heterodimers an kanonische (CACGTG) oder nicht-kanonische (beispielsweise CACATG) Sequenzen in den Promotoren von Zielgenen, die als E-Box bezeichnet werden (Blackwell et al., 1993; Blackwell et al., 1990) (Abb. 2A). In aktuellen Studien konnte jedoch außerdem eine Max-unabhängige Aktivierung der Genexpression durch c-Myc beobachtet werden, wobei es sich dabei ausschließlich um RNA-Polymerase III-transkribierte Zielgene wie die der 5S-rRNA und von tRNAs handelt (Gallant und Steiger, 2009; Steiger et al., 2008).

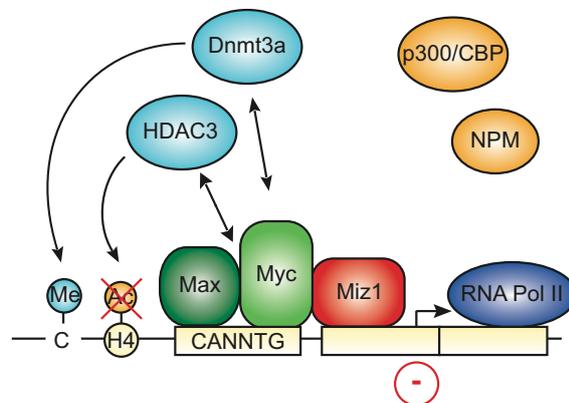
Der Aktivierungsprozess durch c-Myc beinhaltet die Rekrutierung verschiedener Koaktivatoren wie der Histonacetyltransferasen CBP, p300, GCN5 bzw. Tip60 und der ATPasen Tip48/Tip49, die über das Adaptorprotein Trrap indirekt an Myc binden (Adhikary und Eilers, 2005; Cole und Nikiforov, 2006). Dies resultiert in der Acetylierung der Nukleosomen und der damit verbundenen Umstrukturierung des Chromatins im Promotorbereich zu einer „offenen“ DNA-Formation, welche die Transkription der entsprechenden Zielgene begünstigt (Lee und Workman, 2007).

Ein weiterer Mechanismus der Myc-abhängigen Transkriptionsaktivierung beruht auf der Bindung des Mediatorkomplexes und basaler Transkriptionsfaktoren wie P-TEFb durch c-Myc (Bouchard et al., 2004; Eberhardy und Farnham, 2001). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass c-Myc nicht die Rekrutierung der RNA-Polymerase II zum Promotor sondern deren Übertritt in die Elongationsphase begünstigt. Dies basiert auf der Wechselwirkung mit dem Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb, der die carboxyterminale Domäne der RNA-Polymerase II sowie die Pausierungsfaktoren DSIF und NELF phosphoryliert und dadurch die Elongation stimuliert (Cheng und Price, 2007; Kim und Sharp, 2001). Anhand weiterführender, genomweiter Studien in murinen ES-Zellen konnte belegt werden, dass dieser Myc-abhängige Regulationsmechanismus auf eine Vielzahl aktiv transkribierter Myc-Zielgene übertragen werden kann (Rahl et al., 2010).

**A**



**B**



**Abb. 2: Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch c-Myc.**

(A) Dargestellt sind diverse Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung RNA-Polymerase II (RNA Pol II)-abhängiger Gene durch das c-Myc/Max-Heterodimer. (Modifiziert nach Adhikary und Eilers, 2005)

(B) Die Übersicht zeigt die Repression der Miz1-abhängigen Transaktivierung durch das c-Myc/Max-Heterodimer. (Modifiziert nach Adhikary und Eilers, 2005)

Im Gegensatz zur Aktivierung der Transkription, auf die ein großer Teil der biologischen Funktionen von Myc zurückgeführt werden konnte, liegen bezüglich des Ablaufs der Repression durch c-Myc und der beteiligten Faktoren deutlich weniger Informationen vor, obwohl diese beispielsweise essentiell für die Induktion der Myc-induzierten Apoptose als auch während der Zelltransformation durch Myc ist (Patel und McMahon, 2006, 2007; Staller et al., 2001; Wu et al., 1999). Der transformierende Effekt basiert darauf, dass einem großen Teil der Myc-reprimierten Gene eine Funktion in der Zelladhäsion, der Zell-Zell-Kommunikation sowie der Inhibition der Zellzyklusprogression zugeordnet werden konnte (Frye et al., 2003; Gebhardt et al., 2006; Knoepfler et al., 2002; Wilson et al., 2004).

Die Repression durch c-Myc konnte in allen bisherigen Studien auf dessen Assoziation mit den *Core* (Minimal)-Promotor der Zielgene zurückgeführt werden. Obwohl dies ebenfalls auf einen großen Teil der durch Myc aktivierten Gene zutrifft, existieren einige Beispiele, bei denen die Stimulation der Genexpression durch die Bindung einer zum Promotor weit entfernten Region erfolgt (Susanne Walz, persönliche Mitteilung). Dies legt die Vermutung nahe, dass lediglich der Prozess der transkriptionellen Repression durch c-Myc direkt mit den Abläufen an der Transkriptionsstartstelle verknüpft ist.

Ein Mechanismus der transkriptionellen Repression durch c-Myc basiert auf der Assoziation des Myc/Max-Heterodimers mit Miz1, das DNA-gebunden im Promotorbereich von Zielgenen wie beispielsweise *CDKN2B* (p15Ink4b) und *CDKN1A* (p21Cip1) vorliegt (Herold et al., 2002; Staller et al., 2001) (Abb. 2B). Eine detaillierte Beschreibung dieses Miz1-abhängigen Repressionsprozesses erfolgt in Abschnitt 1.2.2. Neben Miz1 wurden auch Spl (Feng et al., 2002), FoxO3a (Chandramohan et al., 2008), YY-1 (Shrivastava et al., 1993), TFII-Ip107/E2F (Luo et al., 2004) und NF-Y (Izumi et al., 2001) als Interaktionspartner von Myc identifiziert, deren transkriptionsaktivierende Wirkung durch Myc blockiert wird. Des Weiteren wurde im Fall des *CDKN1B*-Promotors eine direkte, Miz1-unabhängige DNA-Bindung des Myc/Max-Heterodimeres an den Initiatorbereich vorgeschlagen (Yang et al., 2001).

### **1.1.4 Transkriptions-unabhängige Funktion von c-Myc**

In aktuellen Arbeiten wird zusätzlich zu der Funktion als Transkriptionsfaktor eine Transkriptions-unabhängige Aktivität von c-Myc beschrieben. Erste Beobachtungen, die dies belegen, basieren auf Mutationsstudien, die trotz einer Einschränkung der DNA-Bindekapazität von c-Myc keinen vollständigen Verlust der Myc-induzierten Zellproliferation und Transformation von primären, embryonalen Rattenfibroblasten zeigen (Cowling et al., 2006). Des Weiteren resultiert die Expression von Myc-Mutanten ohne die Fähigkeit zur Dimerisierung mit Max ebenfalls in der Stimulation der Proliferation, allerdings zu einem geringeren Ausmaß als die Wildtyp-Form (Cowling und Cole, 2007). Dies konnte auf die verstärkte Methylierung der 5'-Kappe einiger mRNAs zurückgeführt werden, was einen essentiellen Schritt der Translation Protein-kodierender mRNAs darstellt. Diese kotranskriptionelle Methylierung erhöht die Stabilität der entsprechenden mRNA und ermöglicht den Transport aus dem Kern in das Cytoplasma.

Zudem wurde c-Myc als Interaktionspartner mehrerer Komponenten des Präreplikationskomplexes identifiziert (Dominguez-Sola et al., 2007). Durch die Rekrutierung

dieser Faktoren wird die Initiation der Replikation erleichtert, was zu einer deutlich erhöhten Replikationsrate führt. Daher resultiert die Überexpression von *MYC* in replikativem Stress und, damit verbunden, in der Akkumulation von DNA-Schäden. Die chromosomale Instabilität, die im Zusammenhang mit der Expression von *MYC* beobachtet wurde (Kuttler und Mai, 2006), könnte daher auf dieser nicht-transkriptionellen Funktion beruhen (Cole und Cowling, 2008; Prochownik, 2008).

### 1.1.5 c-Myc in der DNA-Schadensantwort

Da c-Myc aufgrund der Aktivierung von Zielgenen wie beispielsweise *CCND2* (CyclinD2) bzw. der transkriptionellen Repression des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A* die Zellzyklusprogression fördert, ist nach Auftreten von DNA-Schäden eine Regulation der c-Myc-Mengen notwendig, um deren vollständige Reparatur zu gewährleisten und dadurch die Akkumulation von Mutationen bzw. die Einleitung von Apoptose zu vermeiden. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass erhöhte Mengen von c-Myc die ATM-abhängige DNA-Schadensantwort und den damit verbundenen Zellzyklusarrest beeinträchtigt (Sheen und Dickson, 2002; Sheen et al., 2003). Dies äußert sich durch den vorzeitigen Übertritt geschädigter Zellen von der G1- in die S-Phase bzw. von der G2-Phase in die Mitose, was zur Sensitivierung der betroffenen Zellen gegenüber DNA-Schadensinduzierter Apoptose führt. In Übereinstimmung damit konnte in weiterführenden Studien nachgewiesen werden, dass N-Myc in Neuroblastomzelllinien durch die Induktion der micro-RNA miR-421 indirekt die Proteinmengen von ATM vermindert und somit die Aktivierung der ATM-Signalkaskade blockiert (Hu et al., 2010). Um dies zu unterbinden ist eine Regulation der c-Myc-Proteinmengen nach Auftreten von DNA-Schäden notwendig. Diesbezüglich wurden sowohl post-transkriptionelle als auch post-translationelle Mechanismen identifiziert.

In aktuellen Studien wurde die Beteiligung von microRNAs (miRNAs) an der Regulation der zellulären DNA-Schadensantwort beschrieben. Dabei aktiviert p53 die Transkription der miRNAs miR-34a und miR-34b/c, die an der Induktion der p53-abhängigen Apoptose und des Zellzyklusarrests beteiligt sind (Chang et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007; Tarasov et al., 2007). Die miRNAs miR-34b/c, deren Expression bei Vorliegen von DNA-Schäden zudem durch die MK5/FoxO- und p38/MK2-Signalkaskaden aktiviert wird, blockiert beispielsweise die Translation der *MYC*-mRNA (Cannell et al., 2010). Diese miR-34b/c-vermittelte, post-transkriptionelle Repression von c-Myc könnte in der DNA-Schadensantwort eine zentrale Rolle spielen, da sie zum einen die DNA-Schadensinduzierte Apoptose verhindert. Gleichzeitig

ist sie während der DNA-Reparatur für die Inhibition der DNA-Synthese und der Zellzyklusprogression notwendig und verhindert somit die Replikation geschädigter DNA.

Die post-translationelle Regulation der c-Myc-Mengen aufgrund UV-induzierter DNA-Schäden basiert auf der proteasomalen Degradation des Proteins (Britton et al., 2008). Diese ist jedoch unabhängig von den bekannten Bindestellen des F-Box-Proteins Skp2 sowie der E3-Ubiquitinligasen Fbw7, HectH9 bzw. Fbw8. Darüber hinaus konnte eine essentielle Rolle der PI3K-ähnlichen Kinasen ATM, ATR, DNA-PK und mTOR sowie ERK, JNK und p38 in diesem UV-induzierten Abbauprozess ausgeschlossen werden. Daher wurde vorgeschlagen, dass die Degradation von c-Myc einen Teil der universellen Zellantwort auf DNA-Schäden darstellt, der einen Replikationsarrest ermöglicht.

Ein allgemein gültiger Mechanismus einer transkriptionellen Regulation wurde dagegen bisher nicht nachgewiesen. Lediglich eine langfristige Behandlung der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit DNA-schädigenden Agenzien wie dem Topoisomerase II-Inhibitor Teniposid (VM-26) führt zu einer verminderten *MYC*-Expression (Magnet et al., 2001).

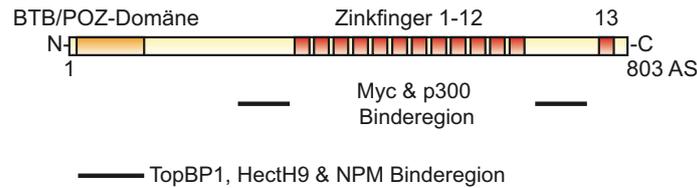
## 1.2 Der Transkriptionsfaktor Miz1

### 1.2.1 Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Miz1

Das Myc-interagierende Zinkfingerprotein 1, Miz1, ist ein Mitglied der Familie der POZ/BTB (*pox virus and zinc finger/bric á brac, tramtrack and broad complex*)-ZF (Zinkfinger)-Transkriptionsfaktoren, das in einem Yeast-two-hybrid-Screen als Interaktionspartner der bHLH/LZ-Domäne des Transkriptionsfaktors c-Myc identifiziert wurde (Peukert et al., 1997). Zeitnah zu dem humanen Miz1-Protein, das 803 Aminosäuren umfasst, wurde die murine Miz1 cDNA bzw. das entsprechende Protein beschrieben, das aus 794 Aminosäuren besteht und eine Sequenzhomologie von 92% im Vergleich zu humanem Miz1 aufweist (Schulz et al., 1995). Bezüglich der pathophysiologischen Relevanz wurde Miz1, im Gegensatz zu dessen Interaktionspartner Myc bzw. N-Myc, als prognostisch günstiger Faktor identifiziert (Ikegaki et al., 2007). Bei Auftreten eines Neuroblastoms, einem malignen Tumor, der aus sympathischen, neuronalen Vorläuferzellen der Neurallleiste hervorgeht, korrelierte die hohe Expression von *MIZ1* mit einem günstigen Krankheitsverlauf.

Die in Miz1 aminoterminal lokalisierte POZ-Domäne wurde erstmals 1994 von Bardwell und Treisman als konservierte Domäne in etwa 40 verschiedenen Zinkfingerproteinen sowie in Proteinen von Pockenviren beschrieben. Während diese hydrophobe Domäne in der Regel etwa 120 Aminosäuren umfasst, liegt sie in Miz1 um 10 Reste verkürzt vor und vermittelt über eine  $\alpha$ -Helix die Homo- und Heterodimerisierung mit weiteren Mitgliedern der POZ/BTB-Familie wie beispielsweise ZBTB4 (Bardwell und Treisman, 1994; Dhordain et al., 1995; Weber et al., 2008). Zudem wurde in weiteren Studien durch die Assoziation zweier Miz1-POZ-Dimere die Tetramerisierung der Miz1-POZ-Domäne beschrieben, die auf der Interaktion von  $\beta$ -Faltblättern basiert (Stead et al., 2007).

Im carboxyterminalen Bereich von Miz1 sind 13 Zinkfinger des Typs Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> lokalisiert, die in einem Cluster aus 12 Zinkfingern, einer  $\alpha$ -helikalen Pufferregion aus 80 Aminosäuren sowie einem isoliert vorliegenden Zinkfinger organisiert sind (Peukert et al., 1997) (Abb. 3). Neben den Zinkfingern, welche die DNA-Bindung vermitteln, ist die 80 Aminosäuren umfassende Sequenz zwischen den Zinkfingern 12 und 13 ebenfalls von funktioneller Bedeutung, da diese zusammen mit einer weiteren Region aminoterminal der Zinkfinger die Interaktion mit c-Myc sowie p300 vermittelt.



**Abb. 3: Schematische Darstellung von humanem Miz1 (*Myc interacting zincfinger protein 1*).** Das humane Miz1-Protein umfasst 803 Aminosäuren (AS) und besteht aus der aminoterminalen BTB/POZ-Domäne (orange) sowie 13 Zinkfingern des Typs Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> (rot). Die schwarzen Querstriche repräsentieren die Bereiche der Myc- bzw. p300- sowie TopBP1, HectH9 bzw. NPM-Interaktion.

## 1.2.2 Regulation der Transkription durch Miz1

Im humanen Genom beträgt die Gesamtzahl der Miz1-Bindestellen etwa 8.400 (Jean-François Naud, persönliche Mitteilung). Die DNA-Bindung durch den Transkriptionsfaktor Miz1 erfolgt unter Verwendung verschiedener Kombinationen der Zinkfinger in unmittelbarer Nähe zur Transkriptionsstartstelle von RNA Polymerase II-abhängigen Zielgenen, wie *CDKN2B* oder *CDKN1A* (Seoane et al., 2002; Seoane et al., 2001; Smale und Baltimore, 1989). In Folge der DNA-Bindung von Miz1 im Promotorbereich seiner Zielgene erfolgt die Rekrutierung von Kofaktoren wie der Histonacetyltransferase p300 (Staller et al., 2001) und Nukleophosmin (NPM; alternativ als B23, Numatrin oder NO38 bezeichnet) (Wanzel et al., 2008) und dadurch die Aktivierung der Transkription.

Modifiziert werden die Aktivität von Miz1 und damit die Expression der Miz1-abhängigen Zielgene durch die Assoziation mit verschiedenen Interaktionspartnern. Dies soll in den folgenden Abschnitten an einigen Beispielen erläutert werden.

### 1.2.2.1 Regulation der transkriptionellen Aktivität von Miz1 durch L23 und Nukleophosmin

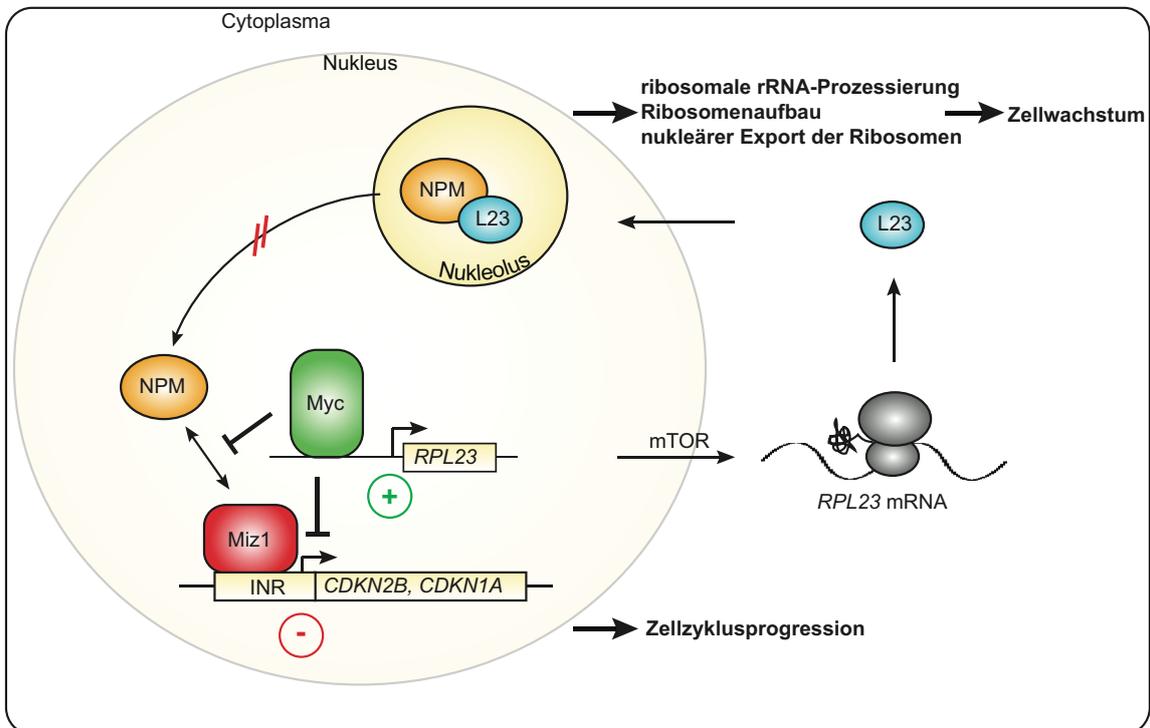
Im Jahr 2008 wurde das ribosomale Protein L23 als negativer Regulator von Miz1 beschrieben (Wanzel et al., 2008). Der zugrundeliegende Mechanismus ist indirekt und basiert auf der Rekrutierung von Nukleophosmin (NPM), einem essentiellen Koaktivator von Miz1, durch L23 aus dem Nukleoplasma in die Nukleoli. Es handelt sich bei dem Protein NPM um eine hochkonservierte nukleoläre Endoribonuklease, die für die Reifung der 47S rRNA zur 18S, 28S und 5,8S rRNA sowie den nukleären Export ribosomaler Untereinheiten notwendig ist und somit einen kritischen Regulator der Ribosomenbiogenese darstellt (Maggi et al., 2008; Savkur und Olson, 1998). Des Weiteren weist Nukleophosmin Chaperon-Aktivität auf und verhindert

die Aggregation und Denaturierung von Arf und p53 (Colombo et al., 2005; Colombo et al., 2002; Hingorani et al., 2000; Szebeni und Olson, 1999). Da NPM zudem in der Lage ist, zwischen Nukleoli und Cytoplasma zu pendeln, ist dieses hoch konservierte Phosphoprotein an zahlreichen Prozessen wie beispielsweise dem Transport ribosomaler Vorläuferpartikel, der Stressantwort bei Stimuli wie UV-Strahlung und Hypoxia, der Aufrechterhaltung der Genomstabilität oder der Regulation der Transkription beteiligt (Borer et al., 1989; Yun et al., 2003).

Die räumliche Trennung von NPM und Miz1 aufgrund der NPM/L23-Interaktion in den Nukleoli unterbindet die Assoziation von Nucleophosmin mit der POZ-Domäne von Miz1 und somit die Transaktivierung Miz1-abhängiger Zielgene, wie die der Zellzyklusinhibitoren p15Ink4b und p21Cip1 (Wanzel et al., 2008). Aufgrund der fehlenden Repression von Cyclin/Cdk-Komplexen durch diese Miz1-Zielproteine verhindern erhöhte Mengen von L23 auf diese Weise einen Miz1-abhängigen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus in ungestressten Zellen. Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Expression einer mutanten Form von NPM beobachtet werden, die als NPMc bezeichnet wird und in 35% aller akuten myeloischen Leukämien (AML) auftritt. NPMc weist in seinem carboxyterminalen Bereich ein nukleäres Exportsignal auf, weshalb dieses Protein ausschließlich im Cytosol lokalisiert ist und nicht als transkriptioneller Aktivator von Miz1 agiert (Mariano et al., 2006; Wanzel et al., 2008). Zudem führt die Interaktion dieser mutanten Form von NPM mit Miz1 zu einer Relokalisierung des Transkriptionsfaktors in das Cytosol, wodurch ein transkriptionell inaktiver Komplex entsteht, der keinen Zellzyklusarrest bewirkt.

Aufgrund der transkriptionellen Aktivierung von *L23* durch das c-Myc/Max-Heterodimer ist ein weiterer Interaktionspartner von Miz1 an diesem regulatorischen Netzwerk beteiligt (Kim et al., 2000). Die Translation der *RPL23*-mRNA steht wiederum unter der Kontrolle des mTOR-Signalwegs, der sowohl Zellwachstum als auch Metabolismus reguliert und bei ausreichender Nährstoffversorgung aktiv ist (Wullschleger et al., 2006). Dies lässt schließen, dass erhöhte Mengen von c-Myc durch die verstärkte *L23*-vermittelte Relokalisierung von NPM in die Nukleoli indirekt zu einer verminderten Expression der Miz1-abhängigen Zielgene *CDKN2B* und *CDKN1A* und damit verbunden einer Derepression Cyclin-abhängiger Kinasen führen. Zusätzlich zu dieser indirekten Inhibition der Miz1-Funktion reguliert c-Myc die Zellzyklusprogression durch die direkte Bindung von Miz1, welche die Rekrutierung des Koaktivators NPM antagonisiert (siehe Abschnitt 1.2.2.2). Da somit der Miz1-abhängige Zellzyklusarrest durch Faktoren reguliert wird, welche die Ribosomenbiogenese und das

Zellwachstum kontrollieren, könnte der c-Myc/Miz1-Komplex ein regulatorisches Bindeglied zwischen Zellzyklusprogression und Zellwachstum darstellen (Abb. 4).



**Abb. 4: Mögliche Verbindung von Zellzyklusprogression und Zellwachstum durch das c-Myc/Miz1-Netzwerk.**

Dargestellt ist die Regulation der transkriptionellen Aktivität von Miz1 durch c-Myc und NPM. Da die Lokalisation des Miz1-Koaktivators NPM durch das c-Myc/mTOR-Zielprotein L23 reguliert wird, stellt der c-Myc/Miz1-Komplex eine potentiell wichtige Schnittstelle der Regulation von Zellwachstum und Zellzyklusprogression dar.

### 1.2.2.2 c-Myc als Repressor der Miz1-abhängigen Genexpression

Die Repression der Miz1-abhängigen Genexpression durch c-Myc beruht auf der direkten Interaktion beider Proteine, die durch die HLH-Domäne von Myc mit den flankierenden Bereichen der benachbarten zwölf Zinkfinger von Miz1 vermittelt wird (siehe Abb. 3) (Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001). Eine Punktmutation in der HLH-Region von c-Myc, MycV394D, führt daher nicht nur zu einem Verlust der c-Myc/Miz1-Wechselwirkung, sondern zudem zu einer Aufhebung der Miz1-Repression durch c-Myc (Herold et al., 2002). Wie auch die Aktivierung der Transkription durch c-Myc erfolgt die transkriptionelle Repression von Miz1 in einem Komplex mit Max und ist von der Myc-Box II abhängig (Staller et al., 2001). ChIP-PET-Sequenz-Analysen zeigten, dass im humanen Genom etwa 7.800 gemeinsame Bindestellen von c-Myc und Miz1 vorliegen, die jedoch nur teilweise von c-Myc reprimiert werden (Susanne Walz, persönliche Mitteilung). Unklar ist weiterhin, ob Miz1 die DNA-

Bindung von Myc vermittelt. Aktuelle Studien legen nahe, dass das Myc/Max-Heterodimer unabhängig von Miz1 an E-Boxelemente (CANNTG) in den Promotorbereichen von Zielgenen wie *CDKN2B* bindet und daraufhin mit Miz1 interagiert (Susanne Walz und Jean-François Naud, persönliche Mitteilung). Die Assoziation von Miz1 mit dem Myc/Max-Heterodimer würde dementsprechend die Bindung von Koaktivatoren wie p300 und Nukleophosmin blockieren, wodurch die transkriptionelle Aktivität von Miz1 deutlich vermindert ist (Abb. 2B) (Wanzel et al., 2008). Außerdem rekrutiert Myc die DNA-Methyltransferase Dnmt3a und begünstigt damit die Cytosin-Methylierung der DNA, was beispielsweise zur Repression der *CDKN1A* Expression führt (Brenner et al., 2005). Weitere Studien zeigten zudem, dass Myc mittels der Myc-Box III Histondeacetylasen wie HDAC3 bindet, die eine verminderte Acetylierung des Histons H4 und somit die Repression einzelner Gene bewirken können (Kurland und Tansey, 2008).

Obwohl die Assoziation von Miz1 und c-Myc die Grundlage dieser Repression darstellt, erfordert die Inhibition von Miz1 zudem die Integrität der aminoterminalen POZ-Domäne. Anhand einer Deletionsmutante von Miz1, Miz1 $\Delta$ POZ, konnte festgestellt werden, dass diese Domäne die Relokalisierung von Miz1 durch c-Myc in subnukleäre Strukturen vermittelt, deren Auftreten mit der Repression der Miz1-Aktivität korreliert (Peukert et al., 1997).

Neben der c-Myc-abhängigen Repression vermittelt Miz1 zudem die Repression von Zielgenen wie *CDKN1A* und *BCL2* durch die Rekrutierung von BCL6 (Phan et al., 2005; Saito et al., 2009), ZBTB4 (Weber et al., 2008) oder Gfi-1 (Liu et al., 2010). Wie auch im Fall der Repression durch c-Myc diskutiert wurde, ist die Repression von Miz1 durch Gfi-1 (*growth factor independence 1*) unabhängig von dessen DNA-Bindungsaktivität. Darüber hinaus kooperieren c-Myc und Gfi-1 in der Miz1-vermittelten Repression von *CDKN1A* durch die Ausbildung eines ternären c-Myc/Gfi-1/Miz1-Komplexes.

### **1.2.2.3 TopBP1 als negativer Regulator der Miz1-Funktion**

In einem Yeast-two-hybrid-Screen wurde das evolutionär konservierte Protein TopBP1 (*topoisomerase II $\beta$  binding protein 1*) als weiterer Interaktionspartner von Miz1 isoliert. Die Assoziation von Miz1 und TopBP1 erfolgt über die POZ-Domäne von Miz1 mit der siebten und achten BRCT-Domäne von TopBP1 (Herold et al., 2002). Diese Interaktion wird durch Akt reguliert, indem dieses TopBP1 phosphoryliert und dadurch die Oligomerisierung von TopBP1 und die darauf folgende Bindung von Miz1 ermöglicht (Liu et al., 2006). Obwohl TopBP1 kein „klassischer“ transkriptioneller Repressor ist, sondern während der DNA-Replikation für die

Rekrutierung von Cdc45 an Replikationsstartstellen notwendig ist (Van Hatten et al., 2002), blockiert die Miz1/TopBP1-Interaktion die Aktivität von Miz1 als Transkriptionsfaktor. Das Auftreten von DNA-Schäden führt zur Dissoziation des Miz1/TopBP1-Komplexes, was zum Einen die Rekrutierung von TopBP1 durch Rad9 zu geschädigter DNA, zum Anderen die Bindung von Miz1 an die Promotorregion von *CDKN1A* und die Aktivierung der *CDKN1A* Expression ermöglicht (Herold et al., 2008; Herold et al., 2002). Dementsprechend bewirkt auch die Depletion von TopBP1 eine p53-unabhängige Induktion der *CDKN1A* Expression und die Inhibition des CyclinE/Cdk2-Komplexes (Jeon et al., 2007).

Da ein Teil der hier vorliegenden Arbeit auf der Rolle von TopBP1, Miz1 und c-Myc während der UV-induzierten DNA-Schadensantwort basiert, wird diese Signalkaskade in einem separaten Abschnitt erläutert (siehe Abschnitt 1.2.4).

### **1.2.3 Transkriptions-unabhängige Funktionen von Miz1**

Obwohl Miz1 ursprünglich als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde, konnten in weiteren Studien Transkriptions-unabhängige Funktionen von Miz1 identifiziert werden, die im Folgenden eingehend beschrieben werden.

#### **1.2.3.1 Hemmung der HectH9-vermittelten Ubiquitinierung von c-Myc**

HectH9 (alternativ als Arf-BP1, Mule bzw. Lasu bezeichnet) stellt eine 500 kDa große E3-Ubiquitin-Ligase mit einer carboxyterminalen, konservierten HECT-Domäne (*homologous to E6-AP carboxy-terminus*), einer UBA-Domäne (*ubiquitin-associated domain*) und einem Kernlokalisierungssignal dar (Buchberger, 2002; Chen et al., 2005; Hicke und Dunn, 2003; Huijbrechtse et al., 1995). Wie schon für TopBP1 erläutert, wurde auch HectH9 in einem Yeast-two-hybrid-Screen als Protein identifiziert, das mit der POZ-Domäne von Miz1 wechselwirkt, jedoch nicht dessen Ubiquitinierung bewirkt (Adhikary et al., 2005). HectH9 katalysiert jedoch die K63-verknüpfte Polyubiquitinierung des Miz1-Interaktionspartners c-Myc. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Substraten von HectH9 wie dem Tumorsuppressor p53 (Chen et al., 2005), dem Replikationsprotein Cdc6 (Hall et al., 2007) und dem mitochondriellen Protein Mcl1 (Zhong et al., 2005), deren Ubiquitinierung die Proteasom-vermittelte Degradation induziert, steigert die Ubiquitinierung von c-Myc durch HectH9 dessen transkriptionelle Aktivität (Adhikary et al., 2005). Dies beruht zumindest teilweise auf einer verstärkten Rekrutierung des Koaktivators p300 durch c-Myc, das durch K63-verknüpfte Ubiquitinketten

modifiziert ist, und resultiert in der erhöhten Expression einiger Myc-Zielgene. Die Relevanz dieses Regulationsmechanismus wird durch die selektive Notwendigkeit von HectH9 für das Wachstum einiger Tumorzelllinien im Vergleich zu primären Zellen, sowie durch die erhöhte Expression von *HECTH9* in primären, humanen Tumoren unterstrichen (Adhikary und Eilers, 2005). Miz1 antagonisiert die Bindung von c-Myc durch HectH9, indem es selbst mit HectH9 interagiert und verhindert dadurch die aktivierende Ubiquitinierung von c-Myc. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für den Tumorsuppressor Arf beschrieben, der HectH9 bindet und dadurch dessen katalytische Aktivität und den Abbau von p53 blockiert (Chen et al., 2005). Da Miz1 bisher lediglich als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde, stellt die Regulation der c-Myc-Modifikation durch die Assoziation mit HectH9 das erste Beispiel einer nicht-transkriptionellen Funktion von Miz1 dar.

Für N-Myc wurde im Gegensatz zu c-Myc eine destabilisierende Funktion von HectH9 während der neuronalen Differenzierung und Proliferation beschrieben (Zhao et al., 2009; Zhao et al., 2008). Damit könnte HectH9 in neuronalen Zellen ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Neurogenese gewährleisten, das in malignen Gehirntumoren gestört ist.

### **1.2.3.2 Inhibition des TNF- $\alpha$ /JNK1-Signalweges durch Miz1**

In aktuellen Studien wurde Miz1 als Signal- und Regulationsweg-spezifischer Modulator oder Regulator (*signal- and pathway-specific modulator or regulator*; SMOR) identifiziert, der spezifisch die TNF- $\alpha$ -induzierte JNK1-Aktivierung und Apoptose reprimiert (Liu et al., 2009). Diese nicht-transkriptionelle, cytoplasmatische Funktion von Miz1 beruht auf der Interaktion mit der Kinase JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase*), die dadurch nicht durch TNF $\alpha$  aktiviert werden kann. Gleichzeitig hemmt Miz1 die TNF- $\alpha$ -induzierte Polyubiquitinierung von TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*), einem Mediator der JNK1-Aktivierung, und blockiert damit über einen zweiten Mechanismus die Aktivierung von JNK1. Da Miz1 jedoch einer proteasomalen Degradation unterliegt, die durch TNF- $\alpha$  stimuliert wird, werden beide Repressionsmechanismen durch TNF- $\alpha$  aufgehoben. Ein Verlust der *MIZ1*-Expression führt daher spezifisch zur Aktivierung der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose durch JNK1, während die JNK1-Aktivierung durch IL-1 $\beta$  oder UV-Strahlung sowie die Aktivierung von p38, ERK und IKK durch TNF- $\alpha$  unbeeinflusst bleibt.

## 1.2.4 Biologische und physiologische Relevanz der Genregulation durch den Transkriptionsfaktor Miz1

### 1.2.4.1 Beschreibung der Funktion von Miz1 anhand von Mausmodellen

*Miz1* wird von der frühen Embryonalentwicklung bis zur Organentwicklung ubiquitär exprimiert, wobei in neuronalen und epidermalen Geweben wie beispielsweise in den Epithelien des Gastrointestinaltrakts eine erhöhte Expression detektiert wurde (Adhikary et al., 2003). Durch den Knockout von *Miz1* in einem konstitutiven Mausmodell konnte gezeigt werden, dass *Miz1* eine essentielle Rolle während der Gastrulation in der frühen Embryonalentwicklung spielt. Darüber hinaus konnte trotz der deutlich reduzierten Expression des *Miz1*-Zielgens und Zellzyklusinhibitors *p57Kip2* in diesem System eine verminderte Proliferationsrate und eine erhöhte Apoptoserate in ektodermalen Zellen beobachtet werden, was zur Lethalität der Embryonen etwa am Tag 7,5 der Entwicklung führt (Adhikary et al., 2003). Im heterozygoten Zustand konnte dagegen kein Phänotyp beobachtet werden.

Die homozygote, konditionelle Deletion der POZ-Domäne von *Miz1* in Keratinozyten resultiert in einer veränderten Haarfollikelstruktur und Haarmorphogenese (Gebhardt et al., 2007). Dies äußert sich durch eine starke Variation in der Länge und Orientierung der Haarfollikel sowie auf molekularer Ebene durch eine anormale Expression epidermaler Marker wie Keratin 14, Keratin 1 und Filaggrin. Des Weiteren wurde ein verspäteter Eintritt und eine verzögerte Progression in einer Phase des Haarzyklus beschrieben, die als Catagen bezeichnet wird (Gebhardt et al., 2007). Dies führte zu einem verspäteten Austritt aus dem Haarzyklus und einer verminderten Differenzierung, was den Phänotyp von TGF $\beta$ -Knockout-Mäusen widerspiegelt (Foitzik et al., 2000). Ein weiterer Hinweis einer Interferenz der Deletion der POZ-Domäne von *Miz1* mit der TGF $\beta$ -abhängigen Signalkaskade war die verminderte Expression des proapoptischen Proteins Clusterin, einem gemeinsamen Zielgen von *Miz1* und TGF $\beta$ . Im Catagen werden epidermale Zellen der Haarfollikel durch Apoptose eliminiert, was zu einer Regression des Haarfollikels führt. Diese Verkürzung trat durch die Deletion der POZ-Domäne von *Miz1* jedoch stark verspätet ein. Dieser verzögerte Austritt aus dem Haarzyklus und die reduzierte Differenzierung könnte daher durch die verminderte Expression von Clusterin verstärkt werden.

Darüber hinaus konnte durch die B-Zell-spezifische Deletion der POZ-Domäne von *Miz1* mit Hilfe der Vav-Cre-Rekombinase dieses als Regulator des IL7-Signalwegs identifiziert werden (Christian Kosan, persönliche Mitteilung). Aufgrund dieser neu entdeckten Funktion ist die Bildung von bestimmten („committed“) B-Zellen spezifisch im Knochenmark von *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup>

Mäusen am Übergang des Prä-Pro-B- zu dem Pro-Stadium blockiert, weshalb diese Vorläuferzellen Apoptose unterlaufen. Diese essentielle Rolle von Miz1 während den frühen Schritten der B-Zellentwicklung konnte auf die transkriptionelle Aktivierung des anti-apoptotischen Proteins Bcl2 sowie die Repression von *Socs1* und *Socs3* zurückgeführt werden, die an der Regulation der IL7-Signalkaskade beteiligt sind und daher für die Bestimmung und Differenzierung von B-Zellen notwendig sind.

### 1.2.4.2 Interferenz mit dem TGF $\beta$ -Signalweg

Aufgrund der Regulation der Proliferation und Differenzierung durch den transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ ) wird der Sensibilitätsverlust der Zelle gegenüber diesem antiproliferativen Stimulus als wichtiger Schritt in der Tumorentstehung angesehen (Hanahan und Weinberg, 2000). Als TGF $\beta$ -Zielgene, die durch c-Myc reprimiert werden und deren verminderte Expression zu der Insensibilität gegenüber TGF $\beta$  beitragen, wurden die der Cdk-Inhibitoren *CDKN2B* (Seoane et al., 2001; Staller et al., 2001), *CDKN1A* (Claassen und Hann, 2000; Herold et al., 2002) und *CDKN1B* (Yang et al., 2001) beschrieben.

TGF $\beta$  induziert die Expression des Zellzyklusinhibitors *CDKN2B* durch die Aktivierung der Smad-Proteine und deren darauf folgende Anlagerung an eine sogenannte Smad-Binderegion im Promotorbereich dieses Gens. Dies ermöglicht die Interaktion von DNA-gebundenem Miz1 mit Smad3/4 und damit die Transaktivierung des *CDKN2B* Promotors (Seoane et al., 2001; Staller et al., 2001). Myc reprimiert dagegen diesen TGF $\beta$ -induzierten Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Am Beispiel des *CDKN2B* Promotors wurden zwei verschiedene Mechanismen beschrieben, die dieser Regulation zugrundeliegen. Zum Einen bindet Myc über dessen zentrale Region aktiviertes Smad2/3 und bildet anschließend zusammen mit Sp1 einen repressiven Sp1/Smad/Myc-Komplex, der die Transkription von *CDKN2B* blockiert (Feng et al., 2002). Außerdem verhindert, wie in Abschnitt 1.1.2.2 beschrieben, das Myc/Max-Heterodimer durch die Bindung von Miz1 die Rekrutierung essentieller Koaktivatoren wie p300 und NPM und verhindert damit ebenfalls die Transaktivierung des *CDKN2B* Promotors.

Bei Vorliegen antimitogener Stimuli in Form erhöhter Mengen von TGF $\beta$  wird dieser Repressionsmechanismus jedoch ausgeschaltet, da die Expression von *MYC* durch TGF $\beta$  reguliert wird. Dabei bindet TGF $\beta$  über ein *TGF $\beta$  responsive element* an den Promotorbereich von *MYC* und reprimiert damit dessen Expression (Chen et al., 2002; Gomis et al., 2006).

In einer weiteren Studie von Gebhardt et al. (2006) konnte die Verbindung zwischen dem TGF $\beta$ -Signalweg und Miz1 bestätigt werden. Miz1, das in den Basalschichten einiger Epithelien stark exprimiert wird, vermittelt auch in murinen, primären Keratinozyten die transkriptionelle Repression von *Cdkn2b* durch Myc trotz TGF $\beta$ -Stimulus. Außerdem ist Miz1 in suprabasalen Schichten der murinen Epidermis in Prozesse der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Adhäsion involviert (Coller et al., 2000; Gebhardt et al., 2006). Beispielsweise gehören die Integrine  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 4$  zu einer Gruppe direkter Zielgene von Miz1, die die Adhäsion von Keratinozyten an der Basalmembran vermitteln und somit eine vorzeitige terminale Differenzierung verhindern (Gebhardt et al., 2006; Watt, 2002). Die Überexpression von *MYC* in murinen Keratinozyten führt jedoch aufgrund der Interaktion mit Miz1 zu einer Repression dieser Integrine, was in der Reduktion der Zelladhäsion und schließlich in dem Verlust epidermaler Stammzellen der Haut resultiert (Frye et al., 2003).

### **1.2.4.3 Regulation der Myc-induzierten Apoptose durch den c-Myc/Miz1-Komplex**

Neben der zentralen Rolle in Wachstum und Proliferation ist das Onkoprotein c-Myc zudem in der Lage, Apoptose auszulösen, was einen Schutzmechanismus der Zelle vor onkogener Transformation darstellt (Askew et al., 1991; Evan et al., 1992; Murphy et al., 2008; Pelengaris et al., 2002). Die grundlegenden Schritte der Myc-induzierten Apoptose sind die transkriptionelle Induktion der pro-apoptotischen Proteine Bax (Mitchell et al., 2000) und Bim (Egle et al., 2004), sowie die Repression der anti-apoptotischen Proteine Bcl2 und Bcl-X<sub>L</sub> (Eischen et al., 2001a; Eischen et al., 2001b). Darüber hinaus führen erhöhte Mengen von c-Myc zu der verstärkten Expression des Tumorsuppressors Arf und der damit verbundenen Stabilisierung von p53 (Zindy et al., 1998). p53 stellt bei Vorliegen von DNA-Schäden den zentralen Regulator der Zellantwort dar (siehe folgender Abschnitt). Entsprechend dem Grad der aufgetretenen Schäden leitet p53 einen reversiblen Zellzyklusarrest mit DNA-Reparatur oder Apoptose ein (Abb. 5). Es wurde vorgeschlagen, dass durch die Miz1-abhängige, transkriptionelle Repression des Zellzyklusinhibitors p21Cip1, dem zentralen Mediator des p53-induzierten G1-Arrests, erhöhte Mengen von c-Myc das Gleichgewicht von Zellzyklusarrest zu Apoptose verschieben, da pro-apoptotische p53-Zielgene wie beispielsweise *PUMA* von diesem Regulationsmechanismus nicht betroffen sind (Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002). Des Weiteren wurde in MEFs eine p53-unabhängige Induktion der Apoptose durch c-Myc beschrieben, die auf der Interaktion von Arf und c-Myc und damit der Repression der Myc-abhängigen Transaktivierung beruht (Qi et al., 2004).

In weiteren Studien von Patel und McMahon wurde außerdem *BCL2* als anti-apoptotisches Zielgen von Miz1 identifiziert, dessen Repression durch den Miz1/c-Myc-Komplex essentiell für die Myc-induzierte Apoptose ist (Patel und McMahon, 2006, 2007). Dies bestätigt eine Vielzahl früherer Beobachtungen basierend auf humanen Tumorproben sowie diversen Mausmodellen, die die Kooperation erhöhter *BCL2*- und *MYC*-Expression während der Tumorgenese belegen (Eischen et al., 2001b; Knezevich et al., 2005; Letai et al., 2004; Martin-Subero et al., 2005).

#### **1.2.4.4 Die Rolle von Miz1 in der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort**

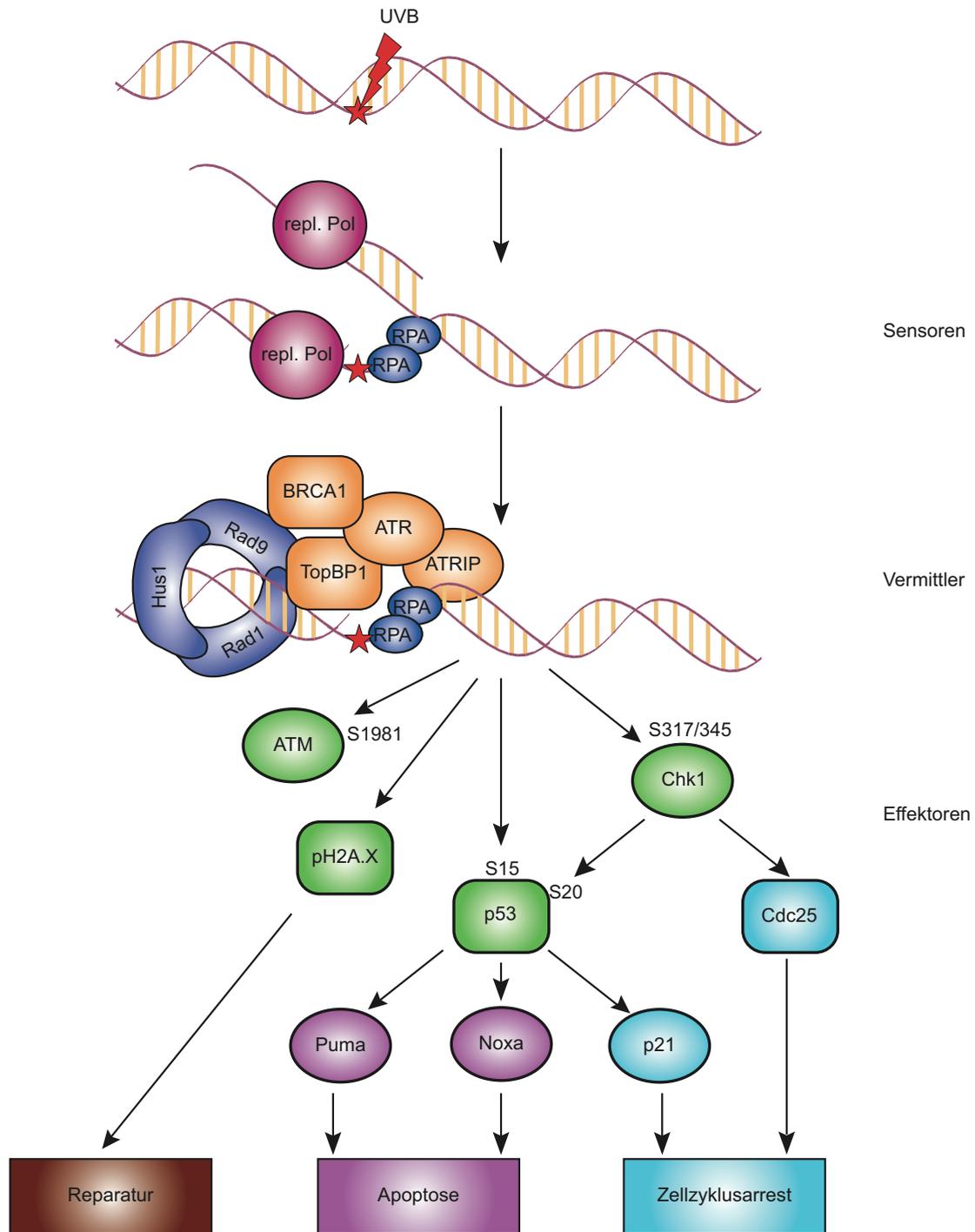
Da die Zellen des Menschen täglich metabolischen Prozessen und verschiedenen Umwelteinflüssen wie beispielsweise UV-Strahlung ausgesetzt sind, die DNA-Schäden verursachen können, sind während des Zellzyklus Kontrollpunkte und Reparaturmechanismen notwendig, um die Vererbung intakter DNA an die Folgegeneration zu gewährleisten.

