

**Molekulare Mechanismen der c-Myc Transaktivierung:
Identifikation von hASH2, Nucleolin und CBP als neue
c-Myc Koaktivatoren**

Dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaft
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Jörg Vervoorts
geboren am 16. Januar 1970 in Bochum

2003

Referenten: Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn
Prof. Dr. Bernhard Lüscher

Tag der Promotion: 13.12.2002

Zusammenfassung

Das c-Myc Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der über die Regulation der Genexpression das Verhalten von Zellen beeinflusst. Dabei ist c-Myc in der Lage Zellwachstum zu stimulieren, Differenzierung zu inhibieren und Apoptose zu induzieren. Eine Deregulation der c-Myc Expression ist wesentlich an der Entstehung von Krebs beteiligt. Trotz der gut charakterisierten biologischen Effekte sind auf molekularer Ebene die transkriptionellen Regulationsmechanismen von c-Myc nur ansatzweise verstanden. Ziel der Arbeit war die Identifizierung neuer c-Myc bindender Faktoren, um ein besseres Verständnis der c-Myc abhängigen Transkriptionsregulation zu gewinnen.

Dazu wurden mittels eines proteinbiochemischen Ansatzes c-Myc bindende Faktoren affinitätschromatographisch mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper aus Jurkat-Zellysaten aufgereinigt. Als c-Myc bindende Faktoren konnten Nucleolin und das Trithoraxprotein hASH2 identifiziert werden.

Untersuchungen zur Funktion der Interaktionen zeigten, dass hASH2 und Nucleolin mit c-Myc bei der Aktivierung von Reportergenkonstrukten kooperieren. Dieses spiegelt sich auch in der identifizierten *in vivo* Interaktion zwischen Nucleolin und hASH2 wider. Sowohl hASH2 als auch Nucleolin interagieren mit den C-terminalen 176 Aminosäuren von c-Myc. Für hASH2 wurde die Interaktionsdomäne weiter auf den Bereich von Aminosäure 265 bis 355 zwischen saurer und basischer-Region von c-Myc eingegrenzt. Diese Domäne hat neben der Transaktivierungs- und DNA-Bindungsdomäne von c-Myc einen Einfluss auf die c-Myc-vermittelte Transformation primärer Fibroblasten. Erste Untersuchungen zeigten, dass auch hASH2 transformierende Eigenschaften besitzt.

Als ein weiterer c-Myc-interagierender Faktor konnte CBP in Koimmunpräzipitationen identifiziert werden. CBP bindet ebenfalls an die C-terminalen 176 Aminosäuren von c-Myc. c-Myc interagiert primär mit einer Region, die die KIX-Domäne von CBP einschließt und von viele Transkriptionsfaktoren gebunden wird. Auch CBP und das CBP-homologe Protein p300 stimulieren die c-Myc-abhängige Transaktivierung von Reportergenkonstrukten. Dabei ist die Acetyltransferase-Aktivität von CBP zu einem wesentlichen Teil an der Transkriptionsstimulation beteiligt. Daher wurde überprüft, ob c-Myc durch CBP acetyliert wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass CBP in der Lage ist, c-Myc *in vitro* zu acetylieren und die *in vivo* Acetylierung von c-Myc zu stimulieren.

Die CBP-Acetyltransferaseaktivität wird zellzyklusabhängig am G1/S-Phaseübergang positiv durch den Cyclin E/CDK2 Kinase-Komplex reguliert. Da CBP die c-Myc Transaktivierung Acetyltransferase-abhängig stimuliert, wurde der Einfluss von Cyclin E/CDK2 auf die Transaktivierung durch c-Myc und CBP untersucht. Dabei zeigte sich, dass Cyclin E/CDK2 und CBP die c-Myc-abhängige Transaktivierung kooperativ stimulieren und Cyclin E/CDK2 c-Myc an Serin-62 phosphoryliert. Allerdings ist die Kooperativität unabhängig von der c-Myc Phosphorylierung. Diese Ergebnisse beschreiben hASH2, Nucleolin und CBP als neue c-Myc interagierende Faktoren, die einen positiven Einfluss auf die c-Myc Transaktivierung ausüben.

Abstract

The c-Myc oncoprotein regulates different aspects of cell behaviour by modulating gene expression. It was demonstrated that c-Myc stimulates cell proliferation, inhibits differentiation and induce apoptosis. The deregulation of c-Myc expression is associated with tumour formation. In spite of the well-characterised biological relevance of c-Myc little information is available how c-Myc affects gene regulation at the molecular level. The aim of this work was to identify novel c-Myc binding partners and to understand c-Myc depending transcriptional regulation in more detail.

Novel c-Myc interacting factors were identified by affinity purification of a c-myc complex from Jurkat cell lysates using a c-Myc specific monoclonal antibody. With this approach Nucleolin and hASH2 were identified as new c-Myc binding partners. Functional investigations of the interaction showed that hASH2 and Nucleolin cooperates to simulate the c-Myc depended activation of reporter gene construct. This cooperation was confirmed by the *in vivo* interaction between Nucleolin and hASH2. Both proteins bind to the C-terminal 176 amino acids of c-Myc. For hASH2 the interaction domain was narrowed down to a region encompassing amino acid 265 to 355 between the acidic and basic regions in c-Myc. This domain is, in addition to the transactivation and the DNA-binding domain of c-Myc, involved in the transformation of primary rodent fibroblasts. Preliminary findings indicates that hASH2 also possesses transforming properties.

During our efforts to identify c-Myc interacting proteins we recognized CBP as a c-Myc binding partner in low stringenced co-immunoprecipitations. CBP interacts with the C-terminal region of c-Myc, while it binds a region of CBP that includes the KIX domain, an interaction surface for several transcription regulators. Furthermore c-Myc and CBP, as well as p300, strongly synergise in the activation of reporter gene constructs. The acetyltransferase domain of CBP was in part important for the cooperativity with c-Myc. Hence it was tested if c-Myc is a substrate for the CBP acetyltransferase since CBP acetylates not only core histones but also several transcriptional regulators. It could be shown that CBP acetylates c-Myc *in vitro* and stimulates the acetylation of c-Myc *in vivo*.

The CBP acetyltransferase activity is regulated in a cell cycle dependent manner. It has been suggested that phosphorylation by cyclin E/CDK2 at the G1/S-phase transition increases the acetyltransferase activity. Because of the acetyltransferase-dependent cooperation between CBP and c-Myc the role of cyclin E/CDK2 in c-Myc-dependent transcriptional activation was tested. Cyclin E/CDK2 cooperates with CBP to stimulate c-Myc-dependent transactivation and phosphorylates c-Myc on serin-62. However the cooperativity was independent of this phosphorylation.

Thus in this work, hASH2, Nucleolin and CBP were identified as novel functional interaction partners of c-Myc which influence the c-Myc-dependent transactivation in a positive way.

Schlagworte

Deutsch:

c-Myc
Transkriptionsfaktor
Protein-Protein-Interaktion

Englisch:

c-Myc
transcription factor
protein-protein interaction

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
SCHLAGWORTE	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Regulation der Genexpression	1
1.1.1 Chromatinstruktur	1
1.1.2 Genspezifische Transkriptionsfaktoren	2
1.1.3 Transkriptionelle Koregulatoren	3
1.1.4 Chromatin Remodeling und Modifikationen	4
1.2 Das Proto-Onkogen c-Myc	7
1.2.1 Funktion, Expression und Struktur von c-Myc	7
1.2.2 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk	9
1.2.3 c-Myc-Zielgene	11
1.2.4 Transaktivierung durch c-Myc	11
1.2.5 Repression durch c-Myc	14
1.2.6 Regulation von c-Myc-Funktion	14
1.3 Zielsetzung	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.1 Vektoren	17
2.1.1.1 Klonierungsvektoren	17
2.1.1.2 Eukaryontische Expressionsvektoren	17
2.1.1.3 Reportervektoren	21
2.1.1.4 Bakterielle Expressionsvektoren	21
2.1.2 Antikörper	22
2.2 Zellkultur	23
2.2.1 Allgemeine Materialien für Zellkultur	23
2.2.2 Eukaryontische Zellen	24
2.2.3 Kulturbedingungen	24
2.2.4 Kryokonservierung	25
2.2.5 Isolation primärer Rattenfibroblasten	25
2.2.6 In vivo-Markierung mit [³⁵ S]-Methionin	25
2.2.7 Transiente Transfektion	26
2.2.8 Reinigung von Baculovirus HIS-CBP	27
2.3 Arbeiten mit prokaryontischen Zellen	27

2.3.1	Kulturmedien	27
2.3.2	Bakterienstämme	28
2.3.3	Transformation	28
2.3.4	Isolation von Plasmid-DNA	28
2.3.5	Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen	30
2.3.6	Aufreinigung von Maltose-bindendes-Protein-Fusionsproteinen	30
2.4	Arbeiten mit DNA	31
2.4.1	Enzymatische Modifizierung von DNA	31
2.4.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten	31
2.4.3	Elektrophorese von DNA und Extraktion aus Agarosegelen	32
2.5	Proteinchemische Methoden	32
2.5.1	Präparation von Zellysaten	32
2.5.2	Messung der Transaktivierung	33
2.5.3	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.5.4	Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau	35
2.5.5	Western-Blot	36
2.5.6	Nachweis von Proteinen in der Immunfluoreszenz	37
2.5.7	Immunopräzipitation	38
2.5.8	Koimmunpräzipitation	39
2.5.9	Affinitätsreinigung von Antikörpern	39
2.5.10	Gekoppelte in vitro-Transkription /-Translation	39
2.5.11	<i>Pulldown</i> -Experimente mit GST-Fusionsproteinen	40
2.5.12	Acetyltransferase-Assay	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Identifizierung c-Myc assoziierter Faktoren	41
3.2	Charakterisierung des Trithorax-Proteins hASH2	42
3.2.1	Das Trithorax Protein hASH2	42
3.2.2	Sequenzanalyse von hASH2	44
3.2.3	Klonierung von hASH2	49
3.2.4	Charakterisierung von hASH2 spezifischen Antikörpern	49
3.2.5	Expression von hASH2 in Zelllinien	50
3.2.6	Kernlokalisierung	51
3.2.7	Einfluss von hASH2 auf die Transaktivierung	53
3.2.8	Einfluss von hASH2 auf Zellwachstum	55
3.3	Interaktion von c-Myc mit hASH2	56
3.3.1	<i>In vivo</i> Interaktion und Charakterisierung der Interaktionsdomänen	56
3.4	Interaktion von c-Myc mit Nucleolin	61
3.4.1	Nucleolin	61
3.4.2	<i>In vivo</i> Interaktion und Charakterisierung der c-Myc Interaktionsdomäne	62
3.4.3	Nucleolin stimuliert die c-Myc abhängige Transaktivierung	64
3.5	Interaktion von c-Myc mit dem CREB-Binding-Protein (CBP)	66
3.5.1	CREB-Binding-Protein (CBP)	66
3.5.2	<i>In vivo</i> Interaktion und Charakterisierung der Interaktionsdomänen	71
3.5.3	CBP stimuliert die c-Myc abhängige Transaktivierung	75

3.5.4	Acetylierung von c-Myc durch CBP	76
3.5.5	Einfluss von Cylin E/CDK2 auf die Myc Transaktivierung	79
4	<u>DISKUSSION</u>	83
4.1	Interaktion von c-Myc mit hASH2 und Nucleolin	83
4.2	Interaktion von c-Myc mit CBP	87
5	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	91
6	<u>ANHANG</u>	110
	Erklärung	110
	Lebenslauf	111
	Veröffentlichungen	112
	Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>Antibody</i>
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium Persulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
b	basische Region
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBP	CREB bindendes Protein
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GI	<i>Genbank Number</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hebs	<i>Hepes Buffered Saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure

HLH	Helix-Loop-Helix
HS	Hochsalz
HS	<i>Horse Serum</i>
IE	<i>immediate early</i>
Ig	Immunglobulin
INR	Initiator-Element
IPTG	□-D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LZ	Leucin- <i>Zipper</i>
MB	Myc-Box
MBP	Maltose-bindendes Protein
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
mRNA	Boten-RNA
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenylgalactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RZPD	Resource Center/ Primary Database Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SID	Sin3-Interaktionsdomäne
SV40	Simian Virus 40
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBP	TATA-Box bindendes Protein
Tet	Tetrazyklin
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen-Verhältnis

w/v	Gewicht pro Volumen-Verhältnis
wt	Wildtyp
XC	Xylencyanol
ZK	Zellkultur

1 Einleitung

1.1 Regulation der Genexpression

Höhere und niedrigere Lebewesen bestehen aus einer Vielzahl verschiedenster Zellen mit unterschiedlichen Aufgaben. Für die Ausprägung des Phänotyps und der jeweiligen Funktion einer Zelle ist ein spezifisches und genau koordiniertes Programm von Genaktivitäten notwendig, die Zellwachstum, Differenzierung und Zelltod steuern. Auch die Fähigkeit von Organismen, sich auf verändernde Umweltbedingungen adäquat einstellen zu können, ist von einer regulierbaren Genexpression abhängig. Eine Fehlregulation dieser Prozesse kann zur Ausbildung von Krankheiten, insbesondere zur Entstehung von Krebs führen. Daher ist es nicht erstaunlich, dass die Transkription von Genen ein genau aufeinander abgestimmter und stark kontrollierter Prozess ist.

1.1.1 Chromatinstruktur

Im Kern eukaryontischer Zellen liegt die DNA nicht in nackter Form vor, sondern ist dicht verpackt mit Proteinen in Chromatin organisiert. Die funktionelle, sich wiederholende Untereinheit des Chromatins bilden die Nukleosomen (Kornberg und Lorch, 1999). Jedes Nukleosom besteht aus je zwei Molekülen der vier Kern-Histon-Proteinen H2A, H2B, H3 und H4. Dabei bilden die Histone H3 und H4 ein Tetramer, das auf jeder Seite von einem H2A/H2B Histon-Dimer gebunden wird. Um dieses Oktamer sind 146 bp DNA in 1,7 Windungen einer linksgängigen Helix gewunden (Luger *et al.*, 1997). Die niedrigste Stufe der Chromatinorganisation besteht aus einer Aneinanderreihung von Nukleosomen, die durch DNA-*linker*-Einheiten von 50 bis 80 bp miteinander verbunden sind. An diese bindet das Histon H1, das an der Komprimierung des Chromatins in Strukturen höherer Ordnung beteiligt ist (Wolffe und Guschin, 2000). Im Gegensatz zu den Kern-Histonen ist das Histon H1 aber nicht essentiell für die Bildung des Chromatins (Dasso *et al.*, 1994).

Die Histone sind evolutionär stark konservierte Proteine. Die zwischen 11 und 16 kDa großen Proteine bestehen aus einem basischen aminoterminalen Schwanz und einer globulären als *histone-fold*-Motiv bezeichneten C-terminalen Domäne. Über das *histone-fold*-Motiv dimerisieren die Histone in einer Art „Hand-gebenden“ Zusammenlagerung (Luger *et al.*, 1997). Daneben ist das *histone-fold* Motiv auch für die Organisation der DNA um das Histon-Oktamer des Nukleosoms verantwortlich. Außer bei Histonen wurde dieses Motiv auch bei einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren gefunden (Burley *et al.*, 1997).

Die 10 bis 40 Aminosäuren langen, evolutionär stark konservierten N-terminalen Schwänze der Histone ragen in einer wenig geordneten Struktur aus den Nukleosomen heraus, wo sie für die Wechselwirkung mit benachbarter DNA und anderen Proteinen zur Verfügung stehen. Durch diese Wechselwirkungen vermitteln die aminoterminalen Schwänze Kontakte zwischen benachbarten Nukleosomen und sind für die Entstehung höher geordneter Strukturen von Bedeutung (Luger *et al.*, 1997; Widom, 1997).

Generell blockiert die Einbindung der DNA in Nukleosomen und Chromatin die Initiation der Transkription (Kornberg und Lorch, 1999; Kuras und Struhl, 1999). Durch das Wickeln der DNA um die Histonoktamere ist die Bindung von Transkriptionsfaktoren und deren Zugang zu Erkennungssequenzen sterisch stark behindert (Workman und Kingston, 1998). Eine Zusammenlagerung von Nukleosomen in höhere Strukturen kann zur transkriptionellen Repression ganzer chromosomaler Abschnitte führen (Ramakrishnan, 1997). Lagern sich die Nukleosomen mit weiteren chromosomalen Proteinen zu Heterochromatin zusammen, wird die Genexpression in einer vererbaren Weise reprimiert (Grunstein, 1998). Um die Expression von Genen zu stimulieren, müssen transkriptionsaktivierende Faktoren die reprimierende Struktur des Chromatins überwinden.

1.1.2 Genspezifische Transkriptionsfaktoren

Die Regulation von genspezifischen Transkriptionsfaktoren bildet den Endpunkt vieler Signaltransduktionswege. Transkriptionsfaktoren binden über ihre DNA-Bindungsdomänen sequenzspezifisch in regulatorischen Bereichen von Genen und wirken über ihre Transaktivierungsdomäne aktivierend oder reprimierend auf deren Expression (Roeder, 1996). Die als Enhancer- und Promotorbereich bezeichneten regulatorischen Sequenzen eines Gens besitzen eine Vielzahl von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Durch diese multiplen Bindungsstellen ist ein Gen in der Lage, auf unterschiedliche Signale zu antworten und erlaubt eine Feinabstimmung der Transaktivierung durch die Wechselwirkung zwischen mehreren Transkriptionsfaktoren (Lefstin und Yamamoto, 1998; McKenna und O'Malley, 2002).

Neben dieser genspezifischen Regulation durch die Kooperation mehrerer Transkriptionsfaktoren wird die Transkription auch über die Aktivität jedes einzelnen Transkriptionsfaktors moduliert. Dies geschieht meist durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung (Karin und Hunter, 1995; Kouzarides, 2000; McBride und Silver, 2001; Orphanides und Reinberg, 2002). Über diese Modifikationen wird die zelluläre Lokalisation, die Halbwertszeit, die Interaktion mit Dimerisierungspartnern und Adaptermolekülen, die DNA-Bindung und die Funktion der Transaktivierungsdomäne (TAD) reguliert (Hill und Treisman, 1995; Orphanides und Reinberg, 2002).

Der Mechanismus, über den Transkriptionsfaktoren die Genaktivität regulieren, wurde in den letzten Jahren stark erweitert. Anfänglich konnte gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren und durch deren Rekrutierung die Transkription aktivieren. Der Mechanismus erweiterte sich durch die Ergebnisse, dass Transkriptionsfaktoren auch an der Prozessierung der basalen Transkriptionsmaschinerie während der Initiation, des *promotor clearance* und der Elongation beteiligt sind. Weitere Ergebnisse zeigten, dass Transkriptionsfaktoren zur Initiation der Transkription die reprimierende Struktur des Chromatins aufbrechen müssen. Für diese Funktionen müssen Transkriptionsfaktoren mit einer Gruppe von Proteinen, den sogenannten Koregulatoren kooperieren, welche meist in größeren Komplexen wirken (Lemon und Tjian, 2000; McKenna und O'Malley, 2002).

Damit Transkriptionsfaktoren an DNA binden können, ist eine Dekondensation des Chromatins erforderlich. Auf der anderen Seite induzieren Transkriptionsfaktoren die Dekondensation des Chromatins. Daher wird angenommen, dass einige Transkriptionsfaktoren, wahrscheinlich in Abhängigkeit von der jeweiligen Organisation des Chromatins an einem spezifischen Promotor ihre Responselemente auch in kondensiertem Chromatin, binden können. Solchen Transkriptionsfaktoren kommt eine zentrale Bedeutung in der initialen Öffnung eines Genlokus zu. Wie oben bereits erwähnt, ermöglichen sie die gezielte Aktivitätssteuerung von Promotoren, z.B. in Abhängigkeit von Signalübertragungskaskaden. Als Beispiel kann der Glucocorticoidrezeptor (GR) angeführt werden, der DNA in Chromatin verpackt erkennt. Der Glucocorticoidrezeptor bindet eine kurze DNA-Sequenz in der großen Furche auf einer Seite der Doppelhelix, wodurch er in der Lage ist seine Zielsequenz im Nukleosoms verpackt zu erkennen (Orphanides und Reinberg, 2002).

1.1.3 Transkriptionelle Koregulatoren

Für die Aktivierung und Regulation der Genexpression sind neben den sequenzspezifischen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren zahlreiche Koregulatoren notwendig, die meist nicht selber DNA binden, sondern von den Transkriptionsfaktoren zu Promotor- und Enhancer-Sequenzen dirigiert werden. Diese lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe wirkt direkt auf die RNA-Polymerase II und die generellen Transkriptionsfaktoren, während die zweite Gruppe die Chromatinstruktur beeinflusst. Die erste Gruppe umfasst die TAFs (TBP-assoziierte Faktoren), den Mediator- und USA-Komplex. Die zweite Gruppe beinhaltet die ATP-abhängigen, Chromatinstrukturverändernden (*chromatin remodeling*) und Chromatin-modifizierenden Komplexe. Allerdings gibt es auch Faktoren mit überlappenden Funktionen aus beiden Gruppen.

1.1.4 Chromatin Remodeling und Modifikationen

Einst wurde Chromatin als ein statisches Gerüst zur Organisation und Verpackung der DNA im Zellkern betrachtet. Heute ist klar, dass über die Modulation der Chromatinstruktur die Genexpression gesteuert wird (Narlikar *et al.*, 2002; Orphanides und Reinberg, 2002). Zur Regulation der Transkription über die Chromatinstruktur haben sich zwei unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Ein Mechanismus umfasst die kovalente Modifikation der Core-Histone an ihren N-terminalen Enden durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinierung (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001). Der zweite Mechanismus führt zu einem ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling, indem die Struktur, Stabilität und Position der Nukleosomen verändert wird (Vignali *et al.*, 2000; Varga-Weisz, 2001).