Die Absorption von UVB-Strahlung durch die DNA führt beispielsweise zu Einzelstrangbrüchen oder zu der Bildung von Pyrimidindimeren, von denen mehr als 60% aus der kovalenten Verknüpfung zweier benachbarter Thymidinbasen entstehen. Daraus resultiert die Arretierung der Replikationsgabel an der modifizierten Stelle, da diese nicht als Matrize zur DNA-Synthese erkannt wird. Der erste Schritt zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort besteht nun in der Anlagerung von RPA (*replication protein A*) an die einzelsträngige DNA sowie des Rad17-Komplexes bestehend aus Rad17 und vier Replikationsfaktor C-Untereinheiten (Rfc2-5) (Fanning et al., 2006; Griffith et al., 2002; Shiomi et al., 2002). Darauf folgt die Rad17-vermittelte Rekrutierung des heterotrimeren 9-1-1 (Rad9, Rad1, Hus1)-Komplexes, der eine Ringstruktur um die DNA bildet (Parrilla-Castellar et al., 2004). Zusätzlich zu diesen Sensormolekülen, die der Erkennung von DNA-Schäden dienen, werden im Anschluss Vermittler der DNA-Schadensantwort wie beispielsweise ATR, TopBP1 und BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*) angelagert, deren BRCT-Domänen als Protein-Phosphoprotein-Interaktionsmodul dienen (Manke et al., 2003; Yu et al., 2003). Im Fall von TopBP1 beruht die Rekrutierung zu Stellen geschädigter DNA auf der Interaktion mit dem carboxyterminalen Teil von Rad9, der an Ser387 phosphoryliert wird und somit eine Bindestelle für die erste und zweite BRCT-Domäne von TopBP1 aufweist (Delacroix et al., 2007; St Onge et al., 2003). Parallel dazu wird ATR aufgrund der Assoziation seines Interaktionspartners ATRIP (*ATR-interacting protein*) mit RPA bzw. direkt mit der einzelsträngigen DNA in direkte Nachbarschaft von TopBP1 gebracht (Ball et al., 2007; Unsal-Kacmaz und Sancar, 2004). Dies

ermöglicht die Stimulation der ATR-Aktivität durch die Wechselwirkung des ATR/ATRIP-Komplexes mit der ATR-Aktivierungsdomäne von TopBP1, die zwischen der sechsten und siebten BRCT-Domäne lokalisiert ist (Delacroix et al., 2007; Kumagai et al., 2006). Aktives ATR leitet das Signal an Effektoren der DNA-Schadensantwort weiter, indem es beispielsweise Ser317/345 der Kontrollpunktkinase Chk1 phosphoryliert (Kumagai und Dunphy, 2000; Liu et al., 2000; Lopez-Girona et al., 2001; Walworth und Bernards, 1996). Phosphoryliertes Chk1 wird vom Chromatin freigesetzt, um die Phosphatasen CDC25A-C durch Phosphorylierung zu inaktivieren, was den Eintritt in die Mitose verhindert (Boutros et al., 2006; Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Smits et al., 2006).

Weitere Substrate von ATR sind Effektoren, die an der DNA-Reparatur, der Transkriptionsregulation, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose beteiligt sind, wie die Histonvariante H2A.X und p53.

Die Phosphorylierung von p53, beispielsweise an Ser15 und Ser20, blockiert die Interaktion mit Mdm2 und führt somit zu einer Stabilisierung von p53 (Kruse und Gu, 2009; Shieh et al., 1997; Zhou und Bartek, 2004). Zahlreiche zusätzliche Modifikationen wie die Phosphorylierung weiterer Aminosäuren, Acetylierung, SUMOylierung und Neddylierung sowie diverse Interaktionspartner regulieren im Folgenden die Induktion von pro- als auch anti-apoptischen Zielgenen von p53. Zudem wird die Expression der p53-abhängigen Zielgene durch dessen Menge und Affinität zu den entsprechenden Promotoren reguliert. Während p53 trotz geringer Mengen mit hoher Affinität an den Promotor des anti-apoptischen Zellzyklusregulators p21Cip1 bindet und diesen aktiviert, assoziiert p53 mit den Promotoren der pro-apoptischen Zielgene lediglich bei hohen Konzentrationen (Vousden, 2000). Darüber hinaus ist der Promotor von *CDKN1A* auch in ungestressten Zellen durch einen arretierten Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase II besetzt, der in einen aktiven Zustand übergeht, sobald die Mengen von phosphoryliertem p53(Ser15), acetylierter Histone und TAFII250 im Promotorbereich ansteigen. Dies ermöglicht nach Auftreten von DNA-Schäden eine schnelle Reaktion zur Arretierung des Zellzyklus aufgrund der Expression anti-apoptischer Zielgene, während die Transkriptionsmaschinerie an pro-apoptischen Zielgenen neu aufgebaut werden muss und diese daher zeitlich verzögert exprimiert werden (Espinosa et al., 2003).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort.**

UVB-induzierte DNA-Schäden führen nach der Arretierung der Replikationsgabel zur Anlagerung von Sensormolekülen (RPA) und der darauf folgenden Rekrutierung von Vermittlerproteinen wie dem 9-1-1-Komplex, BRCA1, ATRIP, ATR und TopBP1. Auf die Aktivierung von ATR folgt die Phosphorylierung von Effektoren wie beispielsweise Chk1, p53 und H2A.X. Dies führt, abhängig von dem Ausmaß der DNA-Schäden, zur Aktivierung verschiedener zellulärer Antworten wie einem Zellzyklusarrest und der Reparatur der Läsionen oder Apoptose. (repl. Pol, replikative Polymerase)

Das Auslösen der p53-abhängigen Apoptose beinhaltet sowohl transkriptionelle als auch nicht-transkriptionelle Mechanismen. Zum Einen erhöht p53 die Expression von pro-apoptotischen Zielgenen wie *BAX* (*Bcl2 associated protein x*), *PUMA* (*p53 upregulated modifier of apoptosis*) und *NOXA* (lateinisch: Schaden) (Roos und Kaina, 2006). Dagegen beinhaltet die transkriptions-unabhängige Induktion der Apoptose die Bindung von p53 an anti-apoptotische Bcl2-Proteine wie Bcl-X<sub>L</sub> am Mitochondrium. Dies führt zur Freisetzung und Aktivierung des durch Bcl-X<sub>L</sub> gebundenen, pro-apoptotischen Bcl2-Proteins Bax (Chipuk et al., 2004). Darüber hinaus interagiert p53 nach Auftreten von DNA-Schäden an der mitochondriellen Membran mit Bak. Dadurch wird die inhibitorische Bindung von Bak an das anti-apoptotische Protein Mcl1 antagonisiert und Bak aus dem inaktiven Bak/Mcl1-Komplex entlassen (Gelinis und White, 2005; Leu et al., 2004). Die Aktivierung von Bax und Bak beinhaltet eine Konformationsänderung dieser Proteine, deren Oligomerisierung und Insertion in die äußere Mitochondrienmembran (Korsmeyer et al., 2000). Dies führt im Folgenden zur Freisetzung von Cytochrom c sowie zur Aktivierung der Caspase-Kaskade (Schuler et al., 2000).

Während des p53-induzierten Zellzyklusarrests spielt dagegen p21Cip1, ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen in der G1-Phase des Zellzyklus, eine zentrale Rolle (el-Deiry et al., 1993). *P21CIP1* wurde ursprünglich als Zielgen von p53 beschrieben, welches dessen tumorsuppressive Funktion vermittelt. Deshalb wird p21Cip1 auch als Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*, CDKN1A) oder Wildtyp-p53-aktiviertes Fragment-1 (WAF1) bezeichnet (el-Deiry et al., 1993). p21Cip1 blockiert durch die Inhibition von Cyclin/Cdk-Komplexen, speziell des CyclinE/Cdk2-Komplexes, den Übertritt von der G1- in die S-Phase (Sherr und Roberts, 1999). Dies basiert auf der Interaktion zweier amino- und carboxyterminaler Domänen von p21Cip1 mit der Cyclin-Untereinheit sowie eines separaten aminoterminalen Bereichs mit der Cdk-Untereinheit, was die Bindung von Substraten der Cyclin/Cdk-Komplexe unterbindet (Chen et al., 1996a; Chen et al., 1996b). Des Weiteren führt die Assoziation von p21Cip1 und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einem akkzesorischen Protein der DNA Polymerase  $\delta$ , zur Inhibition der DNA-Synthese (Boulaire et al., 2000; Chen et al., 1996a; Moldovan et al., 2007).

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 erläutert wurde, ist neben p53 der Transkriptionsfaktor Miz1 ebenfalls an der Aktivierung der Expression des Zellzyklusinhibitors p21Cip1 beteiligt. Erhöhte Mengen von Miz1 führen daher in etablierten Zelllinien durch die Inhibition des CyclinE/Cdk2-Komplexes zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Herold et al., 2002). Einen stärkeren Effekt konnte durch die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante von Miz1, Miz1S428A, beobachtet werden, da die DNA-Bindung dieser mutanten Form von Miz1 nicht

mehr der Regulation durch die Ser/Thr-Kinase Akt unterliegt. Wurden Miz1S428A-exprimierende Zellen einer UVB-Behandlung unterzogen, arretierten diese wie Kontrollzellen in der G1-Phase des Zellzyklus, traten jedoch aufgrund der erhöhten p21Cip1-Mengen deutlich verzögert wieder in den Zellzyklus ein (Herold et al., 2002; Herold et al., 2008). Darüber hinaus konnte ein p21Cip1-unabhängiger G2/M-Arrest beobachtet werden, der auf die Aktivierung der ATR-abhängigen Signaltransduktion zurückzuführen war. Belegt wurde dies durch den Nachweis erhöhter Mengen der phosphorylierten ATR-Zielproteine p53(Ser15) und Chk1(Ser345) (Herold et al., 2008).

Zudem weisen aktuelle Studien eine weitere, potentielle Funktion von Miz1 in der p53-abhängigen DNA-Schadensantwort auf. Miz1 hemmt nämlich durch die direkte Interaktion mit der DNA-Bindedomäne von p53 dessen transkriptionelle Aktivität *in vitro*, wobei die physiologische Relevanz dieses Prozesses bisher nicht belegt wurde (Miao et al., 2010).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit werden die unterschiedlichen Funktionen der Transkriptionsfaktoren Miz1 und dessen Interaktionspartner c-Myc in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden bzw. in der durch den Tumorsuppressor Arf induzierten, onkogenen Apoptose untersucht.

(1) Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass Miz1 in einem Komplex mit c-Myc die Expression seiner Zielgene wie beispielsweise *Cdkn1a* reguliert (Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002). Anhand eines Knockout-Mausmodells soll nun der Einfluss der POZ-Domäne des Transkriptionsfaktors Miz1, die als Transaktivierungsdomäne beschrieben wurde und deren Integrität zudem für die Repression durch c-Myc essentiell ist, auf die Aktivierung der *Cdkn1a*-Expression untersucht werden. Daher werden murine embryonale Fibroblasten eingesetzt, die eine konstitutive Deletion der POZ-Domäne von Miz1 aufweisen, und deren Wachstumsverhalten sowie die Funktionalität der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort analysiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Miz1 zusätzlich zu der Regulation der *Cdkn1a* Expression nicht-transkriptionelle Funktionen in der DNA-Schadensantwort ausübt, da die Aktivierung der ATR-abhängigen Signalkaskade durch Miz1 auf der post-transkriptionellen Stabilisierung von TopBP1 beruht. Deshalb wird zunächst diese transkriptionsunabhängige Rolle von Miz1 in verschiedenen Ansätzen untersucht. Anschließend soll eine Beteiligung von c-Myc an der Regulation dieser Stabilisierung von TopBP1 sowie der dabei zugrundeliegende Mechanismus analysiert werden.

(2) Sowohl anhand diverser Mausmodelle als auch durch die Analyse humaner Tumorproben wurde der Arf/p53-Signalweg als wichtige tumorsuppressive Barriere identifiziert (Sherr, 2006). Allerdings konnten deutliche Unterschiede in der Zellantwort auf onkogene Stimuli wie konstitutiv aktives Ras oder erhöhte Mengen von c-Myc beobachtet werden. Während onkogenes Ras in primären MEFs über die Raf/Mek/Erk-Signalkaskade den *INK4a/Arf*-Lokus aktiviert und dadurch einen irreversiblen Zellzyklusarrest auslöst, der als Onkogen-induzierte Seneszenz bezeichnet wird (Palmero et al., 1998; Serrano et al., 1997), lösen erhöhte Proteinmengen von c-Myc Apoptose aus (Evan et al., 1992). Darüber hinaus konnte im Gegensatz zu Ras eine direkte Interaktion von Arf und c-Myc nachgewiesen werden (Amente et al., 2006), die eine spezifische Wirkungsweise von Arf in dem Schutz vor der onkogenen Transformation durch c-Myc nahelegt. Da zudem das Arf-stabilisierende Protein Nukleophosmin als aktivierender Kofaktor von Miz1 identifiziert wurde, wird im zweiten Teil dieser Arbeit zunächst untersucht, ob Miz1 mit diesem tumorsuppressiven Netzwerk interferiert. Anschließend soll der Mechanismus, der zum Wechsel von Seneszenz zu Apoptose durch onkogenes c-Myc führt, aufgeklärt werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Stämme und Zelllinien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

- DH5 $\alpha$  *Escherichia coli* F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*; verwendet zur Herstellung und Amplifikation von Plasmiden
- BL21 *Escherichia coli* B, F<sup>-</sup>, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>+</sup>), gal [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>( $\lambda$ <sup>S</sup>); verwendet zur Expression von GST-Fusionsproteinen

#### 2.1.2 Säugerzelllinien

- HeLa humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC)
- Ls174T humane Kolonadenokarzinomzelllinie (ATCC)
- MEFs primäre Mausembryofibroblasten, entweder als Wildtyp-Form (wt bzw. *Miz1*<sup>+/+</sup>), mit einer hetero- bzw. homozygoten Deletion der POZ-Domäne von *Miz1* (*Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> bzw. *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup>) oder einer homozygoten Deletion bzw. Inaktivierung von *Npm* und *p53* (*Npm*<sup>-/-</sup>; *p53*<sup>-/-</sup>)
- P493-6 hergestellt durch stabile Transfektion der humanen B-Zelllinie EREB2-5 mit einem Konstrukt zur Tetracyclin-regulierbaren Expression von *MYC* (Pajic et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001; Schuhmacher et al., 1999)
- PHX humane Verpackungszelllinie (Phoenix-Eco) für MoMuLV-Retroviren, von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 abstammend (Kinsella und Nolan, 1996)
- U2OS humane Osteosarkomzelllinie (ATCC)

### 2.1.3 Transgener Mausstamm

Miz $\Delta$ POZ auf einem C57BL/6-Stammhintergrund; von Werner Lutz, Christian Kosan und Tarik Möröy hergestellt

## 2.2 Nukleinsäuren

### 2.2.1 Primer

Die verwendeten DNA-Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Die in Tabelle 1 aufgeführten Primer für quantitative RT-PCRs wurden zur Vermeidung der Amplifikation genomischer DNA Intron-Exon-übergreifend mit Hilfe der Universal ProbeLibrary (Roche) entworfen. Zum Sequenzieren von Plasmiden wurden Standardprimer für die entsprechenden Plasmide oder ein qRT-PCR Primer für das im Plasmid enthaltene Gen verwendet.

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer.**

Die Primer (fwd = forward Primer, rev = reverse Primer) wurden mit Angabe ihrer Verwendung (qRT-PCR = quantitative Reverse Transkriptase-PCR, gen-PCR = genomische PCR), der Spezies (H = *Homo sapiens*, M = *Mus musculus*) des amplifizierten Gens und der Sequenz dargestellt.

Bezeichnung	Verwendung	Spezies	Sequenz (5'→3')
<i>Miz1 loxP3 fwd</i>	gen-PCR	M	GTATTCTGCTGTGGGGCTATC
<i>Miz1 lox P3 rev</i>	gen-PCR	M	GGCTGTGCTGGGGGAAATC
<i>Miz1 neo</i>	gen-PCR	M	GGCAGTTACAGGCTCAGGTG
<i>Miz1 fwd</i>	qRT-PCR	M	CCCATGTACGCCAACACAC
<i>Miz1 rev</i>	qRT-PCR	M	GGCTGGACTGGACAAATCTC
<i>Miz1 wt fwd</i>	qRT-PCR	H, M	CGTGGTGCACCTAGACATCA
<i>Miz1 wt rev</i>	qRT-PCR	H, M	GTTCTCAGGGCTAAGGCTCA
<i>Miz1<math>\Delta</math>POZ fwd</i>	qRT-PCR	M	GCCTTTTGGAGATCTGAGGA
<i>Miz1<math>\Delta</math>POZ rev</i>	qRT-PCR	M	GCTCCTCCTTGAGTTCTCTGC
<i>p21Cip1 fwd</i>	qRT-PCR	M	TCCACAGCGATATCCAGACA
<i>p21Cip1 rev</i>	qRT-PCR	M	GGCACACTTTGCTCCTGTG

## 2.2.2 Oligonukleotide

### DNA-Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide (fwd = forward, rev = reverse) zur Klonierung der shRNA-Vektoren wurden mit Hilfe des „siRNA Design Center“ von Dharmacon und des Programms Sfold ausgewählt und von der Firma Metabion synthetisiert.

Kontroll-sh fwd	5' GATCCCCCATAAGCTGAGATACTTCATTCAAGA GATGAAGTATCTCAGCTTATGTTTTTGGAAA 3'
Kontroll-sh rev	5'-AGCTTTTCCAAAAACATAAGCTGAGATACTTCA TCTCTTGAATGAAGTATCTCAGCTTATGGGG-3'
<i>Miz1</i> -sh 1 fwd	5'-GATCCCCAGCCGAAGCCTTATCAGAGTTCAAGA GACTCTGATAAGGCTTCGGCTTTTTTGGAAA-3'
<i>Miz1</i> -sh 1 rev	5'-AGCTTTTCCAAAAAAGCCGAAGCCTTATCAGAG TCTCTTGAAGTCTGATAAGGCTTCGGCTGGGG-3'
<i>Miz1</i> -sh 2 fwd	5'-GATCCCCGTAAGTCAAAGCTGAGATCATTCAAGA GATGATCTCAGCTTTGAGTACTTTTTTGGAAA-3'
<i>Miz1</i> -sh 2 rev	5'-AGCTTTTCCAAAAAGTACTCAAAGCTGAGATCA TCTCTTGAATGATCTCAGCTTTGAGTACGGGG-3'

### RNA-Oligonukleotide

Die verwendeten RNA-Oligonukleotidgemische, die gegen die humanen Gene *HECTH9*, *MIZ1*, *MYC* sowie *UBC9* gerichtet waren und aus jeweils vier siRNAs (ON-TARGETplus SMARTpool) bestanden, wurden von der Firma Dharmacon entworfen und synthetisiert. Als Kontrolle wurde die siCONTROL (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, Dharmacon) eingesetzt.

Zielsequenzen:

HECTH9            GCUUUGGGCUGGCCUAAUA  
                     GCAGUUGGCGGCUUUCUUA  
                     GAGCCCAGAUGACUAAGUA  
                     UAACAUCAAUUGUCCACUU

MIZ1                GGACUUCUAUCAGCAGUAU  
                     GGACGCAGCACACCCAUAG  
                     GGACGGUGUUCACUUAAG  
                     GCACGGAGUCCAAGGCCUA

MYC                 ACGGAACUCUUGUGCGUAA  
                     GAACACACAACGUCUUGGA  
                     AACGUUAGCUUCACCAACA  
                     CGAUGUUGUUUCUGUGGAA

UBC9                GGGAAGGAGGCUUGUUUAA  
                     GAAGUUUGCGCCCUCAUAA  
                     GGCCAGCCAUCACAAUCAA  
                     GAACCACCAUUAUUUCACC

### 2.2.3 Plasmide

#### Leervektoren

pcDNA3	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus)-Promotor (Invitrogen)
peGFP N1	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Generierung eines Fusionsproteins mit C-terminalem eGFP-Tag (Clontech)
pRETRO-SUPER	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor für shRNAs mit RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002)

#### Expressionsvektoren

pcDNA3 <i>MIZ1</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>MIZ1</i>
pcDNA3 <i>MYC</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>C-MYC</i>
pcDNA3 <i>MYC-V394D</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>C-MYC-V394D</i>
pcDNA3 <i>HA-NPM</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>NPM</i>
pcDNA3 <i>His-Sumo2</i>	pcDNA3 zur Expression von His-markiertem, humanem SUMO2
pcDNA3 <i>p14ARF</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>p14ARF</i>
pcDNA3 <i>Senp3</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>SEN3</i>
pcDNA3 <i>Senp3C532S</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>SEN3C532S</i>
pcDNA3 <i>TOPBP1</i>	pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>TOPBP1</i>
peGFP <i>p14ARF</i> 1-132	peGFP mit der CDS von humanem <i>p14ARF</i>
peGFP <i>p14ARF</i> 51-132	peGFP zur Expression einer N-terminalen Deletionsmutante von <i>p14ARF</i> (Aminosäuren 51-132)

peGFP <i>p14ARF</i> 65-132	peGFP zur Expression einer N-terminalen Deletionsmutante von <i>p14ARF</i> (Aminosäuren 65-132)
pGL2 p15(-113/+160)	pGL2 mit dem Bereich -113 bis +160 des humanen p15Ink4b-Promotors vor dem Luziferase-Gen
pRETRO-SUPER <i>MIZ1</i> sh 1	pRETRO-SUPER mit shRNA-Sequenz 1, die gegen die mRNA von humanem <i>MIZ1</i> gerichtet ist
pRETRO-SUPER <i>MIZ1</i> sh 2	pRETRO-SUPER mit shRNA-Sequenz 2, die gegen die mRNA von humanem <i>MIZ1</i> gerichtet ist

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt. Für Immunpräzipitationen wurde darüber hinaus ein Immunglobulingemisch aus dem Serum von Maus oder Kaninchen (Sigma) als Kontrollantikörper eingesetzt.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.**

Die verwendeten Primärantikörper sind mit dem detektierten Protein und der detektierten Spezies (H = *Homo sapiens*, M = *Mus musculus*), der Verwendung (IB = Immunoblot, IP = Immunpräzipitation, IF = Immunfluoreszenz), dem Antikörpertyp (M = Maus, K = Kaninchen, Z = Ziege, mono = monoklonal, poly = polyklonal) und der Bezeichnung des Antikörperklons bzw. der Katalogbezeichnung des Herstellers aufgeführt.

Protein	Spezies	Verwendung	Antikörpertyp	Antikörperbezeichnung
β-Aktin	H, M	IB	M, mono IgG1	AC15 (Sigma)
p-ATM(S1981)	H, M	IB	M, mono IgG1	MAB3806 (Chemicon)
BARD1	H	IB	K, poly	H-300 (Santa Cruz)
BRCA1	H	IP, IB	M, mono IgG1	MS110/OP92 (Calbiochem)
Cdk2	H, M	IB	K, poly	M-2 (Santa Cruz)
p-Chk1(S345)	H, M	IB	K, mono IgG	2348 (Cell Signaling)
p-Chk2(T68)	H	IB	K, poly	2661 (Cell Signaling)
EDD	H	IB	Z, poly	M-19 (Santa Cruz)
GFP		IP, IB	M, mono IgG1	G6539 (Sigma)

## Materialien

H2A.Z	H	IB	K, poly	Ab4174 (Abcam)
H2B	H	IB	K, poly	Ab1790 (Abcam)
HA		IF, IB	M, mono IgG1	16B12 (Covance)
HectH9	H	IB	M, mono	Von Christian Helin
HectH9	H	IB	K, poly	4213 (Proscience)
Miz1	H, M	IF, IP	K, poly	H190 (Santa Cruz)
Miz1	H, M	IF, IB	M, mono	10E2 (Arbeitsgruppe Eilers)
c-Myc	H	IB	M, mono IgG	9E10 (von Gerard Evan)
c-Myc	H, M	IP, IF	K, poly	N262 (Santa Cruz)
p14Arf	H	IF, IP, IB	K, poly	NB200-111 (Novus Biologicals)
p19Arf	M	IP, IB	K, poly	Ab80 (Abcam)
p21Cip1	M	IB	K, poly	M19 (Santa Cruz)
p53	M	IB	K, poly	CM5 (Novocastra)
p-p53(S15)/(S18)	H, M	IB	K, poly	9284 (Cell Signaling)
TopBP1	H	IB	K, poly	NB100-217 (Novus Biologicals)
$\beta$ -Tubulin	H, M	IB	M, mono IgG2b	KMX-1 (Chemicon)
Ubc9	H	IB	K, poly	Ab33044 (Abcam)

### 2.3.2 Sekundärantikörper

Kaninchen	Esel-anti-Kaninchen-Immunglobulin für IB, mit HRP ( <i>horse-radish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase) konjugiert (Amersham)
Kaninchen	Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin für IF, mit Alexa Fluor 488 konjugiert (Invitrogen)
Kaninchen	Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin für IF, mit Alexa Fluor 647 konjugiert (Invitrogen)
Maus	Esel-anti-Maus-Immunglobulin für IB, mit HRP konjugiert (Amersham)
Maus	Ziege-anti-Maus-Immunglobulin für IF, mit Alexa Fluor 488 konjugiert (Invitrogen)

Maus	Ziege-anti-Maus-Immunglobulin für IF, mit Alexa Fluor 647 konjugiert (Invitrogen)
Ziege	Esel-anti-Ziege-Immunglobulin für IB, mit HRP konjugiert (Amersham)

## 2.4 Chemikalien

Mit Ausnahme von einigen gesondert aufgeführten Substanzen wurden Chemikalien in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma, Merck, Roth, Acors Organics und Applichem verwendet. Von Sigma und Invitrogen wurden Feinchemikalien in höchstem Reinheitsgrad bezogen.

Agarose für präparative Zwecke	Sekam
ATP	Fluka
Bakto-Agar	Difco
Baktotrypton	Difco

## 2.5 Medien

### 2.5.1 Medien für die Bakterienkultivierung

LB-Medium	1% (w/v) Baktotrypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar	LB-Medium mit 1,2% (w/v) Bakto-Agar, nach dem Erhitzen auf 50°C abgekühlt, 100 µg/ml Ampicillin zugefügt, 20 ml auf eine 10 cm-Schale gegeben
LB-Chlor-Medium	LB-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol

LB-Chlor-Agar	LB-Medium mit 1,2% (w/v) Bakto-Agar, nach dem Erhitzen auf 50°C abgekühlt, 25 µg/ml Chloramphenicol zugefügt, 20 ml auf eine 10 cm-Schale gegeben
LB-Kan-Medium	LB-Medium mit 10 µg/ml Kanamycin
LB-Kan-Agar	LB-Medium mit 1,2% (w/v) Bakto-Agar, nach dem Erhitzen auf 50°C abgekühlt, 10 µg/ml Kanamycin zugefügt, 20 ml auf eine 10 cm-Schale gegeben

### 2.5.2 Medien und Chemikalien für die Säugerzellkultivierung

Für die Kultivierung der einzelnen Zelllinien wurden verschiedene Medien verwendet. Die Grundmedien RPMI-1640 und DMEM enthielten bereits L-Glutamin (584 mg/ml). Das Serum wurde vor der Verwendung 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

HeLa, PHX, U2OS	DMEM (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, Cambrex)
Ls174T, P493-6	RPMI-1640 (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, Cambrex)
MEFs	DMEM (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, Cambrex) 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Cambrex) 55 µM β-Mercaptoethanol
Einfriermedium	90% (v/v) FBS 10% (v/v) DMSO

Zur Selektion erfolgreich infizierter Zellen bzw. zur Behandlung der Zellen wurden folgende Konzentrationen der aufgeführten Chemikalien eingesetzt.

Doxyzyklin	0,1 µg/ml
MG-132 (Merck)	10 µM in DMSO
Puromycin (Invivogen)	1 µg/ml

## 2.6 Puffer und Lösungen

Blockierungslösung	5% (w/v) Magermilch in TBS-T
Bradford-Lösung	8,5% (v/v) Ortho-Phosphorsäure 4,75% (v/v) Ethanol 0,01 (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 filtriert mittels Filterpapier
Coomassie-Lösung	50% (v/v) Methanol 7% (v/v) Essigsäure 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
DEPC-Wasser	0,1% (v/v) DEPC in aqua bidest. über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert, autoklaviert
DNA-Ladepuffer 6x	40% (w/v) Saccharose 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylencyanol 10 mM EDTA pH 8,0
DNA-Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,0 100 mM EDTA pH8,0 100 mM NaCl 0,5% (w/v) SDS

## Materialien

---

Entfärbungslösung	5% (v/v) Methanol 7% (v/v) Essigsäure
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris pH 8,0 175 mM NaCl 5% Glycerin 0,5 mM DTT 10 µg/ml PMSF
GST-Bindepuffer	25 mM HEPES pH 7,6 100 mM KCl 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> 20% Glycerin 0,05% NP40 1 mg/ml BSA 1 mM DTT
GST-Waschpuffer	25 mM HEPES pH 7,6 100 mM KCl 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> 20% Glycerin 0,1% NP40 1,5 mg/ml BSA
HBS 2x	280 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mM HEPES Mit NaOH auf einen pH von 7,00 eingestellt, steril filtriert
Hybridisierungspuffer	200 mM NaCl 100 mM HEPES pH 7,4

## Materialien

---

IPH-Puffer	50 mM Tris pH 8,0
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,5% NP40
	Proteaseinhibitorcocktail (1:1000, Sigma) und gegebenenfalls Phosphataseinhibitorcocktail I (1:100, Sigma) frisch zugeben
Luziferase-Substratlösung	25 mM Glycyl-Glycin-Lösung
	15 mM $K_3PO_4$ pH 8,0
	4 mM EGTA
	15 mM $MgSO_4$
	75 $\mu$ M D-Luziferin
	2 mM ATP
	1 mM DTT
Mowiol-Lösung	13,3% (w/v) Mowiol 4-88
	33,3% (v/v) Glycerin
	0,13 M Tris pH 8,5
Natriumphosphatpuffer 1 M	240 ml einer 1 M $Na_2HPO_4$
	mit ca. 10 ml einer 1 M $NaH_2PO_4$ auf pH 8,0 eingestellt
NP40-Lysepuffer	150 mM NaCl
	1% (v/v) NP40
	50 mM Tris pH8,0
	10 mM $Na_4P_2O_7$
	100 mM NaF
	2 mM $NaVO_4$
	Proteaseinhibitorcocktail (1:1000, Sigma) und gegebenenfalls Phosphataseinhibitorcocktail I (1:100, Sigma) frisch zugeben

## Materialien

---

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> autoklaviert
PI-FACS-Puffer	38 mM Natriumcitrat 54 µM Propidiumiodid 24 µg/ml RNase A (DNase-inaktiviert, Roche)
RIPA-Lysepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% (v/v) NP40 1% (w/v) Desoxycholat 0,1% SDS 1 mM EDTA
Sammelgel 4%	4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS

## Materialien

---

SDS-Probenpuffer 3x	187,5 mM Tris-HCl pH 6,8 30% (v/v) Glycerin 6% (w/v) SDS 0,03% (w/v) Bromphenolblau 2 M $\beta$ -Mercaptoethanol
STET-Puffer	8% (w/v) Saccharose 50 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0 Autoklaviert, danach 0,5% (v/v) Triton X-100 zugegeben
TAE-Puffer	40 mM Tris 0,114% (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA
SUMO-Puffer A	6 M Guanidinhydrochlorid 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0 10 mM Imidazol 250 mM NaCl 0,4% (v/v) Tween-20 Proteaseinhibitorcocktail (1:1.000, Sigma), NEM (20 mM) und MG-132 (20 $\mu$ M) frisch dazugegeben
SUMO-Puffer B	25 mM Tris-HCl pH 6,8 20 mM Imidazol
TBS-T	25 mM Tris pH 7,4 (mit HCl eingestellt) 140 mM NaCl 0,2% Tween-20

## Materialien

---

TNN-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 120 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% (v/v) NP40 10 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 100 mM NaF 2 mM NaVO <sub>4</sub> Proteaseinhibitorcocktail (1:1000, Sigma) und gegebenenfalls Phosphataseinhibitorcocktail I (1:100, Sigma) frisch zugeben
Transferpuffer	15% (v/v) Methanol 25 mM Tris 150 mM Glycin
Trenngel 7,5 – 15%	7,5 – 15% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1% (w/v) SDS 0,1% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
Trypanblaulösung	0,75% (w/v) Trypanblau in PBS durch Filterpapier filtriert
Trypsinlösung	0,25% Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris-HCl pH 7,4 125 mM NaCl

### 2.7 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien wie z.B. Reaktionsgefäße oder Zellkulturschalen wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt und Kimberley-Clark bezogen.

## 2.8 Geräte, Membranen und Filme

Chemilumineszenzdetektion	LAS-4000 mini (Fujifilm)
Durchflusszytometer	FACSCalibur (BD Biosciences)
Filterpapier	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Fluoreszenzmikroskop	BD Pathway (BD Biosciences)
Luminometer	GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega)
PCR-Gerät	Mastercycler epgradient S (Eppendorf)
Photometer	NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech)
PVDF-Membran	Immobilon-P PVDF Transfer Membrane (Millipore)
qRT-PCR-Gerät	Mx3000P (Stratagene)
Röntgenfilm	ECL Hyperfilm (Amersham)
Schüttelinkubator	Model G25 (New Brunswick Scientific)
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel (Bio-Rad)
Ultraschallgerät	W-250 D (Heinemann)
Sterilarbeitsbank	HeraSafe (Heraeus)
UV-Tisch	Transilluminator (Bio-Rad)
Immunoblot-Apparatur	SD Apparatur (Harnischmacher)
Zellkulturinkubator	BBD 6220 (Heraeus)
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Zentrifuge (DuPont Instruments) Zentrifuge 5417R (Eppendorf) Megafuge 1.0 R mit Cytospineinsätzen (Heraeus)

## **3 Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation**

Chemisch kompetente *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  wurden auf Eis aufgetaut und 100  $\mu$ l mit 1  $\mu$ g der aufgereinigten Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz gemischt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurde für 90 Sekunden bei 42°C ein Hitzeschock durchgeführt, der Ansatz 2 Minuten auf Eis inkubiert und 1 ml LB-Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Bakterien für 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Bei der Transformation eines Ligationsansatzes wurden die Bakterien kurz zentrifugiert, der Zellrückstand in 50  $\mu$ l resuspendiert und auf einer Schale mit LB-Agar, der das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausgestrichen. Diente die Transformation dagegen der reinen Plasmidamplifikation, wurden lediglich 50  $\mu$ l der ursprünglichen Bakteriensuspension verwendet. Diese Schalen wurden über Nacht bei 37°C über Kopf inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkolonien in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Agar (mit Antibiotikum) überführt, 8 Stunden bei 37°C geschüttelt und im Fall einer Maxi-Präparation im Anschluss in einen Kolben mit 200 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) gegeben.

#### **3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Für eine Maxi-Präparation (Isolation größerer Mengen des Plasmides nach Amplifikation) wurde die 200 ml-Übernachtskultur entsprechend den Angaben des Herstellers (JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit, Genomed) verarbeitet. Das aufgereinigte Plasmid wurde schließlich in aqua bidest. gelöst, nach Bestimmung der Konzentration auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt und bei -20°C gelagert.

Für die Isolation kleinerer Mengen des Plasmides (Mini-Präparation) wurden 1,5 ml der 5 ml-Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und eine Minute bei 2500 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 100  $\mu$ l STET-Puffer resuspendiert und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) wurde das Pellet entfernt und zu der zurückgebliebenen Lösung 100  $\mu$ l Isopropanol gegeben und der Ansatz gründlich gemischt.

Die Probe wurde anschließend zentrifugiert (5 min, 18.000 x g, 4°C), der erhaltene Rückstand mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl aqua bidest. gelöst.

### **3.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben und Zellkulturzellen**

Zur Isolierung genomischer DNA wurde Mausgewebe (z.B. 1 cm des Mausschwanzes für eine Genotypisierung) mit 500 µl DNA-Lysepuffer und 50 µl Proteinase K (10 µg/µl, Roche) bzw. etwa 10<sup>6</sup> Einzelzellen mit 500 µl DNA-Lysepuffer und 5 µl Proteinase K über Nacht bei 56°C inkubiert. Das Gewebe- bzw. Zellysate wurde mit einem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (Verhältnis 25:24:1) durch Invertieren gemischt und erneut zentrifugiert (2 min, 18.000 x g). Nach Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation (15 min, 18.000 x g, 4°C) präzipitiert. Das dadurch entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl aqua bidest gelöst. Die genomische DNA wurde bei 4°C gelagert.

### **3.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Zur Analyse oder Trennung von DNA-Fragmenten wurde je nach erwarteter Fragmentgröße eine Lösung von 1-2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen. Das abgekühlte, ausgehärtete Gel wurde in eine Elektrophorese-Kammer gesetzt und diese mit 1x TAE gefüllt. Die DNA-Lösung wurde mit DNA-Ladepuffer gemischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zum Größenvergleich wurden 3 µl eines DNA-Größenstandards aufgetragen (1kb DNA ladder, 0,5 µg/µl, Gibco). Die Auftrennung erfolgte bei 120V für 30-90 min. Da in die DNA interkaliertes Ethidiumbromid bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm fluoresziert, konnten die DNA-Fragmente auf einem UV-Leuchttisch visualisiert werden.

### **3.1.5 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel**

Zur Aufreinigung eines DNA-Fragmentes wurde die gelelektrophoretische Auftrennung genutzt. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Extraktion wurde mit Hilfe eines Gelextraktionskits (Gel Extraction Kit, Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA wurde die Absorption bei 260 nm von 1,5 µl der Probe am Photometer ermittelt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger RNA 40 µg/ml. Das Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm sollte dabei für kontaminationsfreie DNA bei 1,8, für RNA bei 2,0 liegen.

### 3.1.7 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion)

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Fermentas oder Invitrogen) mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen DNA und Reaktionspuffern gemischt. Bei gleichzeitiger Hydrolyse mit zwei Restriktionsendonukleasen wurde der Reaktionspuffer genutzt, bei dem beide Enzyme ausreichend hohe katalytische Aktivitäten (siehe Herstellerangaben) zeigten. Im Allgemeinen (mit Ausnahme der präparativen Herstellung größerer Mengen geschnittener DNA) wurde der folgende Ansatz verwendet und ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Restriktionsansatz:     1 µg DNA  
                              5 U Restriktionsendonuklease 1  
                              5 U Restriktionsendonuklease 2 (gegebenenfalls)  
                              1,5 µl 10 x Reaktionspuffer  
                              1 µl RNase A (10 mg/ml, bei DNA aus Mini-Präparation)  
                              ad 15 µl aqua bidest.

### 3.1.8 Hybridisierung von Einzelstrang-DNA

Für die Herstellung von shRNA-Vektoren wurden geeignete Sequenzen unter Verwendung des siDESIGN Centers von Dharmacon (<http://www.dharmacon.com>) sowie des Programms sFold ermittelt (<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>) und die entsprechenden DNA-Einzelstrang-Oligonukleotide zunächst hybridisiert. Dies erfolgte in einem Hybridisierungsansatz durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten und ein langsames Abkühlen auf Raumtemperatur.

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

### 3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung doppelsträngiger DNA-Fragmente mit einem linearisierten Plasmid (Ligation) wurde im Fall von hybridisierten Oligonukleotiden ein 240-facher molarer Überschuss, im Fall von einem größeren DNA-Fragment ein dreifacher molarer Überschuss im Vergleich zum Plasmid gewählt. Der Ligationsansatz wurde 12-16 Stunden bei 16°C inkubiert.

Ligationsansatz:            200 ng linearisiertes Plasmid (ca. 0,05 pmol)  
   x ng DNA-Fragment  
   1 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)  
   1 µl T4 DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs)  
   ad 10 µl aqua bidest.

### 3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion zur sequenzspezifischen Amplifikation eines DNA-Abschnittes wurde vor allem zur Genotypisierung von Mäusen bzw. MEF-Kulturen (genomische PCR) oder zur quantitativen Bestimmung von mRNA-Mengen durch cDNA-Amplifikation (qRT-PCR, Abschnitt 3.1.13) eingesetzt. Im Folgenden wird ein üblicher Ansatz und das Temperaturprofil einer Genotypisierungs-PCR angegeben.

Reaktionsansatz:            3 µl DNA  
   1 µl Primermix (forward und reverse, je 10 pmol/µl)  
   5 µl dNTPs (2,5 mM Roth)  
   1 µl RedTaq DNA Polymerase (Sigma)  
   5 µl RedTaq DNA-Polymerase-Puffer (10x, Sigma)  
   ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

---

Temperaturprofil:	1 Zyklus	95°C	für 5 min
	30-35 Zyklen	95°C	für 1 min
		58-62°C	für 45 s
		72°C	für 45 s
	1 Zyklus	72°C	für 10 min

### 3.1.11 RNA-Isolation

Zur Isolation der Gesamt-RNA von adhären Zellen wurden diese zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber abgeschabt. Durch Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4°C) wurden die Zellen pelletiert und der Zellrückstand in 1 ml TriFast™ (peqLab) resuspendiert. Nach 5 Minuten wurden 200 µl Chloroform zugegeben und gründlich gemischt. Anschließend folgten eine Inkubation von 3 Minuten bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation (10 min, 18.000 x g). Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zum Präzipitieren der RNA mit 500 µl Isopropanol und 20 µg Glykogen (Fermentas) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei -20°C und Zentrifugation (10 min, 18.000 x g, 4°C) wurde der Rückstand zweimal mit 75% Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration bestimmt und gegebenenfalls ein Teil der RNA für eine cDNA-Synthese verwendet. Die Lagerung der RNA erfolgte nach Fällung mit 2,5 Volumenteilen Ethanol abs. und 10% (v/v) Natriumacetat (3M, pH 4,9) bei -80°C.

### 3.1.12 cDNA-Synthese

Zur Analyse der Mengen bestimmter mRNAs musste zunächst die Gesamt-mRNA durch eine reverse Transkription mit Hilfe von Zufallshexanukleotid-Primern in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dafür wurden 2 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10 µl verdünnt, eine Minute bei 65°C inkubiert um Sekundärstrukturen aufzulösen und sofort auf Eis gestellt. Danach wurde der cDNA-Syntheseansatz zugegeben und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur, 50 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Eine Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

cDNA-Syntheseansatz: 10 µl 5 x First Strand Buffer (Invitrogen)

5 µl DTT (0,1M, Invitrogen)

5 µl dNTPs (2,5 mM, Roth)

2 µl Random Primer p(dN)<sub>6</sub> (2 mg/ml)

0,2 µl RNAsin Plus (Promega)

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

ad 40 µl DEPC-Wasser

### 3.1.13 Quantitative reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Mengen wurde die durch eine reverse Transkriptase (RT) synthetisierte cDNA in einer Echtzeit-PCR (*real-time* PCR) amplifiziert. Dabei wurde zunächst mit Hilfe des *qPCR Core kit for SYBR Green I* von Eurogentec ein PCR-Reaktionsgemisch für alle Proben angesetzt, in qRT-PCR-Gefäßen vorgelegt und 1 µl der cDNA dazupipettiert.

PCR-Reaktionsansatz: 2,5 µl Reaktionspuffer (Eurogentec)

1,75 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Eurogentec)

1 µl dNTPs (5 mM, Eurogentec)

1 µl Primermix (fwd + rev, je 10 pmol/µl)

0,125 µl Hot Goldstar Enzym (Eurogentec)

0,75 µl SYBR Green I-Lösung (Eurogentec)

ad 24 µl aqua bidest.

PCR-Temperaturprofil: 1 Zyklus      95°C 5 min

40 Zyklen      95°C 15 s

60°C 1 min

Die Quantifizierung erfolgte durch eine adaptive Grundlinie und einen amplifikationsbasierten Schwellenwert. Die relativen mRNA-Mengen wurden unter der Annahme einer Amplifikationseffizienz von 1 und Verwendung der relativen C<sub>T</sub>-Methode (Applied Biosystems User Bulletin #2) berechnet. Das Gen *Rps16* diente für murine Zellen der Normalisierung, das

Gen *B2M* für humane Zellen. Dabei wurden die Messungen in Triplikaten durchgeführt und eine Standardabweichung nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet.

## **3.2 Zellbiologische Methoden**

Die Zellen wurden stets in einem Inkubator (Begasungsbrutschrank) BBD 6220 von Heraeus bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### **3.2.1 Auftauen von Zellen**

Die einem Kryogefäß tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, in 10 ml kaltes Medium transferiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Das Zellpellet wurde dann in Medium aufgenommen und in eine Zellkulturschale überführt.

### **3.2.2 Passagieren von Zellen**

Adhärente Zellen wurden mit Ausnahme von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs) kurz vor dem Erreichen einer vollständigen Bedeckung der Oberfläche (Konfluenz) passagiert, MEFs dagegen erst bei vollständiger Konfluenz. Dazu wurde das Medium gründlich abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1 ml warme Trypsinlösung je 10 cm-Zellkulturschale auf die Zellen gegeben. Sobald sich ein Teil der Zellen vom Boden der Schale löste, wurden die restlichen Zellen auf mechanischem Weg (durch Klopfen der Schale) abgelöst und die Aktivität von Trypsin durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und bei Bedarf mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Im Anschluss wurde ein bestimmter Teil der Zellen in eine neue Zellkulturschale gegeben. Die Anzahl der Zellen, die jeweils passagiert oder für einen Versuch kultiviert wurde, richtete sich nach deren Größe, der Proliferationsrate und der Dichte der zu passagierenden Zellen.

Suspensionszellen setzten sich ebenfalls am Boden der Kulturflasche ab. Sobald dieser vollständig bedeckt war, wurde nach der Resuspension der Zellen ein bestimmter Volumenanteil entnommen, in eine neue Kulturflasche überführt und mit frischem Vollmedium versetzt.

### **3.2.3 Einfrieren von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit Trypsinlösung abgelöst und resuspendiert. Anschließend wurden sie pelletiert (5 min, 400 x g, 4°C), der Zellrückstand in 3 ml Einfriermedium aufgenommen und auf drei Kryogefäße verteilt. Diese wurden sofort auf Eis und kurze Zeit später für zwei Stunden bei -20°C inkubiert. Danach wurden die Zellen einen Tag bis mehrere Wochen bei -80°C gelagert und schließlich in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

### **3.2.4 Transfektion von siRNA in Säugerzellen**

Die Transfektion von synthetischen siRNAs (Dharmacon) wurde unter Verwendung des Lipidtransfektionsreagenz Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst 24 Stunden vor der Transfektion auf 6 cm-Schalen in 4 ml Medium ohne Antibiotika ausplattiert. Zur Transfektion wurden zum Einen 5 µl siRNA (20 µM) mit Opti-MEM I (Invitrogen) auf 500 µl verdünnt. Andererseits wurden 10 µl des Transfektionsreagenz mit Opti-MEM I auf 500 µl verdünnt und 5 Minuten inkubiert. Beide Lösungen wurden anschließend gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde der Transfektionsmix zu den Zellen getropft, was einer Endkonzentration von 20 nM siRNA und 0,2% RNAiMax in 5 ml Gesamtvolumen entsprach. 12-16 Stunden nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurde ein Mediumwechsel der Zellen vorgenommen.

### **3.2.5 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen**

Die Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde meist durch Komplexierung mit Kalziumphosphat erreicht. Hierfür wurden die Zellen 24 Stunden zuvor in einer geeigneten Zellzahl auf 10 cm-Zellkulturschalen ausplattiert. Kurz vor der Transfektion wurden pro Ansatz 500 µl einer DNA-Kalziumchlorid-Mischung angesetzt. Dazu wurden unter Vortexen langsam 500 µl 2 x HBS getropft, wodurch sich Kalziumphosphat-Komplexe mit der DNA bildeten. Unmittelbar darauf wurde dieses Kalziumphosphatgemisch gleichmäßig auf die Zellen getropft. Schließlich wurden die Zellen 12-16 Stunden nach der Transfektion einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versetzt. Da es sich lediglich um eine transiente (vorübergehende) Transfektion handelte, wurden die Zellen meist 48 Stunden später für weitere Analysen wie beispielsweise Proteinisolation oder Immunfluoreszenz verwendet.

DNA-Kalziumchlorid-Mischung: 5-20  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  
50  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  (2,5 M)  
ad 500  $\mu\text{l}$  aqua bidest.

Als weiteres Trägersystem für den Transfer von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde Polyethylenimin (PEI) verwendet. Zur Transfektion von Zellen (50% konfluent) auf einer 10 cm-Schale wurden 10  $\mu\text{g}$  DNA mit 400  $\mu\text{l}$  PBS bzw. 20  $\mu\text{l}$  PEI (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) mit 400  $\mu\text{l}$  PBS gemischt und jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die PEI-PBS-Mischung zur DNA-Verdünnung hinzugegeben und gründlich durchmischt. Nach einer weiteren Inkubation von 15 Minuten wurde das Medium der Zellen abgesaugt, 8 ml antibiotikafreies Medium mit lediglich 2% Serum zugegeben und der Transfektionsmix zugetropt. Nach maximal 3 Stunden wurden die Zellen aufgrund der relativ hohen Toxizität des Transfektionsreagenzes gründlich mit PBS gewaschen und mit frischem Medium (mit 10% Serum und Antibiotika) versetzt.

### 3.2.6 Stabile retrovirale Infektion

Die retrovirale Infektion stellt eine hocheffiziente Methode da, eine genomische Integration der Plasmid-DNA und somit eine stabile Expression zu erreichen. Die Verwendung des Moloney Murine Leukaemia Virus (Mo-MuLV) setzt jedoch Maus- bzw. Rattenzellen oder Zellen, die den murinen ekotrophen Rezeptor exprimieren, für eine Infektion voraus.

Hergestellt wurden rekombinante Retroviren in der Verpackungszelllinie Phoenix-Eco (PHX), welche von der 293T-Zelllinie abstammt. Dabei handelt es sich um eine mit E1A und T-Antigen transformierte humane embryonale Nierenzelllinie (ursprünglich HEK293). Phoenix-Zellen exprimieren die viralen Genbereiche *gag*, *env* und *pol* unter Verwendung der Resistenz gegen Hygromycin und Diphtheriatoxin. 24 Stunden vor Transfektion dieser Zellen mit Hilfe der Kalziumphosphatmethode wurden sie in einer Zelldichte von 5 Millionen pro 10 cm-Schale ausplattiert. Nach der Transfektion der PHX-Zellen mit retroviralen Expressionsvektoren (z.B. pRETRO-SUPER) produzieren diese Zellen rekombinante Retroviren, die in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Es erfolgte 15 Stunden nach der Transfektion ein Mediumwechsel mit 7 ml Medium. Der erste Virusüberstand wurde 48 Stunden nach Transfektion abgenommen, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 500 x g, 4°C). Der Überstand wurde erneut in ein neues 15 ml-Reaktionsgefäß überführt, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei -80°C gelagert. Den Zellen wurden nochmals 7 ml

an frischem Medium zugegeben, nach weiteren 18 Stunden ein zweiter Virusüberstand abgenommen und die Zellen anschließend verworfen.

Zur Infektion von Zellen mit den rekombinanten Retroviren wurden die Zellen 24 Stunden vor Infektion auf eine 10 cm-Schale ausplattiert. Der tiefgefrorene Virusüberstand wurde dann schnell bei 37°C aufgetaut und jeweils 3 ml Virusüberstand mit 2 ml frischem Medium sowie 5 µl Polybren (4 µg/µl, Hexadimethrinbromid, Sigma) gemischt. Anschließend wurde das Kulturmedium der Zellen abgenommen und das Infektionsgemisch von 5 ml auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 12-16 Stunden erfolgte die Zugabe von weiteren 5 ml Medium. Die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen mit entsprechenden Zytostatika wurde nach 24-48 Stunden eingeleitet, wobei der Zeitpunkt der abgeschlossenen Selektion durch Vergleich mit einer Schale nicht infizierter Zellen bestimmt wurde.

### **3.2.7 Wachstumskurve**

Zum Vergleich des Wachstumsverhaltens mehrerer Zelllinien wurden diese zunächst in identischer Zellzahl ausplattiert und anschließend an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen die Anzahl lebender Zellen von jeweils drei Schalen bestimmt. Dafür wurden die Zellen mittels Trypsinlösung wie beim Passagieren abgelöst und eine 1:1-Mischung der Zellsuspension und Trypanblaulösung hergestellt. Dieser anionische Farbstoff bindet an Zellproteine und gelangt lediglich bei toten Zellen durch die defekte Zellmembran in das Zytoplasma und färbt diese somit blau. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop dagegen hell. Die lebenden Zellen wurden nun in einer Neubauer-Zählkammer für drei Schalen pro Bedingung ausgezählt und der Mittelwert dieser drei Werte sowie die Standardabweichung graphisch dargestellt.

### **3.2.8 Etablierung immortaler 3T3 Zelllinien**

Da die Arbeit mit primären murinen embryonalen Fibroblasten durch den Eintritt in die Seneszenz auf wenige Passagen beschränkt ist, wurden zur näheren Charakterisierung der *Miz<sup>APOZ/APOZ</sup>* MEFs immortale 3T3 Zelllinien etabliert. Hierfür wurden frisch isolierte MEFs in einer Zelldichte von  $3 \cdot 10^5$  Zellen pro 6 cm-Zellkulturschale ausgesät, alle drei Tage passagiert und erneut in der gleichen Dichte ausplattiert (Todaro und Green, 1963). Nach etwa 6-8 Passagen durchläuft ein Großteil der Kultur eine sogenannte „Krise“, aus der schließlich die immortalisierten Zellen hervorgehen (14-18 Passagen).

### **3.2.9 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)**

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

Um bereits abgelöste, apoptotische Zellen in die Messung miteinzubeziehen wurde das Medium in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt, die adhären Zellen mittels Trypsinlösung abgelöst, in dem Zellkulturüberstand resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Der Zellrückstand wurde mit PBS gewaschen und anschließend unter intensivem Vortexen in ein 15 ml-Polystyrol-Reaktionsgefäß mit 4 ml eiskaltem Ethanol abs. getropft. Diese Ethanol-fixierten Zellen wurden über Nacht (gegebenenfalls mehrere Tage) bei -20°C gelagert.

Am Tag der FACS-Messung wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C), mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden von jeder Probe 10<sup>6</sup> Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Der Zellrückstand wurde in 400 µl PI-FACS-Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Transfer in FACS-Röhrchen wurde die Messung bei 488 nm Anregungswellenlänge und mit einem 585 ±21 nm Bandpassfilter (Detektor FL2) für Propidiumiodid (Emission 617 nm) gemessen. Ein Ausschluss von Zellaggregaten erfolgte durch Ausgrenzen hoher Signalweite bei der Auswertung. Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurde das Programm CellQuest Pro (BD Biosciences) verwendet.

### **3.2.10 Untersuchung der Schweifbildung zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen**

#### **(Comet Assay)**

Zum Nachweis von DNA-Schädigungen wurde ein alkalischer *Comet Assay* mit Hilfe des *Comet Assay<sup>TM</sup> Reagent Kit for Single Cell Electrophoreses Assay* (Trevigen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wird die DNA einzelner Zellen elektrophoretisch aufgetrennt

und es entsteht neben dem Kopf (intakte DNA) ein Schweif bestehend aus gewanderten DNA-Fragmenten. Die einzelnen Schritte des *Comet Assay* beinhalten die Ablösung der Zellen von den Zellkulturschalen, die Einbettung der Zellen in Agarose auf Objektträgern, die Lyse und alkalische pH-Werteinstellung, die Elektrophorese sowie die anschließende Fixierung und Färbung der DNA. Da zur Anfärbung der DNA der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I mit einem Anregungs- bzw. Emissionsmaximum von 494 nm bzw. 521 nm verwendet wurde, konnte die DNA im Anschluss am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines Fluoreszeinfilters detektiert werden. Die Quantifizierung der vorliegenden DNA-Schäden erfolgte mit Hilfe der Software Cometscore15 in Form des *Comet Tail Moment*. Die Berechnung des *Comet Tail Moment* beruht auf der Formel „Schweiflänge x (Anteil der DNA im Schweif %/100)“.

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Herstellen von Proteinlysaten für Immunoblot**

Für die Isolation von Proteinen adhärenter Zellen wurde zunächst das Medium von der Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml kaltem PBS mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Suspensionszellen wurden im Anschluss an eine Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4°C) mit PBS gewaschen. Nach Zentrifugation beider Zelltypen (5 min, 400 x g, 4°C) wurden diese entweder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert oder für eine Proteinisolation in 30-100 µl (je nach Zellzahl) TNN-, NP40-, IPH- bzw. RIPA-Puffer mit frisch zugesetzten Proteaseinhibitoren (1:1.000) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 30 min bei -80°C gelagert und auf Eis aufgetaut, was zum Aufschluss der Zellen führte. Durch Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) wurden Zelltrümmer pelletiert und lediglich der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (siehe 3.3.3) und evtl. bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Alternativ wurden die Zellen direkt auf der Zellkulturschale durch Zugabe von 2x-SDS-Ladepuffer, der vorher 10 min bei 95°C erhitzt wurde, lysiert (heiße SDS-Lyse). Das Zelllysat wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.8) und Immunoblot (Abschnitt 3.3.9) bei -20°C gelagert.

### **3.3.2 Chromatin-Fraktionierung**

Zur Trennung von Chromatin-assoziierten und löslichen Proteinen wurden sowohl adhärente als auch Suspensionszellen zunächst wie in 3.3.1 beschrieben isoliert und gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden etwa  $3 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l Fraktionierungspuffer A aufgenommen, 5 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (4 min,  $1.300 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Die löslichen cytoplasmatischen Proteine wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, das Kernpellet mit 500  $\mu$ l Fraktionierungspuffer A gewaschen. Zur Isolation der löslichen nukleären Proteine wurden die pelletierten Kerne in 150  $\mu$ l eines hypotonen Fraktionierungspuffers B resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (4 min,  $1.700 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ) von den Chromatin-assoziierten Proteinen getrennt. Da in den durchgeführten Experimenten lediglich zwischen löslichen und Chromatin-gebundenen Proteinen unterschieden wurde, wurden die Überstände der löslichen cytoplasmatischen und nukleoplasmatischen Fraktionen vereinigt. Das isolierte Chromatin wurde nochmals mit 500  $\mu$ l Fraktionierungspuffer B gewaschen, zentrifugiert (4 min,  $10.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ), direkt in 350  $\mu$ l 3x-SDS-Ladepuffer aufgenommen und zur Freisetzung der gebundenen Proteine 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der löslichen Fraktion nach Bradford bestimmt und das entsprechende Volumen der Chromatin-assoziierten Proteine zur elektrophoretischen Auftrennung (SDS-PAGE siehe 3.3.8) und Analyse im Immunoblot (Abschnitt 3.3.9) verwendet.

### **3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford angewandt. Hierfür wurden 100  $\mu$ l 150 mM NaCl in einer Halbmikroküvette (Hirschmann Laborgeräte) vorgelegt, 1  $\mu$ l der Probe hinzupipettiert und der Ansatz nach Zugabe von 900  $\mu$ l Bradford-Lösung gut gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Extinktion jeder Probe in Form von Triplikaten bei 595 nm photometrisch bestimmt, wobei ein Ansatz ohne Probe als Referenz diente. Anhand einer Eichgerade, die mit Hilfe einer BSA-Lösung in dem entsprechenden Lysepuffer erstellt wurde, wurde die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

### **3.3.4 Immunpräzipitation (IP)**

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei wird mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch ein bestimmtes Protein

bindet (IP-Antikörper), dieses Protein zusammen mit dessen Interaktionspartnern aus dem Zellysate isoliert (präzipitiert). Hierfür werden Sepharosekügelchen eingesetzt, die mit Protein A oder Protein G beschichtet sind. Protein A und Protein G binden wiederum mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Immunglobuline (Antikörper) von Säugern, was zur Präzipitation der Antikörper-Protein-Komplexe führt. Um eine unspezifische Bindung der zu untersuchenden Proteine an die Sepharose auszuschließen, wurde parallel ein Immunglobulingemisch (IP-Kontrollantikörper) der gleichen Spezies verwendet. Im Anschluss an die Präzipitation und Denaturierung der interagierenden Proteine können diese mittels SDS-PAGE und Immunoblot (Abschnitt 3.3.8 bzw. 3.3.9) nachgewiesen werden. Dabei treten jedoch unspezifische Banden der leichten und schweren Kette des IP-Antikörpers auf, welche durch den Sekundärantikörper im Immunoblot unter Umständen erkannt werden. Daher ist es vorteilhaft, wenn IP- und Primärantikörper von unterschiedlichen Spezies stammen.

Die Isolation der Proteine für die Immunpräzipitation erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben in TNN-Lysepuffer. Bei der Untersuchung stark DNA-gebundener Proteine wie beispielsweise c-Myc wurde die Probe zusätzlich sonifiziert (4 x 5 s mit jeweils 30 s Pause, 20% Amplitude, gekühlt mit Eis/Ethanol). Nach einer Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) wurde der Überstand in eine neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde anschließend nach Bradford bestimmt (Abschnitt 3.3.3). Für eine IP überexprimierter Proteine wurden pro IP-Ansatz 300 bis 500 µg, bei endogenen Proteinen 1.000 bis 1.500 µg des Lysates in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und jeder IP-Ansatz mit TNN-Lysepuffer auf 500 µl verdünnt. Pro IP-Ansatz wurden 100 µl eines 50:50-Gemisches von Protein A- bzw. Protein G-Sepharose mit 20% (v/v) Ethanol entnommen und dreimal mit insgesamt 10 ml TNN-Lysepuffer gewaschen. Zwischen den Waschrufen wurden die Sepharosekügelchen bei 200 x g und 4°C zentrifugiert und nach dem letzten Waschrufen wurde die Sepharose (pro IP-Ansatz) in 50 µl TNN-Lysepuffer aufgenommen, so dass erneut ein 50:50-Gemisch vorlag.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, erfolgte vor der IP ein sogenanntes *Preclearing*. Dies beinhaltet die Inkubation des Proteinlysates mit 50 µl (pro IP-Ansatz) des 50:50-Gemisches der gewaschenen Protein A- bzw. Protein G-Sepharose für zwei Stunden bei 4°C unter Drehen. Im Anschluss wurde die Probe zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4°C) und der Überstand auf die entsprechende Anzahl von Reaktionsgefäßen aufgeteilt. Nach Zugabe von 1 bis 2 µg des IP- bzw. Kontrollantikörpers wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu jedem Ansatz 50 µl der 50%igen Sepharosesuspension gegeben und weitere zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die

Proben wurden schließlich zentrifugiert (5 min., 200 x g, 4°C) und zweimal mit je 1 ml TNN-Lysepuffer, einmal mit 1 ml Hochsalz-TNN-Lysepuffer (TNN-Lysepuffer mit 200 mM NaCl) und einmal mit 1 ml TNN-Lysepuffer gewaschen. Der Rückstand wurde anschließend in 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation (3 min, 1.000 x g) wurde der komplette Überstand sowie 1 bis 5% des eingesetzten Lysates (Input) für eine Analyse der interagierenden Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.8) und Immunoblot (Abschnitt 3.3.9) verwendet.

### **3.3.5 *In vivo*-SUMOylierungs-Untersuchung**

Zum Nachweis der SUMOylierung endogener Proteine *in vivo* wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid von His-markiertem SUMO2 transfiziert, 48 Stunden später isoliert (Abschnitt 3.3.1) und in ein 15ml-Reaktionsgefäß überführt. 10% des eingesetzten Materials wurden zum Mengenvergleich (Input) abgenommen und mittels einer heißen SDS-Lyse (Abschnitt 3.3.1) eine Proteinisolation durchgeführt. Die Zellen, die im SUMOylierungsexperiment eingesetzt werden sollten, wurden in 1ml SUMO-Puffer A aufgeschlossen und anschließend sonifiziert (4 x 8s mit 20s Pause, 20% Amplitude, gekühlt durch Eis/Methanol). Durch Zentrifugation (10 min, 6000 x g, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt und der Überstand in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Parallel dazu wurden pro Ansatz 100µl einer 50%igen Suspension von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose zweimal mit SUMO-Puffer A gewaschen (1 min, 1000 x g, 4°C) und in 50 µl SUMO-Puffer A resuspendiert. Jeweils 100 µl dieser 50%igen Suspension wurden zu den Proben zugegeben und 4 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (1 min, 1000 x g, 4°C), drei Mal mit 1 ml SUMO-Puffer A, zweimal mit 1 ml eines 1:4-Gemisches bestehend aus SUMO-Puffer A und B sowie zweimal mit 1 ml SUMO-Puffer B gewaschen. Der Rückstand wurde in 100 µl 2 x SDS-Probenpuffer/Imidazol (3x-SDS-Ladepuffer mit aqua bidest. verdünnt, mit 200 mM Imidazol versetzt) aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (1 min, 1.000 x g) und 20% des Überstandes sowie des Inputs zum Nachweis der SUMOylierten Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.8) und Immunoblot (Abschnitt 3.3.9) eingesetzt.

### 3.3.6 GST-Pulldown

Die Interaktion eines *in vitro*-translatierten Proteins (c-Myc) mit einem rekombinanten Protein (GST-SUMO1-3) wurde in einem GST-Pulldown analysiert. Hierfür wurden zunächst chemisch kompetente *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes BL21 mit einem induzierbaren Kontrollplasmid (pGEX) bzw. einem Plasmid, das für ein Fusionsprotein aus SUMO1-3 und der GST-Markierung codiert (pGEX SUMO1-3), transformiert (Abschnitt 3.1.1) und die Ansätze auf einer Schale mit LB-Amp-Agar ausgestrichen. Jeweils eine Bakterienkolonie wurde am nächsten Tag in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Amp-Medium überführt und diese über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Ansätze wurden nun 1:100 verdünnt und jeweils eine 200 ml-Kultur weiterhin bei 37°C inkubiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 bis 1,5 (600 nm) wurde die Expression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Bakterienkulturen wurden nach weiteren 2 Stunden durch Zentrifugation (20 min, 5.000 x g, 4°C) pelletiert und der Zellrückstand mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das bakterielle Material in einem 15 ml-Reaktionsgefäß in 5 ml PBS/1% Triton X-100 aufgenommen und durch Sonifizieren aufgeschlossen (10 x 30 s mit 30s Pause, 40% Amplitude, gekühlt durch Ethanol/Eis). Durch Zentrifugation (10 min, 18.000 x g, 4°C) wurden unlösliche Bestandteile pelletiert und der Überstand in ein neues 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Parallel dazu wurden pro Probe 300 µl einer 50%igen Suspension Gluthation-Sepharosekügelchen mit 10 ml PBS/1% Triton X-100 gewaschen, in 150 µl PBS/1% Triton X-100 resuspendiert und zu dem bakteriellen Lysat gegeben. Anschließend wurde die Mischung zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach drei Waschrissen mit PBS/1% Triton X-100 und zwei mit PBS wurden die an die Kügelchen gekoppelten Proteine in 150 µl PBS aufgenommen. Jeweils 2 µl der GST-, GST-SUMO1-, GST-SUMO2- und GST-SUMO3-Kügelchen wurden mit 200 µl 2x-SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und deren Mengenverhältnis mittels SDS-PAGE sowie anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Hierfür wurde das Gel 15 min in einer Coomassie-Lösung gefärbt und über Nacht in Entfärbelösung gewaschen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Programms MultiGauge. Die restlichen Kügelchen wurden abzentrifugiert (1 min, 200 x g, 4°C), in Glycerin resuspendiert und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

Gleichzeitig wurde ein Expressionsplasmid mit T7 RNA Polymerase-Promotor (pcDNA3 MYC) für die *in vitro*-Transkription/Translation (TNT Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega) eingesetzt und diese entsprechend den Angaben des Herstellers in einem zweifachen Ansatz durchgeführt. Von dem dadurch erhaltenen Material wurden zum Mengenvergleich 2% (Input) abgenommen, die restliche Probe auf vier Ansätze aufgeteilt und

mit GST-Bindepuffer auf 500 µl verdünnt. Anschließend wurden die anhand der Coomassie-Färbung ermittelten Volumina der GST-, GST-SUMO1-, GST-SUMO2- und GST-SUMO3-Kügelchen zugegeben und die Proben vier Stunden bei 4°C unter Drehen inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit je 1 ml GST-Waschpuffer wurden die Kügelchen in 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation (3 min, 1.000 x g) wurde der komplette Überstand sowie 2% des eingesetzten *in vitro*-translatierten Proteins (Input) für eine Analyse der interagierenden Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.8) und Immunoblot (Abschnitt 3.3.8) verwendet.

### **3.3.7 Gelfiltration**

Mit Hilfe einer Gelfiltration erfolgte die Auftrennung von Proteinlysaten entsprechend der Größe der nativen Proteinkomplexe. Hierfür wurden zunächst 600 µg Zelllysate (IPH-Lysepuffer) mit 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 250 U Benzonase (Novagen) versetzt und 1,5 bis 2 Stunden unter Rotation bei 4°C inkubiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) wurde der Überstand auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte, analytische Superose 6-Säule (20 ml Säulenvolumen, GE Healthcare) mit einem Trennbereich von 5 bis 5.000 kDa aufgetragen. Während der Gelfiltration mit einer Flussrate von 0,3 ml/min wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1 ml gesammelt. Zur Aufkonzentrierung der Proben wurden pro Fraktion 10 µl StrataClean™ Resin-Kügelchen (Stratagene) zugegeben und die Ansätze 20 Minuten unter Rotation bei Raumtemperatur inkubiert. Die an die Kügelchen gebundenen Proteine wurden durch Zentrifugation (3 min, 500 x g, 4°C) pelletiert, in 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch 5minütige Inkubation bei 95°C eluiert. Die konzentrierten Fraktionen der Gelfiltration sowie 10% des eingesetzten Lysates (Input) wurden in weiteren Schritten durch SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.8) und Immunoblot (Abschnitt 3.3.9) analysiert.

### **3.3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE angewendet (Laemmli, 1970). Dazu wurden 10 bis 25 µg Proteinlysate oder das Eluat einer Immunpräzipitation (Abschnitt 3.3.4) eingesetzt. Proteinlysate wurden zunächst mit der Hälfte ihres Volumens an 3 x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurden sie in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen, das aus einem 7,5 bis 15%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel bestand. Zum Größenvergleich wurden je

nach Größe der Zielproteine 3 bzw. 5 µl eines Größenstandards geladen (PageRuler Pre-Stained Protein Ladder, Fermentas bzw. HiMark™ Pre-StainedHMW Protein Standard, Invitrogen). Anschließend wurden die Proben in einer SDS-PAGE-Apparatur (Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer zunächst bei 80V im Sammelgel und 120 V im Trenngel für zwei bis drei Stunden separiert.

### **3.3.9 Immunoblot**

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE erfolgten der Transfer und die damit verbundene Immobilisierung auf eine PVDF-Membran mittels Tank-Blot. Die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran wurde etwa 30 Sekunden in Methanol inkubiert, mit aqua bidest. gespült und anschließend zusammen mit dem Gel in Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wurde auf die Membran und beides zwischen zwei 4mm-dicke Filterpapiere gelegt. Der Transfer erfolgte mit Transferpuffer in einer Mini-Nassblot-Apparatur (Harnischmacher) bei 250 mA für 1,5 bis 4 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran für 0,5 bis 2 Stunden unter Schwenken in Blockierungslösung inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierungslösung geschwenkt. Im Fall von phosphospezifischen Antikörpern wurde anstelle von Blockierungslösung 5% (w/v) BSA in TBS-T eingesetzt. Am nächsten Tag erfolgte nach drei Waschschritten mit TBS-T die Inkubation mit einem HRP-konjugierten (Meerrettich-Peroxidase) Sekundärantikörper (1:5.000 verdünnt in Blockierungslösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachdem die Membran weitere dreimal mit TBS-T gewaschen wurde, wurde zur Detektion der Proteine durch Chemilumineszenz das ECL+ Immunoblot Detektionssystem (Amersham Biosciences) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz der Substratumsetzung wurde mittels eines Röntgenfilms bzw. digital nachgewiesen.

### **3.3.10 Strippen von PVDF-Membranen**

Zum Entfernen der gebundenen Antikörper von der PVDF-Membran für eine Detektion eines anderen Proteins wurde die Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Stripppuffer geschwenkt. Anschließend wurde sie dreimal mit TBS-T gewaschen und erneut in Blockierungslösung inkubiert. Die Detektion des zweiten Primärantikörpers erfolgte wie in Abschnitt 3.3.7 beschrieben.

### 3.3.11 Bestimmung der Luziferase-Aktivität

Die transfizierten Zellen einer 6-Well-Platte wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 250 µl des Passiven Lysepuffers (Promega) und 15minütigem Schwenken bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und Zelltrümmer durch Zentrifugation (1 min, 400 x g, 4°C) pelletiert. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden zunächst 50 µl jeder Probe in einer 96-Well-Platte mit transparentem Boden (Greiner Bio-One) vorgelegt und diese in dem Glomax 96 Mikroplate Luminometer (Promega) platziert. Hier erfolgte eine automatische Zugabe von 100 µl Luziferase-Substratlösung pro Probe sowie die Messung der Lichtemission bei 562 nm in relativen Lichteinheiten (RLU, *relative light units*) 2 Sekunden nach Zugabe der Substratlösung. Zur Normalisierung wurde die Proteinkonzentration verwendet, die wie in Abschnitt 3.3.3 nach Bradford bestimmt wurde.

### 3.3.12 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Lokalisation bestimmter Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen aus Glas kultiviert. Sobald die Zellen die benötigte Zelldichte erreicht hatten, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 4% Paraformaldehyd und 15minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. In diesem Zustand konnten die Zellen einige Tage bei 4°C gelagert werden. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben je zweimal für 10 Minuten in 0,1 M Glycin in PBS beziehungsweise für 5 Minuten in 0,1% NP40 in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer überführt, die Zellen für 45 Minuten in Blockierungspuffer und danach für 1,5 Stunden mit der entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit Blockierungslösung folgte die Färbung mit dem Fluoreszenz-markierten (Alexa488 bzw. Alexa647) Sekundärantikörper (1:400 in Blockierungslösung) und parallel die DNA-Färbung mit Hoechst (1:10.000 in Blockierungslösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Im Anschluss daran wurden die Proben erneut dreimal mit 0,1% NP40 in PBS und jeweils einmal mit PBS bzw. aqua bidest. gewaschen. Zum Eindecken der Proben wurde ein kleiner Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen möglichst luftblasenfrei aufgelegt. Zum Abdichten des Deckglases wurden die Ränder mit klarem Nagellack versiegelt und bei 4°C im

Dunkeln gelagert. Die Präparate konnten in diesem Zustand unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

### **3.4 Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.4.1 Zucht von Mäusen**

Die Maushaltung erfolgte in offenen Käfigen bei einer konstanten Raumtemperatur von 20°C und einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden durch die Tierpfleger der tierexperimentellen Einrichtung. Zur Zucht wurden ein Weibchen und ein Männchen mit einem Mindestalter von sechs Wochen in einem Käfig verpaart. Die Nachkommen wurden im Alter von 10 bis 16 Tagen am Ohr markiert und ein Stück des Schwanzes für eine Genotypisierung abgeschnitten. Im Alter von 18 bis 24 Tagen wurden die Nachkommen nach Geschlechtern getrennt in separate Käfige gesetzt.

#### **3.4.2 Entnahme von Embryonen und Isolierung von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEFs)**

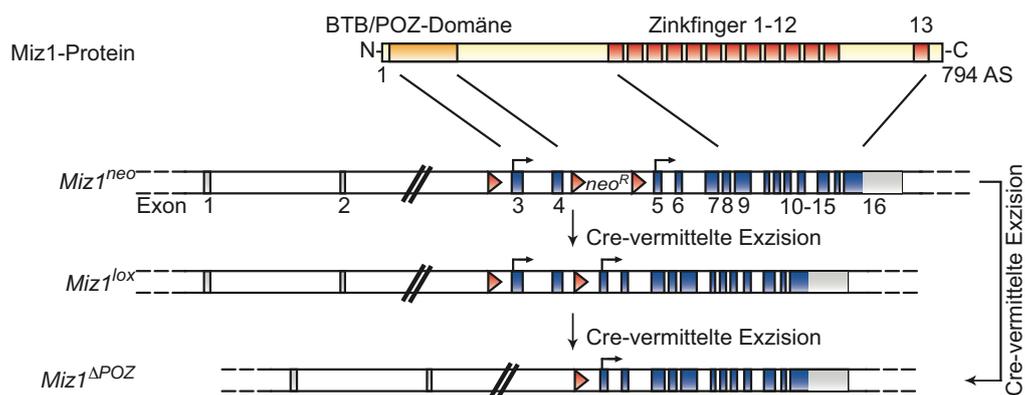
Für die Gewinnung von MEFs wurden Embryonen des Entwicklungstags 12,5 verwendet. Die schwangeren Mäuse wurden mit Isofluran (Baxter) betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nach einer äußeren Desinfektion mit 70% Ethanol wurden die Embryonen entnommen und in eine mit PBS gefüllte Petrischale gelegt. Mit Hilfe eines Skalpells wurde der Kopf der Embryonen abgetrennt und die roten, blutbildenden Gewebe entfernt. Der Rest des Embryos wurde in sehr kleine Stücke geschnitten, welche in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 30 Minuten bei 37°C mit 1 ml Trypsin inkubiert wurden. Während dieser Inkubationszeit wurden die Gewebefragmente mehrmals durch invertieren durchmischt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in 15 ml Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Zwei Drittel der Zellsuspension wurde in eine 10 cm-Schale überführt und für diverse Experimente (z.B. Wachstumskurve, Immortalisierung) verwendet, ein Drittel wurde auf einer 6 cm-Kulturschale ausgebracht und nach 24 Stunden zur Genotypisierung (Abschnitt 3.1.3 und 3.1.10) eingesetzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktionsanalyse der BTB/POZ-Domäne des Transkriptionsfaktors Miz1 in murinen embryonalen Fibroblasten

#### 4.1.1 Beschreibung des konstitutiven und konditionellen *Miz1*<sup>ΔPOZ</sup> Mausmodells

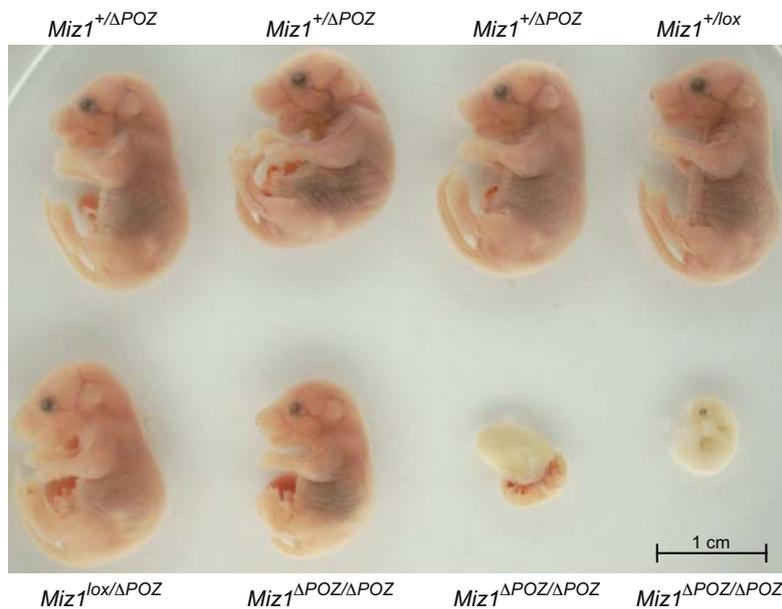
Zur Untersuchung der Funktion des Transkriptionsfaktors Miz1 insbesondere während der Embryonalentwicklung wurde ein konstitutives *Knockout* Mausmodell generiert. Da die homozygote Deletion des vollständigen *Miz1* Gens zur embryonalen Letalität am Tag 6-8 führt (Adhikary et al., 2003), wurde von Dr. Werner Lutz (IMT Marburg) in Kooperation mit Dr. Christian Kosan (AG Prof. Dr. Tarik Möröy, Essen/Montreal) ein konditionelles Mausmodell (*Miz1*<sup>lox</sup>) etabliert, das die Deletion der BTB/POZ-Domäne (kodiert durch Exon 3 und 4) von Miz1 ermöglicht (Abb. 6). Hierfür wurde ein Zielvektor verwendet, in dem die Exons 3 und 4 des murinen *Miz1* Gens von zwei *LoxP*-Sequenzen flankiert wurden und somit das gezielte Entfernen dieser genomischen Region durch Einsatz einer Cre-Rekombinase ermöglicht wurde. Zusätzlich wurde durch die transiente Expression einer Cre-Rekombinase in embryonalen Stammzellen des Genotyps *Miz1*<sup>+neo</sup> eine zweite, konstitutive Mauslinie (*Miz1*<sup>ΔPOZ</sup>) etabliert.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Generierung einer konditionellen und konstitutiven Deletion der POZ-Domäne des Transkriptionsfaktors Miz1.**

Durch homologe Rekombination eines Zielvektors in den murinen *Miz1* Genlokus wurden zwei *LoxP*-Sequenzen (Dreiecke) eingeführt, die die Exons 3 und 4 flankieren. Diese genomische Region, welche die BTB/POZ-Domäne von Miz1 kodiert, kann durch Einsatz einer Cre-Rekombinase entfernt werden bzw. wurde durch transiente Cre-Expression in ES-Zellen zur Generierung einer konstitutiven Mauslinie deletiert. Nicht-kodierende Bereiche sind grau dargestellt. Zusätzlich zu dem Startkodon in Exon 3 ist ein alternatives Startkodon in Exon 5 dargestellt.

Wie bereits für den vollständigen Knockout von *Miz1* beschrieben wurde (Adhikary et al., 2003), resultierte die Deletion der POZ-Domäne von *Miz1* in einem Entwicklungsarrest von homozygoten Embryonen, allerdings etwas verzögert zwischen Tag 12 bis 16 (Abb. 7). Auffallend war bei der Präparation mehrerer Embryonen an Tag 17,5 der Embryonalentwicklung die Heterogenität dieses Phänotyps. Während bei einigen *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> Embryonen die Entwicklung lediglich etwas verzögert war, befanden sich andere schon im Prozess der Resorption. Histologische Untersuchungen zeigten eine normale Organentwicklung, Erythropoese und Vaskularisierung, wobei der deutlich verkleinerte Thymus eine Ausnahme bildete (Christian Kosan, persönliche Mitteilung).



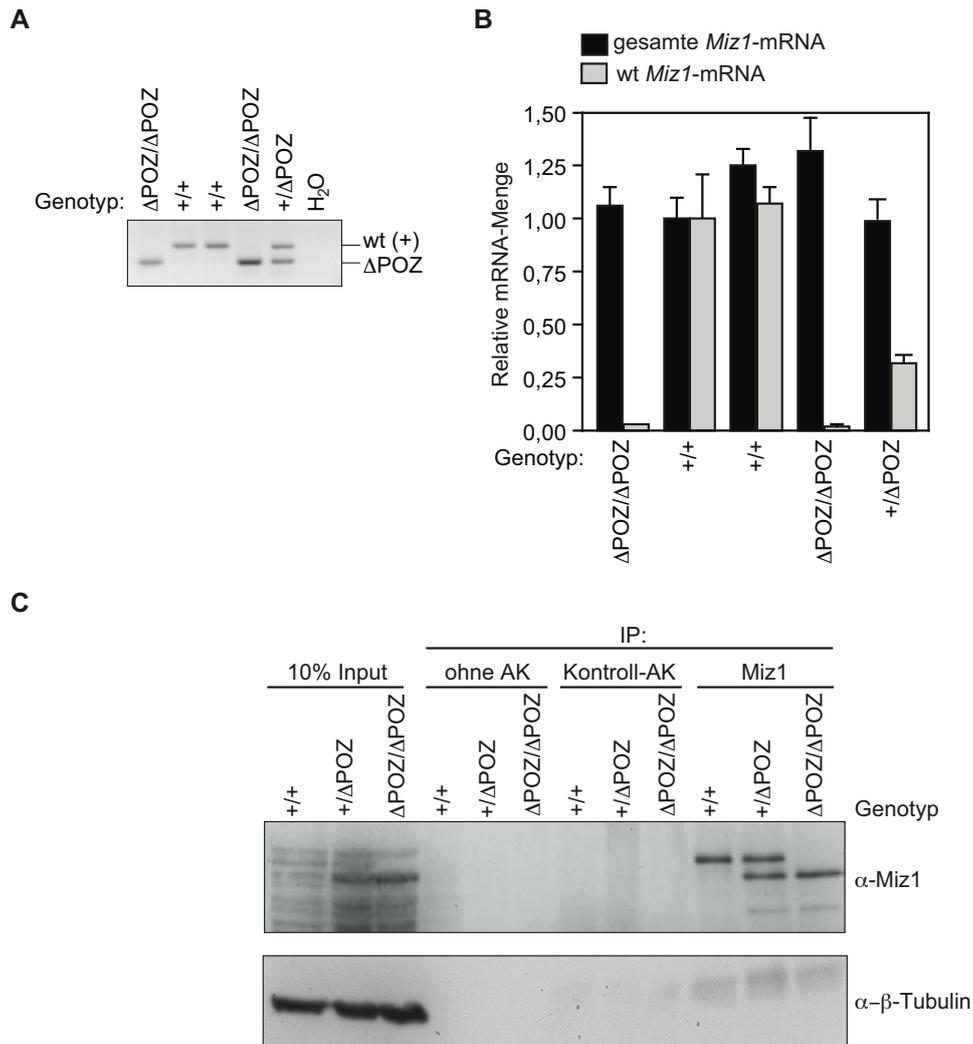
**Abb. 7: Die Deletion der POZ-Domäne von *Miz1* führt zu einem Wachstumsarrest am Tag 12 bis 16 der Embryonalentwicklung und somit zu einem embryonal letalen Phänotyp.**

Zwei *Miz1*<sup>+/<sup>ΔPOZ</sup></sup> Mäuse wurden verpaart und an Tag 17,5 der Entwicklung die Embryonen entnommen, das äußere Erscheinungsbild dokumentiert und anschließend genotypisiert.

Da die weitere Beschreibung des Entwicklungsdefekts durch die Arbeitsgruppe von Prof. Tarik Mörröy erfolgte, wird im Folgenden auf die Charakterisierung von murinen embryonalen Fibroblasten eingegangen, die aus *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> Embryonen isoliert wurden.

#### 4.1.2 Die Deletion von Exon 3 und 4 des murinen *Miz1* Gens führt zur Expression eines trunkierten Miz1 Proteins (*Miz1* $\Delta$ POZ)

Wie in Abbildung 6 dargestellt, besteht das murine *Miz1* Gen aus 16 Exons, wobei Exon 3 die erste ATG Sequenz als Startkodon enthält und somit das erste kodierende Exon darstellt. Die Deletion von Exon 3 und 4 könnte daher die Translation der *Miz1* mRNA unterbinden. Da jedoch Exon 5 ein weiteres, alternatives Startcodon mit benachbarter, schwacher Kozak-Sequenz aufweist, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Exzision dieses genomischen Bereichs zur Synthese eines aminoterminal trunkierten Miz1 Proteins führt. Um festzustellen, welche der beiden Möglichkeiten vorliegt, wurden heterozygote *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> Tiere verpaart und am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung murine embryonale Fibroblasten (MEFs) isoliert. Nach eintägiger Kultivierung der MEFs wurden diese zur Isolierung genomischer DNA und RNA sowie zur Herstellung eines Proteinextraktes verwendet. Nachdem mittels genomischer PCR der Genotyp der einzelnen MEF-Zelllinien bestimmt wurde (Abb. 8A), wurde die RNA der fünf Zelllinien durch qRT-PCR analysiert. Unter Verwendung eines Primerpaares, das komplementär zu Exon 12 bzw. 13 ist, konnten in MEFs aller drei Genotypen ähnliche Mengen der entsprechenden mRNA nachgewiesen werden (Abb. 8B). Dagegen ergaben Wildtyp-spezifische Primer, die Exon 3 und 4 umspannen und damit keine komplementäre Sequenz zu der *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ</sup> mRNA aufweisen, lediglich ein positives Ergebnis für *Miz1*<sup>+/+</sup> und *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> MEFs, wobei die Menge der wildtypischen mRNA in der heterozygoten Zelllinie deutlich reduziert war. In einem weiteren Schritt wurden die Proteinextrakte jeweils einer Zelllinie der drei Genotypen in einer Immunpräzipitation durch Einsatz eines Miz1-spezifischen Antikörpers analysiert, dessen Epitop im carboxyterminalen Bereich von Miz1 liegt und daher das Miz1 $\Delta$ POZ Protein erkennen würde. Während in Wildtyp-MEFs lediglich eine Bande erwarteter Größe detektiert wurde, konnte in heterozygoten MEFs zusätzlich ein verkürztes Miz1-Protein (*Miz1* $\Delta$ POZ) nachgewiesen werden. In homozygoten *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> MEFs wurde ausschließlich das verkürzte Miz1 $\Delta$ POZ-Protein gebildet (Abb. 8C).



**Abb. 8: Die Deletion der Exons 3 und 4 des murinen *Miz1* Genlokus führt zur Expression eines aminoterminal trunkeierten *Miz1* $\Delta POZ$  Proteins.**

(A) Gezeigt ist das Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR einer MEF-Präparation. Nach Verpaarung von heterozygoten *Miz1*<sup>+/ $\Delta POZ$</sup>  Tieren wurden am Tag 12,5 der Entwicklung die Embryonen entnommen, MEFs isoliert, einen Tag kultiviert und genomische DNA isoliert. Durch Einsatz von drei Primern zur Genotypisierungs-PCR konnten das Wildtyp- und *Miz1* <sup>$\Delta POZ$</sup> -Allel parallel amplifiziert werden. Die Amplikons besitzen eine Länge von 277 bzw. 180 bp.

(B) Die in (A) beschriebenen *Miz1*<sup>+/+</sup>, *Miz1*<sup>+/ $\Delta POZ$</sup>  und *Miz1* <sup>$\Delta POZ/\Delta POZ$</sup>  MEFs wurden mittels qRT-PCR mit Primern analysiert, welche die gesamte *Miz1*-mRNA bzw. spezifisch die Wildtyp-mRNA detektieren, und auf *Rps16* normalisiert. Die relativen mRNA-Mengen wurden jeweils auf die erste Wildtyp-Probe bezogen.

(C) Proteinlysate der in (A) beschriebenen primären MEFs wurden durch Immunpräzipitation mit dem Miz1-spezifischen Antikörper H190, einem unspezifischen Kontroll-AK bzw. ohne Antikörper und anschließend Immunoblot untersucht. Zum Mengenvergleich wurden 10% des Lysats (Input) aufgetragen.

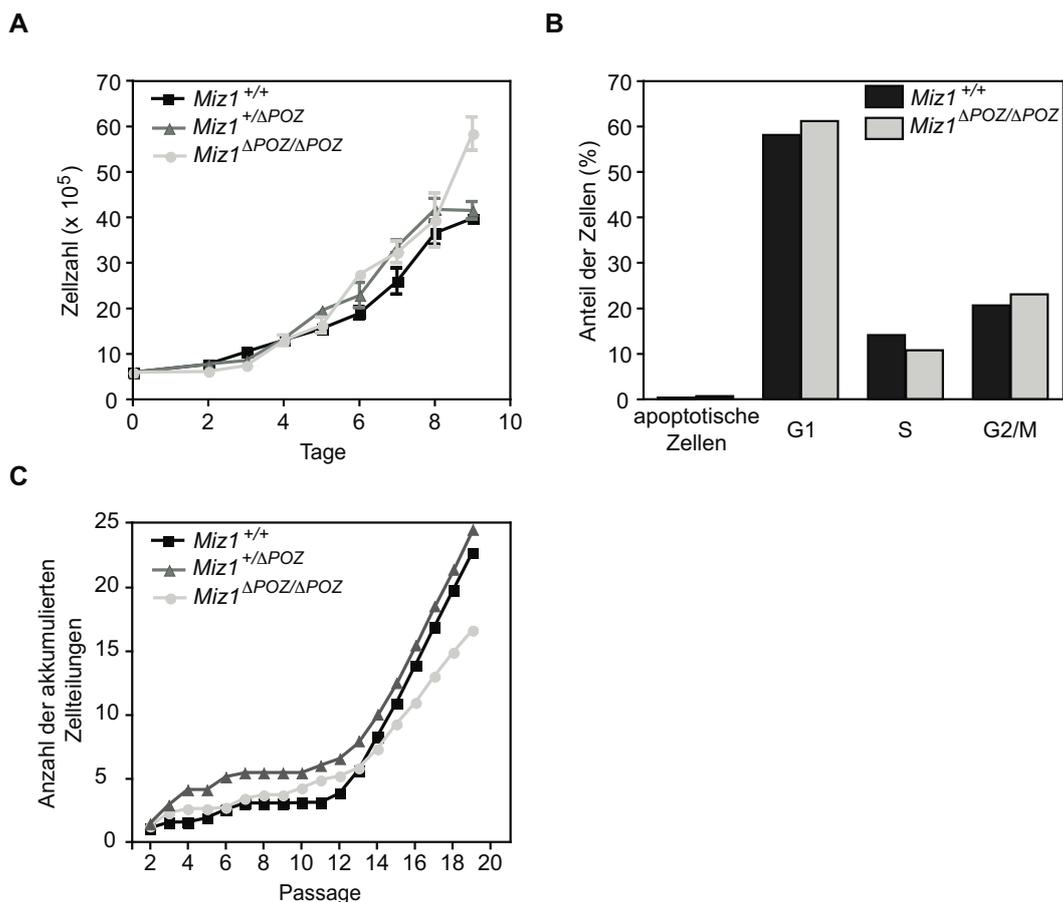
### 4.1.3 Die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 hat keinen Einfluss auf die Proliferation, Zellzyklusverteilung und spontane Immortalisierungsrate von MEFs

In früheren Analysen konnte Miz1 als Transkriptionsaktivator des Zellzyklusinhibitors p21Cip1 identifiziert werden (Herold et al., 2002), dessen erhöhte Expression zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus und damit zu einem Wachstumsarrest führt (Gartel et al., 1996). Da zudem die POZ-Domäne von Miz1 als Transaktivierungsdomäne beschrieben wurde (Herold et al., 2002; Peukert et al., 1997), wurde das Zellwachstum der in Abschnitt 4.1.2 bereits charakterisierten, primären *Miz1*<sup>+/+</sup>, *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> und *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> MEFs untersucht. Dabei zeigte die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 jedoch weder im hetero- noch im homozygoten Zustand eine erhöhte Proliferationsrate (Abb. 9A). Dieses Ergebnis konnte in zusätzlichen Experimenten mit weiteren MEF-Linien bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde im Folgenden die Zellzyklusverteilung der Wildtyp- und homozygot deletierten MEF-Zelllinie mittels Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie (PI-FACS) analysiert. Beide Zelllinien wiesen einen ähnlichen Anteil von Zellen in der G1-, S- bzw. G2/M-Phase des Zellzyklus sowie nahezu identische Werte an apoptotischen Zellen auf (Abb. 9B). Dieses Ergebnis einer unveränderten Zellzyklusverteilung ist konsistent mit dem vorher beschriebenen identischen Wachstumsverhalten der primären *Miz1*<sup>+/+</sup> und *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> MEFs.