Von den posttranslationalen Modifikationen ist die Acetylierung der Lysine an den N-terminalen Enden der Histone die bestcharakterisierte. Schon seit langem war der Zusammenhang zwischen der Acetylierung von Histonen und einem transkriptionell aktiven Zustand bekannt (Allfrey *et al.*, 1964). Die erste direkte Verbindung zwischen Histon-Acetylierung und Transkriptionsregulation kam durch die Beobachtung zustande, dass der Hefe Koaktivator Gcn5 eine Histonacetyltransferase (HAT) ist und dass die Gcn5-induzierte Transkription von der HAT-Aktivität abhängig ist (Brownell *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1998). Neben Gcn5 konnte für eine Reihe weiterer Koaktivatoren HAT-Aktivität nachgewiesen werden. Dazu gehören die Koaktivatoren CBP/p300 und P/CAF, der basale Transkriptionsfaktor TFIID und die SRC-Familie der Steroidrezeptor-Koaktivatoren (Marmorstein, 2001). Das ursprüngliche Modell eines Koaktivators schlug vor, dass sie durch die Bindung an Transkriptionsfaktoren zu Promotoren dirigiert werden und dort die Rekrutierung des generellen Transkriptionsapparates bewirken. Nach der Entdeckung der HAT-Aktivität wurde das Modell um die enzymatische Aktivität erweitert. Dadurch sind Koaktivatoren zusätzlich in der Lage, die Chromatinstruktur in der Umgebung eines Promotors aufzubrechen (Berger, 2001). Acetyltransferasen sind oft Teil großer Komplexe mit vielen Untereinheiten, die einen regulatorischen Einfluss auf die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, Promotorspezifität und Substratspezifität haben (Narlikar *et al.*, 2002).

Neben der Acetylierung scheinen auch die Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinierung von Histonen wesentlich an der Transkriptionsregulation beteiligt zu sein. Dabei scheint die Phosphorylierung und Methylierung kontextabhängig eine aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die Transkription zu haben (Berger, 2002).

Die Phosphorylierung von Serin10 an Histon H3 korreliert mit der Chromatinkondensation während der Mitose. Auf der anderen Seite ist die Phosphorylierung an Serin10 an der Aktivierung der sehr frühen Gene *c-fos*, *c-jun* und *c-myc* beteiligt und stimuliert die nachfolgende Acetylierung von Histon H3 durch verschiedene HATs (Cheung *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2000; Berger, 2001).

Die Histone können an den Aminosäuren Arginin und Lysin methyliert werden. Die Arginine in Histon H3 und H4 werden durch die Histon-Methyltransferase (HMT) Familie CARM1/PRMT1 methyliert, was zu einer transkriptionellen Aktivierung führt (Wang *et al.*, 2001a; Berger, 2002). Die Lysine der Histone werden durch die Familie der Histon-Methyltransferase mit SET-Domäne methyliert. Die Methyltransferaseaktivität in dieser Proteinfamilie wurde zuerst für das Suvar3-9 Protein beschrieben (Rea *et al.*, 2000). Dieses methyliert spezifisch Lysin9 des Histon H3. Diese Methylierung wird von dem HP1 Protein erkannt, das an der Repression von Genen durch die Ausbildung von Heterochromatin beteiligt ist (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001). Daneben ist der Suvar3-9/HP1 Komplex auch an der genspezifischen Repression durch Korepressoren, wie dem Retinoblastoma Protein (RB) beteiligt (Nielsen *et al.*, 2001). Eine zweite Klasse von SET-Protein methyliert Lysin4 an Histon H3 (Roguev *et al.*, 2001; Kouzarides, 2002; Nagy *et al.*, 2002). Diese Methylierung korreliert mit einem transkriptionell aktiven Zustand (Litt *et al.*, 2001; Noma *et al.*, 2001).

Diese Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Modifikationen mit einem spezifischen transkriptionellen Status korrelieren. Zudem ist dieser Status auch von der Kombination und zeitlichen Abfolge mehrerer Modifikationen abhängig. Das N-terminale Ende des Histon H3 scheint in zwei verschiedenen Modifikationszuständen zu existieren, die einen transkriptionell aktiven oder inaktiven Zustand definieren. Die Phosphorylierung von Serin10 inhibiert die Methylierung von Lysin9, aber stimuliert die Acetylierung von Lysin9 und 14. In diesem Status ist Histon H3 für einen transkriptionell aktiven Zustand markiert. Für einen inaktiven Zustand wird Lysin14 deacetyliert, gefolgt von der Methylierung von Lysin9 (Jenuwein und Allis, 2001).

Diese Ergebnisse führten zur Formulierung einer Hypothese, die als Histon-Code bezeichnet wird (Strahl und Allis, 2000). Sie besagt, dass die Gesamtheit aller Modifikationen, in Art, Zahl und zeitlicher Abfolge ein bestimmtes biologisches Programm vorgibt (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001). Dieses Programm kann durch Effektorproteine umgesetzt werden, die die verschiedenen Modifikationen und ihre Kombinationen erkennen. Gestützt wird dieses Modell durch die Identifikation verschiedener Domänen in Chromatin-assoziierten Proteinen, die spezifisch mit bestimmten Modifikationen interagieren. Beispiel dafür ist die Bromodomäne, die spezifisch mit acetylierten Lysinen interagiert und in transkriptionellen Koaktivatoren mit Histon-Acetyltransferaseaktivität und in Chromatin-Remodeling Komplexen gefunden wurde (Jenuwein und Allis, 2001; Berger, 2002). Ein besonderes Beispiel für das Erkennen von Modifikationskombinationen stellt das TAFII250 Protein mit einer doppelten Bromodomäne dar, mit der es präferenziell diacetylierte Histone bindet (Jacobson *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Interaktion der Chromodomäne mit methylierten Histonen. Die Chromodomäne von HP1 erkennt selektiv die Methylierung von Lysin9 an Histon H3 (Bannister *et al.*, 2001). Ob die Chromodomänen anderer Proteine auch eine derartige Spezifität besitzen ist noch unklar.

Die Struktur der Nucleosomen kann auch durch ATP-abhängige Chromatin Remodeling-Komplexe beeinflusst werden. Diese Komplexe nutzen einen ATP-abhängigen Mechanismus um die nucleosomale Struktur zu verändern (Aalfs und Kingston, 2000). Es können aufgrund der ATPase Untereinheit drei verschiedene Klassen von Chromatin Remodeling-Komplexen unterschieden werden: die SWI/SNF-, die ISWI- und die Mi-2-Familie. Die Komplexe aller drei Familien sind *in vitro* in der Lage Nucleosomen entlang der DNA zu verschieben (Corona *et al.*, 1999; Hamiche *et al.*, 1999). Für die SWI/SNF-Komplexe konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sie die Übertragung von Nucleosomen auf einen anderen DNA-Strang katalysieren (Lorch *et al.*, 1999; Whitehouse *et al.*, 1999). In einer Vielzahl von biologischen Systemen konnte die Bedeutung des Chromatin Remodeling für die Genregulation bestätigt werden. Dabei spielen Chromatin-Remodeling Komplexe nicht nur eine Rolle bei der Aktivierung der Transkription, sondern wirken auch reprimierend. In diesem Zusammenhang sind besonders die ISWI and Mi-2-Familien zu nennen (Fry und Peterson, 2001; Varga-Weisz, 2001).

Es ist offensichtlich, dass für die Genregulation ATP-abhängiges Chromatin-Remodeling und die Modifikationen von Histonen funktionell verknüpft sind. Erste Hinweise für ein funktionelles Zusammenspiel kamen aus genetischen Untersuchungen in Hefe (Pollard und Peterson, 1997; Roberts und Winston, 1997). In Säugerzellen konnte eine Abhängigkeit zwischen dem SWI/SNF-Komplex und CBP/p300 bei der Stimulation von Estrogen-Rezeptor-responsiven Promotoren gezeigt werden (DiRenzo *et al.*, 2000; Shang *et al.*, 2000). Der Mechanismus, über den beide Aktivitäten sich wechselseitig beeinflussen, kann vielfältig sein. Beispielsweise kann das Aufbrechen der nucleosomalen Struktur durch Chromatin-Remodeling-Komplexe die Zugänglichkeit der N-terminalen Enden für HATs erhöhen. Alternativ kann durch die Modifikation der N-terminalen Enden die Bindung von Chromatin Remodeling-Komplexen an Nucleosomen stabilisiert werden. Für solche Abhängigkeiten gibt es erste Hinweise, verstanden sind sie allerdings noch nicht. Erschwerend kommt hinzu, dass die Funktionsweise von Chromatin Remodeling-Komplexen und kovalenten Modifikationen promotorspezifisch und nicht allgemein gültig ist (Narlikar *et al.*, 2002). Beim Hefe HO Promotor geht die Rekrutierung von Chromatin Remodeling-Komplexen der Rekrutierung von HAT-Komplexen voran (Cosma *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 1999). Am IFN- γ Promotor und bei Retinsäure-induzierter Transkription ist es umgekehrt (Agalioti *et al.*, 2000; Dilworth *et al.*, 2000). Die genaue Abfolge und Funktionsweise scheint von der Natur des Promotors, der Zusammensetzung der anwesenden Transkriptionsfaktoren und der Chromatinstruktur des Promotors abzuhängen (Narlikar *et al.*, 2002).

1.2 Das Proto-Onkogen c-Myc

1.2.1 Funktion, Expression und Struktur von c-Myc

Das *c-myc* Proto-Onkogen wurde als das zelluläre Homologe des transformierenden Onkogens *v-myc* des Vogel-Leukämie-Virus MC29 identifiziert. In Säugerzellen existieren neben *c-myc* noch *N-* und *L-myc* (Kohl *et al.*, 1983; Nau *et al.*, 1985). Die drei Gene ähneln sich in ihrer genomischen Organisation und die entsprechenden Proteine besitzen eine Reihe von Sequenzelementen mit hoher Homologie. Neben den *myc* Genen in Vertebraten wurde unter anderem auch Homologe in dem Seestern *Asterias vulgaris* und *Drosophila melanogaster* gefunden, jedoch nicht in Hefe (Gallant *et al.*, 1996; Henriksson und Luscher, 1996; Schreiber-Agus *et al.*, 1997).