Aufgrund des begrenzten Replikationspotentials konnte eine umfassende Analyse der primären *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> Zellen nicht durchgeführt werden. Dies erforderte daher die Etablierung immortaler Zelllinien der unterschiedlichen Genotypen. Bereits 1963 wurde von Todaro und Green gezeigt, dass eine spezielle Passagierungsmethode, das sogenannte 3T3 Protokoll, zur spontanen Immortalisierung von MEFs führt. Daher wurden mehrere primäre Kulturen der drei Genotypen für diesen Immortalisierungsprozess eingesetzt. Durch die in Abbildung 9C dargestellten kumulativen Zellteilungen repräsentativer Zelllinien war ersichtlich, dass *Miz1*<sup>+/+</sup>, *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> und *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> MEFs in den ersten zwölf Passagen eine sehr geringe Teilungsrate aufwiesen beziehungsweise während der sogenannten „Krise“ keine Zellteilungen mehr zu verzeichnen waren. Dagegen setzte in Zelllinien aller drei Genotypen parallel eine deutlich erhöhte Proliferation ab den Passagen 12/13 ein, was auf einer spontanen Immortalisierung beruhte.

Da das Eintreten der replikativen Seneszenz von MEFs in den Passagen 6 bis 8 auf eine erhöhte Expression des Tumorsuppressors p19Arf und auf den daraus resultierenden, irreversiblen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus zurückzuführen ist (Zindy et al., 1998), stellen der

Tumorsuppressor p53, der durch p19Arf stabilisiert und somit aktiviert wird, sowie p19Arf selbst die häufigsten Ziele spontan auftretender Mutationen dar (Kamijo et al., 1997; Zindy et al., 1997). Daher wurden in einem weiteren Experiment die Proteinmengen beider Tumorsuppressoren in den etablierten, immortalen Zelllinien analysiert (Abb. 10B). p19Arf konnte in den Zelllinien aller drei Genotypen detektiert werden, was einen Verlust des *INK4a/ARF* Genlokus während des Immortalisierungsprozesses ausschließt. Außerdem konnte durch UVB-Behandlung der Zellen ein Anstieg der p53-Proteinmengen in den drei Zelllinien beobachtet werden, wobei die Basalmengen in heterozygoten MEFs deutlich erhöht waren. Dies deutet auf eine funktionelle Inaktivierung von p53 in den *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> Zellen hin, da mutiertes p53 sein negatives Regulatorprotein Mdm2 nicht mehr transkriptionell induziert (Barak et al., 1993; Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Daher wurde diese Zelllinie in weiteren Analysen zur Funktionalität der DNA-Schadensantwort ausgeschlossen.



**Abb. 9: Die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 beeinflusst nicht das Wachstum von MEFs.** (A) Primäre MEFs mit den Genotypen *Miz1*<sup>+/+</sup>, *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> und *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> wurden in identischer Zellzahl ausplattiert und an acht aufeinanderfolgenden Tagen gezählt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei biologischen Replikaten pro Genotyp und Zeitpunkt.

(B) Die in (A) untersuchten Zellen wurden an Tag 4 fixiert und der DNA-Gehalt mittels PI-FACS bestimmt.

(C) Primäre Kulturen in Passage 1, die von Embryonen der Genotypen *Miz1*<sup>+/+</sup>, *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> und *Miz1*<sup>AP $\Delta$ POZ/AP $\Delta$ POZ</sup> abgeleitet wurden, wurden entsprechend einem 3T3 Protokoll kultiviert. Der Graph gibt die akkumulierte Anzahl der Zellteilungen wieder, die mit der Formel  $\text{Log}(N_f/N_i)/\text{Log}2$  berechnet wurden, wobei  $N_f$  und  $N_i$  der finalen bzw. initialen Zellzahl entsprechen.

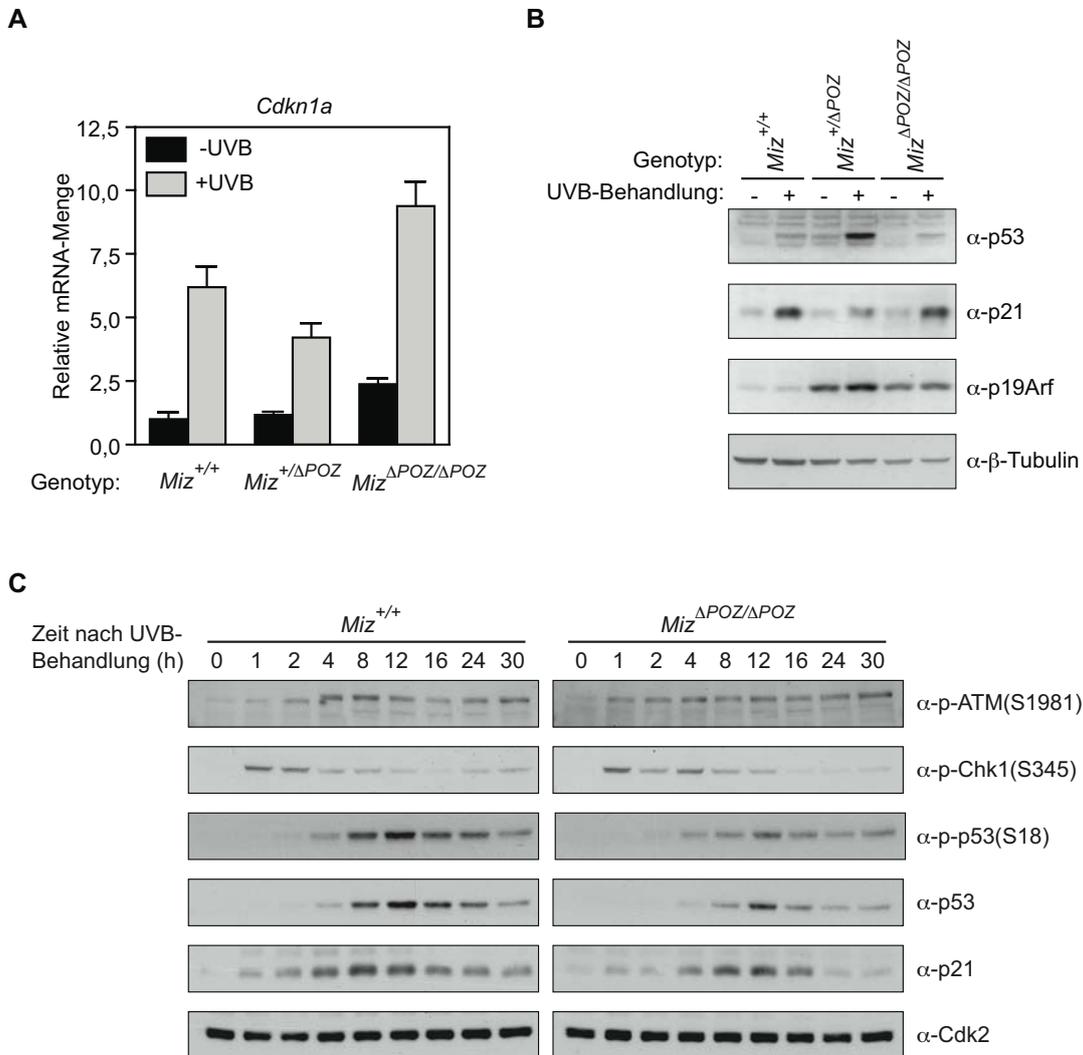
#### 4.1.4 Die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 beeinträchtigt nicht die Aktivierung der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort

Die in Abschnitt 4.1.3 beschriebenen immortalen MEFs wurden nun in Bezug auf die Funktionalität ihrer UVB-induzierten DNA-Schadensantwort analysiert. Das p53-Zielgen *Cdkn1a* (*p21Cip1*) spielt dabei eine Schlüsselrolle, da die Inhibition des CyclinE/Cdk2-Komplexes durch p21Cip1 nach DNA-Schaden zu einem G1-Arrest führt und damit die Zelle vor Apoptose schützt (Bissonnette und Hunting, 1998; el-Deiry et al., 1994; Harper et al., 1993). Es stellte sich jedoch die Frage, ob die POZ-Domäne als Transaktivierungsdomäne von Miz1 für die Induktion der *Cdkn1a* Expression nach Auslösen von DNA-Schäden in Form einer UVB-Behandlung in MEFs essentiell ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden die immortalen *Miz1*<sup>+/+</sup>, *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> und *Miz1*<sup>AP $\Delta$ POZ/AP $\Delta$ POZ</sup> MEFs mit UVB-Strahlung behandelt und mittels qRT-PCR sowie Immunoblot untersucht; als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen der entsprechenden Zelllinie. Die durch die UVB-Bestrahlung induzierte *Cdkn1a* Expression, die in Wildtyp MEFs zu beobachten war, wurde durch die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 nicht aufgehoben (Abb. 10A). Im Gegensatz dazu zeigte *Miz1*<sup>AP $\Delta$ POZ/AP $\Delta$ POZ</sup> MEFs im unbehandelten Zustand eine leicht erhöhte *Cdkn1a* Expression (mRNA), die durch UVB-Behandlung weiter gesteigert wurde. Auch auf Proteinebene konnte eine UVB-induzierte p21Cip1-Akkumulation in *Miz1*<sup>AP $\Delta$ POZ/AP $\Delta$ POZ</sup> MEFs beobachtet werden (Abb. 10B), was belegt, dass die POZ-Domäne von Miz1 für die Induktion der *Cdkn1a* Expression in MEFs nicht essentiell ist.

In den immortalen heterozygoten MEFs konnte eine leicht reduzierte *Cdkn1a* Expression nach UVB-Behandlung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dies war wahrscheinlich auf die in Abschnitt 4.1.3 beschriebene Mutation von *Tp53* zurückzuführen.

Zusätzlich zu p21Cip1 wurde im Folgenden die Induktion weiterer Mediatoren der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort in *Miz1*<sup>+/+</sup> und *Miz1*<sup>AP $\Delta$ POZ/AP $\Delta$ POZ</sup> MEFs in einem Zeitverlaufsexperiment analysiert. Abbildung 10C zeigt, dass nicht nur die Akkumulation von p21Cip1, sondern auch die zusätzlicher Komponenten dieser Signalkaskade wie

phosphoryliertem ATM, Chk1 und p53 von der Deletion der POZ-Domäne von Miz1 nicht blockiert wurde.



**Abb. 10: UVB-Behandlung führt in *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> MEFs zur Akkumulation von p21Cip1 und weiteren Zielproteinen der DNA-Schadensantwort.**

(A) Immortale *Miz1*<sup>+/+</sup>, *Miz1*<sup>+/ $\Delta$ POZ</sup> und *Miz1* <sup>$\Delta$ POZ/ $\Delta$ POZ</sup> MEFs wurden mit 250 J/m<sup>2</sup> UVB bestrahlt und nach 6 h die Expression von *Cdkn1a* (*Cdkn1a* kodiert p21Cip1) im Vergleich zu unbehandelten Proben untersucht. Die mRNA-Mengen wurden relativ zu *Rps16* dargestellt. Die relativen mRNA-Mengen wurden jeweils auf die unbehandelte Wildtyp-Probe bezogen.

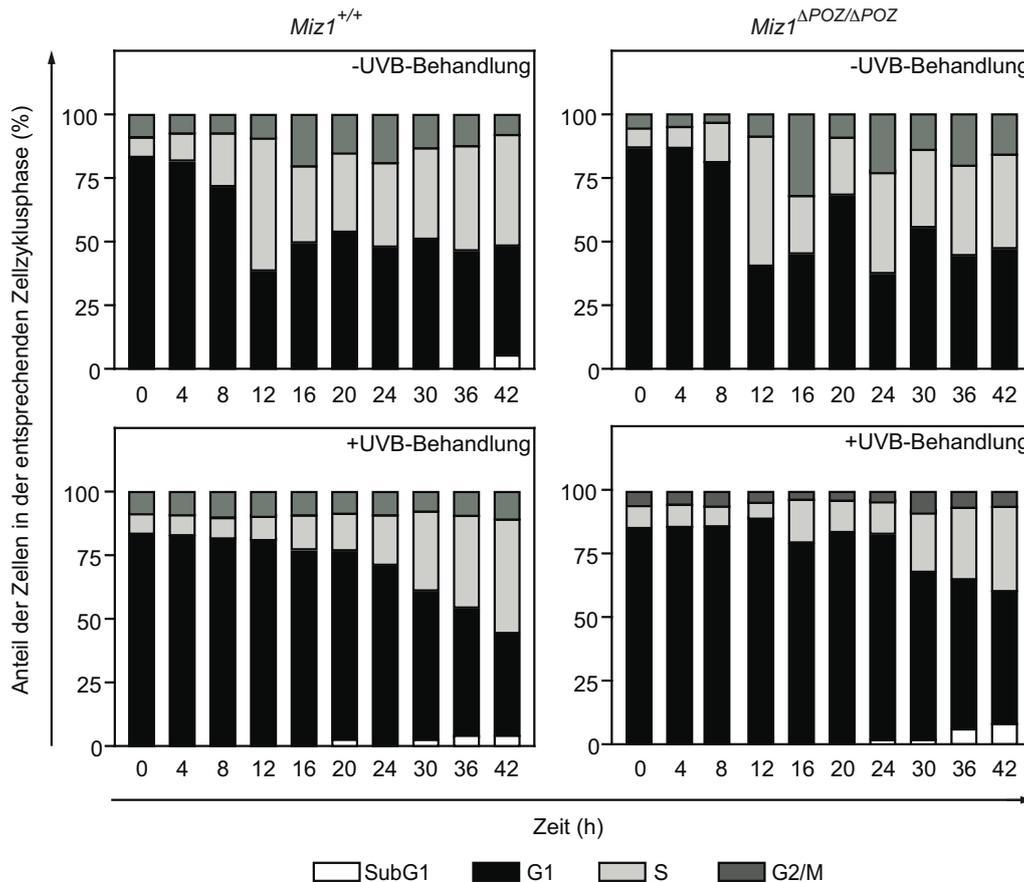
(B) Die in (A) beschriebenen Proben wurden mittels Immunoblot in Bezug auf die Akkumulation von p21Cip1 analysiert.  $\beta$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

(C) Die in (A) und (B) verwendeten Zelllinien wurden 250 J/m<sup>2</sup> UVB-Strahlung ausgesetzt, nach den aufgeführten Zeitpunkten Proteinlysate hergestellt und mittels Immunoblot die Akkumulation von p21, p53, phosphoryliertem ATM, Chk1 und p53 nachgewiesen. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

Um ausschließen zu können, dass dies auf eine Mutation während des Immortalisierungsprozesses zurückzuführen ist, wurde die UVB-induzierte Signalkaskade zudem in primären MEFs untersucht. Wie schon für die immortalen MEFs beobachtet werden konnte, ist die Akkumulation der analysierten Proteine auch in primären Zelllinien unabhängig von der Präsenz der POZ-Domäne von Miz1 (Daten nicht gezeigt). Minimale Unterschiede wie beispielsweise die leicht verzögerte p21Cip-Akkumulation in *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs bzw. die etwas verminderte Signalintensität waren jedoch durch die Analyse mehrerer Zelllinien der beiden Genotypen nicht reproduzierbar.

### **4.1.5 *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus nach DNA-Schaden**

In einem weiteren Experiment wurde der p21Cip1-vermittelte G1-Arrest nach UVB-Behandlung in *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs im Vergleich zu Wildtyp-MEFs analysiert. Um den Effekt zu verstärken, wurden asynchron proliferierende MEFs durch Kontaktinhibition für 48 h in der G1-Phase arretiert und anschließend subkonfluent auf Zellkulturschalen ausgesät. Sobald die Fibroblasten nach 4 h adhärent waren, wurden diese mit 250 J/m<sup>2</sup> UVB bestrahlt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten für eine PI-FACS-Analyse fixiert. Zu Beginn des Experimentes befanden sich etwa 80% der Zellen beider Genotypen in der G1-Phase (Abb. 11). Unbehandelte Zellen traten nach 8 bis 12 Stunden wieder in den Zellzyklus ein, bestrahlte Zellen dagegen deutlich verzögert nach 20 bis 30 Stunden. Ein Vergleich beider Genotypen zeigt jedoch, dass der Arrest der *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> nicht unterbunden sondern im Vergleich zu der Wildtyp-Zelllinie minimal verlängert war und somit auch unter diesen Bedingungen keine Beeinträchtigung eines p21Cip-abhängigen Prozesses durch das Fehlen der POZ-Domäne von Miz1 festgestellt werden konnte.



**Abb. 11: UVB-Bestrahlung immortaler *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs führt zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase.**

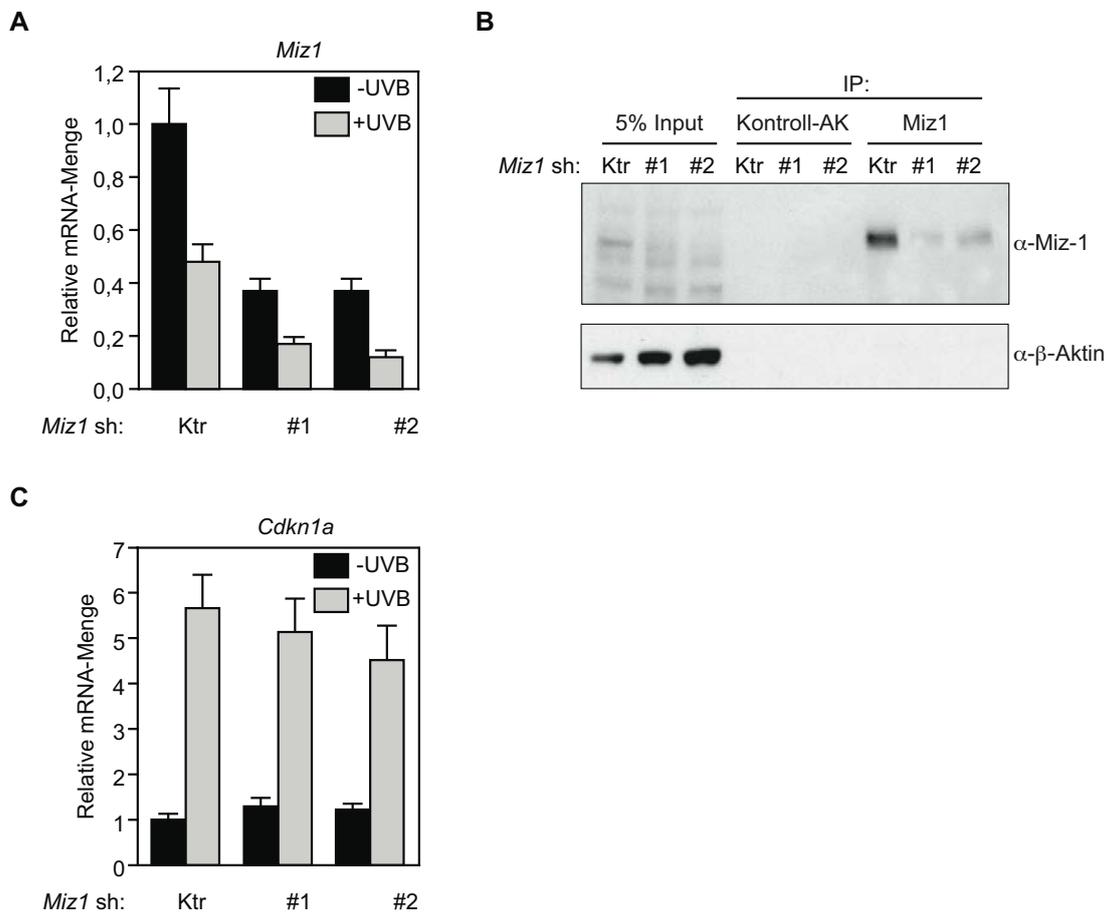
Immortale *Miz1*<sup>+/+</sup> und *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs wurden durch Dichtearrest für 48 h in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, subkonfluent ausgesät und 4 h später mit 250 J/m<sup>2</sup> UVB behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils die Zellen mit Zellkulturüberstand fixiert; unbestrahlte Zellen wurden parallel fixiert. Der DNA-Gehalt wurde anschließend durch PI-FACS bestimmt (Sub-G1 entspricht den apoptotischen Zellen).

#### 4.1.6 *Miz1* spielt keine essentielle Rolle während der UVB-induzierten

##### Expression von *Cdkn1a* in immortalen MEFs

Um eine essentielle Funktion des Transkriptionsfaktors *Miz1* während der Induktion der *Cdkn1a* Expression zu untersuchen, wurden immortale Wildtyp-MEFs mit Vektoren einer Kontroll-shRNA bzw. zwei *Miz1*-shRNAs (*short hairpin RNAs*) infiziert und selektiert. shRNAs werden durch zelluläre Enzyme in die aktiven siRNAs (*short interfering RNAs*) prozessiert. Die entscheidenden Kriterien für einen erfolgreichen Einsatz der Methode der RNA-Interferenz sind eine ausreichende Effizienz sowie die Spezifität des Abbaus der Ziel-mRNA. Dabei basierte die Optimierung der Funktionalität auf etablierten Kriterien zur Identifizierung geeigneter Zielsequenzen in der *Miz1*-mRNA (Reynolds et al., 2004). Nach

Abschluss der Selektion wurden Kontroll- und Miz1-depletierte Zellen mit UVB-Strahlung behandelt. Eine Analyse der *Miz1* mRNA- und Miz1-Proteinmengen zeigte eine deutliche Reduktion durch die gegen *Miz1* gerichteten shRNA-Vektoren (Abb. 12A und B). Zudem konnte wie bereits in vorangegangenen Studien (Herold et al., 2008) durch die Bestrahlung eine Reduktion der *Miz1* Expression festgestellt werden. Des Weiteren resultierte die Depletion von Miz1 lediglich in einer minimal schwächeren *Cdkn1a* Induktion im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 12C), wobei durch den Einsatz von zwei verschiedenen funktionellen shRNAs mit ähnlichen Effekten ein sequenzspezifischer Nebeneffekt der shRNAs (*off-target effect*) nahezu ausgeschlossen werden konnte. Eine Regulation der *Cdkn1a* Expression durch den Transkriptionsfaktor Miz1 konnte daher in immortalen, murinen embryonalen Fibroblasten nicht bestätigt werden.



**Abb. 12: Die shRNA-vermittelte Depletion von Miz1 beeinträchtigt nicht die UVB-induzierte *Cdkn1a* Expression in Wildtyp-MEFs.**

(A) Nach stabiler Infektion immortalen Wildtyp-MEFs mit Kontroll-sh (Ktr) bzw. *Miz1*-sh (#1 bzw. #2) wurden die relativen mRNA-Mengen von *Miz1* mit Hilfe einer qRT-PCR und Normalisierung auf *Rps16*

ermittelt. Verglichen wurden unbehandelte und UVB-bestrahlte Proben der drei Zelllinien (6 h nach 250 J/m<sup>2</sup>). Die relativen mRNA-Mengen wurden jeweils auf die unbehandelte Wildtyp-Probe bezogen.

(B) Die Miz1-Proteinmengen der in (A) beschriebenen, unbehandelten Zellen wurden mittels Immunpräzipitation mit dem Miz1-spezifischen Antikörper H190 bzw. einem unspezifischen Kontrollantikörper und anschließendem Immunoblot analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle.

(C) Die relativen mRNA-Mengen von *Cdkn1a* der in (A) eingesetzten Proben wurden in einer qRT-PCR bestimmt und auf *Rps16* normalisiert. Die relativen mRNA-Mengen wurden jeweils auf die unbehandelte Wildtyp-Probe bezogen.

## 4.2 Nicht-transkriptionelle Funktionen von Miz1 und c-Myc in der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort

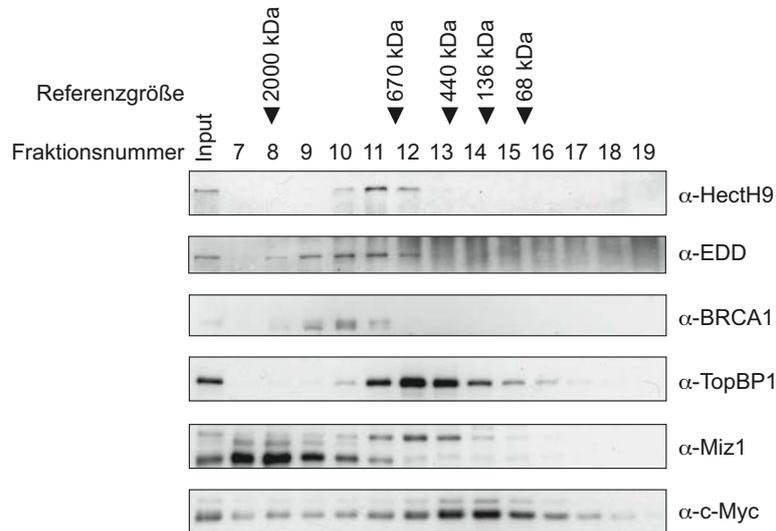
### 4.2.1 Identifikation neuer Interaktionspartner des Miz1/c-Myc-Netzwerks in Abhängigkeit von DNA-Schäden

In der Literatur wurde die Wechselwirkung zwischen Miz1 und TopBP1 (*topoisomerase II binding protein 1*) bisher als DNA-schadensabhängig beschrieben (Herold et al., 2002). In ungestressten Zellen konnte ein Komplex beider Proteine nachgewiesen werden, der durch die Behandlung mit UVB-Strahlung dissoziierte. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob durch Einführen von DNA-Schäden die Komplexbildung weiterer Komponenten des c-Myc/Miz1-Netzwerks beeinflusst wird. Ähnliches wurde bereits für den Tumorsuppressor BRCA1 (*breast cancer 1, early onset*) gezeigt (Greenberg et al., 2006). Das BARD1-BRCA1 Heterodimer bildete nach DNA-Schaden zwei distinkte Superkomplexe, die Mre11/Rad50/NBS1 (M/R/N) als Subkomplex bzw. TopBP1/BACH1 enthielten. Zudem konnten für beide Komplexe unterschiedliche Funktionen in der DNA-Schadensantwort identifiziert werden. Während der BRCA1-M/R/N-Komplex in die Kontrolle des G2/M-Kontrollpunktes involviert war, verhinderte der BRCA1-TopBP1/BACH1-Komplex die Strahlungs-resistente DNA-Synthese (*radiation-resistant DNA synthesis*, RDS) während des S-Phasen-Kontrollpunktes.

Zur Analyse der potentiellen Regulation der Komplexbildung von Miz1 und c-Myc wurde zunächst mit unbehandelten und UVB-bestrahlten Tumorzellen (2 bzw. 6 h) eine Gelfiltration durchgeführt und die einzelnen Fraktionen im Immunoblot untersucht (Abb. 13 und Daten nicht gezeigt). Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte über eine FPLC (*fast protein liquid chromatography*) mit konstanten Laufparametern und einer integrierten Detektion bei 280 nm. Neben Miz1 und c-Myc wurden dabei TopBP1, BRCA1, die Myc-aktivierende E3-Ubiquitin-Ligase HectH9 (Adhikary et al., 2005) sowie die E3-Ubiquitin-Ligase EDD nachgewiesen. EDD wurde in die Untersuchung miteinbezogen, da dieses Protein an der Regulation des S-Phasen- sowie G2/M-Kontrollpunktes beteiligt ist (Munoz et al., 2007) und Hinweise auf eine Reduktion der c-Myc-Stabilität durch EDD vorlagen (Maria Llamazares-Prada, persönliche Mitteilung).

TopBP1 und eine längere Isoform von Miz1 koeluierten in den Fraktionen 10 bis 15, während zwei kürzere Isoformen von Miz1 in den hochmolekularen Fraktionen 7 bis 10 migrierten (Abb. 13). c-Myc war in einem sehr breiten Fraktionsspektrum mit einem Maximum bei Fraktion 14 detektierbar. Die E3-Ubiquitin-Ligasen BRCA1, HectH9 und EDD konnten in überlappenden

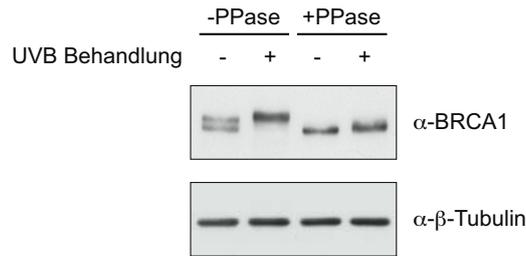
Fractionen im Bereich von 600 bis 2000 kDa nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Elutionsprofile von c-Myc, Miz1, TopBP1, EDD und HectH9 eine partielle Koelution mit BRCA1, was auf eine potentielle Interaktion dieser Proteine hindeuten könnte.



**Abb. 13: Miz1 und die Miz1-Interaktionspartner HectH9, TopBP1 und c-Myc sowie EDD sind in überlappenden Fraktionen einer Gelfiltration mit BRCA1 nachweisbar.**

Lysate von HeLa-Zellen wurden durch eine Gelfiltration mit einer analytischen Superose 6-Säule chromatographisch aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. Die Komplexgrößen der aufgeführten Proteine wurden durch Vergleich mit dem Elutionsprofil von Referenzproteinen (Dextranblau 2000 kDa, Thyroidglobulin 670 kDa, Ferritin 440kDa, Ovalbumin 136 kDa, BSA 68 kDa) bestimmt.

Da sich durch eine UVB-Behandlung der Zellen die Retentionszeiten der untersuchten Proteine nicht änderten, sind die Ergebnisse dieses Teils des Experiments nicht zusätzlich gezeigt. Ein Unterschied war jedoch in dem Laufverhalten von BRCA1 im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel festzustellen. Abbildung 14 zeigt, dass diese Änderung nach einer UVB-Bestrahlung auf die Phosphorylierung von BRCA1 zurückzuführen ist, da eine Phosphatasebehandlung diesen Effekt aufhob. Außerdem wurde BRCA1 bereits als Substrat der DNA-Schaden-aktivierten Kinasen ATM, ATR und Chk2 identifiziert (Cortez et al., 1999; Lee et al., 2000; Tibbetts et al., 2000).

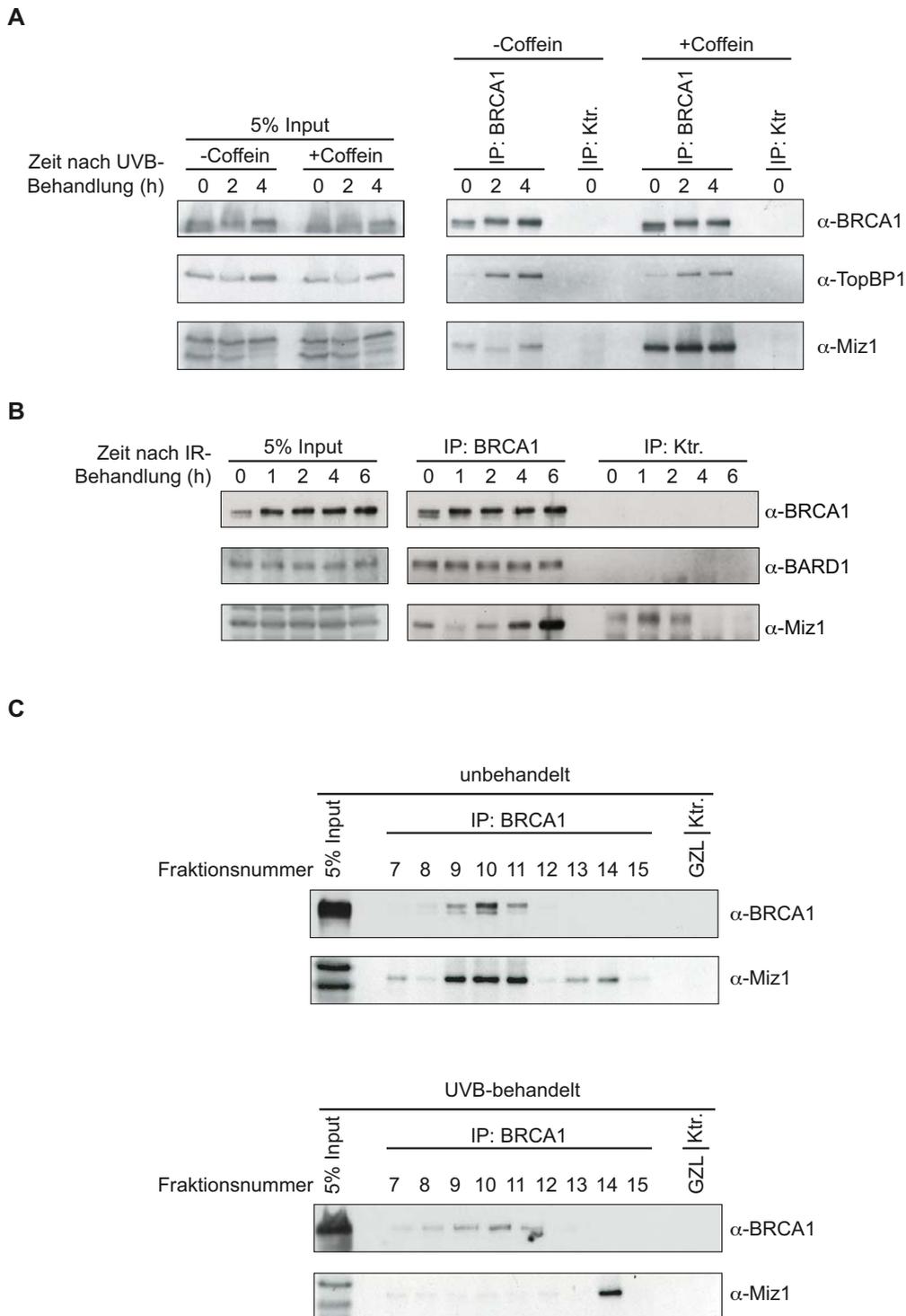


**Abb. 14: BRCA1 wird nach UVB-induzierte DNA-Schäden phosphoryliert.**

Lysate von proliferierenden und bestrahlten HeLa-Zellen ( $250 \text{ J/m}^2$  UVB, nach 2 h geerntet) wurden für 1 h mit 20 U alkalischer Phosphatase (PPase) inkubiert und anschließend das Laufverhalten von BRCA1 mittels Immunoblot analysiert.  $\beta$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Im Folgenden wurden potentielle Wechselwirkungen der in Abbildung 13 aufgeführten Proteine mittels endogener Koimmunpräzipitation untersucht, wobei die bereits beschriebene, Schadens-induzierte Interaktion zwischen BRCA1 und TopBP1 verifiziert werden konnte (Greenberg et al., 2006) (Abb. 15A). Durch Einsatz des BRCA1-Antikörpers zur Immunpräzipitation konnte außerdem Miz1 in dem Eluat nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur BRCA1/TopBP1-Wechselwirkung wurde diese Interaktion allerdings nicht durch DNA-Schaden induziert, sondern konnte schon in unbehandelten Proben beobachtet werden. Zwei Stunden nach UVB-Behandlung war die Interaktion leicht reduziert, nach vier Stunden jedoch wieder unverändert detektierbar. Um eindeutig zu belegen, dass es sich dabei um eine Schadens-abhängige Regulation handelt, wurde die Immunpräzipitation zudem mit Proben durchgeführt, die ionisierender Strahlung ausgesetzt waren. Unter diesen Bedingungen wäre eine Verstärkung des beobachteten Effekts zu erwarten, da dieser genotoxische Stress einen der Hauptauslöser der BRCA1-abhängigen DNA-Schadensantwort darstellt (Okada und Ouchi, 2003). Das in Abbildung 15B dargestellte Experiment bestätigte diese Vermutung. Während in unbehandelten Proben eine eindeutige Miz1/BRCA1-Interaktion nachweisbar war, dissoziierte der Komplex zu Beginn der DNA-Schadensantwort und wurde im weiteren Zeitverlauf neu ausgebildet. Die Wechselwirkung mit dem BRCA1-Interaktionspartner BARD1 blieb dagegen unverändert. Aufgrund der beschriebenen Regulation der Miz1/BRCA1-Interaktion könnte die Inhibition der BRCA1-Aktivatoren ATM und ATR durch den *PI3 kinase*- und *PI3-kinase-like*-Inhibitor Coffein zur Stabilisierung dieser Wechselwirkung führen. Durch eine Immunpräzipitation von BRCA1 konnte diese Annahme bestätigt werden, da durch eine Coffein-Behandlung die präzipitierte Menge von Miz1 in unbestrahlten Zellen deutlich erhöht und zudem im weiteren Zeitverlauf nicht reguliert war (Abb. 15A). Allerdings konnte durch das veränderte Laufverhalten trotz Coffeinbehandlung eine Phosphorylierung von BRCA1 beobachtet werden. Diese Ergebnisse wiesen somit darauf hin, dass die Bindung von Miz1 an BRCA1 durch dessen

ATM/ATR-abhängige Phosphorylierung inhibiert wird, von der Coffein-resistenten Phosphorylierung beispielsweise durch Chk2 jedoch nicht beeinträchtigt wird.



**Abb. 15: Identifikation von BRCA1 als neuen Interaktionspartner von Miz1.**

(A) Eine Immunpräzipitation endogener Proteine wurde in unbehandelten und UVB-bestrahlten HeLa-Zellen ( $250 \text{ J/m}^2$ , nach 2 bzw. 4 h geerntet) durchgeführt, die für 1 h mit 5 mM Coffein bzw. einer Lösungsmittelkontrolle präinkubiert wurden. Die Spezifität der Interaktion wurde durch Präzipitation der

unbestrahlten Lysate mit einem Kontroll-Antikörper bestätigt. Zur Einschätzung der IP-Effizienz wurden 5% des verwendeten Lysats (Input) aufgetragen.

(B) Die Regulation der Miz1/BRCA1-Interaktion wurde in unbehandelten und IR (*ionizing radiation*, 3 Gy)-behandelten HeLa-Zellen untersucht. Eingesetzt wurde ein BRCA1-spezifischer bzw. unspezifischer Kontroll-Antikörper. 5% des verwendeten Lysats (Input) wurden zum Mengenvergleich aufgetragen.

(C) Lysate von unbehandelten und UVB-behandelten HeLa-Zellen (250 J/m<sup>2</sup>, nach 2 h geerntet) wurden unter Verwendung einer präparativen Superose 6-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden im Anschluss durch eine BRCA1-IP auf die Präsenz eines BRCA1/Miz1-Komplexes untersucht. Die Spezifität der Interaktion wurde durch Präzipitation des Gesamtzelllysates (GZL) mit einem Kontroll-Antikörper bestätigt. Die Komplexgrößen der aufgeführten Proteine wurden durch Vergleich mit dem Elutionsprofil von Referenzproteinen (Dextranblau 2000 kDa, Thyroglobulin 670 kDa, Ferritin 440 kDa, IgG 150 kDa, BSA 68 kDa) bestimmt.

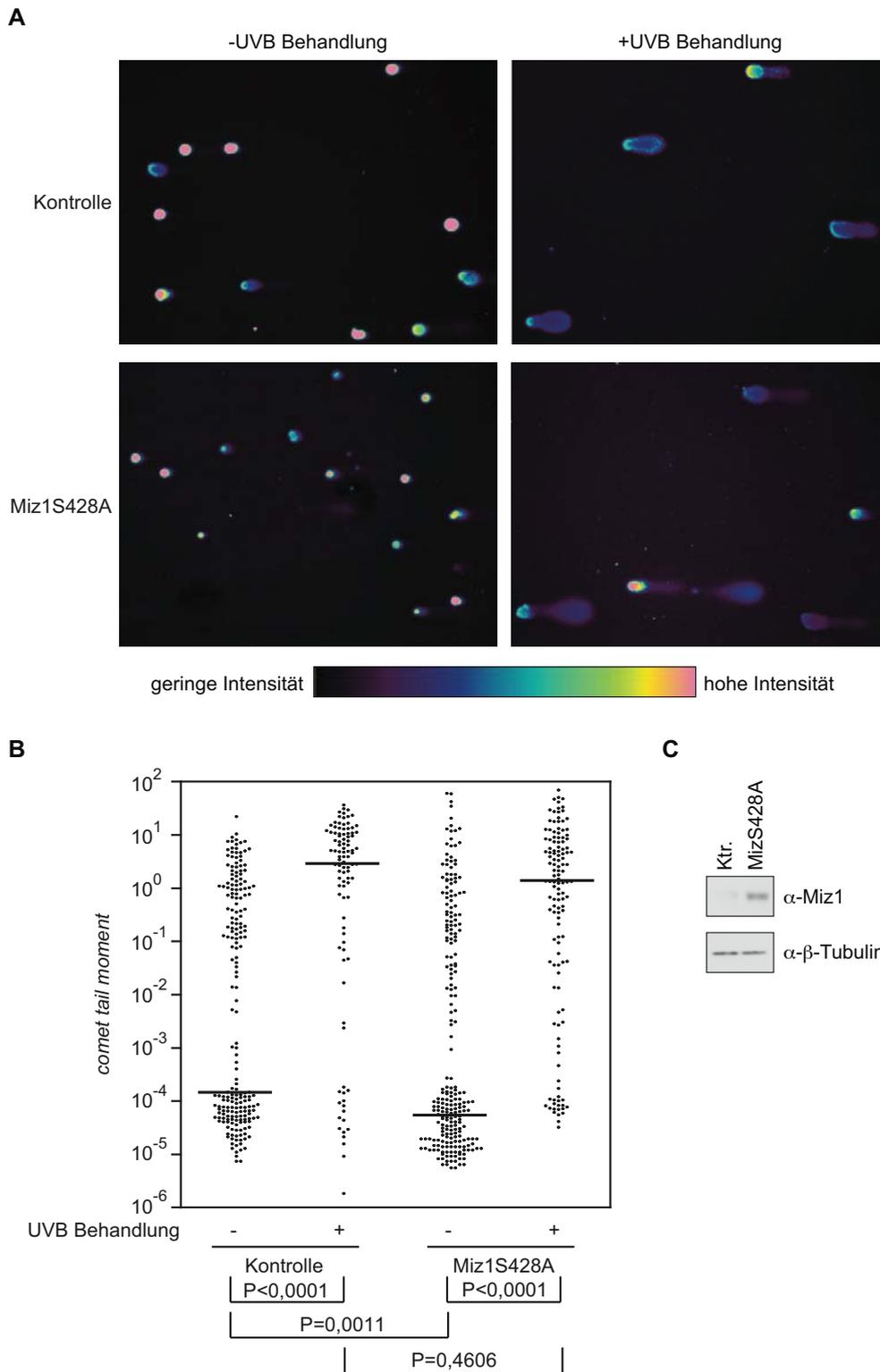
Um nähere Informationen bezüglich der Zusammensetzung des Miz1/BRCA1-Komplexes zu erhalten, wurde im Anschluss an eine Gelfiltration eine BRCA1-Immunpräzipitation durchgeführt und die Eluate der einzelnen Fraktionen auf die Präsenz von Miz1 überprüft. In unbehandelten Zellen konnten BRCA1 (210 kDa) und Miz1 (100 kDa) im Bereich von 1400 bis 700 kDa (Fraktionen 9 bis 11) nachgewiesen werden, was auf eine weitere, bisher unbekannte Komponente des Komplexes hinweist (Abb. 15C). Eine UVB-Bestrahlung reprimierte die Komplexformation vollständig, was die bereits beschriebenen Daten bestätigte. Zusätzlich konnte unter beiden Bedingungen in dem Größenbereich von 400 bis 100 kDa (Fraktionen 13/14) ein Signal durch den Miz1-Antikörper detektiert werden, obwohl BRCA1 nicht nachweisbar war. Dies könnte beispielsweise auf die Präzipitation von Miz1 durch eine kürzere Splicevariante von BRCA1 zurückzuführen sein (Orban und Olah, 2003).

Weitere Interaktionen konnten zwischen TopBP1/EDD und c-Myc/EDD nachgewiesen werden, wobei diese jedoch keiner Regulation durch die UVB-induzierte DNA-Schadensantwort unterlagen (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurden potentielle Wechselwirkungen mit HectH9 analysiert, die kein positives Resultat ergaben (Daten nicht gezeigt).

### **4.2.2 Die Aktivierung der ATR-abhängigen Signaltransduktion durch Miz1 basiert nicht auf der Einführung von DNA-Schäden**

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression der konstitutiv aktiven Mutante von Miz1, Miz1S428A, die nicht mehr der Regulation durch Akt unterliegt, zur Aktivierung der ATR-abhängigen Signaltransduktion und damit verbunden zu einem verlängerten G1- und G2/M-Arrest während der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort führt (Herold et al., 2008). Die Aktivierung dieser Signalkaskade durch Miz1, die auch in Abwesenheit von genotoxischem Stress zu beobachten war, könnte auf einer erhöhten Rate an

DNA-Schäden beruhen, die wiederum beispielsweise durch Produktion reaktiver Sauerstoffspezies oder Inhibition der DNA-Reparatur hervorgerufen werden könnte. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Miz1S428A-exprimierende Kolonkarzinomzellen bzw. die entsprechenden Kontrollzellen in einem alkalischen *Comet Assay* analysiert, der die Detektion von DNA-Schädigungen einzelner Zellen ermöglicht. Diese Analysemethode basiert auf der alkalischen Entwindung der doppelsträngigen DNA und deren anschließender elektrophoretischer Auftrennung. Liegen DNA-Schädigungen in Form von Strangbrüchen vor, bewegen sich diese Fragmente im elektrischen Feld und können durch einen Fluoreszenzfarbstoff wie SYBR<sup>®</sup> Green I als Schweif visualisiert werden (siehe Abschnitt 3.2.10). Anhand dieser Untersuchung konnte keine Verstärkung der Kometenbildung durch erhöhte Miz1-Mengen detektiert werden (Abb. 16A, C). Eine Quantifizierung des Ausmaßes der vorliegenden DNA-Schäden durch das *Comet Tail Moment*, welches auf der Schweiflänge und dessen Signalintensität basiert, bestätigte dies und ergab im Gegensatz dazu eine signifikante Reduktion der DNA-Schäden in Miz1S428A-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 16B). Die Behandlung beider Zelllinien mit UVB-Strahlung führte allerdings zur Bildung von Kometenschweif, was eine Akkumulation von DNA-Strangbrüchen widerspiegelt und die Funktionalität des Experimentes belegt. Diese Ergebnisse zeigen somit eindeutig, dass Miz1 nicht DNA-Schäden induziert sondern lediglich die ATR-Signalkaskade aktiviert.



**Abb. 16: Die Aktivierung der ATR-Signalkaskade durch Miz1S428A ist nicht auf die Bildung von DNA-Strangbrüchen zurückzuführen.**

(A) Kontroll- und Ls174T/Miz1S428A-Zellen wurden vor und 12 h nach UVB-Exposition ( $250 \text{ J/m}^2$ ) mit Hilfe eines alkalischen *Comet Assays* auf das Vorliegen von DNA-Strangbrüchen untersucht. Die Visualisierung der DNA-Färbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines

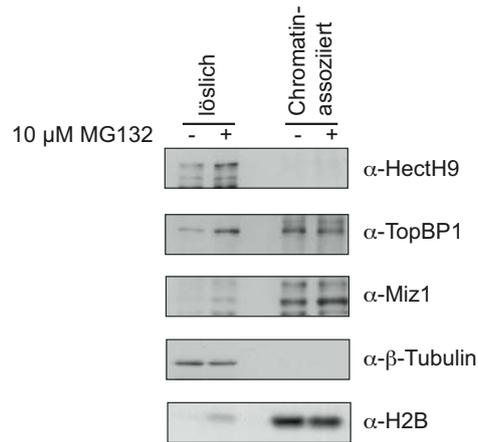
Fluoreszeinfiltern. Dabei repräsentiert die Farbschattierung die Intensität der DNA-Färbung (siehe Farbskala). Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte jeder Zellpopulation.

(B) Quantifizierung der vorliegenden DNA-Schäden anhand des *Comet Tail Moment* mittels der Software Cometscore15. Die Berechnung des *Comet Tail Moment* beruht auf der Formel „Schweiflänge x (Anteil der DNA im Schweif %/100)“. Die statistische Analyse von jeweils 200 Zellen erfolgte durch einen *Wilcoxon rank-sum*-Test.

(C) Die Proteinmengen von Miz1S428A der in (A) bzw. (B) verwendeten stabilen Zelllinien wurden in einem Immunoblot nachgewiesen.  $\beta$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

### **4.2.3 Lösliches TopBP1 unterliegt einer proteasomalen Degradation**

Die bereits beschriebene Aktivierung der ATR-abhängigen Signaltransduktion durch Miz1 war auf eine post-transkriptionelle Stabilisierung von TopBP1 zurückzuführen (Herold et al., 2008). Dies wurde durch siRNA-vermittelte Depletion von Miz1 bestätigt, da TopBP1 unter diesen Bedingungen destabilisiert und die UVB-induzierte DNA-Schadensantwort in Form der Phosphorylierung von Chk1 und p53 vollständig reprimiert wurde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Stabilisierung von TopBP1 durch Miz1 auf der Rekrutierung von TopBP1 zum Chromatin basierte. Da Miz1 in früheren Arbeiten als Antagonist der HectH9-vermittelten Ubiquitinierung von c-Myc beschrieben wurde (Adhikary et al., 2005), könnte auch der hierbei zugrundeliegende Mechanismus in dem Schutz vor HectH9-induziertem proteasomalem Abbau bestehen. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden humane B-Zellen mit dem Proteasominhibitor MG132 bzw. einer Lösungsmittelkontrolle inkubiert, in lösliche und Chromatin-assoziierte Fraktionen aufgetrennt und mittels Immunoblot analysiert. In unbehandelten Zellen wurde TopBP1 fast ausschließlich in der Chromatin-gebundenen Fraktion detektiert, was frühere Beobachtungen bestätigte (Van Hatten et al., 2002) (Abb. 17). Die Inkubation mit MG132 führte zur Akkumulation von TopBP1 in der löslichen Fraktion, während kein Effekt auf das Chromatin-assoziierte Protein auftrat. Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass lösliches TopBP1 einer proteasomalen Degradation unterliegt. Außerdem wies die beobachtete Lokalisation von HectH9 in der löslichen Fraktion auf eine mögliche Beteiligung dieser E3-Ubiquitinligase hin. Die Akkumulation von HectH9 durch die Behandlung mit dem Proteasominhibitor in der löslichen Fraktion stimmt mit Berichten einer Autoubiquitinierung dieser E3-Ligase überein (Chen et al., 2005).



**Abb. 17: Die Inhibition des Proteasoms führt zur Stabilisierung von löslichem TopBP1.**

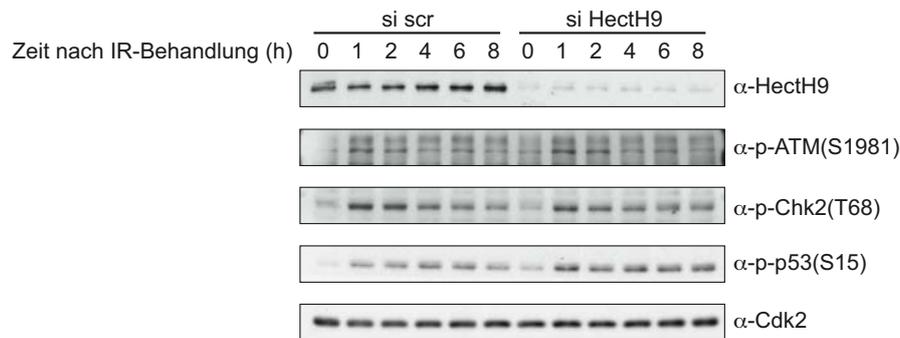
P493-6-Zellen wurden 10 h mit 10 µM MG132 bzw. einer Lösungsmittelkontrolle inkubiert, anschließend fraktioniert und mittels Immunoblot analysiert. β-Tubulin und H2B dienten als Ladungskontrolle und Marker für die lösliche bzw. Chromatin-assoziierte Fraktion.

#### 4.2.4 HectH9 reguliert spezifisch die ATR-induzierte DNA-Schadensantwort

Aus der Literatur war bekannt, dass TopBP1 nach UVB-Behandlung von Miz1 dissoziiert und daraufhin degradiert wird (Herold et al., 2002; Herold et al., 2008). Zudem konnte eine Ubiquitinierung und die daraus resultierende Destabilisierung von TopBP1 durch HectH9 nachgewiesen werden. Eine weitere E3-Ligase, BRCA1/BARD1, deren Interaktion sowohl mit Miz1 als auch mit TopBP1 in Abhängigkeit von DNA-Schäden bereits beschrieben wurde (Abschnitt 4.2.1), hatte dagegen keinen Einfluss auf die Stabilität von TopBP1. Des Weiteren konnte durch die shRNA-vermittelte Depletion von HectH9 in Kombination mit UVB-Behandlung eine direkte Rolle von HectH9 in der Regulation der ATR-abhängigen Signalkaskade gezeigt werden. Unter diesen Bedingungen wurde die transiente Abnahme der TopBP1-Proteinmengen blockiert und dadurch die DNA-Schadens-induzierte Signalkaskade nach erfolgreicher Reparatur nicht abgeschaltet. Dies konnte aus der fehlenden Dephosphorylierung von p53 und ATM geschlossen werden (Herold et al., 2008).

Diese Resultate führten zu der Frage, ob HectH9 eine generelle Rolle nach Auftreten von DNA-Schäden zukommt oder ob dessen Funktion spezifisch für die ATR-abhängige Signaltransduktion nach Einzelstrangbrüchen ist. Deshalb wurden Kontroll- und HectH9-depletierte Zellen ionisierender Strahlung ausgesetzt, die DNA-Doppelstrangbrüche hervorruft und somit die ATM-abhängige DNA-Schadensantwort aktiviert. Allerdings konnte keine Veränderung des Zeitverlaufs der Phosphorylierung von ATM selbst und des ATM-Zielproteins Chk2 durch die Depletion von HectH9 beobachtet werden (Abb. 18). Lediglich die detektierten

Mengen von phosphoryliertem p53(Ser15) waren etwas erhöht, da p53 ein Substrat der E3-Ligase HectH9 darstellt (Chen et al., 2005). Diese Daten belegen, dass HectH9 eine spezifische Rolle in der Regulation der ATR-abhängigen Signalkaskade bei Vorliegen von DNA-Einzelstrangbrüchen zukommt.

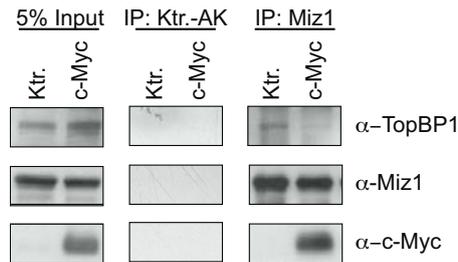


**Abb. 18: HectH9 reguliert nicht die ATM-induzierte DNA-Schadensantwort nach Doppelstrangbrüchen.**

Ls174T-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA bzw. einer Kombination von vier siRNAs gegen HectH9 transfiziert und nach 48 h 3 Gy ionisierender Strahlung (IR) ausgesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und mittels Immunoblot analysiert. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

#### 4.2.5 c-Myc antagonisiert die Stabilisierung von TopBP1 durch Miz1

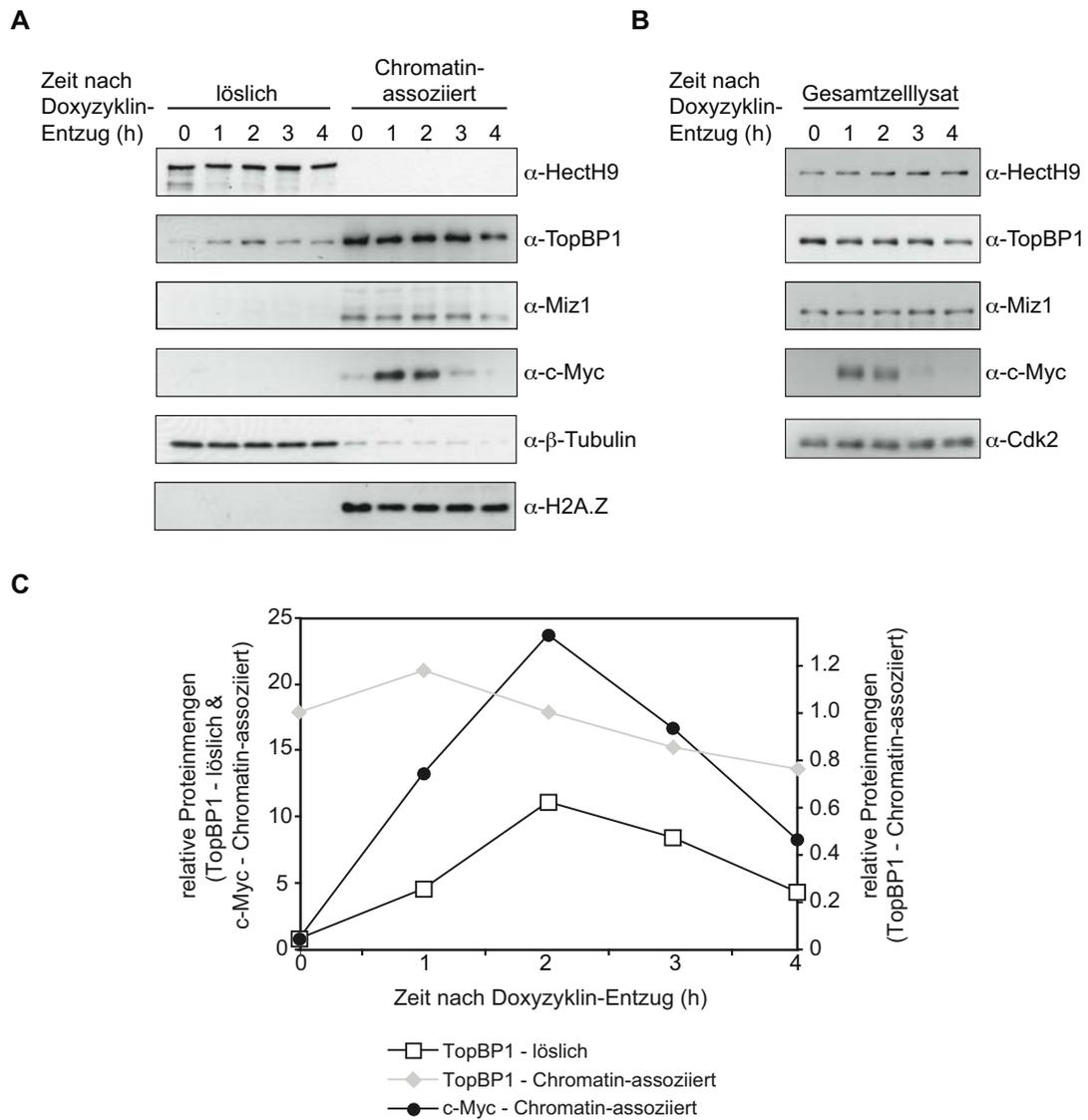
Die Änderung der subzellulären Lokalisation von TopBP1 durch Miz1 verhindert dessen HectH9-abhängige Ubiquitinierung und die daraus resultierende proteasomale Degradation, die im Nukleoplasma stattfindet. Zur Untersuchung einer potentiellen Rolle von c-Myc in diesem Regulationsprozess wurde zunächst der Einfluss von c-Myc auf die Miz1/TopBP1-Interaktion überprüft. Daher wurde eine Immunpräzipitation mit HeLa-Zellen durchgeführt, die mit einem Kontroll- bzw. c-Myc-exprimierendem Plasmid transfiziert wurden. Durch den Einsatz eines Miz1-spezifischen Antikörpers war die Wechselwirkung von endogenem Miz1 und TopBP1 in HeLa-Zellen zu erkennen, während die Expression von *MYC* dies blockierte (Abb. 19). Dies äußerte sich durch das fehlende TopBP1-Signal in den Miz1-Präzipitaten *MYC*-exprimierender Zellen. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch die Interaktion des endogenen Miz1-Proteins mit c-Myc gezeigt werden. Außerdem konnten in weiteren Experimenten keine Interaktionen zwischen c-Myc und TopBP1 nachgewiesen werden, was die Präsenz von zwei sich gegenseitig ausschließenden Miz1-Komplexen unterstreicht (Herold et al., 2008).



**Abb. 19: c-Myc antagonisiert die Bindung von TopBP1 an Miz1.**

HeLa-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor bzw. einem Vektor zur Expression von *MYC* transient transfiziert und 48 h später lysiert. Die Lysate wurden mit einem Miz1-spezifischen Antikörper bzw. einem unspezifischen Kontroll-Antikörper präzipitiert und anschließend im Immunoblot analysiert. 5% des verwendeten Lysats (Input) wurden zum Mengenvergleich aufgetragen.

Unter Voraussetzung dieser kompetitiven Bindung von c-Myc und TopBP1 an Miz1 wäre daher eine Freisetzung von TopBP1 vom Chromatin durch erhöhte c-Myc-Mengen zu erwarten. Um diese Annahme in einem Fraktionierungsexperiment zu bestätigen, wurde die humane B-Zelllinie P493-6 gewählt, die ein exogenes *MYC* Allel unter der transkriptionellen Kontrolle eines Tetrazyklin-reprimierten Promotors exprimiert (Pajic et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001; Schuhmacher et al., 1999). Wurde die Behandlung der Zellen mit 0,1 µg/ml des Tetrazyklinanalogons Doxyzyklin nach dreitägiger Inkubation der Zellen eingestellt, konnte eine Induktion des exogenen *MYC* Allels innerhalb einer Stunde auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 20). Die Fraktionierung in lösliche und Chromatin-assoziierte Proteine zeigte zu Beginn des Experimentes eine nahezu vollständige Assoziation von TopBP1 mit der DNA (Abb. 20A und C). Im weiteren Zeitverlauf führte die Induktion von *MYC* zu einer transienten Akkumulation von löslichem TopBP1 und einem anschließenden Rückgang der Gesamtmengen von TopBP1 (Abb. 20A, B und C). Durch die zusätzliche Analyse von β-Tubulin und H2A.Z als Markerproteine für die lösliche bzw. Chromatin-assoziierte Fraktion konnte eine Kontamination ausgeschlossen werden. Zudem blieben sowohl die Mengen als auch die Chromatin-assoziierte bzw. lösliche Lokalisation von Miz1 bzw. HectH9 von der *MYC* Expression unbeeinflusst, was die Spezifität dieses Mechanismus belegt.



**Abb. 20: Die Induktion der MYC Expression führt zur Freisetzung von TopBP1 vom Chromatin.**

(A) P493-6-Zellen wurden drei Tage in Doxyzyklin-haltigem Medium (0,1  $\mu$ g/ml) kultiviert und zu Beginn des Experiments in Doxyzyklin-freies Medium transferiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, in lösliche und Chromatin-assozierte Proteine fraktioniert und mittels Immunoblot analysiert.  $\beta$ -Tubulin und H2A.Z dienten als Ladungskontrolle und Marker für die lösliche bzw. Chromatin-assozierte Fraktion.

(B) Die in (A) verwendeten Proben wurden zudem als Gesamtzelllysate im Immunoblot analysiert. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

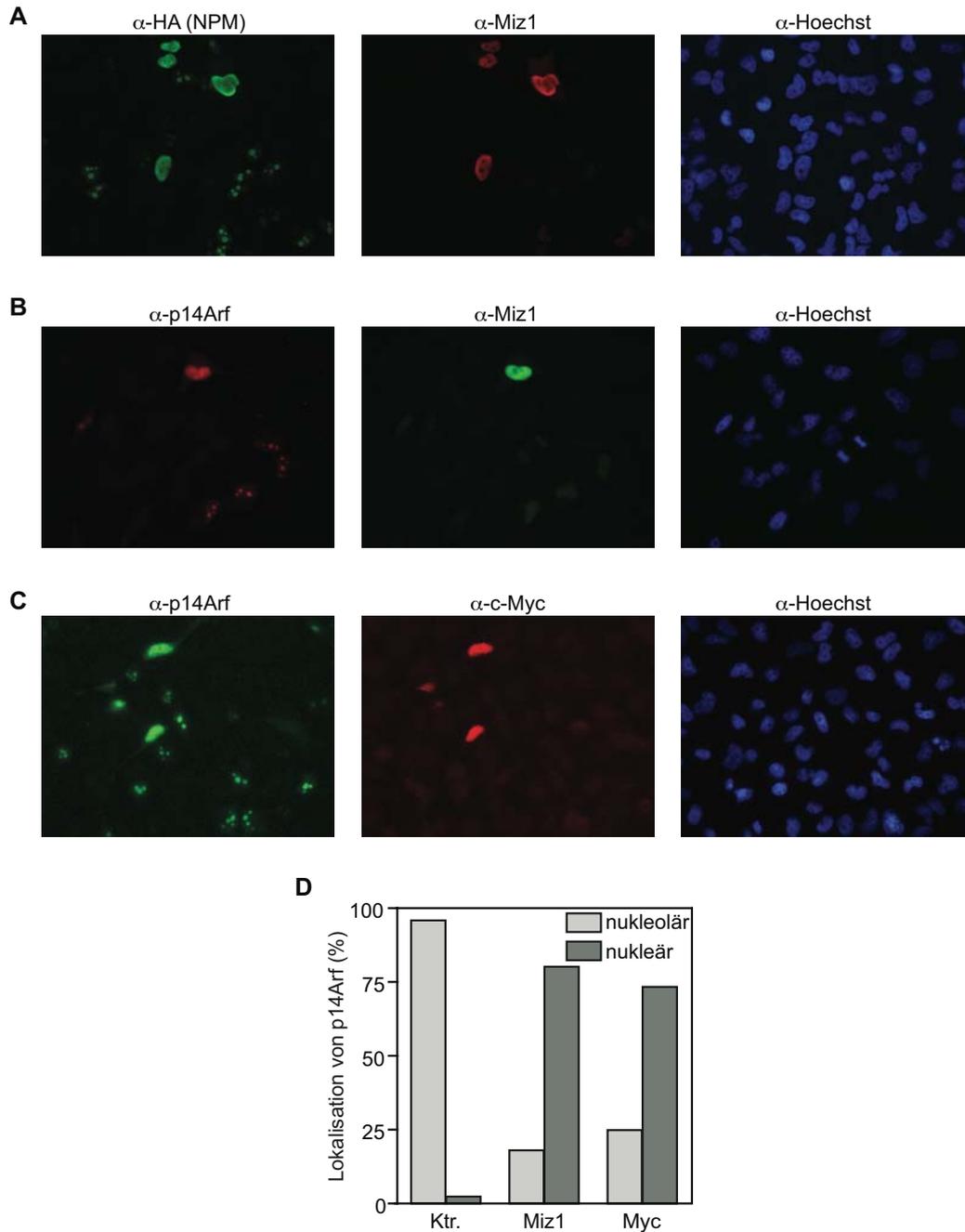
(C) Quantifizierung der c-Myc- und TopBP1-Proteinmengen. Gezeigt sind die mittleren Änderungen der Proteinmengen aus zwei unabhängigen Experimenten.

### 4.3 Der Tumorsuppressor Arf antagonisiert die Funktion von Miz1

#### 4.3.1 Arf interagiert mit Miz1 im Nukleoplasma

In früheren Arbeiten konnte das hauptsächlich nukleolär vorliegende Protein Nukleophosmin (NPM) als aktivierender Cofaktor von Miz1 identifiziert werden (Wanzel et al., 2008). In ungestressten Zellen pendelt Nukleophosmin zwischen den Nukleoli, dem Nukleoplasma und Cytoplasma (Maggi et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Stress beispielsweise in Form von DNA-Schaden als auch die Expression von *MIZ1* das dynamische Gleichgewicht der NPM-Verteilung stört und zur Relokalisierung von NPM aus den Nukleoli in das Nukleoplasma führen (Abb. 21A, Wanzel et al., 2008).

Da ein großer Anteil des Tumorsuppressors Arf in einem nukleolären Komplex mit Nukleophosmin vorliegt (Bertwistle et al., 2004; Lindström und Zhang, 2006), wurde mittels einer immunzytochemischen Färbung von Arf analysiert, ob Miz1 auch die Relokalisierung des Interaktionspartners von NPM in das Nukleoplasma bewirkt. Tatsächlich konnte durch die Expression von *MIZ1* auch für p14Arf in mehr als 75% der Zellen eine Rekrutierung in das Nukleoplasma beobachtet werden (Abb. 21B und D). Zudem trat eine Veränderung der subnukleären Verteilung von Miz1 in etwa 50% der Arf-positiven Zellen auf. Statt einer typischen homogenen Kernfärbung konnte Miz1 mittels konfokaler Mikroskopie in distinkten, subnukleären Foci detektiert werden (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus konnte die bereits von Qi und Kollegen beschriebene Relokalisierung von Arf durch c-Myc bestätigt werden (Qi et al., 2004) (Abb. 21C und D), die mit einer Kolokalisierung von c-Myc und Miz1 in subnukleären Strukturen einhergeht (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung).



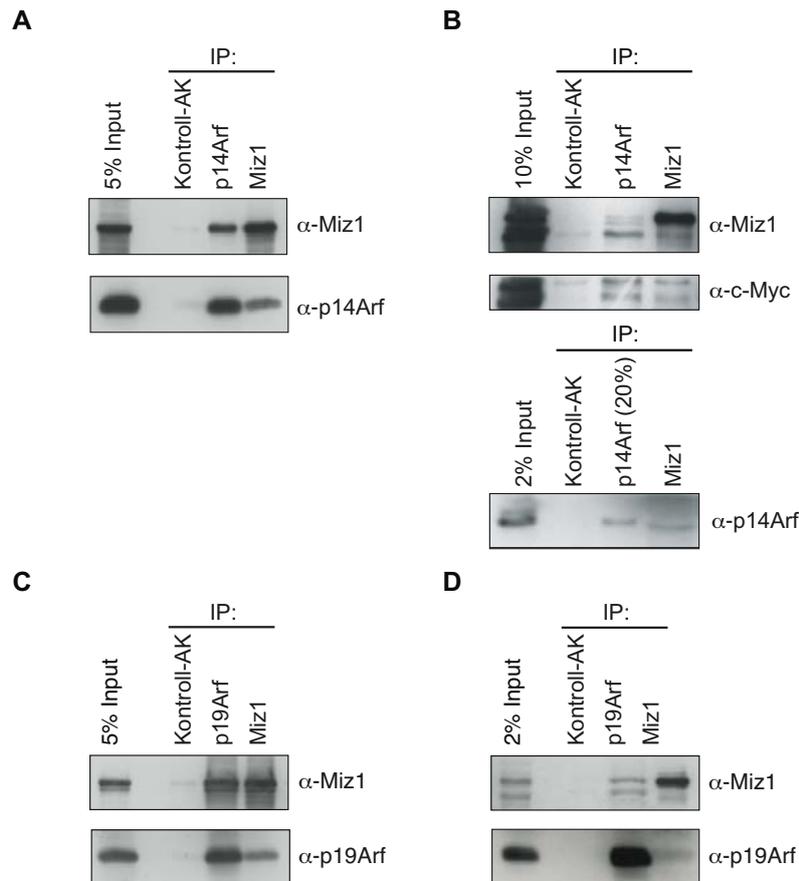
**Abb. 21: Die Expression von *MIZ1* und *MYC* führt zur Relokalisierung von NPM und p14Arf aus den Nucleoli in das Nucleoplasma.**

(A)–(C) HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit Expressionsplasmiden für NPM und Miz1 (A), p14Arf und Miz1 (B) bzw. p14Arf und c-Myc (C) kotransfiziert und 48 h später fixiert. Die Lokalisation der Proteine wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung der entsprechenden spezifischen Antikörper bestimmt. Die Gegenfärbung der DNA erfolgte mit Hoechst 33258.

(D) Die Quantifizierung der Relokalisierung von exogenem p14Arf durch *MIZ1* bzw. *MYC* Expression aus den Nucleoli in das Nucleoplasma erfolgte durch die Analyse von 50 Zellen je Bedingung.

Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass der Tumorsuppressor Arf nicht nur mit c-Myc sondern auch mit Miz1 interagiert. Diese Interaktion wurde in *P14ARF* und *MIZ1* kotransfizierten HeLa-Zellen mittels Immunpräzipitation sowohl unter Verwendung eines p14Arf- als auch eines Miz1-spezifischen Antikörpers nachgewiesen (Abb. 22A). Außerdem wurde eine Immunpräzipitation der endogenen Proteine in HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei war ebenfalls die Bindung von drei Isoformen von Miz1 in dem p14Arf-Präzipitat und umgekehrt das Arf-Signal in dem Miz1-Präzipitat zu erkennen (Abb. 22B). Zudem konnte die Assoziation von c-Myc mit beiden Proteinen bestätigt werden (Staller et al., 2001; Qi et al., 2004).

Da das humane p14Arf- und das murine p19Arf-Protein eine relativ geringe Sequenzhomologie von 44% im aminoterminalen bzw. 54% im carboxyterminalen Bereich aufweisen (Sharpless und DePinho, 1999), wurde zudem die Interaktion des murinen Arf-Proteins mit Miz1 in MEFs untersucht. Sowohl die Wechselwirkung der exogenen als auch der endogenen Proteine konnte in diesen Immunpräzipitationsexperimenten nachgewiesen werden (Abb. 22C und D). Auffallend war dabei der relativ hohe Anteil von endogenem Miz1 in dem p19Arf-Präzipitat, während umgekehrt lediglich eine geringe Menge des endogenen p19Arf-Proteins durch einen Miz1-spezifischen Antikörper präzipitiert wurde. Dies deutet darauf hin, dass ein großer Anteil der Miz1-Moleküle durch Arf gebunden vorliegt, während lediglich ein geringer Prozentsatz von Arf durch Miz1 komplexiert wird.



**Abb. 22: Miz1 und Arf interagieren *in vivo*.**

(A) HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für Miz1 bzw. p14Arf kodieren. 48 h nach der Transfektion wurde die Interaktion beider Proteine durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern bzw. einem unspezifischen Kontroll-Antikörper und Immunoblot analysiert. Zum Mengenvergleich wurden 5% des verwendeten Lysates (Input) aufgetragen.

(B) Die Immunpräzipitation der endogenen Proteine Miz1 und p14Arf wurde in HeLa-Zellen durchgeführt. Zum Mengenvergleich wurden 10% bzw. 2% des verwendeten Lysates (Input) aufgetragen.

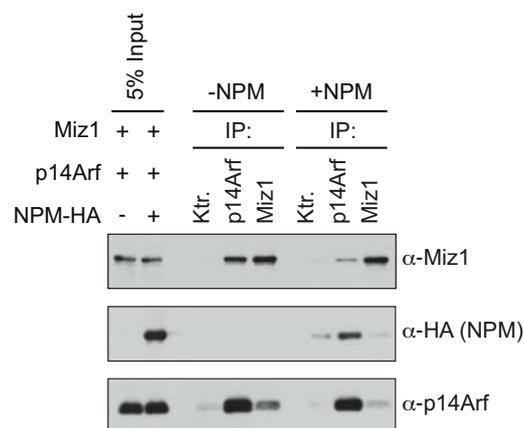
(C) *MIZ1* und *p19Arf* wurden in DKO (*p53*<sup>-/-</sup>; *Npm*<sup>-/-</sup>)-MEFs transient exprimiert und 48 h nach der Transfektion geerntet. Anschließend wurde die Interaktion beider Proteine durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern bzw. einem unspezifischen Kontroll-AK und Immunoblot analysiert. Zum Mengenvergleich wurden 5% des verwendeten Lysates (Input) aufgetragen.

(D) Die Immunpräzipitation der endogenen Proteine Miz1 und p19Arf wurde in DKO-MEFs durchgeführt. Zum Mengenvergleich wurden 2% des verwendeten Lysates (Input) aufgetragen.

### 4.3.2 Nukleophosmin antagonisiert die Interaktion von Miz1 und p14Arf und damit die Sequestrierung von Miz1 in subnukleäre Foci

Da der Miz1-Koaktivator NPM und p14Arf in ungestressten Zellen einen stöchiometrischen Komplex bilden (Lindström und Zhang, 2006), lag die Vermutung nahe, dass NPM die Wechselwirkung von Miz1 und Arf beeinflusst. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden

*MIZ1*, *P14ARF* und *NPM* in *p53*- und *Npm*-defizienten MEFs exprimiert und deren Interaktion mittels Immunpräzipitation überprüft. Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 beschrieben wurde, konnten beide Proteine in Abwesenheit von NPM sowohl durch Einsatz eines Miz1-spezifischen als auch eines p14Arf-spezifischen Antikörpers in den Eluaten nachgewiesen werden, was belegt, dass die Bindung der beiden Proteine nicht von NPM abhängig ist (Abb. 23). Dagegen war die Interaktion von Miz1 und p14Arf durch die Expression von *NPM* merklich beeinträchtigt. NPM wurde lediglich in den Präzipitaten der p14Arf-IP detektiert, was die bereits angeführte hohe Präsenz des NPM/Arf-Komplexes unterstreicht. Konsistent mit einer derartigen antagonistischen Wechselwirkung von NPM und Miz1 mit p14Arf war die Beobachtung, dass NPM die Sequestrierung von Miz1 durch Arf in unlösliche, subnukleäre Foci inhibiert, was durch Löslichkeitsstudien und konfokale Mikroskopie nachgewiesen werden konnte (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung).



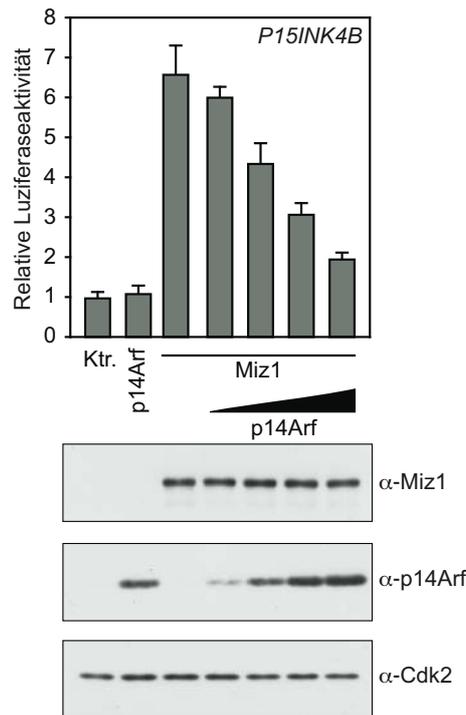
**Abb. 23: Die Expression von *NPM* verhindert die Komplexbildung von Miz1 und p14Arf.**

*p53* und *Npm*-defiziente MEFs wurden wie dargestellt mit Expressionsplamiden transfiziert, die *MIZ1*, *p14Arf* bzw. *NPM* kodieren. 48 h nach der Transfektion wurden die entsprechenden Lysate in einer Immunpräzipitation unter Verwendung eines p14Arf-, Miz- bzw. Kontrollantikörpers und anschließendem Immunoblot untersucht. 5% des eingesetzten Lysates wurden zum Mengenvergleich (Input) aufgetragen.

### 4.3.3 Arf inhibiert die Transaktivierung durch Miz1

Um die funktionelle Bedeutung der Interaktion zwischen Miz1 und Arf zu analysieren, wurde der Einfluss von p14Arf auf die Transaktivierung durch Miz1 in einer Reporteranalyse untersucht. Wie bereits in vorangegangenen Studien beobachtet wurde, verstärkte Miz1 die Expression des Luziferase-Reportergens unter der Kontrolle des *P15INK4B* bzw. *P21CIP1* Promotors (Wanzel et al., 2008) (Abb. 24 und Daten nicht gezeigt). Während die Expression

von p14Arf keinen Effekt auf die Basalaktivität beider Promotoren ausübte, reprimierte es die Miz1-induzierte Transaktivierung in einer Dosis-abhängigen Weise. Dies ist konsistent mit der in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen antagonistischen Miz1-Bindung durch Arf und den Miz1-Koaktivator NPM. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser inhibitorische Effekt nicht auf die Reduktion der Miz1-Proteinmengen zurückzuführen ist (siehe auch 4.3.4).



**Abb. 24: p14Arf inhibiert die Miz1-abhängige Transaktivierung des *P15INK4B*-Promotors.**

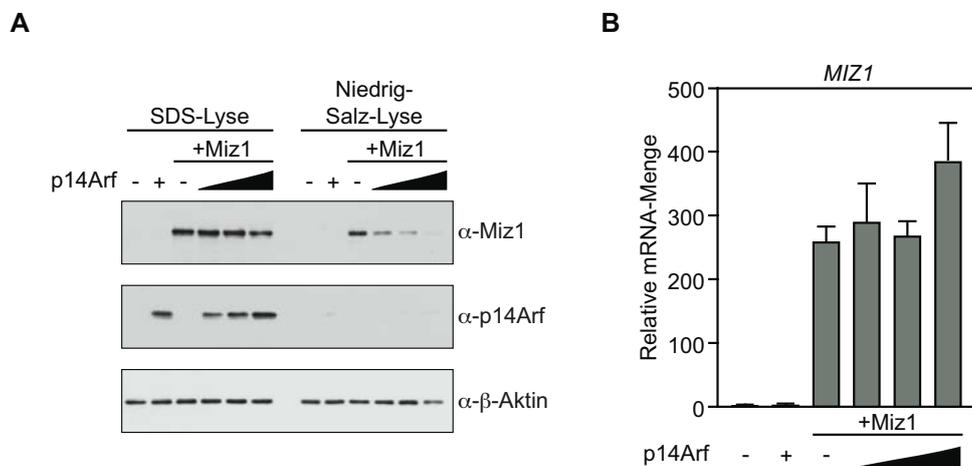
HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Plasmiden und einem Luziferase-Reporterplasmid transfiziert, das die Miz1-Bindungsstelle und den Transkriptionsstart des *P15INK4B*-Promotors enthält. 48 h nach der Transfektion wurde die spezifische Luziferaseaktivität bestimmt und auf den Proteingehalt normalisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei biologischen Replikate je Bedingung an. Zusätzlich zu den Proben zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden weitere Proben parallel transfiziert, durch SDS-Lyse ein Gesamtzelllysat hergestellt und mittels Immunoblot analysiert. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

Diese Repression der Miz1-Funktion konnte auch *in vivo* durch stabile retrovirale Infektion von Miz1 bzw. Miz1 in Kombination mit p19Arf in *p53*-, *Mdm2*- und *Arf*-defizienten MEFs nachgewiesen werden. Den Erwartungen entsprechend führte die Expression von *Miz1* zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, was auf erhöhte Mengen des Zellzyklusinhibitors p21Cip1 zurückzuführen war (Michael Wanzel, persönliche Mitteilung). Dieser Miz1-induzierte G1-Arrest wurde durch p19Arf aufgehoben und die Zellen unterlagen

einem transkriptionsunabhängigen S-Phasenarrest durch Miz1 (Herold et al., 2008). Diese Ergebnisse belegen somit, dass die Expression von Arf sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Repression der Miz1-Funktion resultiert.

#### 4.3.4 Arf reduziert die Löslichkeit des Miz1-Proteins

Zur genaueren Analyse des Mechanismus, welcher der Repression der Miz1-abhängigen Transaktivierung durch Arf zugrundeliegt, wurde zunächst der Effekt von p14Arf auf die Löslichkeit von Miz1 analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression von *P14ARF* zu einer Reduktion der Miz1-Mengen in Proteinlysaten führte, die durch Einsatz eines Niedrig-Salz-Puffers auf TritonX100-Basis hergestellt wurden. Dieser Effekt wurde jedoch durch die Extraktion mit Hilfe eines 5%igen SDS-Puffers bei 95°C nahezu vollständig aufgehoben (Abb. 25A). Aufgrund der unveränderten Expressionsrate von *MIZ1*, die mittels qRT-PCR festgestellt wurde, konnte eine Regulation der Transkription von exogenem *MIZ1* durch Arf ausgeschlossen werden (Abb. 25B). Die Extraktion von p14Arf durch den Niedrig-Salz-Puffer war generell sehr ineffizient. Das Protein konnte durch diese Lysemethode daher lediglich nach langer Expositionszeit des Röntgenfilms detektiert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 25: p14Arf reguliert nicht die Expression von *MIZ1* sondern die Löslichkeit des Miz1-Proteins.**

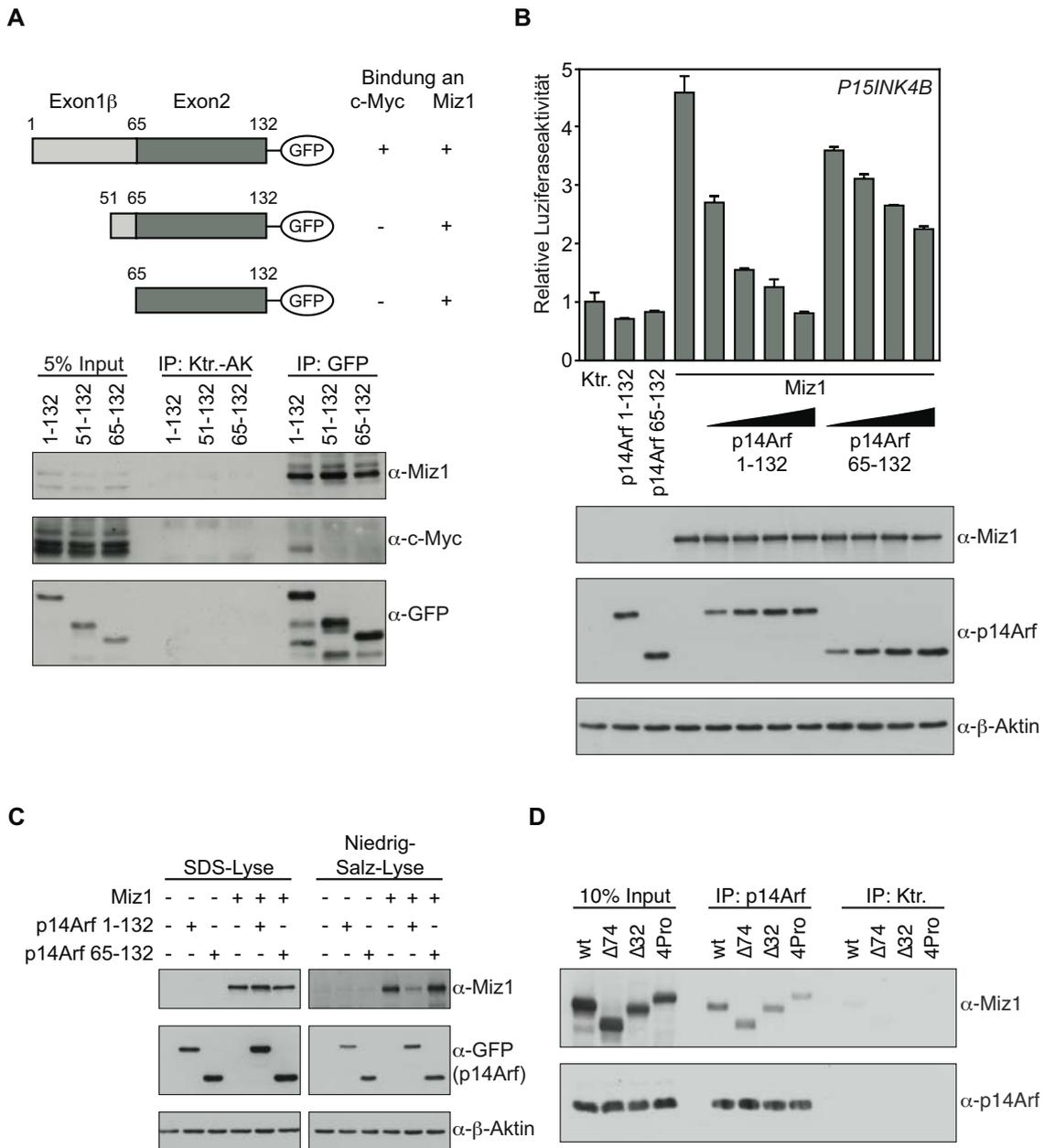
(A) HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Expressionsplasmiden transfiziert und 48 h später geerntet. Von den verschiedenen Proben wurden parallel Proteinextrakte durch Niedrig-Salz- bzw. SDS-Lyse hergestellt und mittels Immunoblot analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle.

(B) Von den unter (A) verwendeten Proben wurden im Anschluss an einen DNase-Verdau die *MIZ1*-mRNA-Mengen mittels qRT-PCR analysiert. Die Normalisierung erfolgte durch *B2M*. Die relativen mRNA-Mengen wurden jeweils auf die Kontroll-transfizierte Probe bezogen.

### **4.3.5 Die Rekrutierung von c-Myc ist notwendig für die Repression von Miz1 durch Arf**

Da c-Myc in zahlreichen Arbeiten als Repressor der Miz1-induzierten Genexpression beschrieben wurde und zudem, wie in Abschnitt 4.3.2 bereits für Arf gezeigt, die Bindung des Koaktivators NPM an Miz1 antagonisiert (Herold et al., 2002; Wanzel et al., 2008), wurde im Folgenden untersucht, ob die Regulation durch Arf auf der Bildung eines repressorischen c-Myc/Miz1/Arf-Komplexes beruht. Diese Vermutung wurde zudem durch die in Abschnitt 4.3.1 bereits beschriebene Interaktion von c-Myc und p14Arf sowie durch die Kolo-kalisierung von exogenem c-Myc in Arf-induzierten Miz1-Foci unterstützt (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Daraus ergab sich die Frage, ob Miz1 und c-Myc mit unterschiedlichen Regionen von p14Arf interagieren. Würde dies zutreffen, könnte durch Einsatz einer entsprechenden Deletionsmutante von Arf die Beteiligung von c-Myc an der Repression von Miz1 durch Arf analysiert werden. Da die Interaktion von Arf mit c-Myc durch die ersten 14 aminoterminalen Aminosäuren von Arf vermittelt wird (Datta et al., 2004), wurde Miz1 mit Arf-GFP-Fusionsproteinen voller Länge bzw. aminoterminalen Deletionsmutanten in Arf-defizienten Osteosarkomzellen koexprimiert und deren Interaktion mittels Immunpräzipitation überprüft. Während endogenes c-Myc ausschließlich mit Wildtyp-Arf wechselwirkte, konnte Miz1 zudem in den Präzipitaten der Arf-Mutanten detektiert werden, die um die ersten 50 bzw. 64 Aminosäuren verkürzt waren (Abb. 26A). Dies lässt den Schluss zu, dass der aminoterminal Bereich von Arf zwar für die Interaktion mit c-Myc ausreichend (Datta et al., 2004), für die Bindung an Miz1 jedoch nicht notwendig ist.

Die kürzere, aminoterminal Deletionsmutante, die die Aminosäuren 65 bis 132 von humanem p14Arf umfasst, wurde daher in einer Reporterstudie eingesetzt und die Repression der Miz1-abhängigen Aktivierung des *P15INK4B*-Promotors untersucht. Ein Vergleich mit dem p14Arf-GFP-Fusionsprotein voller Länge zeigte, dass die Repression durch die eingesetzte Deletionsmutante deutlich beeinträchtigt war (Abb. 26B), obwohl im Immunoblot identische bzw. leicht erhöhte p14Arf-Proteinmengen detektiert wurden. Darüber hinaus war die Sequestrierung von Miz1 in unlösliche Strukturen durch diese aminoterminal verkürzte Mutante von p14Arf aufgehoben (Abb. 26C). Diese Daten zeigen zum Einen, dass der Aminoterminus von p14Arf für die Repression der Miz1-induzierten Transaktivierung und die Sequestrierung von Miz1 notwendig ist. Zum Anderen belegen diese Beobachtungen jedoch eindeutig, dass die Interaktion von p14Arf und Miz1 für diese Prozesse nicht ausreichend ist.



**Abb. 26: Die Interaktion von p14Arf und Miz1 ist für die Inhibition der Transaktivierung durch Miz1 und dessen Sequestrierung nicht ausreichend.**

(A) Arf-defiziente U2OS-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für Miz1 bzw. die angegebenen p14Arf-GFP-Fusionsproteine kodieren (Aminosäuren 1-132, 51-132 bzw. 65-132 von humanem p14Arf). p14Arf-Komplexe wurden unter Verwendung eines GFP- bzw. eines Kontroll-Antikörpers präzipitiert und anschließend mittels Immunoblot analysiert. Die schematische Darstellung gibt die Resultate der Koimmunpräzipitation wieder.

(B) U2OS-Zellen wurden mit den aufgeführten Plasmiden und einem Luciferase-Reporterplasmid transfiziert, das die Miz1-Bindungsstelle und den Transkriptionsstart des *P15INK4B*-Promotors enthält. 48 h nach der Transfektion wurde die spezifische Luciferaseaktivität bestimmt und auf den Proteingehalt normalisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei biologischen Replikate je Bedingung an. Zusätzlich zu den Proben zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden weitere Proben

parallel transfiziert, durch heiße SDS-Lyse ein Gesamtzelllysate hergestellt und mittels Immunoblot analysiert.  $\beta$ -Aktin diene als Ladungskontrolle.

(C) U2OS-Zellen wurden mit den aufgeführten Plasmiden transfiziert, 48 h später durch Niedrig-Salz- bzw. heiße SDS-Lyse Proteinextrakte hergestellt und mittels Immunoblot analysiert.  $\beta$ -Aktin diene als Ladungskontrolle.

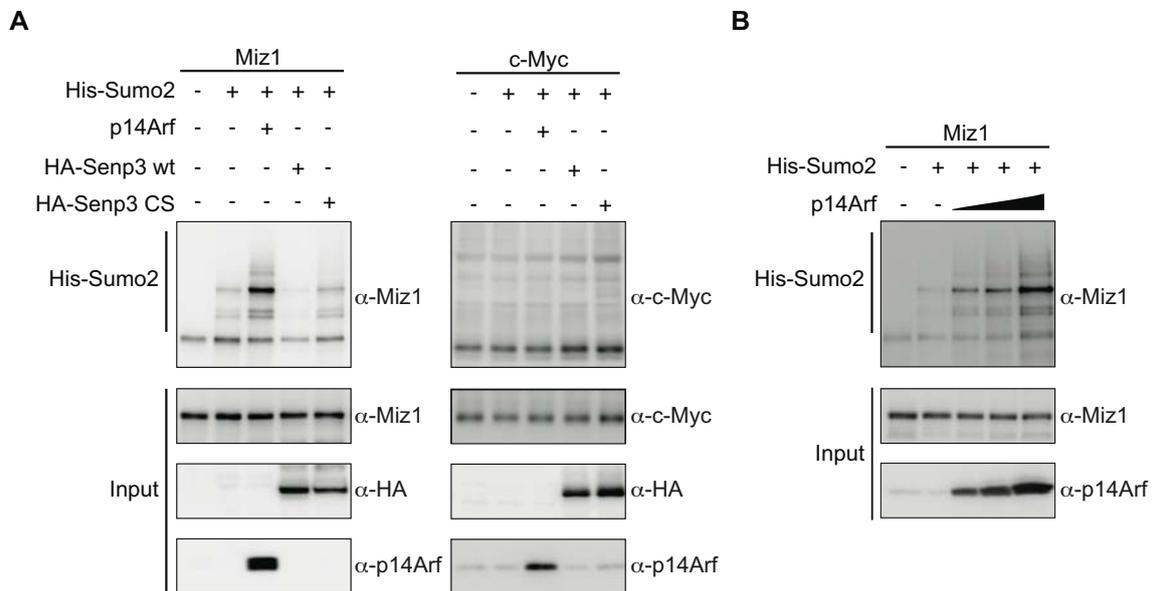
(D) HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für p14Arf bzw. die angegebenen Miz1-Proteine kodieren (wt,  $\Delta 75$ ,  $\Delta 33$ , 4Pro). p14Arf-Komplexe wurden unter Verwendung eines p14Arf- bzw. eines Kontroll-Antikörpers präzipitiert und anschließend mittels Immunoblot analysiert. 10% des eingesetzten Lysates wurden zum Mengenvergleich (Input) aufgetragen.

Da die fehlende Bindung von c-Myc unter diesen Bedingungen die entscheidende Komponente sein könnte, wurde dies in einem weiteren Ansatz überprüft. Dabei wurden drei Mutanten von Miz1 verwendet, deren Interaktion mit c-Myc stark reduziert bzw. vollständig aufgehoben ist (Peukert et al., 1997). Zunächst wurde analysiert, ob diese Deletionen von 33 ( $\Delta 33$ ) und 75 ( $\Delta 75$ ) Aminosäuren zwischen dem 12. und 13. Zinkfinger bzw. die vierfache Punktmutation (4Pro) in diesem Bereich die Wechselwirkung mit p14Arf beeinträchtigen. Abbildung 26D zeigt jedoch, dass die drei Miz1-Mutanten unverändert mit p14Arf interagieren. Dagegen waren die Inhibition der Miz1-induzierten Aktivierung des *P15INK4B*-Promotors und die Sequestrierung der Miz1-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Miz1 deutlich reduziert (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Zusätzlich zur Interaktion von Miz1 und p14Arf ist daher die Bindung von c-Myc sowohl durch Miz1 als auch durch p14Arf essentiell für die Arf-induzierte Regulation der Miz1-Funktion.