Die Identifizierung des zellulären *c-myc* Gens zeigte, dass es ein Proto-Onkogen ist. Die Expression von c-Myc ist in einer Vielzahl verschiedener Tumoren aufgrund von chromosomalen Translokationen, Genamplifikationen und retroviralen Insertionen fehlreguliert. Dies führt zu einer ständig erhöhten, nicht regulierbaren Expression von *myc*. Chromosomale Translokationen, bei denen das *c-myc* Gen unter die Kontrolle eines der Immunglobulin-Loci gerät, sind charakteristisch für Burkitt-Lymphome. Genamplifikationen von *N-myc* werden häufig bei Neuroblastomen beobachtet, von *L-myc* bei kleinzelligen Lungenkarzinomen (Nesbit *et al.*, 1999).

Diese tumorigenen und proliferierenden Eigenschaften von c-Myc ließen sich in Tier- und Zellkulturmodellen bestätigen. Die zielgerichtete Deletion von *c-myc* oder *N-myc* in Mäusen führt zwischen Tag 9,5 und 10,5 der Embryonalentwicklung zur Letalität. Der Verlust von *L-myc* erzeugt keinen erkennbaren Phänotyp (Grandori *et al.*, 2000). Transgene Mausmodelle, die c-Myc überexprimieren, entwickeln sich normal, bilden aber mit hoher Frequenz Tumore (Henriksson und Luscher, 1996). Mausmodelle, in denen c-Myc konditional in epithelialen oder hämatopoetischen Systemen überexprimiert wird, zeigen, dass c-Myc allein ausreichend ist, um einen prä-malignanten Status zu initiieren oder aufrecht zu halten (Felsher und Bishop, 1999; Pelengaris *et al.*, 1999; Pelengaris *et al.*, 2000).

In zellulären Systemen besteht eine hohe Korrelation zwischen c-Myc Expression und Proliferation. Diese spiegelt sich darin wider, dass c-Myc als eine sehr frühe Gen-Antwort durch die Stimulation mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mitogenen exprimiert wird (Grandori *et al.*, 2000). In ruhenden Zellen ist eine Expression von c-Myc nicht zu detektieren. Nach Serumstimulation wird c-Myc bis zum Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus stark induziert und fällt dann in proliferierenden Zellen auf ein basales Niveau ab. Im Verlaufe der Differenzierung von Zellen geht die Expression von c-Myc stark zurück (Henriksson und Luscher, 1996; Facchini und Penn, 1998; Grandori *et al.*, 2000).

Der Eintritt von ruhenden Zellen in den Zellzyklus wird durch Inhibition der c-Myc Expression blockiert und eine Überexpression von c-Myc in ruhenden Zellen induziert den Eintritt in die S-Phase (Eilers *et al.*, 1989; Eilers *et al.*, 1991; Roussel *et al.*, 1991; Barone und Courtneidge, 1995). Primäre Zellen werden durch c-Myc immortalisiert und zusammen mit anderen kooperierenden Onkogenen wie z.B. aktiviertes Ras transformiert. In proliferierenden Zellen wird durch eine c-Myc Überexpression die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren reduziert, das Verlassen des Zellzyklus blockiert, die Zellteilung beschleunigt und die Zellgröße erhöht (Iritani und Eisenman, 1999; Schuhmacher *et al.*, 1999; Grandori *et al.*, 2000). Darüber hinaus inhibiert überexprimiertes c-Myc die zelluläre Differenzierung in zahlreichen unterschiedlichen Systeme, wie Adipozyten, Muskelzellen und Erythroleukämie-Zellen (Henriksson und Luscher, 1996; Grandori *et al.*, 2000). Wird c-Myc in der Abwesenheit von Überlebensfaktoren überexprimiert, so induziert es Apoptose über den ARF-Mdm2-p53 Signaltransduktionsweg (Zindy *et al.*, 1998; Prendergast, 1999).

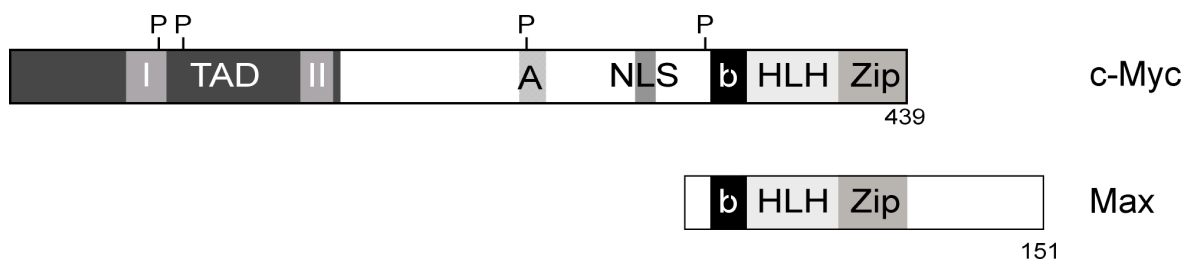


Abb. 1 c-Myc Struktur und der obligatorische Interaktionspartner Max. I: Myc Box I; II: Myc Box II; TAD: Transaktivierungsdomäne; A: saure Domäne; NLS: Kernlokalisierungssignal; BR: basische Region; HLH: Helix-Loop-Helix; LZ: Leucin-Zipper; P: Phosphorylierungsstellen

Lange Zeit war unklar wie c-Myc die oben beschriebenen biologischen Funktionen ausübt. Aufgrund seiner Kernlokalisierung wurden vorgeschlagen, dass c-Myc eine mögliche Rolle bei der Replikation, beim posttranskriptionellen Spleißen oder der Transkription spielt. Seine Funktion als Transkriptionsfaktor wurde wegen der Homologie zu anderen Transkriptionsfaktoren postuliert, die wie c-Myc ein Motiv aus basischer Region, Helix-Loop-Helix- und Leucin-Zipper-Domäne (bHLHZip) besitzen. Die basische Region ist für die spezifische DNA-Bindung notwendig. Über die Helix-Loop-Helix- und Leucin-Zipper-Domäne wird eine Protein-Protein Interaktion vermittelt. Da c-Myc nicht in der Lage ist, Homodimere zu bilden und alleine auch nicht DNA bindet, wurde vermutet, dass c-Myc mit einem weiteren Protein heterodimerisiert und so spezifisch DNA bindet (Blackwell *et al.*, 1990). Auf der Suche nach einem Interaktionspartner wurde Max identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass c-Myc mit Max *in vivo* Heterodimere bildet und spezifisch an sogenannte E-Boxen mit der DNA-Sequenzen 5'-CACGTG bindet (Blackwood und Eisenman, 1991; Prendergast *et al.*, 1991; Lüscher und Larsson, 1999). Für die durch c-Myc vermittelte Transformation, Apoptose und Transaktivierung ist die Interaktion mit

Max essentiell (Amati *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1992; Gu *et al.*, 1993; Amati *et al.*, 1993a; Amati *et al.*, 1993b). Dies spiegelt sich auch in dem letalem Phänotyp von Max *knock-out* Mäusen wider (Shen-Li *et al.*, 2000). Am N-Terminus von c-Myc wurde eine Transaktivierungsdomäne (TAD) gefunden, über die c-Myc als Heterodimer zusammen mit Max die Transkription von Reporterkonstrukten aktivieren kann. Mutationen in der Transaktivierungs- und bHLHZip-Domäne zeigten, dass beide Domänen für die oben beschriebenen biologischen Funktionen von c-Myc notwendig sind (Grandori *et al.*, 2000).

1.2.2 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk

In den letzten Jahren wurden weitere bHLHZip-Proteine identifiziert, die zusammen mit den Myc-Proteinen und Max ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren bilden. Die einzelnen Homo- und Heterodimere üben zum Teil gegenläufige Funktionen auf biologischer und molekularer Ebene aus. Max stand bis vor einiger Zeit als zentraler Dimerisierungspartner im Mittelpunkt des Netzwerkes (Lüscher, 2001).

Da Max im Gegensatz zu c-Myc auch während der Differenzierung und in ruhenden Zellen exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob es weitere Max interagierende Proteine gibt (Henriksson und Luscher, 1996). Dies führte zur Identifizierung der Mad-Proteine, zu denen Mad1, Mxi1, Mad3 und Mad4 zählen (Ayer *et al.*, 1993; Zervos *et al.*, 1993; Hurlin *et al.*, 1995). Sie gehören ebenfalls zur Klasse der bHLHZip-Proteine, bilden keine Homodimere, gehen aber wie c-Myc mit Max Heterodimere ein und binden dann sequenzspezifisch an die selben E-Boxen wie c-Myc. Neben der Sequenzhomologie in der bHLHZip-Domäne besitzen alle Proteine am N-Terminus eine SID-Domäne (Sin3-interaktions Domäne), über die sie mit dem mSin3 Protein interagieren und Histondeacetylase-Komplexe rekrutieren können (Hassig *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1997; Sommer *et al.*, 1997). Über die Rekrutierung von Histondeacetylase sind sie im Gegensatz zu c-Myc/Max-Komplexen in der Lage, Transkription zu reprimieren. Die Repression scheint dabei über die Deacetylierung von Histonen und die Bildung einer unzugänglichen Chromatinstruktur zu erfolgen (Knoepfler und Eisenman, 1999). Den Mad-Proteinen wird eine zu c-Myc antagonistische Funktion zugeschrieben (Henriksson und Luscher, 1996; Grandori *et al.*, 2000). Mad-Proteine werden im Gegensatz zu c-Myc in differenzierenden Zellen exprimiert. Zudem werden Reportergenkonstrukte, die durch Myc aktiviert werden, von Mad-Proteinen reprimiert. Auf biologischer Ebene geht diese reprimierende Funktion mit der Inhibition der Transformation primärer embryonaler Fibroblasten und der Hemmung von Proliferation und Apoptose einher (Henriksson und Luscher, 1996; Grandori *et al.*, 2000).

Neben den Mitgliedern der Myc- und Mad-Familie interagiert Max noch mit zwei weiteren bHLHZip-Proteinen, Mnt und Mga (Hurlin *et al.*, 1997; Hurlin *et al.*, 1999). Mnt besitzt wie die Mad-Proteine eine SID-Domäne, über die es Histondeacetylase-Komplexe rekrutieren kann. Allerdings führt die Deletion der SID-Domäne von Mnt dazu, dass Mnt die Transkription aktivieren kann (Hurlin *et al.*, 1997). Mga besitzt zwei funktionelle DNA-bindende Domänen, eine bHLHZip-Region, die mit Max interagiert und eine Brachyury oder T-Box Domäne.

Das Netzwerk konnte auf Seiten der Mad-Proteine durch die Identifizierung von Mix noch erweitert werden. Mix, ein Max ähnliches Protein, kann mit Mad1, Mad4 und Mnt heterodimerisieren, nicht aber mit anderen Mad-Proteinen, c-Myc oder Max (Billin *et al.*, 1999; Meroni *et al.*, 2000). Durch die Klonierung von MondoA und WBSR14 wurden dem Netzwerk zwei weitere Proteine zugefügt, die beide mit Mix interagieren. Diese üben wahrscheinlich eine transkriptionsaktivierende Funktion aus (Billin *et al.*, 2000; Cairo *et al.*, 2001). Das Gen für WBSR14 liegt in einer häufig deletierten Region, die mit dem Williams-Beuren Syndrom assoziiert ist (Cairo *et al.*, 2001).

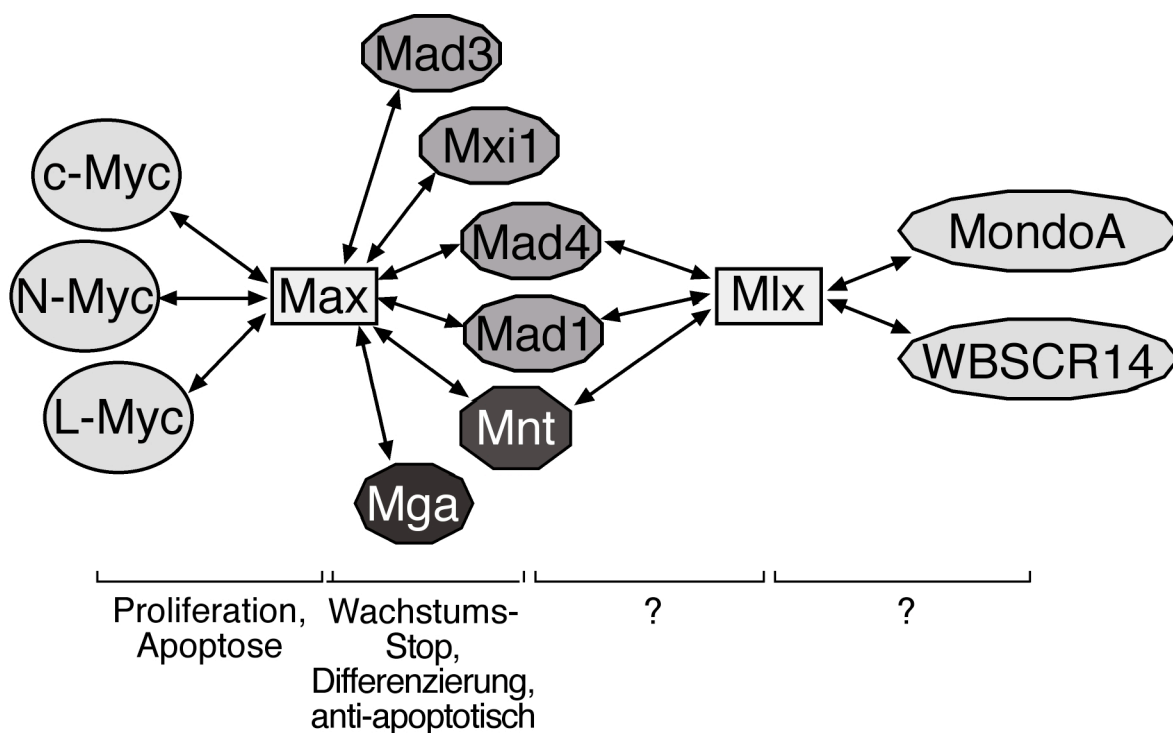


Abb. 2 Myc/Max/Mad-Netzwerk von Transkriptionsfaktoren. Es sind die Komponenten des Myc/Max/Mad-Netzwerkes dargestellt. Pfeile beschreiben die bekannten Interaktionen zwischen den einzelnen Netzwerkmitgliedern. Soweit bekannt sind die unterschiedlichen biologischen Funktionen aufgeführt

1.2.3 c-Myc-Zielgene

Nachdem c-Myc als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde, sollten zur Klärung der biologischen Effekte die c-Myc Zielgene identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass c-Myc die Expression zahlreicher Gene moduliert und so das zelluläre Verhalten reguliert. Dazu gehören Gene, die an der Kontrolle des Zellzyklus, der Protein- und DNA-Biosynthese, des Zellwachstums, der Zelladhäsion, der Apoptose und der Transformation beteiligt sind (Grandori und Eisenman, 1997; Dang, 1999; Grandori *et al.*, 2000). Diese Befunde stützen die Hypothese, dass c-Myc Zellverhalten über die Modulation von Genen reguliert.

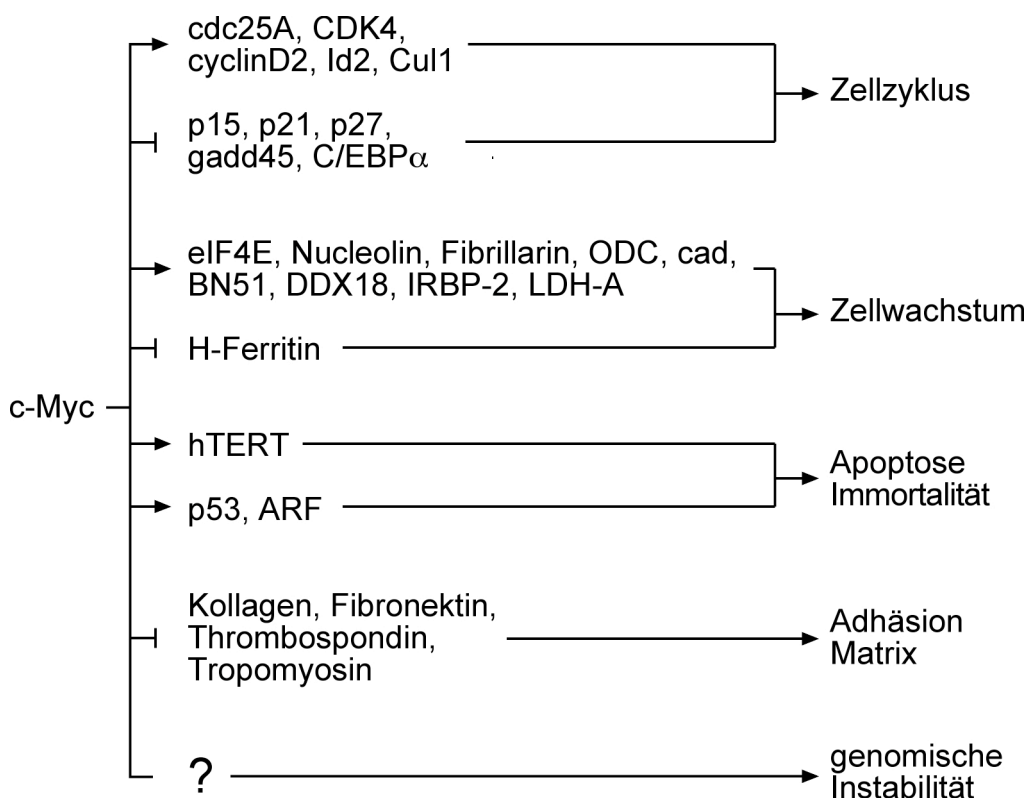


Abb. 3 Biologische Funktion und Zielgene von c-Myc. Es sind die c-Myc Funktionen und Beispiele von Zielgenen dargestellt, die mit dieser Funktion verknüpft sind (nach Grandori *et al.*, 2000).

1.2.4 Transaktivierung durch c-Myc

Die Transaktivierungsdomäne von c-Myc wurde anhand von Experimenten identifiziert, bei denen Fusionsproteine aus der DNA-Bindungsdomäne des Hefe Transkriptionsfaktors Gal4 mit verschiedenen c-Myc-Fragmenten auf ihren aktivierenden Einfluss auf Gal4-Reportergenkonstrukten getestet wurden (Kato *et al.*, 1990). Dabei wurde die Transaktivierungsdomäne in dem Bereich zwischen Aminosäure 1 bis 143 lokalisiert. In diesem Bereich liegen auch die beiden Aminosäureregionen Myc Box I (MB I, AS 45-63)

und Myc Box II (MB II, AS 128-143), die innerhalb der Myc-Familie hochkonserviert und für alle biologischen Funktionen von c-Myc essentiell sind.

Tabelle 1: Einfluss auf die c-Myc Funktion. Zusammenfassung aller bisher beschriebenen c-Myc interagierenden Faktoren mit ihren beschriebenen Effekten auf die c-Myc Funktion und die Position der Interaktionsdomäne im c-Myc Protein. (n.u.: nicht untersucht; MB I, MB II: Myc-Box I und II):

Interagierendes Protein	Transaktivierung	Transformation	Apoptose	Interaktionsdomäne
N-terminal bindend				
□-Tubulin	n.u.	n.u.	n.u.	48-135
AMY-1	+	n.u.	n.u.	68-121
BAF53	n.u.	+	n.u.	MB I, MB II
Bin1	-	-	+	MB I, MB II
MM-1	-	-	n.u.	104-166
p107	-	-	n.u.	41-178
p21CIP1	-	n.u.	n.u.	122-146
Pam	n.u.	n.u.	n.u.	45-107
Sp1	- ^a	n.u.	n.u.	1-250
TBP	n.u.	n.u.	n.u.	MB I, MB II
TIP48/49	n.u.	+	n.u.	118-152
TRRAP	n.u.	+	-	20-48, 129-145
C-terminal bindend				
Max	+	+	+	355-439
AP2	-	n.u.	n.u.	346-439
BRAC1	-	-	n.u.	367-412
CBF/NF-Y	- ^a	n.u.	n.u.	368-439
CBP*	+	n.u.	n.u.	262-439
CDC6	-	n.u.	n.u.	368-439
Cdr2	-	n.u.	n.u.	368-439
hASH2*	+	+	n.u.	262-368
hSnf5/INI1	+	n.u.	n.u.	355-439
Miz-1	- ^a	n.u.	n.u.	370-412
MSSP	-	+	n.u.	338-368
Nmi	n.u.	n.u.	n.u.	315-439
Nucleolin*	+	n.u.	n.u.	262-439
ORC1	-	n.u.	n.u.	369-410
p150*	+	n.u.	n.u.	n.u.
Smad2/Smad3	- ^a	n.u.	n.u.	258-360
TFII-I	-	n.u.	n.u.	371-439
YY1	-	-	n.u.	250-353
p73	- ^a	n.u.	n.u.	n.u.
p400	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

* In dieser Arbeit identifiziert.

^a Die Transaktivierung dieser Transkriptionsfaktoren wird durch die Interaktion mit c-Myc inhibiert.

Für die Stimulation der Transaktivierung durch c-Myc ist neben der Transaktivierungsdomäne auch die basische Domäne und die HLH/Leuzin-Zipper Region notwendig, um als Heterodimer mit Max DNA binden zu können. Dabei ist die Funktion der Transaktivierungsdomäne, die zur direkten oder indirekten Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparates führt, bisher nur ansatzweise verstanden. Es sind eine Reihe von Myc interagierenden Proteinen beschrieben worden (Tabelle 1). Allerdings liefern sie keinen offensichtlichen Mechanismus, wie c-Myc die Transkription aktiviert, da sie

überwiegend einen negativen Einfluss auf c-Myc ausüben oder nur sehr spärliche Informationen über die Funktion bekannt sind (Tabelle 1).