### **4.3.6 Der Tumorsuppressor Arf induziert die SUMOylierung von Miz1**

Zusätzlich zu der sehr intensiv analysierten p53-stabilisierenden Funktion von Arf wurden in aktuelleren Studien p53-unabhängige Funktionen des Tumorsuppressors beschrieben (Sherr et al., 2005). Dazu gehört beispielsweise die Induktion der SUMOylierung einiger Interaktionspartner von Arf wie beispielsweise Mdm2 (Xirodimas et al., 2002), p53 (Chen und Chen, 2003), WRN (Woods et al., 2004) und NPM (Tago et al., 2005), deren SUMO-Konjugate meist im Nukleolus akkumulieren. Die Effekte dieser Modifikation sind Substrat-spezifisch und beinhalten die Veränderung der Proteinstabilität, des Proteintransportes, der Ubiquitinierung, der DNA-Reparatur, die Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren (meist Repression) und Zellzyklusprogression sowie die Bildung subnukleärer Strukturen (Gill, 2003; Hay, 2005; Hilgarth et al., 2004; Melchior, 2000). Die biologische Relevanz der Arf-induzierten SUMO-Modifikation ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt.

Generell ist die transkriptionelle Repression aufgrund der SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren meist an die Ausbildung von Heterochromatin im Promotorbereich der Zielgene geknüpft (Garcia-Dominguez und Reyes, 2009). Da Arf die Ausbildung von Heterochromatin am *P15INK4B*-Promotor induziert (Steffi Herold, persönliche Mitteilung), lag die Vermutung nahe, dass dies auf die Arf-abhängige SUMOylierung von c-Myc oder Miz1 zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnte durch Sequenzanalysen von c-Myc ein potentiell, hochkonserviertes SUMO-Interaktionsmotiv (SIM) (Hecker et al., 2006) identifiziert werden (Abb. 28A), was eine Beteiligung von SUMOylierten Komponenten in dem Arf-induzierten Repressionsmechanismus des c-Myc/Miz1-Komplexes nahelegt. Bestätigt wurde diese Hypothese durch die Arf-induzierte Kolokalisierung von SUMO2, Miz1 und c-Myc (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Des Weiteren wurde untersucht, ob Arf *in vivo* die SUMOylierung von c-Myc beziehungsweise Miz1 induziert. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit His-markiertem *SUMO2*, *P14ARF* sowie *MIZ1* beziehungsweise *MYC* kotransfiziert. Im Anschluss wurden die SUMOylierten Proteine affinitätschromatographisch mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose isoliert und im Immunoblot nachgewiesen. Während p14Arf den SUMOylierungsstatus von c-Myc nicht veränderte (Abb. 27A), führte die Expression steigender Mengen von *p14Arf* zu einer Akkumulation von modifiziertem Miz1 (Abb. 27A und B).



**Abb. 27: Arf induziert die Modifikation von Miz1 durch SUMO2.**

(A) HeLa-Zellen wurden mit den aufgeführten Konstrukten transfiziert und nach 48 h in einem denaturierenden Puffer lysiert. Die mit His-SUMO2 modifizierten Proteine wurden affinitätschromatographisch durch Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose angereichert und mittels Immunoblot analysiert. Zum Mengenvergleich wurden ebenfalls 10% der eingesetzten Lysate aufgetragen.

(B) siehe (A)

Im Gegensatz dazu verminderte die SUMO-spezifische Protease Senp3 das Miz1-Signal in dem Eluat der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Abb. 27A). Eine katalytisch inaktive Mutante, Senp3C532S, hatte darauf dagegen keinen Einfluss. Dies belegt, dass es sich bei der nachgewiesenen Form von Miz1 um eine SUMO-Modifikation handelt.

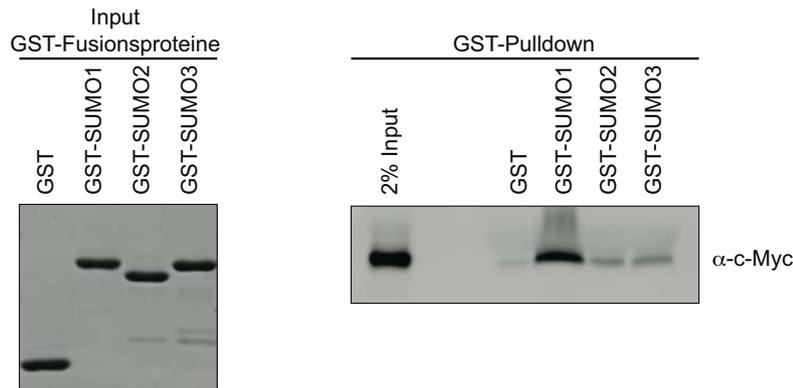
#### **4.3.7 c-Myc interagiert mit SUMO-Spezies**

Da die transkriptionelle Repression durch SUMOylierte Proteine häufig eine SIM (*SUMO interaction motif*)-vermittelte Komplexbildung mit weiteren Proteine beinhaltet (Hay, 2005), wurde im Folgenden eine Sequenzanalyse von humanem c-Myc durchgeführt. Der Vergleich mit SIM-Motiven bekannter SUMO-bindender Proteine wie TRRAP (Golebiowski et al., 2009; Hecker et al., 2006), RanBP2 (Mahajan et al., 1997; Song et al., 2004) und PIAS1 (Kotaja et al., 2002) ergab eine hohe Ähnlichkeit im Bereich der Aminosäuren 249-270. Es konnte neben einer hydrophoben Kernregion der Konsensussequenz V/I-X-V/I-V/I, die in beiden Orientierungen auftreten kann, ein Abschnitt mit mehreren sauren Aminosäuren sowie potentiellen Phosphorylierungsstellen zugeordnet werden (Abb. 28A). Daher wurde im Folgenden die Interaktion von *in vitro*-translatiertem c-Myc und GST-markiertem SUMO1, SUMO2 und SUMO3 untersucht. GST diente dabei als Negativkontrolle. Diese Bindungsstudie zeigte, dass c-Myc bevorzugt mit SUMO1 assoziiert, während lediglich eine schwache Interaktion mit SUMO2 und SUMO3 zu beobachten war (Abb. 28B).

A

	potentielle Phosphorylierungsstelle/ saure Aminosäuren	V/I-X-V/I-V/I V/I-V/I-X-V/I	potentielle Phosphorylierungsstelle/ saure Aminosäuren
TRRAP	RCGGLPNN	IVDV	WEFLGKP
RanBP2	SPSDDD	VLIV	Y
PIAS1	KNKK	VEVI	DLTI
c-Myc	TTSSDSEEEQEDEEE	IDVV	DSSSDEEEEEEP
c-Myc	TTSSDSEEEQEDEEEID	VVSV	SVEKRQAPGKRS
			EKRQAPGKRS

B



**Abb. 28: Myc bindet präferenziell SUMO1.**

(A) Mit Hilfe des Programms MegAlign wurde ein Sequenzvergleich von humanem c-Myc und bekannten SIM-Proteinen durchgeführt, wodurch eine hohe Sequenzhomologie im Bereich der Aminosäuren 249 bis 270 von humanem c-Myc festgestellt werden konnte. Da c-Myc zwei überlappende SIM-Sequenzen aufweist, wurden beide möglichen Zuordnungen dargestellt. Hervorgehoben sind potentielle Phosphorylierungsstellen (blau), saure Aminosäuren (grün) sowie hydrophobe Aminosäuren des Kernbereichs (gelb); modifiziert nach Hecker et al., 2006.

(B) GST sowie GST-markiertes SUMO1, SUMO2 und SUMO3 wurden in BL21 exprimiert und affinitätschromatographisch durch Gluthation-Sepharose aufgereinigt. Die Dokumentation der gleichmäßigen Input-Mengen erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (links). c-Myc wurde durch *in vitro*-Translation (IVT) hergestellt und dessen Bindung an die GST-Fusionsproteine (an Gluthation-Sepharose gekoppelt) analysiert. Die Präzipitate des GST-Pulldowns wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Immunoblot untersucht (rechts). Zum Mengenvergleich wurden 2% der eingesetzten IVT-Probe aufgetragen.

#### 4.3.8 Arf induziert die Ausbildung des repressorischen c-Myc/Miz1/SUMO-Komplexes in zwei unabhängigen Schritten

In weiteren Experimenten wurde untersucht, welche der bereits beschriebenen Arf-induzierten Effekte von der SUMOylierung von Miz1 abhängig sind. Daher wurde in einem ersten Ansatz Ubc9, das E2-Enzym der SUMO-Konjugation, mittels siRNA depletiert. Allerdings hatte dies keine Auswirkung auf die Arf-induzierte verminderte Löslichkeit (Abb. 29A) oder die Bildung subnukleärer Foci von Miz1 (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Auch die Expression der SUMO-Protease Senp3, die, wie bereits erläutert, den SUMOylierungsstatus von Miz1

deutlich verringerte (Abb. 29A), verhinderte nicht die Sequestrierung von Miz1 in unlösliche Strukturen durch p14Arf (Abb. 29B). Diese Beobachtungen deuten auf einen Repressionsmechanismus hin, bei dem Arf zum Einen die SUMOylierung seines Interaktionspartners Miz1, zum Anderen in einem davon unabhängigen Prozess die Bildung unlöslicher, intranucleärer Foci von Miz1 und c-Myc induziert. Allerdings kann anhand dieser Daten auch ein SUMOylierungs-unabhängiger Repressionsmechanismus nicht ausgeschlossen werden. Der Nachweis von Senp3 zeigte jedoch eine deutliche Abnahme der Proteinmengen, die mit den ansteigenden p14Arf-Mengen korrelierten. Dies ist konsistent mit der von Kuo und Kollegen beschriebenen, Arf-induzierten Phosphorylierung, Ubiquitinierung und darauf folgenden proteasomalen Degradierung (Kuo et al., 2008).



## 5 Diskussion

### 5.1 Miz1 ist nicht essentiell für die Expression von *Cdkn1a* und die Einleitung der DNA-Schadensantwort in MEFs

Die vielseitigen Funktionen von p21Cip1 in der Regulation von Zellzyklusarrest, Transkription, Apoptose und DNA-Reparatur erfordern eine differentielle Aktivierung und Repression der *CDKN1A* Expression. Der Tumorsuppressor p53 fungiert dabei als transkriptioneller Hauptregulator. Daher ist die Aktivierung der Transkription als Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli wie beispielsweise dem Auftreten von DNA-Schäden von p53 abhängig (el-Deiry et al., 1993; Gartel und Radhakrishnan, 2005). Neben p53 wurden zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren wie Sp1/Sp3, Smads, Ap2, STATs und BRCA1 identifiziert, welche die Expression von *CDKN1A* aktivieren (Gartel und Tyner, 1999).

Auch Miz1 wurde bereits in mehreren Studien als wichtige Komponente des Signaltransduktionsapparates zur Einleitung eines Zellzyklusarrests nach Auftreten von DNA-Schäden identifiziert. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls *CDKN1A* ein kritisches Zielgen, dessen Expression durch Miz1 aktiviert und durch c-Myc reprimiert wird (Herold et al., 2002).

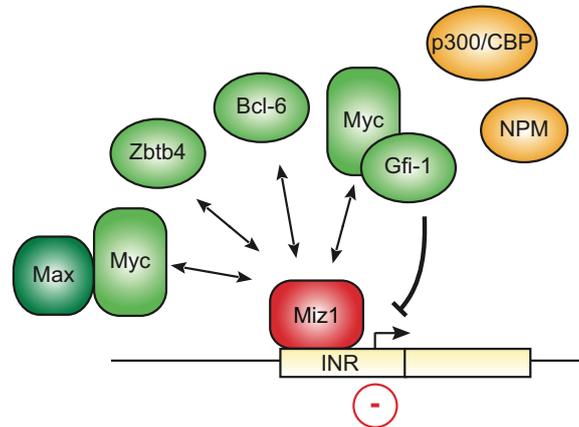
#### 5.1.1 Die POZ-Domäne von Miz1 ist nicht essentiell für die Aktivierung der *Cdkn1a*-Expression

Um die exakte Funktion der POZ-Domäne von Miz1 für die Aktivierung der Transkription von *Cdkn1a* und der UVB-induzierten Signalkaskade zu analysieren, wurden murine embryonale Fibroblasten verwendet, die eine homozygote Deletion der Exons 3 und 4 des *Miz1*-Gens (*Miz1<sup>ΔPOZ</sup>*) aufweisen. Dies resultierte in der Transkription des *Miz1<sup>ΔPOZ</sup>* Allels und schließlich, aufgrund der Verwendung eines alternativen Startkodons in Exon 5, in der Synthese eines aminoterminal trunkierten Miz1-Proteins, Miz1 $\Delta$ POZ, in dem die POZ-Domäne deletiert ist (Abb. 8). Obwohl die POZ-Domäne in früheren Arbeiten als Transaktivierungsdomäne von Miz1 beschrieben wurde (Herold et al., 2002; Peukert et al., 1997) und die Interaktion mit dem Koaktivator NPM vermittelt (Wanzel et al., 2008), konnte keine Veränderung der Proliferation und Zellzyklusverteilung von *Miz1<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup>* im Vergleich zu Wildtyp-MEFs festgestellt werden (Abb. 9), die auf eine verminderte Expression der Zellzyklusinhibitoren p15Ink4b und p21Cip1

hindeuten würden. Darüber hinaus konnten diese Ergebnisse durch eine unveränderte bzw. leicht erhöhte basale *Cdkn1a* Expression in *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs bestätigt werden (Abb. 10A), was auf eine untergeordnete Rolle von Miz1 in der Induktion dieser Gene hindeutet. Allerdings wurde die transkriptionelle Regulation der *Cdkn1a* Expression durch Miz1 in diesen Arbeiten meist nach Induktion von DNA-Schäden analysiert, die zu einem Verlust der Repression von Miz1 durch die Assoziation mit TopBP1 führen und somit die transkriptionelle Aktivität von Miz1 verstärken (Herold et al., 2002). Daher wurde im Folgenden die Akkumulation von p21Cip1 sowie die Aktivierung der zentralen Mediatoren der UVB-induzierten Signalkaskade in Wildtyp- und *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs nach der Behandlung mit UVB-Strahlung verglichen (Abb. 10B und C). Jedoch konnte auch unter diesen Bedingungen keine signifikante, differentielle Regulation festgestellt werden. Dementsprechend blieb zudem der Arrest synchronisierter Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, der in UVB-behandelten MEFs zu beobachten und von den p21Cip1-Mengen abhängig ist, von der Deletion der POZ-Domäne unbeeinflusst (Abb. 11).

Eine Reihe verschiedener Untersuchungen deuten bereits darauf hin, dass die POZ-Domäne von Miz1 für die transkriptionelle Aktivierung von *Cdkn1a* in Zellen des *Miz1*<sup>ΔPOZ</sup>-Mausmodells nicht essentiell ist, sondern aufgrund deren Deletion womöglich hauptsächlich die Repression durch c-Myc beeinträchtigt ist. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass die POZ-Domäne eine Oligomerisierungsdomäne darstellt. Somit könnte diese nicht nur essentiell für die Interaktion von Miz1 mit dessen Koaktivator NPM (Wanzel et al., 2008) sondern auch mit c-Myc sein. Darüber hinaus zeigten bereits die ersten Studien zur Miz1-vermittelten Repression durch c-Myc, dass diese die Integrität der POZ-Domäne erfordert (Peukert et al., 1997). Dementsprechend konnte nachgewiesen werden, dass in neuronalen Zellen des Genotyps *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> die Expression der Miz1-Zielgene *Cdkn2b* (*p15Ink4b*), *Cdkn1a* (*p21Cip1*) und *Cdkn1c* (*p57Kip1*) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich erhöht ist (Alessandra Avezzu, persönliche Mitteilung). Entsprechendes wurde in Bezug auf die p21Cip1-Proteinmengen in histologischen Färbungen der murinen Epidermis beobachtet (Jan Hönnemann, persönliche Mitteilung). Auffallend ist dabei die Tatsache, dass dieser Phänotyp den Knockout von c-Myc widerspiegelt (Oskarsson et al., 2006). Die Cre-vermittelte Inaktivierung von Myc in etablierten, DMBA/TPA-induzierten Tumoren, die onkogenes Ras exprimieren, führte in diesem Mausmodell zu einer Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p21Cip1. Außerdem konnten neben c-Myc weitere Transkriptionsfaktoren wie BCL6 (Phan et al., 2005; Saito et al., 2009), ZBTB4 (Weber et al., 2008) und Gfi-1 (Liu et al., 2010) identifiziert werden, deren Bindung an Miz1 die Grundlage der Repression von Zielgenen wie *CDKN1A* und *BCL2* darstellt. Im Zusammenhang mit BCL6 wurde gezeigt, dass die POZ-Domäne von Miz1 essentiell für die Interaktion der beiden Proteine ist (Phan et al., 2005). Dies stützt die

Hypothese, dass Miz1 vor allem die Repression seiner Zielgene durch diese unterschiedlichen Faktoren vermittelt, während es in der Aktivierung der *Cdkn1a* Transkription lediglich eine untergeordnete Rolle spielt (Abb. 30).



**Abb. 30 Mögliche Hauptfunktion von Miz1 als Plattform zur Rekrutierung diverser Repressorkomplexe.**

Zusätzlich zu c-Myc assoziiert Miz1 mit weiteren Repressorproteinen wie Bcl-6, Zbtb4 oder Gfi-1 am Promotor von Zielgenen wie *CDKN1A* und *BCL2*, was zur Repression der Genexpression führt.

Um dies zu belegen wurde eine vektorbasierte Expression von shRNAs (*short hairpin RNAs*), die gegen *Miz1* gerichtet waren, durchgeführt. Die Spezifität des beobachteten Effektes wurde durch den Einsatz von zwei unabhängigen Zielsequenzen gewährleistet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Depletion von *Miz1* (Abb. 12A und B) die UVB-induzierte *Cdkn1a* Aktivierung nicht signifikant beeinträchtigt (Abb. 12C). Dies stimmt jedoch nicht mit Beobachtungen aus früheren Publikationen überein, die durch eine siRNA-vermittelte Reduktion der *Miz1*-Proteinmengen in p19Arf-defizienten MEFs bzw. immortalen MEFs (NIH3T3) eine essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors in der Regulation von *Cdkn1a* bei Vorliegen von DNA-Schäden aufzeigten (Herold et al., 2002; Wanzel et al., 2005). Allerdings kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass in dem in dieser Arbeit dargestellten Experiment die Effizienz der Herunterregulation der *Miz1* mRNA nicht ausreichend war, um einen Effekt der transkriptionellen Regulation von *Cdkn1a* nachzuweisen. Jedoch konnte in genomweiten Expressionsanalysen bestätigt werden, dass die siRNA-vermittelte Depletion von *MIZ1* in humanen Zellen nicht zu einer Reduktion sondern einer erhöhten Basalexpression von *CDKN1A* führt (Gartel et al., 1996; Ziegelbauer et al., 2004). Die Beobachtung einer *Miz1*-unabhängigen *Cdkn1a* Expression wird zudem durch die unveränderten p21Cip1-Proteinmengen am Tag 7.5 der Embryonalentwicklung in einem Mausmodell mit einer

homozygoten, konstitutiven Deletion von *Miz1* gestützt (Adhikary et al., 2003). Diese voneinander abweichenden Beobachtungen könnten jedoch auf die unterschiedlichen Modellsysteme zurückzuführen sein. Darüber hinaus wurde die *Cdkn1a* Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Einführen von DNA-Schäden analysiert, was eine weitere, mögliche Erklärung für die voneinander abweichenden Ergebnisse sein könnte. Während Herold und Kollegen (2002) die Untersuchung der *Cdkn1a* mRNA-Menge 24 bzw. 48 h nach der UVB-Behandlung durchführten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein früherer Zeitpunkt von 6h gewählt, da die Hauptfunktion von p21Cip1 in der Blockade der Zellzyklusprogression kurze Zeit nach Auftreten der DNA-Schäden besteht.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass die primäre Funktion von Miz1 in der *Cdkn1a* Expression nicht in deren Aktivierung sondern in der Vermittlung der Repression durch c-Myc bzw. weitere Repressoren bestehen könnte (Abb. 30), während das Ausmaß der Aktivierung der *Cdkn1a* Expression durch Miz1 Zelltyp-spezifisch sein könnte und möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielt.

### **5.1.2 *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs weisen keine Veränderungen in der Induktion der DNA-Schadensantwort auf**

Da zusätzlich zu der transkriptionellen Regulation des Zellzyklusinhibitors p21Cip1 Hinweise auf eine nicht-transkriptionelle Funktion von Miz1 in der UVB-induzierten Signalkaskade vorlagen (siehe Abschnitt 4.2), wurde anhand der Phosphorylierung diverser Mediatoren die Aktivierung der DNA-Schadensantwort in *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs analysiert. Miz1 bewirkt durch die Rekrutierung von TopBP1, einem Vermittler der DNA-Schadensantwort, zum Chromatin dessen Stabilisierung, was zur Aktivierung dieser Signalkaskade führt (Herold et al., 2008). Die DNA-Bindungskapazität von Miz1, und damit dessen stabilisierende Funktion, könnte jedoch durch die Deletion der POZ-Domäne beeinträchtigt werden, da diese Domäne die Ausbildung von Homodimeren bzw. –tetrameren vermittelt und dadurch möglicherweise die gerichtete Interaktion mit der DNA erleichtert (Stead et al., 2007). Würde diese Annahme zutreffen, sollte die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 den Phänotyp einer siRNA-vermittelter Depletion widerspiegeln und die Stabilisierung von TopBP1 und damit verbunden die Aktivierung der DNA-Schadensantwort unterbinden. Allerdings konnte in einem Zeitverlaufsexperiment sowohl in immortalen Zelllinien als auch in primären MEFs keine differentielle Phosphorylierung von ATM, Chk1 und p53 in *Miz1*<sup>ΔPOZ/ΔPOZ</sup> MEFs festgestellt werden (Abb. 10C, Daten nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Ausbildung von Homodimeren bzw. –

tetrameren die DNA-Bindung von Miz1 nicht begünstigt und somit nicht für diese nicht-transkriptionelle Funktion von Miz1 relevant ist. Um diese Aussage jedoch eindeutig zu belegen, wäre der Nachweis einer nicht beeinträchtigten DNA-Bindung durch das Miz1 $\Delta$ POZ-Protein, beispielsweise anhand einer Chromatinimmunpräzipitation (ChIP), notwendig. Dies war allerdings nicht möglich, da kein ChIP-geeigneter Miz1-spezifischer Antikörper verfügbar war.

## **5.2 c-Myc antagonisiert die TopBP1-stabilisierende Funktion von Miz1**

### **5.2.1 Das Auftreten von DNA-Schäden induziert die Freisetzung von Miz1 aus einem repressorischen Komplex mit TopBP1 und einem Komplex mit dem Tumorsuppressor BRCA1**

Wie bereits in Kapitel 1.1.5 erläutert wurde, ist die post-transkriptionelle und post-translationelle Regulation der c-Myc-Menge ein wichtiger Schritt zur Vermeidung der DNA-Replikation und Zellzyklusprogression bei Vorliegen von DNA-Schäden. Eine direkte Beteiligung von c-Myc an der Einleitung oder dem Abschalten der DNA-Schadensantwort aufgrund nicht-transkriptioneller Mechanismen wurde dagegen bisher nicht nachgewiesen. Entsprechendes trifft auf den Transkriptionsfaktor Miz1 zu, dessen bekannte Funktion in der UVB-induzierten Signalkaskade bisher hauptsächlich auf die Regulation des Zellzyklusinhibitors p21Cip1 beschränkt war, die bereits in Abschnitt 5.1.1 beschrieben wurden. Lediglich eine essentielle Funktion von c-Myc während der Aktivierung der IR-induzierten, ATM-abhängigen Signalantwort wurde berichtet, wobei diese wahrscheinlich ebenfalls auf eine transkriptionelle Regulation mit Nbs1 als kritischem Zielgen zurückzuführen ist (Chiang et al., 2003; Guerra et al., 2010).

Um nun eine mögliche zusätzliche Rolle des c-Myc/Miz1-Netzwerkes in diesen Prozessen zu untersuchen, wurde zunächst mittels Gelfiltration überprüft, ob die Größe und damit die Zusammensetzung der Komplexe, in denen beide Proteine vorliegen, durch eine UVB-Behandlung verändert wird. Dies ist beispielsweise in Zusammenhang mit dem Tumorsuppressor BRCA1 beschrieben worden, der bei Auftreten von DNA-Schäden zwei Komplexe mit unterschiedlichen Funktionen ausbildet (Greenberg et al., 2006). In einem Komplex mit BACH1 und TopBP1 reguliert BRCA1 beispielsweise den S-Phasen-Kontrollpunkt, der gewährleistet, dass bei Vorliegen geschädigter DNA keine weitere DNA-Synthese stattfindet. Da der Miz1-Interaktionspartner TopBP1 eine Komponente dieses Komplexes darstellt, wurde eine Beteiligung von Miz1 in diesem Kontrollpunkt untersucht.

Die Auftrennung von Proteingemischen, die aus unbehandelten und UVB-bestrahlten Zervixkarzinomzellen isoliert wurden, zeigte jedoch kein verändertes Elutionsprofil der analysierten Proteine, das auf eine UVB-induzierte Ausbildung distinkter c-Myc/Miz1-Komplexe hinweisen könnte (Abb. 13 und Daten nicht gezeigt). Da allerdings neben TopBP1

zudem eine Isoform von Miz1 mit BRCA1 in einem Größenbereich von etwa 670 bis 800 kDa koeluierte, wurde im Folgenden die Interaktion dieser Proteine und deren Regulation durch Einführen von DNA-Schäden untersucht. Wie bereits für die Wechselwirkung von TopBP1 und Miz1 berichtet wurde (Herold et al., 2008), konnte in unbehandelten Zellen ein Komplex von Miz1 und BRCA1 nachgewiesen werden, der eine Größe von etwa 700 kDa aufweist (Abb. 15C). Dieser wurde durch die Initiation der DNA-Schadensantwort aufgelöst, bildete sich jedoch nach vier Stunden erneut aus (Abb. 15A und B). Damit ist die in diesem Experiment erstmals beschriebene Interaktion von Miz1 und BRCA1 und deren Regulation vergleichbar mit der TopBP1/Miz1-Wechselwirkung (Herold et al., 2008). Daher könnte die Bindung an Miz1 nicht nur zur Chromatin-Assoziation und damit Stabilisierung von TopBP1 (siehe Abschnitte 4.2.3 und 4.2.5) sondern auch von BRCA1 führen. Damit würden nach der Detektion von DNA-Schäden zwei der zentralen Vermittlerproteine dieser Signalkaskade, TopBP1 und BRCA1, in ausreichender Menge vorliegen, um eine effektive Zellantwort auszulösen. Zum Anderen wurde eine Inaktivierung der Miz1-Funktion durch die Wechselwirkung mit TopBP1 aufgezeigt (Herold et al., 2002), was mit der Beobachtung übereinstimmt, dass die Depletion von TopBP1 zu einer p53-unabhängigen Aktivierung der *CDKN1A*-Expression und der Inhibition des CyclinE/Cdk2-Komplexes führt (Jeon et al., 2007). Falls Miz1 zudem durch die Interaktion mit BRCA1 transkriptionell inaktiviert wird, könnten beide Komplexe, TopBP1/Miz1 und BRCA1/Miz1 eine duale Funktion ausüben. Neben der Bereitstellung ausreichender Mengen der Komponenten der UVB-induzierten Zellantwort würde Miz1 dadurch gleichzeitig ohne das Auftreten von Stress in einem inaktiven Zustand vorliegen, der die Expression des Zellzyklusinhibitors p21Cip1 unterbindet. Eine derartige Repressorfunktion von BRCA1 wurde bereits für ein weiteres Protein der Familie der Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>-Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, ZBRK1, nachgewiesen (Zheng et al., 2000).

### **5.2.2 Die Aktivierung der ATR-Signalkaskade durch erhöhte Miz1-Mengen ist nicht auf vermehrt auftretende DNA-Schäden zurückzuführen**

In vorangegangenen Studien konnte die Stimulierung der ATR-Aktivität sowie eine Aktivierung dieser Signalkaskade durch TopBP1 nachgewiesen werden (Kumagai und Dunphy, 2006; Kumagai et al., 2006; Toledo et al., 2008). Erhöhte Mengen des Miz1-Proteins führen aufgrund der Stabilisierung von TopBP1 zu einer Transkriptions-unabhängigen Aktivierung der ATR-abhängigen Signaltransduktion, die durch die Phosphorylierung und damit Aktivierung von Effektorproteinen wie p53(Ser15) und Chk1(Ser345) belegt werden konnte (Herold et al.,

2008). Neben der Stabilisierung von ATR und TopBP1 durch Miz1 könnten jedoch zudem Miz1-induzierte DNA-Schäden zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort beitragen. Dies wurde bereits im Zusammenhang mit c-Myc berichtet, dessen Aktivierung mit der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und dem Auftreten von DNA-Schäden einhergeht (Vafa et al., 2002). Darüber hinaus würde die Inhibition der DNA-Reparatur und die damit verbundene Akkumulation von DNA-Schäden während der DNA-Replikation eine Aktivierung der ATR-abhängigen Signaltransduktion auslösen. Eine Quantifizierung der DNA-Schäden mittels eines alkalischen *Comet Assays* ergab jedoch im Vergleich zur Kontrollpopulation keinen signifikanten Anstieg sondern eine Reduktion in ungestressten Miz1S428A-exprimierenden Zellen (Abb. 16). Auch die Analyse der beiden UVB-behandelten Proben lieferte keinen Hinweis auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber genotoxischem Stress bzw. eine unzureichende DNA-Reparatur aufgrund der erhöhten Mengen der konstitutiv aktiven Miz1-Mutante, Miz1S428A. Allerdings konnte durch den Nachweis der Akkumulation von DNA-Strangbrüchen in diesen Proben die Funktionalität des Experimentes belegt werden. Die Aktivierung der ATR-abhängigen Signalkaskade ist daher vermutlich ausschließlich auf die Stabilisierung von TopBP1 und ATR und nicht auf die Induktion von DNA-Schäden durch Miz1 zurückzuführen.

### **5.2.3 Die E3-Ubiquitin-Ligase HectH9 reguliert während der UVB-induzierten Signalantwort die Stabilität von löslichem TopBP1**

Eine erhöhte Expression von TopBP1 resultiert aufgrund der Aktivierung des ATR-abhängigen DNA-Schadenkontrollpunktes in einer verminderten Proliferationsrate und Arretierung in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus (Toledo et al., 2008). Daher ist in ungestressten Zellen eine Regulation der Proteinmengen von Initiatoren und Mediatoren der ATR-Signalkaskade, wie beispielsweise TopBP1, notwendig, um ein normales Wachstum und die Zellzyklusprogression zu gewährleisten.

Dementsprechend konnten Honda und Kollegen (2002) in ungestressten Zellen eine Interaktion von TopBP1 mit der E3-Ubiquitin-Ligase hHYD (*human hyperplastic disc*, alternativ als Edd bezeichnet) sowie die damit verbundene Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von TopBP1 nachweisen (Honda et al., 2002). Die Behandlung mit Röntgenstrahlung führte jedoch zu einer Phosphorylierung von TopBP1, was die Bindung von hHYD und dadurch den Abbau von TopBP1 blockierte. Unter diesen Bedingungen würden somit ansteigende Mengen von TopBP1 zur Verfügung stehen, um die Funktion in der Initiation der ATR-abhängigen

Signalantwort auszuüben. Allerdings war nicht belegt, dass dieser hHYD-abhängige proteasomale Abbau den einzigen Regulationsmechanismus der TopBP1-Proteinmengen in ungestressten Zellen darstellt bzw. außerdem eine Funktion während des Abschaltens der DNA-Schadensantwort ausübt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Miz1 TopBP1 in ungestressten Zellen sowohl stabilisiert als auch eine Fraktion von TopBP1 zum Chromatin rekrutiert (Herold et al., 2008). Ein direkter Zusammenhang von Stabilisierung und Rekrutierung von TopBP1 durch Miz1 wurde allerdings bisher nicht nachgewiesen. Durch den Einsatz des Proteasominhibitors MG132 in einem Fraktionierungsexperiment konnte nun belegt werden, dass lösliches TopBP1 durch das Proteasom abgebaut wird, während die Chromatin-assoziierte Fraktion von TopBP1 durch den Proteasominhibitor nicht zusätzlich stabilisiert wird (Abb. 17). Diese Daten legen einen Mechanismus nahe, bei dem TopBP1 durch die Rekrutierung zum Chromatin aufgrund der räumlichen Trennung vor proteasomaler Degradation geschützt wird. Neben der E3-Ubiquitin-Ligase hHYD, deren Depletion jedoch keinen Einfluss auf die Mengen von löslichem TopBP1 ausübte (Herold et al., 2008), wurde die Rolle von HectH9 in diesem Prozess analysiert. Hinweise auf eine potentielle Beteiligung dieser Ubiquitin-Ligase bestanden in der Detektion von HectH9 ausschließlich in der löslichen Fraktion (Abb. 17) und der bereits bekannten Funktion von Miz1 in der Regulation der Ubiquitinierung von c-Myc durch HectH9 (Adhikary et al., 2005). Zudem wurde HectH9 als Substrat von ATM und/oder ATR identifiziert (Matsuoka et al., 2007; Mu et al., 2007), was auf eine DNA-Schadensabhängige Rolle dieser E3-Ligase hinweist. Daher könnte sowohl die Aktivität von HectH9 als auch die Assoziation mit TopBP1 einer Regulation durch Phosphorylierung unterliegen. Ähnliches wurde bereits für das anti-apoptische, mitochondrielle Protein Mcl1 beobachtet, das nach Initiation der DNA-Schadensantwort durch HectH9 ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom degradiert wird (Zhong et al., 2005).

Tatsächlich induzierte HectH9 die Ubiquitinierung von TopBP1 *in vivo* (Herold et al., 2008). Dementsprechend führte die Expression von HectH9 zu einer reduzierten Stabilität von TopBP1 bei Vorliegen von DNA-Schäden. In ungestressten Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, da wahrscheinlich die Chromatinassoziation von TopBP1 durch Miz1 die Ubiquitinierung verhindert. Eine UVB-Behandlung führt jedoch zu der Auflösung des TopBP1/Miz1-Komplexes, weshalb der Effekt von HectH9 auf die Stabilität von TopBP1 hauptsächlich unter diesen Bedingungen relevant sein könnte. Anhand der Depletion von HectH9 konnte nachgewiesen werden, dass der proteasomale Abbau von TopBP1 durch HectH9 das Abschalten der ATR-abhängigen Signalantwort reguliert, was durch die verzögerte bzw. fehlende Dephosphorylierung von ATM und p53 belegt wurde (Herold et al., 2008). Die Initiation der ATR-Signalkaskade war dagegen nicht beeinträchtigt, da eine unveränderte

Phosphorylierung und damit Aktivierung von Mediatoren dieses Signalwegs nachgewiesen werden konnte.

Zusätzlich zu ATR ist ATM eine zweite, nah verwandte Kinase, der eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden zukommt. Während ATR spezifisch durch arretierte Replikationsgabeln aktiviert wird, erfolgt die Initiation der ATM-abhängigen Signalantwort aufgrund von DNA-Doppelstrangbrüchen. Obwohl zwischen den ATR- und ATM-abhängigen Signalkaskaden eine Vernetzung besteht, erfolgt die Aktivierung und Vermittlung dieser Signale zum Teil spezifisch durch distinkte Proteinkomplexe (Kastan und Lim, 2000). Dies konnte unter anderem anhand von Zellen nachgewiesen werden, die aus Ataxia-telangiectasia-Patienten isoliert wurden und daher eine homozygote Null- bzw. *Missense*-Mutation von *ATM* aufweisen. Diese zeigen eine Hypersensitivität gegenüber genotoxischem Stress, der DNA-Doppelstrangbrüche verursacht wie beispielsweise ionisierende Strahlung. Im Gegensatz dazu verläuft die zelluläre Antwort auf UV-Strahlung, die DNA-Einzelstrangbrüche induziert und daher zur Arretierung der Replikationsgabel führt, nahezu normal, was die spezifische Wirkungsweise von ATM unterstreicht und eine generelle Funktion während der DNA-Reparatur ausschließt (Kastan und Lim, 2000). Des Weiteren beinhaltet die ATM-Aktivierung aufgrund von DNA-Doppelstrangbrüchen die Detektion dieser Art von DNA-Schäden durch den Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN)-Komplex, der ATM an die betroffenen Stellen rekrutiert (Lee und Paull, 2005). Wie in Abschnitt 1.2.4 erläutert, kommt dagegen bei Vorliegen von DNA-Einzelstrangbrüchen dem Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1)-Komplex eine zentrale Rolle zur Aktivierung von ATR zu. Auch die aktivierende Phosphorylierung der Effektorinasen Chk1 und Chk2 erfolgt spezifisch durch die ATR- bzw. ATM-abhängigen Signalkaskaden (Zhou und Bartek, 2004). Daher lag die Vermutung nahe, dass auch das Abschalten beider Signalwege auf unterschiedlichen Mechanismen basiert und HectH9 damit eine spezifische Funktion während des Abschaltens des ATR-Signalwegs zukommt. Diese Hypothese wurde durch die siRNA-vermittelte Depletion von HectH9 und die anschließende Behandlung mit ionisierender Strahlung überprüft. Während die verminderten Mengen von HectH9 im Fall von UVB-Strahlung aufgrund der erhöhten TopBP1-Proteinmengen ein verzögertes Abschalten der ATR-induzierten Signalkaskade bewirkte (Herold et al., 2008), spielte diese Ubiquitin-E3-Ligase während der ATM-abhängigen DNA-Schadensantwort keine Rolle (Abb. 18). Verdeutlicht wurde dies durch die unveränderte Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ATM selbst sowie der Effektorkinase Chk2. Lediglich die Mengen von phosphoryliertem p53 waren in dem Zeitverlaufsexperiment erhöht, da HectH9 als Ubiquitin-E3-Ligase die Stabilität von p53 reguliert (Chen et al., 2005). Dies lässt den Schluss zu, dass die Ubiquitin-Ligase HectH9 spezifisch das Abschalten der ATR-abhängigen Signalkaskade durch die Ubiquitinierung und

Degradation von TopBP1 vermittelt und keine entsprechende Funktion während der ATM-abhängigen Signalkaskade ausübt.

#### **5.2.4 Die Ausbildung eines c-Myc/Miz1-Komplexes induziert die Degradierung von TopBP1 und blockiert dadurch die Aktivierung der ATR-Signalkaskade**

Die Stabilisierung von TopBP1 durch Miz1 beruht auf deren Interaktion und die Vermittlung der Chromatin-Assoziation von TopBP1 durch Miz1. Mittels einer Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass diese Bindung von c-Myc antagonisiert wird. Während in Kontrollzellen eine Interaktion von TopBP1 und Miz1 nachgewiesen werden konnte, verhinderte die Expression von *MYC* diese Wechselwirkung, jedoch wurde unter diesen Bedingungen eine Komplexbildung von c-Myc und Miz1 detektiert (Abb. 19). Dementsprechend führte die Tetrazyklin-regulierbare, verstärkte Expression von *MYC* in humanen B-Zellen zu einer Freisetzung von TopBP1 vom Chromatin und zu einer gleichzeitigen Akkumulation in der löslichen Fraktion (Abb. 20A und C). Diese direkte Korrelation der Menge von c-Myc und der Chromatin-Dissoziation von TopBP1 stützt ein Modell, in dem c-Myc durch dessen kompetitive Bindung an Miz1 TopBP1 vom Chromatin verdrängt. Außerdem war der Anstieg der löslichen Proteinmengen von TopBP1 lediglich transient. Gleichzeitig konnte in einem Gesamtzelllysat ein leichter Rückgang der TopBP1-Proteinmengen nachgewiesen werden (Abb. 20B). Diese Daten stimmen mit den bereits beschriebenen Beobachtungen überein, dass HectH9 diese Fraktion von TopBP1 ubiquitiniert und degradiert. Bestätigt wurde dies durch die stabile Expression von *MYC*, die in der Reduktion der TopBP1-Gesamt mengen sowie der verminderten Aktivierung der ATR-Signalkaskade bei Vorliegen von DNA-Schäden resultierte (Herold et al., 2008). Da die Punktmutante *MycV394D*, deren Bindung an Miz1 stark beeinträchtigt ist, diese Effekte nicht hervorrief, deuten diese Ergebnisse ebenfalls auf eine antagonistische Bindung von Miz1 durch c-Myc bzw. TopBP1 hin. Darüber hinaus konnte anhand von Genexpressionsanalysen eine transkriptionelle Regulation von Komponenten der ATR-induzierten DNA-Schadensantwort wie TopBP1 durch c-Myc ausgeschlossen werden, was in Kombination mit der schnellen zeitlichen Abfolge einen indirekten Mechanismus unwahrscheinlich erscheinen lässt. Dies stimmt mit vorangegangenen Studien überein, die eine Beeinträchtigung der p53-abhängigen DNA-Schadensantwort aufgrund erhöhter c-Myc-Proteinmengen belegten (Sheen und Dickson, 2002; Sheen et al., 2003; Vafa et al., 2002). Die Expression von *Myc* führte auch in primären, immortalen Zellen zu einem abgeschwächten Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus nach Auftreten von DNA-Schäden, einem verfrühten

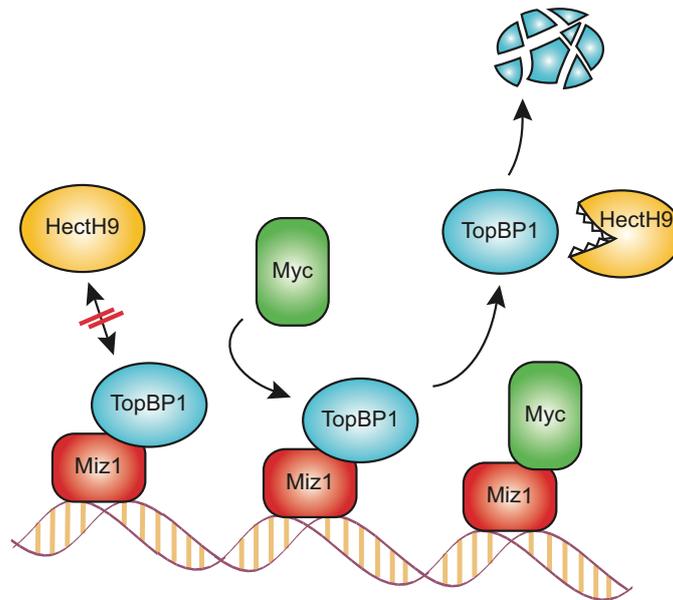
Übertritt in die S-Phase des Zellzyklus und damit verbunden zur Replikation geschädigter DNA (Sheen und Dickson, 2002). Ähnliches wurde bezüglich der Effizienz des G2/M-Kontrollpunktes und dem Übertritt in die Mitose bei erhöhten Myc-Proteinmengen berichtet (Sheen et al., 2003). Folglich akkumulierten in einem Langzeitexperiment polyploide Zellen. Gleichzeitig konnte eine Sensitivierung der Myc-exprimierenden Zellen gegenüber genotoxischem Stress und daher eine Zunahme der apoptotischen Zellpopulation detektiert werden. Da in diesen Untersuchungen allerdings der zugrundeliegende molekulare Mechanismus jedoch nicht vollständig identifiziert wurde und ausschließlich die ATM-abhängige Signalkaskade einschlossen, die durch ionisierende Strahlung aktiviert wird, stellt die hier beschriebene Regulation der TopBP1-Lokalisation bzw. -Stabilität durch c-Myc eine neue, nicht-transkriptionelle Funktion in der Initiation der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort dar.

### **5.2.5 Relevanz der nicht-transkriptionellen Regulation der ATR-Signalkaskade durch Miz1 und c-Myc**

Die beschriebenen Daten legen ein Modell nahe, in dem die durch Miz1-vermittelte Chromatin-Assoziation TopBP1 vor der Ubiquitinierung durch HectH9 schützt und daher stabilisiert (Abb. 31). Die Chromatin-assoziierte Fraktion von TopBP1 könnte daher als Reservoir dienen, aus dem TopBP1 nach Auftreten von DNA-Schäden zu arretierten Replikationsgabeln rekrutiert werden kann. Ob dieser Fraktion von TopBP1 zudem eine Rolle in der DNA-Replikation zukommt und damit die Cdc45-Rekrutierung zum Präreplikationskomplex vermittelt (Van Hatten et al., 2002), kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

Ein ähnlicher Mechanismus der Regulation von Chromatin-Assoziation und Degradation wurde bereits für Cdc6, einer Komponente des Prä-Replikationskomplexes, beschrieben, das wie TopBP1 nach der Freisetzung vom Chromatin von HectH9 ubiquitiniert wird (Hall et al., 2007). Cdc6 wird jedoch im Gegensatz zu TopBP1 direkt nach Auftreten der DNA-Schädigung durch HectH9 degradiert, was auf eine zusätzliche Rolle von HectH9 in der Initiation der DNA-Schadensantwort hinweist. Somit wäre die DNA-Replikation trotz unzureichender DNA-Reparatur verhindert und würde die geschädigte Zelle vor genomischer Instabilität schützen. Die zeitlich verzögerte proteasomale Degradation von TopBP1 ist dagegen essentiell für das Abschalten der ATR-abhängigen Signalkaskade. Nachdem TopBP1 zusammen mit ATR und ATRIP die DNA-Schadensantwort initiiert hat, erfolgt die Arretierung des Zellzyklus und die Reparatur der DNA-Schäden. Darauf wird TopBP1 vom Chromatin freigesetzt und könnte von

HectH9 als Substrat erkannt, ubiquitiniert und degradiert werden. Da HectH9 selbst ein Substrat der beiden Kontrollpunkt-kinasen ATR und ATM darstellt (Matsuoka et al., 2007; Mu et al., 2007), könnte diese Phosphorylierung die Bindung an BRCT-Domänen von TopBP1 vermitteln, die als Interaktionsmodul für phosphorylierte Serin- und Threoninreste dienen.



**Abb. 31: Modell der Regulation der TopBP1-Stabilität durch c-Myc, Miz1 und HectH9.**

Miz1 vermittelt die Chromatin-Assoziation von TopBP1 und verhindert dadurch dessen Ubiquitinierung durch HectH9 sowie die proteasomale Degradierung. c-Myc antagonisiert die Bindung von TopBP1 an Miz1 und begünstigt dadurch die Freisetzung von TopBP1 in die lösliche Fraktion. Dies ermöglicht die Interaktion von TopBP1 mit HectH9 und damit verbunden dessen Ubiquitinierung und Degradierung.

Das Onkoprotein c-Myc reguliert durch die antagonistische Bindung an Miz1 die Chromatin-Assoziation und damit verbunden die Stabilität von TopBP1. Deshalb resultieren onkogene Mengen von c-Myc in der Destabilisierung von TopBP1 und einer unzureichenden Initiation der ATR-Signalkaskade bei Auftreten von DNA-Einzelstrangbrüchen. In Übereinstimmung damit wurde bereits im Zusammenhang mit erhöhten Mengen von c-Myc das Auftreten genomischer Instabilität beschrieben (Kuttler und Mai, 2006). Beispielsweise konnte durch Einsatz eines Hydroxytamoxifen-regulierten Myc-ER (*estrogen receptor*)-Fusionsproteins als zelluläre Antwort auf die Myc-Aktivierung die Akkumulation von  $\gamma$ H2A.X-Foci nachgewiesen werden (Judith Müller, persönliche Mitteilung), die in unmittelbarer Nähe von DNA-Doppelstrangbrüchen auftreten und für eine maximale Effizienz der Reparatur notwendig sind (Celeste et al., 2002; Rogakou et al., 1998). Diese Interpretation von TopBP1 als kritischem Zielprotein von c-Myc zur Abschwächung des ATR-induzierten Reparaturwegs und der

Akkumulation von DNA-Schäden bzw. DNA-Doppelstrangbrüchen stimmt mit Berichten überein, die eine H2A.X-Phosphorylierung und Aktivierung von ATM und Chk2 in TopBP1-defizienten Zellen belegen (Kim et al., 2005).