Erst die Identifikation von TRRAP als c-Myc interagierendes Protein und die Untersuchung von Myc-Zielgenen durch Chromatin-Immunoprecipitationsexperimente (ChIP) lieferten erste Erkenntnisse über den Mechanismus der Transaktivierung durch c-Myc. Bei ChIP-Experimenten werden Transkriptionsfaktoren und ihre Koaktivatoren *in vivo* an ihre DNA-Bindungsstellen quervernetzt. Anschließend wird die gebundene DNA mittels der assoziierten Proteine immunpräzipitiert und mit einer Gen-spezifischen PCR analysiert.

TRRAP ist ein Koaktivator, der als eine Art Plattform für die Bildung von Komplexen dient, die an der Genaktivierung und Transkription auf chromosomaler Ebene beteiligt sind (McMahon *et al.*, 1998). TRRAP ist Teil des SAGA- und des NuA4-Histon-Acetyltransferase-Komplexes. Es spielt eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung dieser Komplexe an entsprechenden Promotoren (Vassilev *et al.*, 1998; Ikura *et al.*, 2000). Beide Komplexe enthalten eine Histonacetyltransferase (HAT). Der SAGA-Komplex rekrutiert die Histonacetylase GCN5, der NuA4-Komplex die Histonacetylase Tip60. Welcher der beiden Komplexe von c-Myc rekrutiert wird, ist zur Zeit noch unklar. Es konnte zwar gezeigt werden, dass mit c-Myc HAT-Aktivität und GCN5 ko-immunpräzipitiert werden (McMahon *et al.*, 2000). Andererseits wurden vor kurzem die Proteine Tip48 und Tip49 als c-Myc interagierende Proteine identifiziert, die Teil des NuA4-Komplexes mit der HAT Tip60 sind (McMahon *et al.*, 2000).

TRRAP interagiert mit der Myc Box II der Transaktivierungsdomäne. Dies konnte auch in ChIP-Experimenten bestätigt werden (Bouchard *et al.*, 2001). Dabei zeigte sich, dass c-Myc TRRAP in Abhängigkeit von MB II rekrutiert. Dies führt zu einer Acetylierung von Histonen in Promotoren von c-Myc Zielgenen und zu einer anschließenden Expression dieser Zielgene (Bouchard *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2001).

Ein weiterer Chromatin-modifizierender Komplex, mit dem c-Myc in Verbindung steht, ist der SWI/SNF-Komplex. Es konnte gezeigt werden, dass c-Myc mit dem SNF5-Homologen INI1 mittels seiner bHLHZip-Domäne *in vivo* interagiert und dass dominant negative Formen von INI1 und Brg1 die c-Myc Transaktivierung reprimieren (Cheng *et al.*, 1999). Allerdings ist die Funktion des SWI/SNF-Komplexes als positiver Regulator der c-Myc Funktion nicht unumstritten, da INI1 als Tumorsuppressor eingestuft wird und Brg1 einen Zellzyklusarrest induzieren kann (Versteeg *et al.*, 1998; Kingston und Narlikar, 1999; Peterson und Workman, 2000).

1.2.5 Repression durch c-Myc

Schon seit langem wurde beschrieben, dass eine Überexpression von c-Myc auf bestimmte Promotoren eine reprimierende Funktion ausübt. Dazu gehören Gene, die an der Differenzierung (*mim1*, *C/EBP β* , *MycD*) und dem Zellzyklusarrest (*p15^{INK4b}*, *p21^{CIP1}*, *p27*, *gadd*, *gas1*) beteiligt sind, aber auch für Zelloberflächenproteine (*LFA-1*, β 3 \int 1 *Integrin*) kodieren (Claassen und Hann, 1999). Allerdings gestaltete sich die Identifizierung des Repressionsmechanismus als schwierig. Es war unklar, über welche DNA-Sequenzen c-Myc die Repression vermittelt und ob c-Myc direkt mit diesen Sequenzen interagiert oder indirekt über Proteine, die an diese Sequenzen binden.

Für einige Promotoren konnte gezeigt werden, dass c-Myc über ein Initiator-Element (INR), welches häufig Bestandteil von Promotoren ohne TATA-Box ist, reprimiert. Dabei scheint c-Myc mit INR-bindenden Proteinen zu assoziieren, und die von diesen Proteinen über das INR vermittelte Transaktivierung zu inhibieren. INR-Elemente werden von TFII-D aber auch von regulatorischen Proteinen wie dem Initiatorfaktor TFII-I und den Transkriptionsfaktoren YY1 und Miz-1 erkannt. Die letzten drei Faktoren binden alle an die bHLHZip Domäne von c-Myc (Roy *et al.*, 1993; Shrivastava *et al.*, 1993; Peukert *et al.*, 1997). Für alle drei Faktoren konnte *in vitro* und in transienten Transfektionen gezeigt werden, dass ihre über INR-Elemente vermittelte Transaktivierung durch c-Myc inhibiert wird (Amati *et al.*, 2001). Am besten verstanden ist bisher die von c-Myc ausgeübte Repression durch die Interaktion mit Miz-1.

So konnte gezeigt werden, dass Miz-1 Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert und die Aktivität von Cyclin D assoziierten Kinasen inhibiert. Dabei aktiviert Miz-1 die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors *p15^{INK4b}* durch Bindung an das INR-Element des *INK4b* Promotors. c-Myc bindet Miz-1 am *INK4b* INR-Element und inhibiert die Miz-1 abhängige Transaktivierung, indem es mit Miz-1 um die Bindung an p300/CBP konkurriert (Staller *et al.*, 2001). Andere Gene, wie *gadd45* und der *pdgf \int -Rezeptor*, besitzen kein INR-Element und werden über einen anderen Mechanismus reprimiert.

1.2.6 Regulation von c-Myc-Funktion

In normalen Zellen existieren verschiedene überlappende Kontrollmechanismen zur schnellen und effizienten Regulation der c-Myc Expression und Funktion. Fehlregulierte Kontrollmechanismen sind wesentlich an der Entstehung von Tumoren beteiligt. Diese Mechanismen spielen sich auf unterschiedlichen Ebenen, wie Transkription, RNA-Stabilität und Translation, ab. Auf Proteinebene wird c-Myc durch posttranskriptionelle Modifikationen reguliert.

c-Myc wird an zahlreichen Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Die Phosphorylierungsstellen treten gehäuft auf und lassen sich in drei Regionen einteilen. Die Proteinkinase CK2 phosphoryliert c-Myc in der sauren Domäne und nahe der basischen Region (Lüscher *et al.*, 1989). Über die Regulation und Funktion dieser Phosphorylierungsstellen ist wenig bekannt. Die dritte Phosphorylierungsregion liegt in der Transaktivierungsdomäne am C-Terminus von Myc Box I (Seth *et al.*, 1992; Henriksson *et al.*, 1993; Lutterbach und Hann, 1994; Pulverer *et al.*, 1994). Die Mutation dieser Region tritt bei Patienten mit Burkitt- und AIDS-assoziierten-Lymphomen auf. Die am häufigsten mutierte Aminosäure ist Threonin-58, eine Mutation, die auch in drei *v-myc* Genen vorkommt (Bhatia *et al.*, 1993; Yano *et al.*, 1993; Albert *et al.*, 1994; Bhatia *et al.*, 1994; Axelson *et al.*, 1995).

Threonin-58 ist eine *in vivo* Phosphorylierungsstelle und kann *in vitro* von der Glykogensynthasekinase 3 (GSK3) phosphoryliert werden (Henriksson *et al.*, 1993; Sears *et al.*, 2000). Threonin-58 wird erst phosphoryliert, wenn zuvor Serin-62 durch MAP-Kinasen oder Cyclin-abhängigen Kinasen phosphoryliert wurde (Sears *et al.*, 2000). Die Funktion der Phosphorylierung von Threonin-58 und Serin-62 und die Inhibition der Threonin-58-Phosphorylierung durch Mutation in Tumoren war lange unklar. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäurereste für die Stabilität von c-Myc verantwortlich sind (Salghetti *et al.*, 1999; Bahram *et al.*, 2000; Gregory und Hann, 2000). c-Myc wird durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse degradiert. Wichtige Zielsequenzen für den Abbau von c-Myc liegen in Myc Box I und II der Transaktivierungsdomäne (Lüscher *et al.*, 2001). Für Mutationen von und um Threonin-58 und Serin-62 in Burkitt-Lymphomen konnte gezeigt werden, dass sie c-Myc stabilisieren (Salghetti *et al.*, 1999; Bahram *et al.*, 2000; Gregory und Hann, 2000). Übereinstimmend damit ist die Stabilisierung von c-Myc durch den Ras-Signaltransduktionsweg (Sears *et al.*, 1999; Sears *et al.*, 2000). Dieser induziert die Phosphorylierung an Serin-62 und inhibiert gleichzeitig die Phosphorylierung an Threonin-58 (Sears *et al.*, 2000).

1.3 Zielsetzung

Die biologischen Effekte von c-Myc können klar umrissen werden. Dazu gehört die Stimulation der Proliferation, die Induktion von Apoptose und die Inhibition von Differenzierung. Kommt es zu einer Fehlregulation der c-Myc Expression, so ist c-Myc wesentlich an der Entstehung von Krebs beteiligt. Trotz der gut charakterisierten biologischen Effekte sind auf molekularer Ebene die transkriptionellen Regulationsmechanismen von c-Myc nur ansatzweise verstanden.

So ist unumstritten, dass c-Myc ein Transkriptionsfaktor ist, der als Heterodimer mit Max sequenzspezifisch DNA bindet und über seine Transaktivierungsdomäne Reportergenkonstrukte aktivieren kann. Allerdings ist c-Myc nur ein sehr schwacher

Transaktivator, wodurch die Validierung von potentiellen c-Myc Zielgenen und eine detaillierte Analyse der transkriptionellen Aktivierungsmechanismen schwierig ist. Trotz des geringen Aktivierungspotentials wurde eine Vielzahl von Zielgenen beschrieben. Dabei übt nur ein kleiner Teil dieser Zielgene die erwarteten Funktionen im Zellzyklus aus, durch die sich die proliferierenden und onkogenen Eigenschaften von c-Myc erklären lassen. Der überwiegende Teil der Zielgene ist an unterschiedlichsten zellulären Funktionen wie Metabolismus, Ribosomenbiogenese und Translation beteiligt. Für die c-Myc Funktion ist die Bedeutung und Notwendigkeit einzelner Zielgene noch nicht klärbar. Grund hierfür ist die schwache Transaktivierung durch c-Myc und die Vielzahl an Zielgenen. Daher ist es zunächst wichtig, den Mechanismus der c-Myc vermittelten Genregulation aufzuklären. Die Identifizierung von Faktoren, über die c-Myc die Expression seiner Zielgene reguliert, ist hierzu notwendig. Im Wesentlichen fehlen Faktoren, die als sogenannte Ko-Aktivatoren Einfluss auf die basale Transkriptionsmaschinerie oder die Chromatinstruktur nehmen, zumal diese für die Gegenspieler von c-Myc, den Mad-Proteinen, beschrieben wurde.

Ziel meiner Arbeit war infolgedessen die Identifizierung neuer c-Myc bindender Faktoren. Dazu wurden mittels eines proteinbiochemischen Ansatzes c-Myc bindende Faktoren affinitätschromatographisch mit einem c-Myc-spezifischen Antikörper aus Zelllysaten aufgereinigt. Nach der Identifikation neuer c-Myc interagierender Faktoren sollten die Bindung *in vivo* bestätigt und die Interaktionsdomänen kartiert werden. Darüberhinaus sollte die Funktionalität der Interaktionen zwischen den identifizierten Faktoren und c-Myc untersucht werden. Dabei stand der Einfluss dieser Faktoren auf die c-Myc abhängige Transkriptionsregulation im Mittelpunkt. Um den Einfluss der identifizierten Faktoren auf die onkogenen Eigenschaften von c-Myc untersuchen zu können, sollte Transformationsexperimente in primären embryonalen Rattenfibroblasten etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden von den Firmen Amersham, Amicon, AppliChem, Baker, Biomol, BioRad, Boehringer, Difco, Du Pont, Eurogentech, Falkon, Fluka, Gibco BRL, ICN, Invitrogene, Merck, New England Biolabs, Promega, Riedel-deHaen, Roth, Santa Cruz, Seromed, Serva, Sigma und Stratagene verwendet. Verbrauchsmaterialien stammen von den Firmen Amersham, Beckman, Biozym, Costar, Eppendorf, Falcon, Fuji, Gilson, Greiner, Kodak, Macherey-Nagel, Pharmacia, Qiagen, Sarstedt, Schleicher&Schuell und Whatman.

2.1.1 Vektoren

2.1.1.1 Klonierungsvektoren

pT7T3-ASH2: Der Vektor wurde beim RZPD in Berlin bestellt und beinhaltet den EST-Klon N32725, der die Basenpaare 257 bis 2361 der hASH2 cDNA umfaßt. Um ein vollständiges cDNA Konstrukt von hASH2 zu erhalten, wurden über die Restriktionsschnittstellen BspE I und EcoR I die fehlenden 257 bp eingesetzt. Die fehlenden Basenpaare stammen aus dem EST-Klon AA378721, der bei ATCC bestellt wurde.

2.1.1.2 Eukaryontische Expressionsvektoren

pCB6⁺ (Brewer, 1994): Die Bgl II, EcoR I, Kpn I, Not I, Cla I, EcoR V, Hind III, Xba I und BamH I Schnittstellen liegen zwischen einem CMV-IE-Promotor und einer Terminationssequenz vom humanen Wachstumshormon (hGH). Der Vektor kodiert für Resistenzen gegen Neomycin und Ampicillin, hat einen SV40-Replikationsursprung und einen bakteriellen Replikationsursprung von pBR322.

pCB6⁺-hASH2-HA: In pT7T3-hASH2 wurde am C-Terminus der hASH2 cDNA in die Nco I und Not I Schnittstellen ein Oligonukleotid, das für ein Hämagglutinin-Epitop kodiert, eingeführt (pT7T3-hASH2-HA). Anschließend wurde ein EcoR I/Not I Fragment aus pT7T3-hASH2-HA in die EcoR I/Not I Schnittstellen von pCB6⁺ kloniert.

pcDNA3: pcDNA3 ist ein Eukaryotisches Expressionsplasmid unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Der Vektor kodiert für Resistenzen gegen Neomycin und Ampicillin, hat einen SV40-Replikationsursprung und einen bakteriellen Replikationsursprung von pBR322. Für *in vitro* Translationen besitzt der Vektor am 5'-Ende der Multiple Cloning Site ein T7-Promotor (Invitrogene). In einer zweiten Variante kodiert der Vektor für N-terminale Flag-Epitop getaggte Proteine.

pcDNA3-Flag-hASH2: Ein EcoR I/Not I Fragment aus pT7T3-hASH2 wurde in die EcoR I/Not I Schnittstellen von pcDNA3-Flag kloniert. Um in das Leseraster der Sequenz für das Flag-Epitop zu gelangen, wurde nach nochmaligem Schneiden mit EcoR I und Auffüllen mit dem Klenow-Fragment der Vektor wieder religiert (S. Schreck).

pcDNA3-CBP-HA: Ein Hind III/BamH I Fragment aus pRSV-CBP-HA mit der murinen cDNA für CBP wurde in pcDNA3 kloniert (Ralf Janknecht).

pcDNA3-CBP-HAT: Ein BsrG I/Sca I Fragment wurde aus pcDNA3-Gal4-CBP-HAT (Martinez-Balbas *et al.*, 1998) in die BsrG I/Sca I Schnittstellen der CBP cDNA in pcDNA3-CBP-HA kloniert.

pcDNA3-Flag-c-Myc: Ein BamH I/Bgl II Fragment aus BJ-Myc3-wt (B. Amati) wurde in die BamH I Schnittstelle von pcDNA3-Flag kloniert. Um die Mutanten MB I und MB II zu erzeugen, wurden die entsprechenden Regionen in pcDNA3-Flag-Myc mit Fragmenten aus pSGMyc1 und 4 (M. Eilers) ersetzt (M. Austen).

pCGN-c-Myc (Salghetti *et al.*, 1999): Die Aminosäuren 2 bis 439 der humane c-Myc cDNA wurde PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Xba I und BamH I in pCGN kloniert. pCGN ist ein auf dem CMV-Promotor basierendes Expressionsplasmid, das HA-Epitop getaggte Fusionsproteine erzeugt. Das Plasmid wurde von W. P. Tansey zur Verfügung gestellt.

pCGN-c-Myc A, C, D, I: Aus den entsprechenden pSP-Myc Mutanten (Henriksson *et al.*, 1993) wurde ein EcoR V/Cla I Fragment in pCGN-c-Myc kloniert. Dem Buchstabenkode sind folgende Mutationen zuzuordnen A T58S/S62A/S64A, C T58A, D S62A, I T58A/S62A.

pCi-neo-dMyc: Der Vektor kodiert für die Myc cDNA aus *Drosophila*. Am N-Terminus befindet sich ein 9E10 Epitop-Tag (P. Gallant).

pCi-neo-Nucleolin: Der Vektor kodiert für die humane Nucleolin cDNA. Am N-Terminus befindet sich ein Hämagglutinin-Epitop-Tag (H. Rotheneder).

pEV-HA-RF0, 1, 2 (Matthias *et al.*, 1989): Mit den pEV-HA Vektoren können HA-Epitop getagte cDNAs in eukaryotischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert werden. Das HA-Epitop ist in den drei möglichen Leserastern zu den Restriktionschnittstellen Kpn I, Sma I und Xba I angeordnet. Ansonsten besitzen die drei Vektoren einen SV40 *origin of replication* und beruhen auf dem bakteriellen Plasmidsequenz von pSP65.

pEV-HA-Nucleolin: Ein EcoR I/Bgl II Fragment aus pGAD-Nuc1 (P. Bouvet) mit der murinen Nucleolin cDNA wurde in die Xba I/Sma I Schnittstellen von pEV-HA-RF0 kloniert.

pEQ176 (Firzlaff *et al.*, 1991): pEQ176 wurde zur Standardisierung der transienten Transfektion benutzt. Der frühe (*immediate early*) Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor exprimiert konstitutiv die β -Galactosidase in eukaryontischen Zellen. Außerdem trägt der Vektor Replikationsursprungssequenzen (*origin of replication*) für bakterielle (von pBR322) und eukaryontische Zellen (von SV40) und kodiert für Ampizillinresistenz.

pEQ176P2 (Firzlaff *et al.*, 1991): Durch Restriktionsverdau von pEQ176 mit Pvu II und Religation des verbliebenen Vektors wurde ein Großteil der β -Galactosidase-cDNA entfernt.

pEQ176P2-hASH2: Ein EcoRI/BamHI Fragment aus pCB6⁺-hASH2 wurde in die HindIII/BglII Schnittstellen von pEQ176P2 kloniert.

pCMV-c-Myb (Oelgeschläger *et al.*, 1995): cDNA des humanen c-Myb Gens in pEQ176P2.

pCMV-c-Myc: Humanes *c-myc* wurde *blunt-end* in die Hind III-Schnittstelle von pEQ176P2 (Firzlaff *et al.*, 1991) kloniert (M. Henriksson).

pSP-Max-p22: pSP ist ein auf pBS (Stratagene) basierender eukaryontischer Expressionsvektor mit dem SV40-early-Promotor. Humanes *max9*, das für MAX p22 kodiert, wurde als EcoRI/BamHI Fragment in die EcoR I/BamH I-Schnittstellen von pSP eingefügt (Bousset *et al.*, 1993).

pSP-Myc: Ein EcoR I Fragment mit der c-Myc cDNA aus pSP65 wurde in die EcoR I Schnittstelle von pSP kloniert (M. Henriksson).

pSV-flag-VP16 (Mori *et al.*, 1998): Der Vektor kodiert für die Flag Epitop-getaggte Transaktivierungsdomäne von VP16 unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Zwischen dem Flag-Epitop und der VP16 Transaktivierungsdomäne befinden sich die Schnittstellen EcoR I, Sma I, BamH I, Sal I und Xho I zum Herstellen von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen Flag-Tag und einem C-terminalen VP16-Tag.

pSV-flag-c-Myc-VP16 (Mori *et al.*, 1998): Eine über PCR amplifizierte humane c-Myc cDNA wurde über die EcoR I/Xho I Schnittstellen in pSV-flag-VP16 eingefügt.

pGal0: pGal0 ist eine durch einen verbesserten Polylinker modifizierte Version von pSG242 (Sadowski und Ptashne, 1989) und wurde im Labor von C. Dang konstruiert. GM1-262 exprimiert ein Fusionsprotein bestehend aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne (1-147) und Aminosäure 1 bis 262 des humanen c-Myc.

pVR1012Gal4 (Snowden *et al.*, 2000): Ein Hind III/BamH I Fragment, das die Gal4-DNA-Bindungsdomäne aus pSG424 enthält, wurde in den Polylinker von pVR1012 kloniert. pVR1012 ist ein auf dem CMV-Promotor basierendes Expressionsplasmid und kodiert für eine Kanamycinresistenz. Das Plasmid wurde von N. D. Perkins zur Verfügung gestellt.

pVR1012Gal4-CBP (Snowden *et al.*, 2000): Die Maus CBP cDNA wurde als BamH I Fragment aus pRSV-HA-CBP in die BamH I Schnittstelle von pVR1012Gal4 eingefügt.

pVR1012Gal4-CBP 1-1099, 1099-2441 (Snowden *et al.*, 2000): Gal4-CBP 1-1099 wurde aus einem Xba I Fragment aus Gal4-CBP (*full length*) kloniert. Gal4-CBP 1099-2441 wurde durch Religation nach Restriktionsverdau von Gal4-CBP (*full length*) mit Xba I erzeugt. Beide Plasmide wurde von N. D. Perkins zur Verfügung gestellt.

pVR1012Gal4-CBP Δ HAT: Ein BamH I Fragment aus pcDNA3-CBP Δ HAT wurde in die BamH I Schnittstelle von pVR1012Gal4 kloniert.

pVR1012Gal4-p300 (Snowden *et al.*, 2000): Ein Sal I, Not I, Fragment aus pBluescript-p300 wurde in pVR1012Gal4 kloniert. Das Plasmid wurde von N. D. Perkins zur Verfügung gestellt.