Darüber hinaus deuten weitere Arbeiten in *Xenopus* und humanen Zellen auf die Beteiligung von c-Myc an der DNA-Replikation hin (Dominguez-Sola et al., 2007). Durch die Interaktion und Rekrutierung diverser Komponenten des Präreplikationskomplexes stimuliert c-Myc die Initiation der DNA-Replikation und verursacht dadurch replikativen Stress. Zudem konnte eine negative Regulation der Replikationsinitiation in ungeschädigten Zellen durch die ATR-Signalkaskade nachgewiesen werden (Shechter et al., 2004). Zusätzlich zu der Erhöhung der Replikationsrate könnte c-Myc daher über die Reduktion der TopBP1-Mengen die ATR-abhängige Limitierung der Replikationsinitiation aufheben. In Übereinstimmung mit einer derartigen Regulation der DNA-Replikation durch die ATR-Signalkaskade weisen Chk1-defiziente Zellen eine gesteigerte Replikationsrate auf (Maya-Mendoza et al., 2007).

### **5.3 Die Inhibition der Miz1-Funktion durch den Tumorsuppressor Arf führt zum Verlust der Zelladhäsion und induziert Apoptose**

Der Tumorsuppressor Arf (*alternate reading frame*) wurde erstmals 1995 als Produkt eines alternativen Transkripts des *INK4a/ARF*-Genlokus in humanen, malignen B-Zell-Lymphomen sowie einer murinen Erythroleukämie-Zellbibliothek beschrieben (Duro et al., 1995; Quelle et al., 1995). Dieser Genlokus kodiert somit zwei distinkte Tumorsuppressoren, p16Ink4a und p14Arf (p19Arf im murinen System), die spezifisch die Aktivität des Retinoblastom-Proteins Rb bzw. des Transkriptionsfaktors p53 und somit deren wachstumshemmende Funktion regulieren (Kamijo et al., 1998; Quelle et al., 1995; Serrano et al., 1993; Zhang et al., 1998). Diese vier Proteine bilden die Basis eines zentralen und komplexen Netzwerkes zum Schutz der Zelle vor onkogener Transformation, was durch das Auftreten von Deletionen, Mutationen oder epigenetischem Stilllegen des *INK4a/ARF*-Lokus in einem breiten Spektrum von Tumoren wie Melanomen, Glioblastomen und einigen Leukämien bestätigt wird (Lowe und Sherr, 2003). Doch auch die eigenständige Funktion von Arf als Tumorsuppressor wurde schon 1997 von Kamijo und Kollegen durch die Analyse p19Arf-defizienter Mäuse beschrieben, die funktionelles p16Ink4a exprimierten. In diesem Mausmodell führte die homozygote Deletion von p19Arf zu einer erhöhten Tumorzinzidenz bei Mäusen sowie einer Transformation der Knockout MEFs alleine durch onkogenes H-Ras.

#### **5.3.1 Die Interaktion von Miz1 und Arf führt zur Relokalisierung von Arf aus den Nukleoli in das Nukleoplasma**

Obwohl nukleolär lokalisiertes Arf häufig als „inaktiver Vorratsspeicher“ beschrieben wird, welcher der Stabilisierung von Arf durch NPM dienen soll (Korgaonkar et al., 2005; Llanos et al., 2001; Rodway et al., 2004), gibt es gegenteilige Berichte, die eine Beteiligung von Arf an der Regulation der Ribosomenbiogenese durch die Verzögerung der Prozessierung der 47/45S und 32S rRNA Vorläufer beschreiben, die in den Nukleoli stattfindet (Sugimoto et al., 2003). Dieser Regulationsprozess ist nicht von Mdm2 oder p53 abhängig sondern erfordert die Interaktion mit Nucleophosmin (NPM), einem ebenfalls vorwiegend nukleolären Protein, das in geringen Mengen auch im Nukleoplasma nachgewiesen werden kann (Bertwistle et al., 2004). Arf inhibiert die Funktion der Endoribonuclease NPM, indem es zum Einen dessen Ubiquitinierung und Degradierung induziert (Itahana et al., 2003). Zum Anderen verhindert Arf die DeSUMOylierung von NPM durch die Isopeptidase Senp3, wodurch dessen Aktivität in der

rRNA-Prozessierung blockiert wird (Haindl et al., 2008; Kuo et al., 2008). Der Tumorsuppressor Arf stellt daher ein wichtiges Bindeglied zwischen der Regulation der Ribosomenbiogenese und des Zellwachstums sowie der Proliferation dar.

Aufgrund des stöchiometrischen Überschusses von NPM wird davon ausgegangen, dass nahezu alle Arf-Moleküle einer Zelle durch NPM komplexiert und dadurch stabilisiert vorliegen (Bertwistle et al., 2004; Lindstrom und Zhang, 2006). Die Interaktion von NPM mit Arf in hochmolekularen Komplexen führt zur nukleolären Lokalisation beider Proteine, wodurch Arf aufgrund der räumlichen Trennung vor Ubiquitin-vermittelter proteasomaler Degradation geschützt wird (Colombo et al., 2005; Kuo et al., 2004; Rodway et al., 2004).

Da NPM als aktivierender Cofaktor von Miz1 agiert (Wanzel et al., 2008), wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst eine potentielle Interaktion von Miz1 und Arf in einem trimeren Komplex mit NPM untersucht. Wie bereits für NPM in der Literatur gezeigt wurde, führte die Expression von *MIZ1* auch zu einer räumlichen Umverteilung von Arf (Abb. 21A, B und D). Diese Relokalisierung von Arf aus den Nukleoli in das Nukleoplasma konnte auf die Bindung an Miz1 zurückgeführt werden, die mittels Immunpräzipitation *in vivo* nachgewiesen wurde (Abb. 22A und B). Um die Spezies-übergreifende Funktion der Miz1/Arf-Interaktion zu belegen, wurde diese ebenfalls in einem murinen Zellsystem sowohl exo- als auch endogen bestätigt (Abb. 22C und D). Diese Beobachtungen legen zwar eine direkte Interaktion von Arf und Miz1 nahe, jedoch könnte aufgrund der bereits in der Literatur beschriebenen Interaktion von Miz1 und NPM die Bindung beider Proteine auch auf einer indirekten Komplexbildung beruhen, die durch NPM vermittelt wird. Daher wurden diese Bindungsstudien in *p53<sup>-/-</sup>; Npm<sup>-/-</sup>* MEFs durchgeführt, die eine Brücken-Funktion von NPM ausschlossen. Weiterhin wurde dieses Zellsystem verwendet, um den Effekt der Rekonstitution von NPM auf die Assoziation von Miz1 und Arf zu untersuchen. Dabei konnte nicht nur verifiziert werden, dass die Interaktion von Miz1 und Arf unabhängig von NPM stattfindet, sondern zudem durch NPM antagonisiert wird (Abb. 23). Entsprechendes wurde bereits für die Interaktion von Arf mit NPM und Mdm2 berichtet (Brady et al., 2004). Das Auftreten von DNA-Schäden bewirkt die Auflösung des nukleolären Arf/NPM-Komplexes, was zur nukleopasmatischen Lokalisierung beider Proteine führt, wodurch Mdm2 und NPM um die Bindung von Arf konkurrieren (Lee et al., 2005; Yogeve et al., 2008).

### 5.3.2 Arf blockiert die transkriptionelle Aktivierung Miz1-abhängiger Zielgene

Da der Großteil der bisher beschriebenen Funktionen von Miz1 auf dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor beruht, wurde mittels Reporteranalysen überprüft, ob die Interaktion des Tumorsuppressors Arf mit Miz1 die Transkriptionsaktivierung durch Miz1 beeinflusst. Entsprechend der antagonistischen Bindung an Miz1 üben NPM und Arf gegensätzliche Effekte auf die transkriptionelle Aktivität von Miz1 aus. Während NPM in der Literatur als aktivierender Cofaktor identifiziert wurde (Wanzel et al., 2008), konnte im Zusammenhang mit Arf eine Repression der *P15INK4B* und *P21CIP1* Reporterplasmide festgestellt werden (Abb. 24).

Die biologische Bedeutung dieses Repressionsmechanismus durch Arf konnte zudem *in vivo* belegt werden, da Arf in *p53*-, *Mdm2*- und *Arf*-defizienten MEFs einen Miz1-induzierten G1-Arrest aufgrund erhöhter p21-Mengen aufhob. Des Weiteren zeigten genomweite Genexpressionsanalysen in humanen Osteosarkomzellen eine Repression von 322 Genen durch die Koexpression von Miz1 und Arf, während Miz1 lediglich 100 Gene reprimierte (Michael Wanzel, persönliche Mitteilung). Anhand einer GO-Term (Genontologie)-Analyse konnte eine Subgruppe der durch Miz1 und Arf reprimierten Gene identifiziert werden, die an der Regulation der Zelladhäsion und der Signaltransduktion beteiligt sind. Der Kontakt zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix wird hauptsächlich durch Integrine vermittelt, deren Expression durch Miz1 und Arf dereguliert war (Michael Wanzel, persönliche Mitteilung). Beispiele hierfür sind *ITGBL1* und *ITGA3*. Da viele epitheliale Zellen zum Überleben auf den Kontakt zur extrazellulären Matrix angewiesen sind (Reginato et al., 2003), führte die Repression dieser Gene zu einem Verlust der Zelladhäsion und damit verbunden zur Einleitung eines spezifischen Typs von Apoptose, der als Anoikis bezeichnet wird (Michael Wanzel, persönliche Mitteilung). Zudem konnte beobachtet werden, dass erhöhte Mengen von Miz1 und Arf trotz einer Blockade der Apoptose mittels Expression des anti-apoptotischen Gens *BCL2* zu einem Verlust der Zelladhäsion führen. Dadurch konnte eindeutig belegt werden, dass die Apoptose eine Konsequenz des Verlusts der Adhäsion aufgrund der Expression von *MIZ1* und *ARF* ist. Darüber hinaus wurde durch den Vergleich mit einer Datenbank von genomischen p53-Bindestellen gezeigt (Wei et al., 2006), dass keines der Adhäsionsgene ein Zielgen von p53 darstellt, weshalb eine direkte Beteiligung von p53 an der Einleitung der Apoptose ausgeschlossen werden konnte. Eine Regulation von p53-abhängigen, proapoptischen Zielgenen wie *BAX* und *NOXA*, die auf die direkte Interaktion von Miz1 mit p53 zurückzuführen ist und durch Arf antagonisiert wird (Miao et al., 2010), konnte nicht beobachtet werden.

### **5.3.3 Arf induziert die Bildung von Heterochromatin im Bereich von Miz1-Bindestellen**

Für die mechanistische Aufklärung der Repression der Miz1-Funktion durch Arf wurde zunächst die Chromatinassoziation von Miz1 überprüft. Obwohl Arf die transkriptionelle Aktivität von Miz1 deutlich reduzierte (Abb. 24), zeigten ChIP-Analysen beispielsweise am *P15INK4B*-Promotor keine Beeinträchtigung der DNA-Bindekapazität des Transkriptionsfaktors sondern einen leichten Anstieg von gebundenem Miz1 (Steffi Herold, persönliche Mitteilung). Des Weiteren konnte eine inverse Korrelation der Arf-Mengen und der Löslichkeit von Miz1 festgestellt werden (Abb. 25), die mit der Relokalisierung von Miz1 von einer homogenen nukleären Verteilung zu einer Lokalisation in distinkten subnukleären Foci einher ging (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Da eine derart verminderte Extrahierbarkeit häufig in Verbindung mit der Ausbildung heterochromatischer Strukturen einhergeht (Kouzarides, 2007), wurde zudem das Auftreten von repressorischen Histonmodifikationen wie beispielsweise der Trimethylierung des Histons H3 untersucht. Durch Einsatz eines Antikörpers, der spezifisch trimethyliertes Histon H3 (H3K9me3) bindet, konnte mittels Chromatinimmunpräzipitation nachgewiesen werden, dass die Expression von Arf zu einem deutlichen Anstieg dieser Heterochromatinmarkierung im Bereich der Miz1-Bindestelle des *P15INK4B*-Promotors führt (Steffi Herold, persönliche Mitteilung). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Tumorsuppressor Arf die Bindung bestimmter Promotoren durch Miz1 und die Bildung von Heterochromatin in den flankierenden Bereichen induziert, was schließlich in einer verminderten Löslichkeit von Miz1 sowie der Repression der Miz1-abhängigen Transaktivierung resultiert.

### **5.3.4 Die Ausbildung eines trimeren Komplexes bestehend aus Miz1, c-Myc und Arf bildet die Grundlage der Arf-induzierten Repression von Miz1**

Einige der bisherigen Ergebnisse sowie Hinweise aus der Literatur lassen eine Beteiligung von c-Myc an der Repression der Miz1-Funktion durch Arf möglich erscheinen. So wurde Miz1 beispielsweise ursprünglich als Vermittler der transkriptionellen Repression durch c-Myc identifiziert (Peukert et al., 1997). Zudem deutet die in Abschnitt 4.3.1 beschriebene Kolo-kalisierung von Miz1 und c-Myc in Arf-induzierten, subnukleären Foci auf einen c-Myc-abhängigen Repressionsmechanismus hin. Darüber hinaus interferiert c-Myc auf unterschiedliche Weise mit dem Arf/NPM-Netzwerk:

Zum Einen führen andauernde, hyperproliferative Signale aufgrund aktivierter Onkogene wie *MYC* zur Induktion der *ARF* Expression und leiten eine p53-abhängige Signalantwort ein, die der Eliminierung transformierter Zellen dient. Die funktionelle Inaktivierung beziehungsweise Deletion der Tumorsuppressoren p53 oder Arf ist daher ein entscheidender Schritt der Myc-abhängigen Tumorgenese. Unter Verwendung des E $\mu$ Myc-Mausmodells, das die Pathogenese des Burkitt Lymphoms widerspiegelt, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Arf/p53-Signalkaskade als Tumor-suppressive Barriere die transkriptionelle Aktivität von FoxO-Proteinen beinhaltet, die durch onkogenes c-Myc aktiviert werden und schließlich die Expression von *Arf* induzieren (Bouchard et al., 2007).

Zum Anderen kompetiert c-Myc, wie auch Arf (Abb. 23), mit dem Miz1-Koaktivator NPM um die Bindung von Miz1 und blockiert dadurch dessen Transaktivierung (Wanzel et al., 2008). Darüber hinaus konnte die in der Literatur bereits beschriebene Relokalisierung von Arf aus den Nukleoli in das Nukleoplasma durch die (onkogene) Aktivierung bzw. Expression von c-Myc ebenso verifiziert werden wie die Interaktion der beiden Proteine (Amente et al., 2006; Datta et al., 2004) (Abb. 21C und D, Abb. 22B).

Daher wurde analysiert, ob Arf die Bildung eines repressorischen c-Myc/Miz1-Komplexes induziert. Durch Einsatz aminoterminaler Deletionsmutanten von Arf wurde zunächst mittels Immunpräzipitation festgestellt, dass c-Myc und Miz1 mit unterschiedlichen Domänen des humanen Arf-Proteins interagieren. Während c-Myc wie die bekannten Arf-Interaktionspartner Mdm2 (Zhang et al., 1998) und NPM (Bertwistle et al., 2004) an den durch Exon 1 $\beta$  kodierten aminoterminalen Bereich bindet, ist dieser Bereich für die Interaktion mit Miz1 nicht notwendig (Abb. 26A). Dies ist insbesondere von Bedeutung, da aufgrund dieser selektiven Bindung eine Mutante (p14Arf 65-132), die lediglich den durch Exon 2 kodierten Bereich von Arf umfasst, eingesetzt werden konnte, um eine potentielle Rolle von c-Myc während der Arf-induzierten Repression von Miz1 zu analysieren. Anhand einer Reporterstudie konnte eine Korrelation zwischen dieser Deletion des aminoterminalen Bereichs von Arf und einem partiellen Verlust der transkriptionellen Repression von Miz1 nachgewiesen werden (Abb. 26B). Dementsprechend konnte der Effekt der verminderten Löslichkeit von Miz1 ebenfalls auf den Aminoterminus von Arf zurückgeführt werden (Abb. 26C). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Bindung von Miz1 durch Arf für die Repression der transkriptionellen Funktion als auch für die Sequestrierung von Miz1 in unlösliche Foci nicht ausreichend ist, sondern hierfür die Präsenz der aminoterminalen Domäne von Arf notwendig ist. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die durch Exon 1 $\beta$  kodierten Domäne essentiell für den größten Teil

der bisher bekannten Funktionen wie beispielsweise der Inhibition von Mdm2 und dem damit verbundenen p53-abhängigen Zellzyklusarrest ist (Clark et al., 2002; Quelle et al., 1997).

Um eindeutig zu belegen, dass die Rekrutierung von c-Myc in den repressorischen Miz1/Arf-Komplex erforderlich ist, wurden die aufgeführten Effekte von Arf auf Miz1 außerdem mit Mutanten von Miz1 überprüft, deren Assoziation mit c-Myc stark reduziert bzw. vollständig unterdrückt ist (Peukert et al., 1997). Die reduzierte Bindekapazität dieser Miz1-Mutanten an c-Myc ist auf die Deletion der Aminosäuren 683 bis 716 ( $\Delta 33$ ) bzw. 641 bis 716 ( $\Delta 75$ ) zwischen dem 12. und 13. Zinkfinger zurückzuführen, da dieser Bereich die Interaktion von Miz1 mit c-Myc vermittelt (Abb. 3). Darüber hinaus resultiert der Austausch von fünf hydrophoben Aminosäuren von Miz1 durch Prolin bzw. Glycin (4Pro) in der Unterbrechung der  $\alpha$ -helikalen Struktur in diesem Bereich und dadurch zu einer verminderten Bindung von c-Myc. Die Bindung von Arf wurde durch diese Deletionen bzw. Mutation jedoch nicht beeinträchtigt (Abb. 26D), da die Interaktion mit Arf durch die Zinkfingerregionen von Miz1 vermittelt wird (Miao et al., 2010). Daher konnte aus dem Verlust der Repression und der fehlenden Sequestrierung dieser Mutanten von Miz1 in unlösliche Foci eine wichtige Rolle von c-Myc während der Ausbildung des unlöslichen, repressorischen Miz1-Komplexes nachgewiesen werden (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Die Bedeutung von c-Myc in diesem repressorischen Mechanismus wird zudem durch die Beobachtung gestützt, dass nicht nur die Koexpression von Miz1 und Arf sondern auch von c-Myc und Arf den in Abschnitt 5.3.4 beschriebenen Phänotyp Anoikis hervorruft (Michael Wanzel, persönliche Mitteilung). Die Punktmutante c-MycV394D, deren Interaktion mit Miz1 selektiv gehemmt ist, löste in Kombination mit Arf allerdings keinen Verlust der Adhäsion aus, was das Modell der Ausbildung eines repressorischen c-Myc/Miz1/Arf-Komplexes unterstreicht. Unterstützt werden diese Resultate durch Daten aus der Literatur, die belegen, dass c-Myc in hämatopoietischen und epithelialen Zellen die Zelladhäsion über einen Miz1-abhängigen Mechanismus reprimiert (Frye et al., 2003; Gebhardt et al., 2006; Wilson et al., 2004).

Des Weiteren konnte bereits eine direkte Beteiligung des c-Myc/Miz1-Komplexes während der Induktion von Apoptose durch onkogene Mengen von c-Myc nachgewiesen werden. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Miz1-vermittelte Repression der *P21CIP1*- und *BCL2*-Expression durch c-Myc einen essentiellen Schritt während der Myc-induzierten Apoptose darstellt (Patel und McMahon, 2006, 2007; Seoane et al., 2002). Während der Transkriptionsfaktor Miz1 bei Vorliegen geringer Mengen des Onkoproteins c-Myc die Expression von *P21CIP1* sowie *BCL2* und dadurch ein Überleben der Zelle begünstigte, führte die onkogene Aktivierung von c-Myc zur Repression dieser anti-apoptotischen Zielgene und

leitete unter anderem dadurch das apoptotische Programm ein. Auch in diesem Zusammenhang war die Mutante c-MycV394D nicht in der Lage, Apoptose auszulösen, stimulierte allerdings noch die Proliferation.

Darüber hinaus wurde Arf als Repressor der Myc-induzierten Hyperproliferation und Transformation sowie als Aktivator der Myc-induzierten Apoptose beschrieben, was mit den Beobachtungen in der hier vorliegenden Arbeit übereinstimmt (Qi et al., 2004). Diese tumorsuppressive Funktion von Arf äußert sich beispielsweise dadurch, dass das epigenetische Stilllegen von *ARF* einen Selektionsschritt während der Immortalisierung humaner Fibroblasten durch c-Myc darstellt (Benanti et al., 2007).

Obwohl Miz1 und Arf einen Zellzyklusarrest hervorrufen können, kooperieren die beiden Interaktionspartner nicht in diesem Prozess sondern inhibieren gemeinsam die Zelladhäsion, was zu Apoptose führt. Die Bindung beider Proteine an c-Myc stellt dabei einen kritischen Faktor dar, welcher der Auslöser für einen Wechsel der Arf-Funktion von Arrest zu Apoptose sein könnte. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass vor allem onkogener Stress durch erhöhte Mengen von c-Myc Apoptose hervorruft, während konstitutiv aktives Ras lediglich einen irreversiblen Zellzyklusarrest auslöst, der als Seneszenz bezeichnet wird.

### **5.3.5 Arf induziert die SUMOylierung von Miz1**

Aus der Literatur liegen bereits mehrere Hinweise vor, dass der Tumorsuppressor Arf unabhängig von p53 die SUMOylierung einiger Interaktionspartner wie Mdm2 (Xirodimas et al., 2002), p53 (Chen und Chen, 2003), WRN (Woods et al., 2004) und NPM (Xirodimas und Lane, 2008) stimuliert, wobei die Effekte dieser Modifikation sehr unterschiedlich sind. Da jedoch die Modifikation von Transkriptionsfaktoren durch SUMO (*small ubiquitin like modifier*) bis auf wenige Ausnahmen mit transkriptioneller Repression verknüpft ist (Gill, 2005; Hay, 2005), wurde die Hypothese überprüft, ob Arf die SUMOylierung von Miz1 oder c-Myc induziert und dadurch die Transkription Miz1-abhängiger Zielgene blockiert.

Im humanen System wurden bisher vier SUMO-Formen identifiziert, SUMO1-4. Während SUMO2 und SUMO3 in der reifen Form lediglich an drei Positionen unterschiedliche Aminosäuren und dadurch eine Sequenzhomologie von 97% aufweisen, ergibt ein Sequenzvergleich von SUMO1 mit SUMO2/3 lediglich eine Übereinstimmung von 50% (Gill, 2004). Diese Sequenzunterschiede spiegeln sich in der Art der Modifikation durch diese drei verschiedenen SUMO-Formen wider, da die Übertragung von SUMO1 lediglich in der Mono-

SUMOylierung der Substrate resultiert, SUMO2 und SUMO3 dagegen interne SUMO-Modifikationsstellen aufweisen und dadurch die Ausbildung polymerer Ketten ermöglichen. Da im Fall von SUMO4 nicht belegt ist, dass dieses in die reife, Konjugations-kompetente Form prozessiert werden kann, ist die physiologische Funktion dieser SUMO-Spezies bisher unklar (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). Der Prozess der SUMOylierung verläuft analog zu dem der Ubiquitinierung mittels einer Enzymkaskade bestehend aus drei Komponenten, dem aktivierenden, dimeren E1-Enzym Uba2/Aos1, dem E2-Konjugationsenzym Ubc9 sowie einer E3-Ligase, wobei bisher wenige E3-Ligasen wie RanBP2, das *polycomb group protein* Pc2 und die Familie der PIAS-Proteine beschrieben wurden (Hay, 2005; Johnson, 2004; Melchior, 2000).

Tatsächlich konnte durch die Expression von Arf auch die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors Miz1 *in vivo* nachgewiesen werden, während im Fall von c-Myc unter den Versuchsbedingungen keine Akkumulation einer SUMO-modifizierten Form zu beobachten war (Abb. 27). Durch die siRNA-vermittelte Depletion von c-Myc konnte zudem gezeigt werden, dass c-Myc die SUMOylierung von Miz1 durch Arf begünstigt, was mit der Notwendigkeit von Myc in der Arf-abhängigen Repression von Miz1 übereinstimmt (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Darüber hinaus ist die aminoterminaler Deletionsmutante von Arf, deren Einsatz zu einer verminderten Inhibition und Sequestrierung von Miz1 führt (Abb. 26), nicht in der Lage, die SUMOylierung von Miz1 zu stimulieren (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung). Dies legt die Vermutung nahe, dass neben der Bildung eines repressorischen c-Myc/Miz1/Arf-Komplexes die SUMOylierung von Miz1 notwendig für die Repression der Genexpression ist.

Für einige Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Sp3 wurde bereits gezeigt, dass deren SUMOylierung zur Repression der transkriptionellen Aktivität führt (Sapetschnig et al., 2002), die häufig auf der SUMO-vermittelten Rekrutierung von weiteren Effektoren beruht. Als potentielle Kandidaten wurden beispielsweise Chromatin-Remodeling Proteine und Histondeacetylasen vorgeschlagen, deren repressive Funktion während der Transkription auf der Interaktion mit SUMOylierten Bindepartnern basiert (Girdwood et al., 2003; Kuo et al., 2005; Lin et al., 2006; Stielow et al., 2008; Yang und Sharrocks, 2004). Da, wie bereits erläutert, Arf die SUMO-Modifikation von Miz1 stimuliert und zudem c-Myc ein hochkonserviertes SIM (*SUMO interaction motif*) aufweist (siehe Abschnitt 5.3.6), könnte die Repression der Miz1-Funktion durch Arf ebenfalls auf der Ausbildung eines repressorischen c-Myc/Miz1-Komplexes und anschließender Rekrutierung von Korepressoren beruhen. Meist liegt jedoch lediglich ein geringer Anteil eines Transkriptionsfaktors (< 5%) in der SUMOylierten Form vor, was auf eine zeitlich sehr begrenzte Blockade der Transkription hindeutet. Dennoch könnte eine andauernde

Repression durch die Rekrutierung und Ausbildung eines stabilen Repressorkomplexes gewährleistet werden (Hay, 2005). Durch die Bindung eines SIM-Proteins, z.B. c-Myc, an einen SUMOylierten Transkriptionsfaktor wie Miz1 würde ein neues Interaktionsmodul zur Rekrutierung von Korepressoren entstehen. Dieser Komplex könnte trotz der DeSUMOylierung des Transkriptionsfaktors langfristig stabil vorliegen und die Repression des Gens bewirken (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). Alternativ wurde die Bindung repressiver Faktoren vorgeschlagen, die Chromatin-Remodelling Aktivität aufweisen und posttranslationelle Histonmodifikationen einführen, was ebenfalls zu einer andauernden Blockade der Transkription führen würde. Dieses Modell der SUMO-vermittelten transkriptionellen Repression stützt die in Abschnitt 5.3.3 beschriebene Beobachtung des Auftretens repressorischer Histonmodifikationen wie die Trimethylierung des Histons 3 (Lys9). Zudem stimmt dies mit der Beobachtung überein, dass die SUMO-vermittelte Repression mit der Ausbildung von Heterochromatin einhergeht (Garcia-Dominguez und Reyes, 2009).

Die Mechanismen, die der SUMOylierung der Interaktionspartner von Arf zugrundeliegen, sind nicht eindeutig geklärt. Zum Einen liegen Berichte über die Interaktion von Arf mit dem E2-Konjugationsenzym Ubc9 vor. Daher wurde postuliert, dass Arf die SUMO-Übertragung direkt von dem SUMO-E2-Komplex auf den Arf-Interaktionspartner begünstigt (Rizos et al., 2005). Kuo und Kollegen (2008) konnten dagegen am Beispiel von NPM nachweisen, dass Arf nicht die SUMOylierung seiner Interaktionspartner induziert, sondern die Stabilität der nukleolären, SUMO-spezifischen Protease Senp3 reguliert. Tatsächlich katalysiert Senp3 die DeSUMOylierung von NPM, was einen kritischen Schritt in der Aktivierung von NPM in der rRNA-Prozessierung darstellt (Haindl et al., 2008). Arf wiederum induziert die Phosphorylierungs-abhängige Ubiquitinierung und Degradierung von Senp3 und dadurch einen Anstieg der Mengen von SUMOyliertem NPM (Kuo et al., 2008). Durch den Einsatz von Senp3 in dem *in vivo*-SUMOylierungsexperiment konnte allerdings lediglich gezeigt werden, dass die modifizierte Form von Miz1 tatsächlich einer SUMOylierten Variante entspricht (Abb. 27A). Eine Aussage über die Rolle des endogenen Proteins für die Akkumulation von SUMOyliertem Miz1 kann anhand dieser Daten jedoch nicht getroffen werden, da aufgrund der hohen Proteinmengen von Senp3 in diesem Experiment eine unspezifische Substraterkennung nicht auszuschließen ist. Lediglich die RNAi-vermittelte Depletion von Senp3 würde eine derartige Wirkungsweise von Arf bzw. Senp3 eindeutig bestätigen.

### **5.3.6 c-Myc enthält einen hochkonservierten Bereich, der möglicherweise die Bindung von SUMO1 vermittelt**

In der Literatur liegen bereits mehrere Verweise auf eine evolutionär hochkonservierte Region von Myc (im Bereich der Aminosäuren 249 bis 270 im Fall von humanem c-Myc) vor, die aus einem stark sauren Bereich mit potentiellen Phosphorylierungsstellen gefolgt von einer Reihe hydrophober Aminosäuren besteht und deren Funktion bisher nicht eindeutig belegt werden konnte (siehe Abb. 28A). Aufgrund des Vorkommens mehrerer Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threoninreste in diesem Bereich wurde vermutet, dass es sich dabei um eine PEST-Domäne handelt, die den Abbau von c-Myc stimuliert. Die PEST-Sequenz wurde erstmals in zehn eukaryotischen Proteinen identifiziert, die eine geringe Halbwertszeit aufweisen (Rogers et al., 1986), weshalb diese Domäne als Degradationssignal angesehen wird. Allerdings konnte dies durch die Deletion des entsprechenden Bereichs von c-Myc nicht bestätigt werden, da dessen Proteinstabilität dadurch nicht beeinflusst wurde (Herbst et al., 2004). Erste Hinweise auf eine Funktion dieser Domäne lieferten Experimente, die zeigten, dass diese Region für die Transformation einiger Zelllinien wie Rat1a und primärer hämatopoietischer Zellen des Huhns notwendig ist (Heaney et al., 1986; Stone et al., 1987). Eine mechanistische Aufklärung dieser Zelltyp-spezifischen Rolle der Domäne wurde allerdings nicht gegeben.

Aufgrund der sehr starken evolutionären Konservierung stellte sich die Frage, ob dieser Bereich von c-Myc eine weitere Funktion ausübt. Daher wurden weitere Sequenzanalysen durchgeführt, die eine hohe Übereinstimmung mit SIMs bekannter SUMO-bindender Proteine wie TRRAP (Golebiowski et al., 2009; Hecker et al., 2006), RanBP2 (Mahajan et al., 1997; Song et al., 2004) und PIAS1 (Kotaja et al., 2002) aufzeigten (Abb. 28A). Zusätzlich zu der hydrophoben Kernregion der Konsensussequenz V/I-X-V/I-V/I, die in beiden Orientierungen auftreten kann, konnte eine stark saure Region identifiziert werden, die charakteristisch für eine Subgruppe SUMO-bindender Proteine ist (Hecker et al., 2006; Song et al., 2005). Dieser Bereich kann amino- und carboxyterminal des hydrophoben Bereichs vorliegen. Zudem sind bei dem Großteil der SIMs in unmittelbarer Nachbarschaft Serin- oder Threoninreste zu finden, die als potentielle Phosphorylierungsstellen fungieren. Da alle diese Merkmale durch den in c-Myc identifizierten Bereich erfüllt werden, wurde die Bindung von c-Myc an GST-Fusionsproteine von SUMO1, SUMO2 und SUMO3 analysiert. Dadurch konnte eine schwache Assoziation von c-Myc mit SUMO2 und 3 sowie eine starke Bindung an SUMO1 nachgewiesen werden (Abb. 28B). Dies stimmt mit Berichten aus der Literatur überein, die für das SUMO-interagierende Protein RanBP2 eine spezifische Beteiligung des sauren Bereichs an der Bindung von SUMO1 aufzeigten, der ebenfalls in c-Myc vorliegt (Hecker et al., 2006). Die Deletion der sauren

Sequenz führte daher zu einer deutlichen Reduktion der Affinität von RanBP2 gegenüber SUMO1. Umgekehrt resultierte das Einführen von sauren Aminosäuren im Bereich der SIM von TRRAP zu einer deutlich verstärkten Bindekapazität des Proteins an SUMO1. Diese Daten unterstützen ein Modell, in dem c-Myc über ein SUMO-Interaktionsmotiv an eine durch Arf SUMOylierte Komponente des repressorischen Komplexes, beispielsweise Miz1, bindet und diesen dadurch stabilisiert bzw. einen weiteren SUMOylierten Faktor rekrutiert, der die transkriptionelle Repression verstärkt. Durch eine massenspektrometrische Analyse konnte bereits die SUMOylierung einiger c-Myc- und Miz1-Interaktionspartner wie TRRAP, Tip48/49, HectH9, NPM und Skp2 als zelluläre Antwort auf einen Hitzeschock nachgewiesen werden (Golebiowski et al., 2009). Um die Bedeutung der SIM in c-Myc jedoch eindeutig zu belegen ist allerdings die Deletion dieses Bereichs von c-Myc und der Nachweis des damit verbundenen Verlusts der SUMO-Bindung erforderlich.

### **5.3.7 Der Arf-induzierte Repressionsmechanismus verläuft in zwei unabhängigen Schritten**

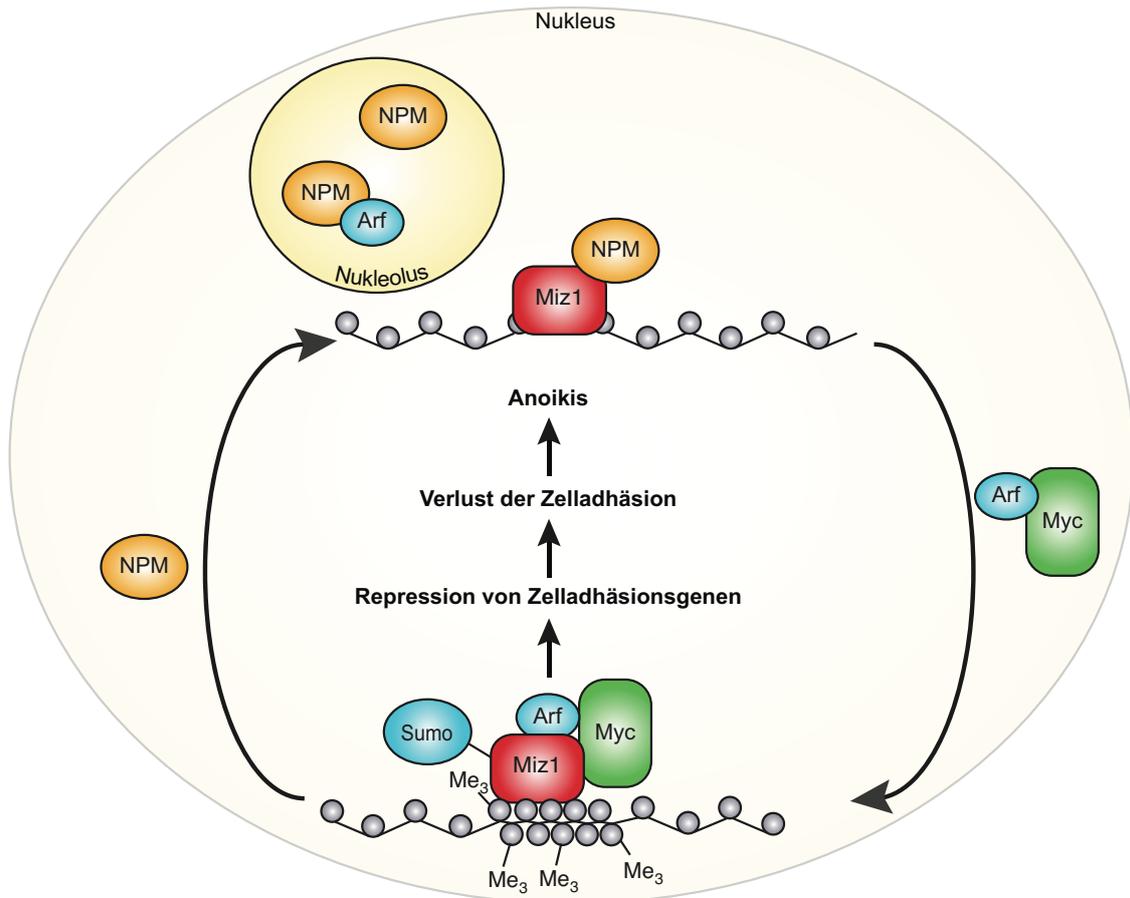
Um die Bedeutung der SUMOylierung von Miz1 für die Ausbildung des repressorischen c-Myc/Miz1/Arf-Komplexes zu untersuchen, wurden zwei Strategien angewandt. Zunächst wurden mittels RNA-Interferenz die Proteinmengen von Ubc9 reduziert und anschließend die Arf-induzierte verminderte Löslichkeit (Abb. 29A) sowie die Bildung subnucleärer Foci von Miz1 analysiert. In einem zweiten Ansatz wurde die SUMO-spezifische Protease Senp3 exprimiert (Abb. 29B), welche die SUMO-Modifikation von Miz1 deutlich reduzierte (Abb. 27). Jedoch konnte unter beiden experimentellen Bedingungen keine Veränderung der Löslichkeit (Abb. 29) bzw. der Foci-Bildung (Anne Dwertmann, persönliche Mitteilung) beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass beide Prozesse SUMO-unabhängig stattfinden. Im Fall der Expression von Senp3 könnte der fehlende Effekt jedoch auch auf eine hohe Stabilität der SUMOylierung zurückzuführen sein, falls Miz1-SUMO aufgrund der Bindung durch ein SIM-Protein wie beispielsweise c-Myc maskiert ist (Abb. 29B). Dies kann jedoch in dem ersten Ansatz ausgeschlossen werden, da die RNAi-vermittelte Reduktion der Ubc9-Mengen vor der Expression von Miz1 durchgeführt wurde und somit kein SUMOyliertes Miz1 vorliegen dürfte. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass ein *Ubc9*-Allel für ein normales SUMOylierungsmuster ausreichend ist (Nacerddine et al., 2005). Durch den vollständigen Knockout von Ubc9 konnte belegt werden, dass der SUMO-Signalweg eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der nukleären Integrität und Chromosomensegregation spielt (Nacerddine

et al., 2005). Trotz dieser Funktionen sind für das Überleben einer Zelle jedoch lediglich 20% der normalen Ubc9-Mengen notwendig (Frauke Melchior, persönliche Mitteilung). Somit könnte die unveränderte Löslichkeit und Foci-Bildung in diesem experimentellen Ansatz auf eine zu geringe Herunterregulierung der Ubc9-Mengen zurückgeführt werden, was allerdings aufgrund der Ergebnisse des Immunoblots unwahrscheinlich erscheint (Abb. 29A). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Arf die Ausbildung des repressorischen c-Myc/Miz1/SUMO-Komplexes in zwei unabhängigen Schritten induziert. Die Ausbildung des c-Myc/Miz1-Komplexes in charakteristischen subnukleären Strukturen, die zu einer verminderten Löslichkeit von Miz1 führt, könnte somit unabhängig von der SUMOylierung beteiligter Komponenten ablaufen, während die Ausbildung heterochromatischer Strukturen im Bereich von Miz1-abhängigen Zielgenen entsprechend Hinweisen aus der Literatur wahrscheinlich mit der SUMOylierung von Miz1 einhergeht.

### **5.3.8 Potentielle Relevanz der Regulation der Miz1-Funktion durch den Tumorsuppressor Arf**

Zusammengefasst ergeben die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit das in Abbildung 32 dargestellte Wirkungsmodell: In ungestressten Zellen liegt Arf in einem nukleolären Komplex mit NPM vor. NPM ist allerdings in der Lage zwischen den Nukleoli und dem Cytoplasma zu pendeln (Borer et al., 1989), was dessen Funktion als Koaktivator von Miz1 im Nukleoplasma ermöglicht. Onkogene Mengen von c-Myc führen zu der Relokalisierung von Arf in das Nukleoplasma, wo Arf und c-Myc den Koaktivator NPM von Miz1 verdrängen und die Ausbildung eines repressorischen c-Myc/Miz1/Arf-Komplexes ermöglichen. Zudem induziert Arf in diesem Komplex die SUMOylierung von Miz1, was zur Rekrutierung von Korepressoren und damit zur Repression Miz1-abhängiger Zielgene führen könnte. Darüber hinaus ist die Bindung von Histonmethyltransferasen wahrscheinlich, die die Ausbildung heterochromatischer Strukturen in den betroffenen Promotorbereichen induzieren. Da die onkogene Aktivierung von c-Myc zur Induktion der *Arf*-Expression sowie der Stabilisierung von Arf führt (Chen et al., 2010; Zindy et al., 1998), ist es vorstellbar, dass die daraus resultierende Repression von Zelladhäsionsgenen durch den c-Myc/Miz1/Arf-Komplex den Kontakt zwischen der extrazellulären Matrix und den Zellen, die diese onkogenen Mutationen aufweisen, unterbindet. Dieser repressorische Mechanismus induziert aufgrund der Abhängigkeit vieler epithelialer Zellen von der Interaktion mit der extrazellulären Matrix Anoikis und könnte daher einen tumorsuppressiven Mechanismus darstellen (Reginato et al., 2003). Darüber hinaus erklärt

dieser Effekt die differentielle Zellantwort auf onkogenen Stress in Form erhöhter Mengen von Ras bzw. c-Myc. Obwohl beide Onkogene die Arf/p53-Signalkaskade aktivieren, induziert Ras Seneszenz, c-Myc dagegen Apoptose. Diese Spezifität könnte daher auf dem durch den c-Myc/Miz1-Komplex hervorgerufenen Verlust der Zelladhäsion und der damit verbundenen Apoptose beruhen.



**Abb. 32: Modell des potentiellen Wirkungsmechanismus des c-Myc/Miz1/Arf-Komplexes.**

In ungestressten Zellen stabilisiert NPM Arf in den Nucleoli und dient als transkriptioneller Koaktivator von Miz1. Onkogene Mengen von c-Myc resultieren in der Relokalisierung von Arf und der Verdrängung von NPM aus dem Komplex mit Miz1. Der repressorische c-Myc/Miz1/Arf-Komplex blockiert die Transkription von Zelladhäsionsgenen, was zu dem Kontaktverlust zum Substrat und daher zu Anoikis führt.

In Übereinstimmung mit einer tumorsuppressiven Rolle des Arf-induzierten c-Myc/Miz1-Komplexes konnte in der genomweiten Expressionsanalyse neben den Adhäsionsgenen eine weitere Gruppe identifiziert werden, die als Korezeptoren von Wachstumsfaktorrezeptoren agieren und deren verminderte Expression somit möglicherweise mit dem Verlust kritischer Überlebenssignale einhergeht (Orlan-Rousseau et al., 2002). Ein Beispiel stellt diesbezüglich

der Tyrosinkinase-Rezeptor c-Met dar, der die Proliferation sowie das invasive Wachstum von Tumorzellen stimuliert und in vielen soliden Tumoren überexprimiert wird (Maulik et al., 2002; To und Tsao, 1998). Da das entsprechende Protoonkogen *MET* spezifisch durch die Expression von Miz1 und Arf bzw. c-Myc und Arf reprimiert wurde, würden die betroffenen Zellen die Sensitivität gegenüber dessen Ligand HGF (*hepatocellular growth factor*) verlieren. Damit verbunden wäre eine verminderte Aktivierung von Effektor-Signalwegen wie der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)- oder MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Kaskade (Gentile et al., 2008).

Zudem ist in vielen Tumorarten die Expression von *MYC* und dadurch auch von *NPM* als c-Myc-Zielgen dereguliert (Li und Hann, 2009). Die Arbeitsgruppe von Steve Hann konnte eine Kooperation der Überexpression von NPM und c-Myc in Bezug auf Proliferation und Transformation zeigen, die auf der direkten Interaktion von NPM und c-Myc an Promotoren von Zielgenen und der Stimulation der Expression beruht (Li et al., 2008). Des Weiteren könnte die kooperative Wirkung von c-Myc und NPM durch die zu Arf antagonistische Bindung von NPM an Miz1 erklärt werden, welche die Repression der Adhäsionsgene aufheben und die damit verbundene Apoptose unterbinden würde. Dies stimmt mit Berichten überein, welche die Inhibition von Onkogen-induzierter Apoptose und Seneszenz aufgrund der deregulierten Expression von *NPM* aufzeigen (Grisendi et al., 2006; Li et al., 2007; Li und Hann, 2009). Als weiterer potentieller Mechanismus, der diese Effekte hervorrufen könnte, wurde die permanente Sequestrierung von Arf durch NPM in die Nukleoli vorgeschlagen, was dessen anti-proliferative und pro-apoptotische Regulatorfunktion auf c-Myc aufheben würde (Li und Hann, 2009).

Gleichzeitig legt das Modell jedoch nahe, dass bei einer Blockade der Apoptose, beispielsweise durch eine funktionelle Inaktivierung von p53, Arf über den c-Myc/Miz1-Komplex eventuell sogar die Tumorgenese und Invasivität von Tumoren stimuliert, sobald die betroffenen Zellen den Kontakt zur extrazellulären Matrix verlieren. Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Anoikis könnte somit zu einer verstärkten Metastasierung führen, da Tumorzellen dadurch in den Blutstrom gelangen und darüber verbreitet werden (Simpson et al., 2008; Voulgari und Pintzas, 2009). Diese Hypothese wird durch die Repression des RhoGTPase-Regulatorproteins RhoGDI2 (Rho GDP Dissoziationsinhibitor 2; alternativ bezeichnet als: ARHGDIB) durch den Arf-induzierten c-Myc/Miz1-Komplex gestützt (Michael Wanzel, persönliche Mitteilung), da RhoGDI2 durch die Inhibition von RhoGTPasen die Metastasierung unterdrückt (Moissoglu et al., 2009). Eine ähnliche Kooperation multipler onkogener Mutationen in Bezug auf die Zellmigration wurde bereits für konstitutiv aktives Ras, RasV12, und funktionell inaktives p53 nachgewiesen. Die Expression von RasV12 und p53R175H in YAMC (*young adult mouse*

*colon*)-Zellen führte zur synergistischen Aktivierung von RhoA und dadurch zu einer erhöhten Zellmotilität (Xia und Land, 2007). Auch die Funktion von Myc-Onkoproteinen in der Regulation der Invasivität und Metastasierung wurde bereits in vorangegangenen Studien belegt. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Repression von *ITGA1* (Integrin  $\alpha 1$ ) durch N-Myc die Invasivität humaner Neuroblastomzellen erhöht (Tanaka und Fukuzawa, 2008). Zudem wurde in aktuellen Studien die Aktivierung der *RhoA*-Genexpression durch einen Komplex bestehend aus c-Myc, Miz1, Skp2 und p300 beschrieben (Chan et al., 2010). Onkogene Mengen von Skp2 und c-Myc resultieren daher in erhöhten Mengen von RhoA, welche die Invasivität und Metastasierung fördern. Dies konnte durch die Analyse humaner Prostatakarzinome belegt werden, die eine signifikante Korrelation der Expression von *RhoA*, *MYC*, *SKP2* sowie *MIZ1* mit dem Ausmaß der Metastasenbildung aufzeigten. Darüber hinaus ist Myc für die Zelltransformation durch die konstitutiv aktive Form von RhoA, RhoA<sup>Q63L</sup>, notwendig, da die shRNA-vermittelte Reduktion der *MYC*-mRNA zu einer verminderten Bildung sekundärer Foci muriner Fibroblasten führte (Berenjeno et al., 2007).

Zudem hebt Arf aufgrund der verminderten *CDKN1A*-Expression den Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Miz1 auf und würde daher die Proliferation stimulieren. Tatsächlich werden dem Tumorsuppressor Arf aufgrund aktueller Studien auch wachstumsfördernde Funktionen zugeschrieben, da das Stilllegen des *ARF*-Genlokus die Progression von Lymphomen mit mutiertem *TP53* bzw. einer funktionellen Inaktivierung von *TP53* limitiert (Humbey et al., 2008). Diese neu entdeckte Wirkungsweise basiert auf der Stimulation von Autophagie, was die Progression von Tumoren unter Nährstoffmangel begünstigt (Amaravadi et al., 2007; Carew et al., 2007). Tumorzellen, die *ARF* nicht exprimieren bzw. in denen der *ARF*-Lokus deletiert ist, weisen aufgrund der verminderten Autophagie eine erhöhte Sensitivität gegenüber metabolischem Stress und daher ein verlangsamtes Wachstum sowie eine verminderte Überlebensrate auf (Humbey et al., 2008). Dieser Effekt scheint jedoch spezifisch für einige Tumorarten zu sein und ist beispielsweise in Myc-induzierten Lymphomen zu beobachten. Ein weiteres Beispiel stellt der Verlust von *p19Arf* in Epithelien der Prostata Pten-defizienter Mäuse dar, der die Tumorprogression nicht verstärkt sondern unabhängig von p53 partiell inhibiert (Chen et al., 2009). Dies konnte auf die Blockade der Apoptose durch die konstitutive Aktivität der PI3-Kinase zurückgeführt werden. Diese Resultate werden von Proben humaner Pten-defizienter Prostatatumore gestützt, die ebenfalls keinen Verlust von *PI4ARF* aufzeigen.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Deutsche Zusammenfassung

Die onkogene Wirkung von c-Myc, die zur Entstehung eines breiten Spektrums maligner Tumore führt, wurde bisher hauptsächlich auf die Aktivierung von Zielgenen in einem Komplex mit Max zurückgeführt. Allerdings weisen aktuelle Studien auch auf eine bedeutende Rolle der Interaktion von c-Myc mit dem Transkriptionsfaktor Miz1 hin, die in einer transkriptionellen Repression resultiert. Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit der Interferenz des c-Myc/Miz1-Komplexes mit der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort sowie der Induktion der Apoptose durch den Tumorsuppressor Arf als Antwort auf onkogene Stimuli in Form erhöhter c-Myc-Mengen.

Zunächst wurde durch Einsatz von murinen, embryonalen Fibroblasten, die eine Deletion der POZ-Domäne von Miz1 aufweisen, sowie durch die shRNA-vermittelte Depletion von Miz1 die Notwendigkeit von Miz1 als Aktivator der *Cdkn1a* Expression analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Miz1 in dem verwendeten Zellsystem keine essentielle Funktion als Transkriptionsaktivator des Zellzyklusregulators p21Cip1 einnimmt. In einem humanen Zellsystem konnte jedoch eine nicht-transkriptionelle Funktion von Miz1 in der ATR-abhängigen Signalkaskade identifiziert werden, die auf der Stabilisierung des Vermittlerproteins TopBP1 beruht und somit zur Aktivierung dieses Signalwegs führt. Diese Wirkungsweise von Miz1 basiert auf der Rekrutierung von TopBP1 zum Chromatin, was dieses vor der Ubiquitinierung durch die E3-Ligase HectH9 und dadurch vor dem proteasomalen Abbau schützt. Antagonisiert wird die stabilisierende Interaktion von Miz1 und TopBP1 durch c-Myc, dessen Überexpression die Dissoziation von TopBP1 vom Chromatin und dessen Abbau bewirkt. Dementsprechend blockieren erhöhte Mengen von c-Myc die Aktivierung der UVB-induzierten Signalkaskade und somit wahrscheinlich die Reparatur der vorliegenden Schäden.

Darüber hinaus wurde die Bedeutung der Interferenz von Miz1, c-Myc und dem Tumorsuppressor Arf zum Schutz vor onkogener Transformation beschrieben. Diese potentiell tumorprotektive Wirkungsweise beruht auf der Ausbildung eines DNA-assoziierten, transkriptionell repressorischen c-Myc/Miz1/Arf-Komplexes. Die Inhibition der Transkription beinhaltet neben der Relokalisierung von Arf in das Nukleoplasma die Verdrängung des Koaktivators NPM von Miz1. Zudem konnte die Ausbildung von Heterochromatin in den Promotorbereichen der Zielgene nachgewiesen werden. Darüber hinaus induziert die Assoziation mit c-Myc und Arf die post-translationelle Modifikation von Miz1 durch das

Ubiquitin-ähnliche Molekül SUMO. Da c-Myc die Sequenz eines hochkonservierten SUMO-Interaktionsmotifs (SIM) aufweist und *in vitro* SUMO-Spezies bindet, könnte sowohl die SUMOylierung von Miz1 als auch die Bindung des modifizierten Miz1-Proteins durch c-Myc an der Aufrechterhaltung des repressiven Chromatinstatus involviert sein. Neben dem Zellzyklusinhibitor *P15INK4B* reprimiert dieser Komplex eine Vielzahl von Genen, welche sowohl die Zell-Zell- als auch die Zell-Matrixadhäsion vermitteln. Daher führt die Expression von Miz1, c-Myc und Arf zum Verlust der Zelladhäsion und löst somit Anoikis aus. Da für die Ausbildung dieses repressiven Komplexes die Interaktion von Arf und Miz1 mit dem Transkriptionsfaktor c-Myc essentiell ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Proteinmengen von c-Myc für den Wechsel von Seneszenz zu Apoptose entscheiden sind. Daher könnte diese Funktionsweise des c-Myc/Miz1-Komplexes eine Möglichkeit zur Eliminierung von Zellen mit onkogenen Mutationen darstellen.

## 6.2 English Summary

So far, the oncogenic potential of Myc that contributes to the genesis of a broad spectrum of malignant tumors has been mainly ascribed to the activation of target gene expression in a complex with Max. However, current studies suggest an important functional role of the c-Myc/Miz1 interaction mediating transcriptional repression. Therefore, my thesis aimed at investigating the interference of the c-Myc/Miz1 complex with the UVB induced DNA damage response and the oncogene-induced apoptosis via the tumor suppressor Arf.

Initially, I used murine, embryonic fibroblasts expressing a truncated version of the transcription factor Miz1, Miz1 $\Delta$ POZ, and a RNAi approach to study the importance of Miz1 as an activator of *Cdkn1a* expression. These experiments showed that Miz1 is not essential for the expression of the cell cycle inhibitor p21Cip1 in the cellular system used. However, Miz1 exerts a non-transcriptional function during the ATR-dependent signaling cascade in a human cell system. This is due to the stabilization of the mediator protein TopBP1 and the subsequent activation of this pathway. This function of Miz1 depends on the recruitment of a fraction of TopBP1 to chromatin resulting in the protection of TopBP1 from HectH9-mediated ubiquitination and subsequent proteasomal degradation. c-Myc antagonizes this stabilizing interaction of Miz1 and TopBP1. Overexpression of c-Myc results in the dissociation of TopBP1 from chromatin and its subsequent degradation. Consequently, increased levels of c-Myc block the activation of the UVB induced signal transduction and, therefore, possibly the repair of DNA damage.

Furthermore, I was able to demonstrate a role of Miz1, c-Myc and the tumor suppressor Arf in preventing oncogenic transformation. Miz1, c-Myc and Arf assemble into a DNA-binding complex that silences genes by disrupting the interaction of Miz1 with its coactivator nucleophosmin and by the formation of heterochromatin at the promoters of target genes. In addition, association with Arf and Myc triggers the post-translational modification of Miz1 by the ubiquitin-like molecule SUMO. As c-Myc harbors a potential SUMO-binding motif and binds SUMO moieties *in vitro*, the SUMOylation of Miz1 as well as the association of the SUMOylated Miz1 protein with c-Myc may be involved in the maintenance of the repressive chromatin state. Despite the cell cycle inhibitor *P15INK4B*, this complex also switches off many genes associated with cell-cell and cell-matrix adhesions, causing cells expressing Miz1, c-Myc and Arf to lose their attachment and undergo anoikis. The assembly of this repressive complex relies on the interaction of both Arf and Miz1 with the transcription factor c-Myc, suggesting that c-Myc levels may be crucial in switching Arf's function from irreversible cell cycle arrest

to cell death. Therefore, this way of action of the c-Myc/Miz1 complex points to a tumor protective mechanism that facilitates the elimination of cells harboring an oncogenic mutation.

## 7 Literaturverzeichnis

Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R., and Eisenman, R.N. (1982). Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* 29, 427-439.

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

Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., *et al.* (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123, 409-421.

Adhikary, S., Peukert, K., Karsunky, H., Beuger, V., Lutz, W., Elsasser, H.P., Moroy, T., and Eilers, M. (2003). Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Mol Cell Biol* 23, 7648-7657.

Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I., Thomas-Tikhonenko, A., and Thompson, C.B. (2007). Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 117, 326-336.

Amente, S., Gargano, B., Varrone, F., Ruggiero, L., Dominguez-Sola, D., Lania, L., and Majello, B. (2006). p14ARF directly interacts with Myc through the Myc BoxII domain. *Cancer Biol Ther* 5, 287-291.

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

Ball, H.L., Ehrhardt, M.R., Mordes, D.A., Glick, G.G., Chazin, W.J., and Cortez, D. (2007). Function of a conserved checkpoint recruitment domain in ATRIP proteins. *Mol Cell Biol* 27, 3367-3377.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 12, 461-468.

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

Benanti, J.A., Wang, M.L., Myers, H.E., Robinson, K.L., Grandori, C., and Galloway, D.A. (2007). Epigenetic down-regulation of ARF expression is a selection step in immortalization of human fibroblasts by c-Myc. *Mol Cancer Res* 5, 1181-1189.

Berenjeno, I.M., Nunez, F., and Bustelo, X.R. (2007). Transcriptomal profiling of the cellular transformation induced by Rho subfamily GTPases. *Oncogene* 26, 4295-4305.

Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C.J. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* 24, 985-996.

Bissonnette, N., and Hunting, D.J. (1998). p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene* 16, 3461-3469.

- Blackwell, T.K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F.W., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* *13*, 5216-5224.
- Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* *250*, 1149-1151.
- Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* *251*, 1211-1217.
- Borer, R.A., Lehner, C.F., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* *56*, 379-390.
- Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M., and Schmitt, C.A. (2007). FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev* *21*, 2775-2787.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R.H., and Eilers, M. (2004). Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J* *23*, 2830-2840.
- Boulaire, J., Fotedar, A., and Fotedar, R. (2000). The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)* *48*, 190-202.
- Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* *18*, 185-191.
- Brady, S.N., Yu, Y., Maggi, L.B., Jr., and Weber, J.D. (2004). ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway. *Mol Cell Biol* *24*, 9327-9338.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., *et al.* (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* *24*, 336-346.
- Britton, S., Salles, B., and Calsou, P. (2008). c-MYC protein is degraded in response to UV irradiation. *Cell Cycle* *7*, 63-70.
- Buchberger, A. (2002). From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends Cell Biol* *12*, 216-221.
- Cannell, I.G., Kong, Y.W., Johnston, S.J., Chen, M.L., Collins, H.M., Dobbyn, H.C., Elia, A., Kress, T.R., Dickens, M., Clemens, M.J., *et al.* (2010). p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 5375-5380.
- Carew, J.S., Nawrocki, S.T., and Cleveland, J.L. (2007). Modulating autophagy for therapeutic benefit. *Autophagy* *3*, 464-467.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* *296*, 922-927.

- Chan, C.H., Lee, S.W., Li, C.F., Wang, J., Yang, W.L., Wu, C.Y., Wu, J., Nakayama, K.I., Kang, H.Y., Huang, H.Y., *et al.* (2010). Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 12, 457-467.
- Chandramohan, V., Mineva, N.D., Burke, B., Jeay, S., Wu, M., Shen, J., Yang, W., Hann, S.R., and Sonenshein, G.E. (2008). c-Myc represses FOXO3a-mediated transcription of the gene encoding the p27(Kip1) cyclin dependent kinase inhibitor. *J Cell Biochem* 104, 2091-2106.
- Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., *et al.* (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26, 745-752.
- Chen, C.R., Kang, Y., Siegel, P.M., and Massague, J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 110, 19-32.
- Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-1083.
- Chen, D., Shan, J., Zhu, W.G., Qin, J., and Gu, W. (2010). Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* 464, 624-627.
- Chen, I.T., Akamatsu, M., Smith, M.L., Lung, F.D., Duba, D., Roller, P.P., Fornace, A.J., Jr., and O'Connor, P.M. (1996a). Characterization of p21Cip1/Waf1 peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction. *Oncogene* 12, 595-607.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B.D., and Dutta, A. (1996b). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol* 16, 4673-4682.
- Chen, L., and Chen, J. (2003). MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation. *Oncogene* 22, 5348-5357.
- Chen, Z., Carracedo, A., Lin, H.K., Koutcher, J.A., Behrendt, N., Egia, A., Alimonti, A., Carver, B.S., Gerald, W., Teruya-Feldstein, J., *et al.* (2009). Differential p53-independent outcomes of p19(Arf) loss in oncogenesis. *Sci Signal* 2, ra44.
- Cheng, B., and Price, D.H. (2007). Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *J Biol Chem* 282, 21901-21912.
- Chiang, Y.C., Teng, S.C., Su, Y.N., Hsieh, F.J., and Wu, K.J. (2003). c-Myc directly regulates the transcription of the NBS1 gene involved in DNA double-strand break repair. *J Biol Chem* 278, 19286-19291.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.
- Claassen, G.F., and Hann, S.R. (2000). A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9498-9503.

- Clark, P.A., Llanos, S., and Peters, G. (2002). Multiple interacting domains contribute to p14ARF mediated inhibition of MDM2. *Oncogene* 21, 4498-4507.
- Coffin, J.M., Tsichlis, P.N., and Robinson, H.L. (1981). Genetics of leukemogenesis by avian leukosis viruses. *Haematol Blood Transfus* 26, 432-438.
- Cole, M.D. (1986). Activation of the c-myc oncogene. *Basic Life Sci* 38, 399-406.
- Cole, M.D., and Cowling, V.H. (2008). Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 810-815.
- Cole, M.D., and Nikiforov, M.A. (2006). Transcriptional activation by the Myc oncoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol* 302, 33-50.
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260-3265.
- Colombo, E., Bonetti, P., Lazzerini Denchi, E., Martinelli, P., Zamponi, R., Marine, J.C., Helin, K., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2005). Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol* 25, 8874-8886.
- Colombo, E., Marine, J.C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P.G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4, 529-533.
- Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., and Eisenman, R.N. (2010). Myc-Nick: A Cytoplasmic Cleavage Product of Myc that Promotes alpha-Tubulin Acetylation and Cell Differentiation. *Cell* 142, 480-493.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286, 1162-1166.
- Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L., and Cole, M.D. (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol* 26, 4226-4239.
- Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2007). The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. *Mol Cell Biol* 27, 2059-2073.
- Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2008). An N-Myc truncation analogous to c-Myc-S induces cell proliferation independently of transactivation but dependent on Myc homology box II. *Oncogene* 27, 1327-1332.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824-7827.
- Dang, C.V., and Lee, W.M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 8, 4048-4054.

- Datta, A., Nag, A., Pan, W., Hay, N., Gartel, A.L., Colamonici, O., Mori, Y., and Raychaudhuri, P. (2004). Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *J Biol Chem* 279, 36698-36707.
- Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., and Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671-682.
- Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., and Karnitz, L.M. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev* 21, 1472-1477.
- Dhordain, P., Albagli, O., Ansieau, S., Koken, M.H., Dewindt, 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* 11, 2689-2697.
- Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448, 445-451.
- Duro, D., Bernard, O., Della Valle, V., Berger, R., and Larsen, C.J. (1995). A new type of p16INK4/MTS1 gene transcript expressed in B-cell malignancies. *Oncogene* 11, 21-29.
- Eberhardy, S.R., and Farnham, P.J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem* 276, 48562-48571.
- Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6164-6169.
- Eischen, C.M., Packham, G., Nip, J., Fee, B.E., Hiebert, S.W., Zambetti, G.P., and Cleveland, J.L. (2001a). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene* 20, 6983-6993.
- Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F., and Cleveland, J.L. (2001b). Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 21, 5063-5070.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., *et al.* (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-1174.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Espinosa, J.M., Verdun, R.E., and Emerson, B.M. (2003). p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell* 12, 1015-1027.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.

- Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A.R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* 34, 4126-4137.
- Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W., and Lin, X. (2002). Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell* 9, 133-143.
- Foitzik, K., Lindner, G., Mueller-Roeber, S., Maurer, M., Botchkareva, N., Botchkarev, V., Handjiski, B., Metz, M., Hibino, T., Soma, T., *et al.* (2000). Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *FASEB J* 14, 752-760.
- Freytag, S.O., Dang, C.V., and Lee, W.M. (1990). Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation. *Cell Growth Differ* 1, 339-343.
- Frye, M., Gardner, C., Li, E.R., Arnold, I., and Watt, F.M. (2003). Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130, 2793-2808.
- Furnari, B., Rhind, N., and Russell, P. (1997). Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277, 1495-1497.
- Gallant, P., Shiiio, Y., Cheng, P.F., Parkhurst, S.M., and Eisenman, R.N. (1996). Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* 274, 1523-1527.
- Gallant, P., and Steiger, D. (2009). Myc's secret life without Max. *Cell Cycle* 8, 3848-3853.
- Garcia-Dominguez, M., and Reyes, J.C. (2009). SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* 1789, 451-459.
- Gartel, A.L., and Radhakrishnan, S.K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65, 3980-3985.
- Gartel, A.L., Serfas, M.S., and Tyner, A.L. (1996). p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 213, 138-149.
- Gartel, A.L., and Tyner, A.L. (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 246, 280-289.
- Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsasser, H.P., and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J Cell Biol* 172, 139-149.
- Gebhardt, A., Kosan, C., Herkert, B., Moroy, T., Lutz, W., Eilers, M., and Elsasser, H.P. (2007). Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis. *J Cell Sci* 120, 2586-2593.
- Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 947-956.
- Gelinas, C., and White, E. (2005). BH3-only proteins in control: specificity regulates MCL-1 and BAK-mediated apoptosis. *Genes Dev* 19, 1263-1268.

- Gentile, A., Trusolino, L., and Comoglio, P.M. (2008). The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27, 85-94.
- Gill, G. (2003). Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. *Curr Opin Genet Dev* 13, 108-113.
- Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18, 2046-2059.
- Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15, 536-541.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., and Hay, R.T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.
- Golebiowski, F., Matic, I., Tatham, M.H., Cole, C., Yin, Y., Nakamura, A., Cox, J., Barton, G.J., Mann, M., and Hay, R.T. (2009). System-wide changes to SUMO modifications in response to heat shock. *Sci Signal* 2, ra24.
- Gomis, R.R., Alarcon, C., Nadal, C., Van Poznak, C., and Massague, J. (2006). C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 10, 203-214.
- Greenberg, R.A., Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S.B., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev* 20, 34-46.
- Griffith, J.D., Lindsey-Boltz, L.A., and Sancar, A. (2002). Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy. *J Biol Chem* 277, 15233-15236.
- Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., and Pandolfi, P.P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 493-505.
- Guerra, L., Albiñ, A., Trønnersjø, S., Yan, Q., Guidi, R., Stenerlow, B., Sterzenbach, T., Josenhans, C., Fox, J.G., Schauer, D.B., *et al.* (2010). Myc is required for activation of the ATM-dependent checkpoints in response to DNA damage. *PLoS One* 5, e8924.
- Haindl, M., Harasim, T., Eick, D., and Muller, S. (2008). The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep* 9, 273-279.
- Hall, J.R., Kow, E., Nevis, K.R., Lu, C.K., Luce, K.S., Zhong, Q., and Cook, J.G. (2007). Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage. *Mol Biol Cell* 18, 3340-3350.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hann, S.R., King, M.W., Bentley, D.L., Anderson, C.W., and Eisenman, R.N. (1988). A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* 52, 185-195.

- Hann, S.R., Sloan-Brown, K., and Spotts, G.D. (1992). Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes Dev* 6, 1229-1240.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Hay, R.T. (2005). SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18, 1-12.
- 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.
- Heaney, M.L., Pierce, J., and Parsons, J.T. (1986). Site-directed mutagenesis of the gag-myc gene of avian myelocytomatosis virus 29: biological activity and intracellular localization of structurally altered proteins. *J Virol* 60, 167-176.
- Hecker, C.M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem* 281, 16117-16127.
- Herbst, A., Hemann, M.T., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., Lowe, S.W., and Tansey, W.P. (2005). A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* 6, 177-183.
- Herbst, A., Salghetti, S.E., Kim, S.Y., and Tansey, W.P. (2004). Multiple cell-type-specific elements regulate Myc protein stability. *Oncogene* 23, 3863-3871.
- Herkert, B., Dwertmann, A., Herold, S., Abed, M., Naud, J.F., Finkernagel, F., Harms, G.S., Orian, A., Wanzel, M., and Eilers, M. (2010). The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. *J Cell Biol* 188, 905-918.
- Herold, S., Hock, A., Herkert, B., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R., Bernards, R., and Eilers, M. (2008). Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. *EMBO J* 27, 2851-2861.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H.P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 10, 509-521.
- Hicke, L., and Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 141-172.
- Hilgarth, R.S., Murphy, L.A., Skaggs, H.S., Wilkerson, D.C., Xing, H., and Sarge, K.D. (2004). Regulation and function of SUMO modification. *J Biol Chem* 279, 53899-53902.
- Hingorani, K., Szebeni, A., and Olson, M.O. (2000). Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 275, 24451-24457.
- Honda, Y., Tojo, M., Matsuzaki, K., Anan, T., Matsumoto, M., Ando, M., Saya, H., and 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.

- Hu, H., Du, L., Nagabayashi, G., Seeger, R.C., and Gatti, R.A. (2010). ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 1506-1511.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 2563-2567.
- Humbey, O., Pimkina, J., Zilfou, J.T., Jarnik, M., Dominguez-Brauer, C., Burgess, D.J., Eischen, C.M., and Murphy, M.E. (2008). The ARF tumor suppressor can promote the progression of some tumors. *Cancer Res* *68*, 9608-9613.
- 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* *13*, 6001-6009.
- Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* *12*, 1151-1164.
- Izumi, H., Molander, C., Penn, L.Z., Ishisaki, A., Kohno, K., and Funai, K. (2001). Mechanism for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor. *J Cell Sci* *114*, 1533-1544.
- Jeon, Y., Lee, K.Y., Ko, M.J., Lee, Y.S., Kang, S., and Hwang, D.S. (2007). Human TopBP1 participates in cyclin E/CDK2 activation and preinitiation complex assembly during G1/S transition. *J Biol Chem* *282*, 14882-14890.
- Johnson, E.S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* *73*, 355-382.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8292-8297.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* *91*, 649-659.
- Kastan, M.B., and Lim, D.S. (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 179-186.
- Kim, J.B., and Sharp, P.A. (2001). Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase. *J Biol Chem* *276*, 12317-12323.
- Kim, J.E., McAvoy, S.A., Smith, D.I., and Chen, J. (2005). Human TopBP1 ensures genome integrity during normal S phase. *Mol Cell Biol* *25*, 10907-10915.
- Kim, S., Li, Q., Dang, C.V., and Lee, L.A. (2000). Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11198-11202.

- Kinsella, T.M., and Nolan, G.P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* 7, 1405-1413.
- Knezevich, S., Ludkovski, O., Salski, C., Lestou, V., Chhanabhai, M., Lam, W., Klasa, R., Connors, J.M., Dyer, M.J., Gascoyne, R.D., *et al.* (2005). Concurrent translocation of BCL2 and MYC with a single immunoglobulin locus in high-grade B-cell lymphomas. *Leukemia* 19, 659-663.
- Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16, 2699-2712.
- Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A.A., Allamargot, C., Quelle, F.W., and Quelle, D.E. (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* 25, 1258-1271.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J., and Schlesinger, P.H. (2000). Proapoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (2002). PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 22, 5222-5234.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Kruse, J.P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2000). Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 6, 839-849.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2006). How cells activate ATR. *Cell Cycle* 5, 1265-1268.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124, 943-955.
- Kuo, H.Y., Chang, C.C., Jeng, J.C., Hu, H.M., Lin, D.Y., Maul, G.G., Kwok, R.P., and Shih, H.M. (2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16973-16978.
- Kuo, M.L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev* 18, 1862-1874.
- Kuo, M.L., den Besten, W., Thomas, M.C., and Sherr, C.J. (2008). Arf-induced turnover of the nucleolar nucleophosmin-associated SUMO-2/3 protease Senp3. *Cell Cycle* 7, 3378-3387.
- Kurland, J.F., and Tansey, W.P. (2008). Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer Res* 68, 3624-3629.
- Kuttler, F., and Mai, S. (2006). c-Myc, Genomic Instability and Disease. *Genome Dyn* 1, 171-190.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, C., Smith, B.A., Bandyopadhyay, K., and Gjerset, R.A. (2005). DNA damage disrupts the p14ARF-B23(nucleophosmin) interaction and triggers a transient subnuclear redistribution of p14ARF. *Cancer Res* 65, 9834-9842.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554.
- Lee, J.S., Collins, K.M., Brown, A.L., Lee, C.H., and Chung, J.H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404, 201-204.
- Lee, K.K., and Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 284-295.
- Letai, A., Sorcinelli, M.D., Beard, C., and Korsmeyer, S.J. (2004). Antiapoptotic BCL-2 is required for maintenance of a model leukemia. *Cancer Cell* 6, 241-249.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., and George, D.L. (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443-450.
- Li, J., Sejas, D.P., Burma, S., Chen, D.J., and Pang, Q. (2007). Nucleophosmin suppresses oncogene-induced apoptosis and senescence and enhances oncogenic cooperation in cells with genomic instability. *Carcinogenesis* 28, 1163-1170.
- Li, Z., Boone, D., and Hann, S.R. (2008). Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18794-18799.
- Li, Z., and Hann, S.R. (2009). The Myc-nucleophosmin-ARF network: a complex web unveiled. *Cell Cycle* 8, 2703-2707.
- Lin, D.Y., Huang, Y.S., Jeng, J.C., Kuo, H.Y., Chang, C.C., Chao, T.T., Ho, C.C., Chen, Y.C., Lin, T.P., Fang, H.I., *et al.* (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol Cell* 24, 341-354.
- Lindstrom, M.S., and Zhang, Y. (2006). B23 and ARF: friends or foes? *Cell Biochem Biophys* 46, 79-90.
- Liu, J., Zhao, Y., Eilers, M., and Lin, A. (2009). Miz1 is a signal- and pathway-specific modulator or regulator (SMOR) that suppresses TNF-alpha-induced JNK1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18279-18284.
- 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 J* 25, 4795-4807.
- Liu, Q., Basu, S., Qiu, Y., Tang, F., and Dong, F. (2010). A role of Miz-1 in Gfi-1-mediated transcriptional repression of CDKN1A. *Oncogene*.

- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., *et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14, 1448-1459.
- Llanos, S., Clark, P.A., Rowe, J., and Peters, G. (2001). Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 3, 445-452.
- Lopez-Girona, A., Tanaka, K., Chen, X.B., Baber, B.A., McGowan, C.H., and Russell, P. (2001). Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11289-11294.
- Lowe, S.W., and Sherr, C.J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13, 77-83.
- Luo, Q., Li, J., Cenkci, B., and Kretzner, L. (2004). Autorepression of c-myc requires both initiator and E2F-binding site elements and cooperation with the p107 gene product. *Oncogene* 23, 1088-1097.
- Maggi, L.B., Jr., Kuchenruether, M., Dadey, D.Y., Schwoppe, R.M., Grisendi, S., Townsend, R.R., Pandolfi, P.P., and Weber, J.D. (2008). Nucleophosmin serves as a rate-limiting nuclear export chaperone for the Mammalian ribosome. *Mol Cell Biol* 28, 7050-7065.
- Magnet, K.J., Orr, M.S., Cleveland, J.L., Rodriguez-Galindo, C., Yang, H., Yang, C., Di, Y.M., Jain, P.T., and Gewirtz, D.A. (2001). Suppression of c-myc expression and c-Myc function in response to sustained DNA damage in MCF-7 breast tumor cells. *Biochem Pharmacol* 62, 593-602.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A., and Yaffe, M.B. (2003). BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* 302, 636-639.
- Mariano, A.R., Colombo, E., Luzzi, L., Martinelli, P., Volorio, S., Bernard, L., Meani, N., Bergomas, R., Alcalay, M., and Pelicci, P.G. (2006). Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene* 25, 4376-4380.
- Martin-Subero, J.I., Odero, M.D., Hernandez, R., Cigudosa, J.C., Agirre, X., Saez, B., Sanz-Garcia, E., Ardanaz, M.T., Novo, F.J., Gascoyne, R.D., *et al.* (2005). Amplification of IGH/MYC fusion in clinically aggressive IGH/BCL2-positive germinal center B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer* 43, 414-423.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Maulik, G., Kijima, T., Ma, P.C., Ghosh, S.K., Lin, J., Shapiro, G.I., Schaefer, E., Tibaldi, E., Johnson, B.E., and Salgia, R. (2002). Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 8, 620-627.

- Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D.A., Caldecott, K.W., and Jackson, D.A. (2007). Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *EMBO J* 26, 2719-2731.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D., and Cole, M.D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.
- Miao, L., Song, Z., Jin, L., Zhu, Y.M., Wen, L.P., and Wu, M. (2010). ARF antagonizes the ability of Miz-1 to inhibit p53-mediated transactivation. *Oncogene* 29, 711-722.
- Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C., and El-Deiry, W.S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. *Cancer Res* 60, 6318-6325.
- Moissoglu, K., McRoberts, K.S., Meier, J.A., Theodorescu, D., and Schwartz, M.A. (2009). Rho GDP dissociation inhibitor 2 suppresses metastasis via unconventional regulation of RhoGTPases. *Cancer Res* 69, 2838-2844.
- Moldovan, G.L., Pfander, B., and Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 129, 665-679.
- Mu, J.J., Wang, Y., Luo, H., Leng, M., Zhang, J., Yang, T., Besusso, D., Jung, S.Y., and Qin, J. (2007). A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J Biol Chem* 282, 17330-17334.
- Munoz, M.A., Saunders, D.N., Henderson, M.J., Clancy, J.L., Russell, A.J., Lehrbach, G., Musgrove, E.A., Watts, C.K., and Sutherland, R.L. (2007). The E3 ubiquitin ligase EDD regulates S-phase and G(2)/M DNA damage checkpoints. *Cell Cycle* 6, 3070-3077.
- Murphy, D.J., Junttila, M.R., Pouyet, L., Karnezis, A., Shchors, K., Bui, D.A., Brown-Swigart, L., Johnson, L., and Evan, G.I. (2008). Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell* 14, 447-457.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell* 9, 769-779.
- Okada, S., and Ouchi, T. (2003). Cell cycle differences in DNA damage-induced BRCA1 phosphorylation affect its subcellular localization. *J Biol Chem* 278, 2015-2020.
- Orban, T.I., and Olah, E. (2003). Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol Pathol* 56, 191-197.
- Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J.P., Herrlich, P., and Ponta, H. (2002). CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 16, 3074-3086.
- Oskarsson, T., Essers, M.A., Dubois, N., Offner, S., Dubey, C., Roger, C., Metzger, D., Chambon, P., Hummler, E., Beard, P., *et al.* (2006). Skin epidermis lacking the c-Myc gene is

resistant to Ras-driven tumorigenesis but can reacquire sensitivity upon additional loss of the p21Cip1 gene. *Genes Dev* 20, 2024-2029.

Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., *et al.* (2000). Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int J Cancer* 87, 787-793.

Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-126.

Park, K., Kwak, K., Kim, J., Lim, S., and Han, S. (2005). c-myc amplification is associated with HER2 amplification and closely linked with cell proliferation in tissue microarray of nonselected breast cancers. *Hum Pathol* 36, 634-639.

Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J., and Karnitz, L. (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)* 3, 1009-1014.

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

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

Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G.I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.

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.

Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., and Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 6, 1054-1060.

Prochownik, E.V. (2008). c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med* 8, 446-458.

Qi, Y., Gregory, M.A., Li, Z., Brousal, J.P., West, K., and Hann, S.R. (2004). p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature* 431, 712-717.

Quelle, D.E., Cheng, M., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1997). Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16INK4a but not by the alternative reading frame protein p19ARF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 669-673.

Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.

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

- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., and Oren, M. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 26, 731-743.
- Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. (2003). Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5, 733-740.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326-330.
- Rizos, H., Woodruff, S., and Kefford, R.F. (2005). p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme Ubc9 and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle* 4, 597-603.
- Rodway, H., Llanos, S., Rowe, J., and Peters, G. (2004). Stability of nucleolar versus non-nucleolar forms of human p14(ARF). *Oncogene* 23, 6186-6192.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273, 5858-5868.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12, 440-450.
- Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., *et al.* (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11294-11299.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., and Suske, G. (2002). Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J* 21, 5206-5215.
- Savkur, R.S., and Olson, M.O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 26, 4508-4515.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzgel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H., *et al.* (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.
- Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U.H., Bornkamm, G.W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255-1258.

- Schuler, M., Bossy-Wetzell, E., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P., and Green, D.R. (2000). p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 275, 7337-7342.
- 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. *Biochem J* 311 ( Pt 1), 219-224.
- Seoane, J., Le, H.V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729-734.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 3, 400-408.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9, 22-30.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004). Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 3, 901-908.
- Sheen, J.H., and Dickson, R.B. (2002). Overexpression of c-Myc alters G(1)/S arrest following ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 22, 1819-1833.
- Sheen, J.H., Woo, J.K., and Dickson, R.B. (2003). c-Myc alters the DNA damage-induced G2/M arrest in human mammary epithelial cells. *Br J Cancer* 89, 1479-1485.
- Sheiness, D., and Bishop, J.M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* 31, 514-521.
- Sheiness, D.K., Hughes, S.H., Varmus, H.E., Stubblefield, E., and Bishop, J.M. (1980). The vertebrate homolog of the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus: characteristics of the DNA locus and its RNA transcript. *Virology* 105, 415-424.
- Sherr, C.J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 6, 663-673.
- Sherr, C.J., Bertwistle, D., W, D.E.N.B., Kuo, M.L., Sugimoto, M., Tago, K., Williams, R.T., Zindy, F., and Roussel, M.F. (2005). p53-Dependent and -independent functions of the Arf tumor suppressor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 129-137.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.

- Shih, C., and Weinberg, R.A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29, 161-169.
- Shiomi, Y., Shinozaki, A., Nakada, D., Sugimoto, K., Usukura, J., Obuse, C., and Tsurimoto, T. (2002). Clamp and clamp loader structures of the human checkpoint protein complexes, Rad9-1-1 and Rad17-RFC. *Genes Cells* 7, 861-868.
- Shrivastava, A., Saleque, S., Kalpana, G.V., Artandi, S., Goff, S.P., and Calame, K. (1993). Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* 262, 1889-1892.
- Simpson, C.D., Anyiwe, K., and Schimmer, A.D. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett* 272, 177-185.
- Smale, S.T., and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.
- Smits, V.A., Reaper, P.M., and Jackson, S.P. (2006). Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. *Curr Biol* 16, 150-159.
- Song, J., Durrin, L.K., Wilkinson, T.A., Krontiris, T.G., and Chen, Y. (2004). Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14373-14378.
- Song, J., Zhang, Z., Hu, W., and Chen, Y. (2005). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) recognition of a SUMO binding motif: a reversal of the bound orientation. *J Biol Chem* 280, 40122-40129.
- Spotts, G.D., Patel, S.V., Xiao, Q., and Hann, S.R. (1997). Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol* 17, 1459-1468.
- St Onge, R.P., Besley, B.D., Pelley, J.L., and Davey, S. (2003). A role for the phosphorylation of hRad9 in checkpoint signaling. *J Biol Chem* 278, 26620-26628.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., *et al.* (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-399.
- 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* 373, 820-826.
- Steiger, D., Furrer, M., Schwinkendorf, D., and Gallant, P. (2008). Max-independent functions of Myc in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 40, 1084-1091.
- Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Kruger, I., and Suske, G. (2008). SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep* 9, 899-906.
- Stone, J., de Lange, T., Ramsay, G., Jakobovits, E., Bishop, J.M., Varmus, H., and Lee, W. (1987). Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol* 7, 1697-1709.

- Sugimoto, M., Kuo, M.L., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2003). Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell* *11*, 415-424.
- Sugiyama, A., Kume, A., Nemoto, K., Lee, S.Y., Asami, Y., Nemoto, F., Nishimura, S., and Kuchino, Y. (1989). Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 9144-9148.
- Szebeni, A., and Olson, M.O. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* *8*, 905-912.
- Tago, K., Chiocca, S., and Sherr, C.J. (2005). Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: a p53-independent function. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7689-7694.
- Tanaka, N., and Fukuzawa, M. (2008). MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells. *Int J Oncol* *33*, 815-821.
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., and Hermeking, H. (2007). Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* *6*, 1586-1593.
- Tibbetts, R.S., Cortez, D., Brumbaugh, K.M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S.J., and Abraham, R.T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* *14*, 2989-3002.
- To, C.T., and Tsao, M.S. (1998). The roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor in human cancers (Review). *Oncol Rep* *5*, 1013-1024.
- Todaro, G.J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* *17*, 299-313.
- Toledo, L.I., Murga, M., Gutierrez-Martinez, P., Soria, R., and Fernandez-Capetillo, O. (2008). ATR signaling can drive cells into senescence in the absence of DNA breaks. *Genes Dev* *22*, 297-302.
- Treszl, A., Adany, R., Rakosy, Z., Kardos, L., Begany, A., Gilde, K., and Balazs, M. (2004). Extra copies of c-myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanomas as revealed by fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry B Clin Cytom* *60*, 37-46.
- Unsal-Kacmaz, K., and Sancar, A. (2004). Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Mol Cell Biol* *24*, 1292-1300.
- Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* *9*, 1031-1044.
- Van Hatten, R.A., Tutter, A.V., Holway, A.H., Khederian, A.M., Walter, J.C., and Michael, W.M. (2002). The *Xenopus* Xmus101 protein is required for the recruitment of Cdc45 to origins of DNA replication. *J Cell Biol* *159*, 541-547.

- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J.M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4, 484-490.
- Vita, M., and Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16, 318-330.
- Voulgari, A., and Pintzas, A. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 1796, 75-90.
- Vousden, K.H. (2000). p53: death star. *Cell* 103, 691-694.
- Walworth, N.C., and Bernards, R. (1996). rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* 271, 353-356.
- Wanzel, M., Kleine-Kohlbrecher, D., Herold, S., Hock, A., Berns, K., Park, J., Hemmings, B., and Eilers, M. (2005). Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol* 7, 30-41.
- Wanzel, M., Russ, A.C., Kleine-Kohlbrecher, D., Colombo, E., Pelicci, P.G., and Eilers, M. (2008). A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat Cell Biol*.
- Watt, F.M. (2002). Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J* 21, 3919-3926.
- Weber, A., Marquardt, J., Elzi, D., Forster, N., Starke, S., Glaum, A., Yamada, D., Defossez, P.A., Delrow, J., Eisenman, R.N., *et al.* (2008). Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *EMBO J* 27, 1563-1574.
- Wei, C.L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., *et al.* (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124, 207-219.
- Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J.E., Harper, J.W., Eisenman, R.N., and Clurman, B.E. (2004). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9085-9090.
- Wilson, A., Murphy, M.J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M.D., Oser, G.M., Pasche, A.C., Knabenhans, C., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* 18, 2747-2763.
- Wood, M.A., McMahon, S.B., and Cole, M.D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* 5, 321-330.
- Woods, Y.L., Xirodimas, D.P., Prescott, A.R., Sparks, A., Lane, D.P., and Saviile, M.K. (2004). p14 Arf promotes small ubiquitin-like modifier conjugation of Werners helicase. *J Biol Chem* 279, 50157-50166.
- 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.

- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* *124*, 471-484.
- Xia, M., and Land, H. (2007). Tumor suppressor p53 restricts Ras stimulation of RhoA and cancer cell motility. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 215-223.
- Xirodimas, D.P., Chisholm, J., Desterro, J.M., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2002). P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett* *528*, 207-211.
- Xirodimas, D.P., and Lane, D.P. (2008). Targeting a nucleolar SUMO protease for degradation: A mechanism by which ARF induces SUMO conjugation. *Cell Cycle* *7*.
- Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* *23*, 2116-2125.
- Yamada, T., Kohno, T., Navarro, J.M., Ohwada, S., Perucho, M., and Yokota, J. (2000). Frequent chromosome 8q gains in human small cell lung carcinoma detected by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Cancer Genet Cytogenet* *120*, 11-17.
- Yang, S.H., and Sharrocks, A.D. (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* *13*, 611-617.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsur, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., *et al.* (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* *20*, 1688-1702.
- Yogev, O., Saadon, K., Anzi, S., Inoue, K., and Shaulian, E. (2008). DNA damage-dependent translocation of B23 and p19 ARF is regulated by the Jun N-terminal kinase pathway. *Cancer Res* *68*, 1398-1406.
- Yu, X., Chini, C.C., He, M., Mer, G., and Chen, J. (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* *302*, 639-642.
- Yun, J.P., Chew, E.C., Liew, C.T., Chan, J.Y., Jin, M.L., Ding, M.X., Fai, Y.H., Li, H.K., Liang, X.M., and Wu, Q.L. (2003). Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J Cell Biochem* *90*, 1140-1148.
- Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* *92*, 725-734.
- Zhao, X., D, D.A., Lim, W.K., Brahmachary, M., Carro, M.S., Ludwig, T., Cardo, C.C., Guillemot, F., Aldape, K., Califano, A., *et al.* (2009). The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing brain. *Dev Cell* *17*, 210-221.
- Zhao, X., Heng, J.I., Guardavaccaro, D., Jiang, R., Pagano, M., Guillemot, F., Iavarone, A., and Lasorella, A. (2008). The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. *Nat Cell Biol* *10*, 643-653.

Zheng, L., Pan, H., Li, S., Flesken-Nikitin, A., Chen, P.L., Boyer, T.G., and Lee, W.H. (2000). Sequence-specific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1. *Mol Cell* *6*, 757-768.

Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* *121*, 1085-1095.

Zhou, B.B., and Bartek, J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* *4*, 216-225.

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 U S A* *101*, 458-463.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* *12*, 2424-2433.

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

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

Im Folgenden sind spezielle Abkürzungen sowie die Bezeichnung wichtiger Gene erläutert. Darüber hinaus wurden Abkürzungen der IUPAC (*International union of pure and applied Chemistry*) und des SI-Systems (*Système international d'unités*) verwendet.

A	Adenin
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
Arf	<i>alternate reading frame</i> , Produkt eines alternativen Transkriptes des <i>INK4a/ARF</i> -Genlokus
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β2-Mikroglobulin
bHLH/LZ	basische Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper-(Domäne)
BR	basische Region
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
<i>CCND2</i>	Genbezeichnung des Cyclins D2
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
cDNA	Komplementär-DNA ( <i>complementary DNA</i> )
<i>CDKN1A</i>	Genbezeichnung des Zellzyklusinhibitors p21Cip1
<i>CDKN2B</i>	Genbezeichnung des Zellzyklusinhibitors p15Ink4b
CDS	kodierende Sequenz ( <i>coding sequence</i> )
CMV	Cytomegalievirus
c-Myc	Transkriptionsfaktor, durch das Gen <i>MYC</i> kodiert
Da	Dalton (= 1 u)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat-Gemisch

DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E $\mu$	Enhancer der schweren Immunglobulinkette
E2	Ubiquitin/SUMO-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin/SUMO-Ligase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
Ethanol abs.	100% Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FBS	fötales Rinderserum ( <i>foetal bovine serum</i> )
G	Guanin
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung ( <i>HEPES buffered saline</i> )
HDAC	Histondeacetylase-Komplex
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix-Motiv
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
INR	Initiatorelement
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton (1 kg/mol)
LB	Medium zur Bakterienkultivierung ( <i>lysogeny broth</i> )
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LZ	Leuzin-Zipper
MB	Myc-Box
MEFs	Mausembryofibroblasten
miRNA	microRNA
Miz1	<i>Myc interacting zincfinger protein 1</i>
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localisation signal</i> )
N-Myc	Transkriptionsfaktor, durch das Gen <i>MYCN</i> kodiert
NP40	Nonidet P-40
NPM	Nukleophosmin
NTA	Nitrilotriessigsäure ( <i>nitrilotriacetic acid</i> )

P	Phosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEST	Pro-, Glu-, Ser- und Thr-reiche Region
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI-FACS	Propidiumiodid-Durchflusszytometrie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
polyA	Polyadenylierungssignal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR
Ras	<i>rat sarcoma virus oncogene</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	reverse Transkriptase
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
sub-G1	Zellen mit geringerem DNA-Gehalt als in der G1-Phase, apoptotische Zellen
T	Thymin
T	Threonin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TopBP1	<i>topoisomerase II<math>\beta</math> binding protein 1</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
U	Aktivitätseinheit (von Enzymen)
U	Uracil
UVB	Ultraviolettlicht im Wellenlängenbereich von 280 bis 315 nm
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )

w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
IB	Immunoblot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZF	Zinkfinger

## 8.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Barbara Herkert

geboren am 02. Januar 1981 in Miltenberg

ledig

### Schulbildung

September 1987 bis August 1991

Grundschule Kirchzell

September 1991 bis Juni 2000

Karl-Ernst-Gymnasium Amorbach

Abschluss: Abitur (1,2)

### Hochschulbildung

Oktober 2000 bis Juli 2002

Grundstudium Biochemie Diplom,

Universität Bayreuth

Abschluss: Vordiplom (1,5)

Oktober 2002 bis Mai 2005

Hauptstudium Biochemie Diplom,

Universität Bayreuth

Abschluss: Diplom (1,2)

November 2004 bis Mai 2005

Diplomarbeit auf dem Gebiet der Mikrobiologie,

Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Bayreuth,

Betreuung: Dr. Vitaly Svetlitchnyi

Thema: Transkriptions- und Funktionsanalyse des

CO-Stoffwechsels des anaeroben hydrogenogenen

Bakteriums *Carboxyothermus hydrogenoformans*

Juli 2005 bis Januar 2009

Doktorarbeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie,

Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung,

Philipps-Universität Marburg

Betreuung: Prof. Dr. Martin Eilers

seit Januar 2009

Doktorarbeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie,

Biozentrum,

Ludwigs-Maximilians-Universität Würzburg

Betreuung: Prof. Dr. Martin Eilers

### **8.3 Danksagung**

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen habe.

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Martin Eilers für das interessante Thema sowie die fortwährende Unterstützung und wertvollen Ratschläge. Ebenso danke ich PD Dr. Werner Lutz für die Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft zu Beginn meiner Doktorarbeit.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer und Anneli Gebhardt für den regen Gedankenaustausch und die angenehme Zusammenarbeit bedanken. Ein großer Dank geht auch an Antje Grzeschiczek für die zahlreiche Mausearbeit, Waltraud Ackermann für die Hilfe bei der Bearbeitung der Gewebeproben für histologische Färbungen sowie Bianca Jebavy, Inge Pelz und Renate Metz für die experimentelle Unterstützung.

Außerdem danke ich Theresia Kress, Katrin Wiese und Steffi Herold für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ein besonderer Dank gilt allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Eilers, Lutz, Bauer und Elsässer, besonders Judith Müller und Michael Wanzel, für die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie die vielen Anregungen und Hilfestellungen für meine wissenschaftliche Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und Geschwistern für die tatkräftige und ausdauernde Unterstützung, ihr ständiges Interesse und unerschöpfliches Verständnis bedanken.

## 8.4 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

In Bayreuth:

Dettner, Gradzielski, Hillebrecht, Hoffmann, Hoffmann, Kleiner, Komor, Krausch, Krauss, Kreuzer, Lehner, Meyer, Ott, Rösch, Schmid, Schumann, Seifert, Sprinzi, Svetlitchnyi, Unverzagt

In Marburg:

M. Eilers, W. Lutz

## 8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Charakterisierung transkriptioneller und nicht-transkriptioneller Funktionen der Faktoren Miz1 und c-Myc in der UVB-induzierten DNA-Schadensantwort**

**und**

**Die Inhibition der Miz1-Funktion durch den Tumorsuppressor Arf führt zum Verlust der Zelladhäsion und induziert Apoptose**

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Martin Eilers (ehemals Fachbereich Medizin) selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angerfertigt habe sowie mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde wie folgt veröffentlicht:

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

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

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

Barbara Herkert

Würzburg, 16. Februar 2011