2.1.1.3 Reportervektoren

(Gal4)₄-tk-luc (Janknecht *et al.*, 1993): Dieser Vektor enthält vier Kopien der Gal4-DNA-Bindungsdomäne vor dem minimalen TK-Promotor.

XP-2 (Nordeen, 1988): Er trägt die cDNA des Luziferasegens von *Photinus pyralis* (Leuchtkäfer). Direkt an deren 5'-Ende befinden sich Restriktionsschnittstellen für 5'-BamH I, Hind III, Sma I, Kpn I, Sac I, , Xho I und Bgl II-3'. Außerdem kodiert XP-2 für eine Ampicillinresistenz und einen SV40-Replikationsursprung.

mim-1-luc (Oelgeschläger *et al.*, 1995): Ein Hind III, Xho I Fragmentes des mim-1 Promotors (-242 bis +150) (Ness *et al.*, 1989) wurde in die Hind III/Xho I Schnittstellen von XP-2 kloniert.

mintkluc (Henriksson *et al.*, 1993): Hergestellt durch Einsetzen eines minimalen TK-Promotors (-32 bis +53) in XP-2luc.

M4mintkluc (Henriksson *et al.*, 1993): Dieser Vektor enthält vier Kopien eines Oligonukleotids mit einer Myc/Max Konsensusbindungsstelle (CMD, Blackwell *et al.*, 1993) vor dem minimalen TK-Promotor.

2.1.1.4 Bakterielle Expressionsvektoren

pGEX-2T, pGEX-3T, pGEX-2TK, pGEX-4T: Die Vektoren kodieren für Glutathion-S-Transferase (GST) gefolgt von Restriktionsschnittstellen zum Einfügen von cDNAs. Die Expression der Fusionsproteine kann mittels des synthetischen *lac*-Promotors mit IPTG induziert werden.

GST-hASH2: Ein EcoR I/Not I Fragment wurde aus pT7T3-hASH2 in pGEX-4T3 kloniert (S. Schreek).

GST-CBP: Die cDNA-Fragmente von CBP wurden ebenfalls in das Leseraster der GST-cDNA pGEX-Vektoren kloniert. Die Expressionsvektoren wurden von R. Janknecht zur Verfügung gestellt.

GST-Max p22: Ein BamH I/EcoR I Fragment aus pbluescript-Max p22 wurde in pGEX-3X kloniert.

GST-Myc-N262, -C176: pGEX-2T-Myc1-262 und pGEX-2T-Myc262-439 stammen aus dem Labor von R. Eisenmann.

pMal-Pre (Kitaura *et al.*, 2000): Der Vektor kodiert für das Maltose-bindende Protein (MBP) gefolgt von Restriktionsschnittstellen zum Einfügen von cDNAs. Die Expression der Fusionsproteine kann mittels des synthetischen *lac*-Promotors mit IPTG induziert werden. In pMal-Pre wurde die Faktor Xa Schnittstelle durch die Schnittstelle der PreScission Protease ersetzt.

pMal-Pre-c-Myc (Kitaura *et al.*, 2000): Die c-Myc cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Sal I in pMal-Pre kloniert.

2.1.2 Antikörper

[-acetyl-Lysin: Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen ein synthetisches acetyliertes Lysinpeptid (New England Biolabs, #9941)

[-hASH2 (4B5, 4C5): Monoklonale Ratten Antikörper gegen GST-hASH (E. Kremmer).

[-hASH2 (547, 548): Polyklonale Kaninchenserum gegen GST-hASH2. Vom Serum 548 wurden die Blutabnahmen 2, 3 und 4 vereinigt und nach Ammoniumsulfatfällung affinitätsgereinigt.

[-CBP (AC-238): Maus monoklonaler IgG₁ Antikörper gegen aufgereinigtes rekombinantes CBP (NeoMarker).

[-CBP (C-20): Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen ein C-terminales Peptid aus humanem CBP.

[-Flag (M2): Maus monoklonaler IgG₁ Antikörper gegen das synthetische Flag Peptid (Sigma).

[-GAL4: Maus monoklonaler IgG₂ Antikörper gegen die Aminosäuren 94-147 der Gal4 DNA-bindenden Domäne (St. Cruz).

[-HA (3F10): Monoklonaler Ratten Antikörper, erkennt die Aminosäuren 98-108 in Hämagglutinin des Influenzavirus (E. Kremmer).

□-HA (Y-11): Affinitätschromatographisch gereinigtes polyklonales Kaninchenserum, das die Aminosäuren 98-108 in Hämagglutinin des Influenzavirus erkennt.

□-Mad1 (5C9): Monoklonaler Rattenantikörper (E. Kremmer, B. Lüscher) reaktiv gegen humanes Mad1. Er wurde erzeugt durch Immunisierung von Wistar-Ratten mit bakteriell exprimiertem His-Mad1-Fusionsprotein. 5C9 erkennt den N-Terminus von Mad1.

□-Max (C-17): Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum (Santa Cruz) gegen ein synthetisches Peptid der C-terminalen 19 Aminosäuren 135-151 von humanem Max p21.

□-Myc (1236): Polyklonales Serum gegen c-Myc (K. Moelling).

□-c-Myc (3H2 , 4H3, 6A10): Monoklonale Ratten Antikörper (E. Kremmer, B. Lüscher) gegen den N-Terminus von humanem c-Myc. Der Antikörper 4H3 erkennt ein Epitop im Bereich von Aminosäure 55-92, der Antikörper 6A10 hingegen ein Epitop von Aminosäure 7-38. Beide haben die Subklasse IgG2a.

□-c-Myc (9E10): Monoklonaler Antikörper gegen die 31 C-terminalen Aminosäuren 408-439 im HLH-Bereich von humanem c-Myc. (Evan *et al.*, 1985)

□-c-Myc (IG13): Polyklonales Kaninchenserum gegen bakteriell exprimiertes c-Myc Protein (L.-G. Larsson)

□-c-Myc (N-262): Affinitätsgereinigtes Kaninchenserum (Santa Cruz) gegen die Aminosäuren 1-262 von humanem c-Myc.

□-Myc (O22Y): Polyklonales Serum gegen c-Myc (K. Alitalo).

□-Nucleolin (MS-3): Monoklonaler Maus IgG₁ Antikörper gegen das humane Nucleolin (St. Cruz). Kreuzreagiert auch mit Nucleolin aus Maus und Ratte.

□-Nucleolin (134): Polyklonales Kaninchenserum gegen humanes Nucleolin. (P. Bouvet,)

2.2 Zellkultur

2.2.1 Allgemeine Materialien für Zellkultur

DMEM (Gibco)

mit 4,5 g/l Glucose

MEM (Gibco)	mit 4,5 g/l Glucose
RPMI 1640 (Gibco)	
PBS	140 mM NaCl 2,6 mM KCl 2 mM Na ₂ HPO ₄ 1,45 mM KH ₂ PO ₄
Penicillin/Streptomycin (Seromed)	10.000 Einheiten/10.000 µg/ml
Trypsin/EDTA (Seromed)	0,5/0,02% (w/v) in PBS
FCS (Gibco)	fötales Kälberserum
HS (Gibco)	Pferdeserum
Pyruvat	
Gewebekulturschalen (Falcon)	Durchmesser 6, 10 cm
Gewebekulturflaschen (Falcon)	Volumen 100, 250, 1000 ml
1 ml Einfriergefäße (Nalgene)	

2.2.2 Eukaryontische Zellen

<u>293:</u>	Mit Adenovirus Type 5 (Ad 5) DNA transformierte embryonale Nieren Zelllinie (ATCC CRL-1573).
<u>COS-7:</u>	Nierenfibroblasten, die aus der Niere der Grünen Meerkatze isoliert und mit SV40 transformiert wurde (ATCC CRL-1651)
<u>HL60:</u>	Humane promyelozytäre Leukämie-Zelllinie (ATCC CCL-240).
<u>Jurkat:</u>	humane T-Zell Leukämie Zelllinie(ATCC ACC-282)
<u>MCF7:</u>	humane Adenokarzinom aus der Milchdrüse (ATCC HTB-22)
<u>REF:</u>	primäre Rattenfibroblasten, präpariert aus Tag 14,5 alten Embryonen von Fischer Ratten
<u>U-2 OS:</u>	Osteosarkoma Zelllinie (ATCC HTB-96).
<u>Saos-2:</u>	Osteosarkom Zelllinie (ATCC HTB-85)

2.2.3 Kulturbedingungen

Alle Zellkulturmedien enthalten 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin.

COS-7, MCF, U-2 OS, Saos-2, REF: DMEM mit 10% (v/v) FCS

293	DMEM/NutMix F12 (1:1) mit 1% (v/v) Pyruvat, 10% (v/v) FCS
HL-60, Jurkat,	RPMI 1640 mit 10% (v/v) FCS

2.2.4 Kryokonservierung

Zum Einfrieren wurden Zellen in 1 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen, in ein Einfriergefäß überführt und in Zellstoff eingewickelt bei -80°C über Nacht langsam abgekühlt. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen für 10 min in einem 37°C -Wasserbad inkubiert, mit 10 ml Medium gewaschen und in die entsprechenden Gefäße mit frischem Medium überführt.

2.2.5 Isolation primärer Rattenfibroblasten

Trächtige Fischer-Ratten wurden am Tag 13,5 oder 14,5 der Schwangerschaft getötet, die Embryonen isoliert und in PBS gewaschen. Nach Abtrennung des Kopfes wurden die blutbildenden Organe entfernt und der Rest des Torsos mit Hilfe von Skalpell zerkleinert. Das Gewebe wurde einmal mit PBS gewaschen und Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA dispergiert. Nach zehnmütiger Inkubation bei 37°C wurde der die Zellen enthaltende Überstand zu einem gleichen Volumen DMEM + 10% FCS gegeben. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in Medium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl zu $2,5 \times 10^6$ Zellen auf 10 cm Gewebekulturschalen ausplattiert. Nach Ausbildung einer konfluenten Einzelzellschicht wurden die Fibroblasten in Aliquots zu 5×10^6 Zellen eingefroren.

2.2.6 In vivo-Markierung mit [^{35}S]-Methionin

Methionin/Cystein-freies DMEM (Gibco) supplementiert mit 2% dialysiertem FCS
[^{35}S]-Methionin/Cystein (Translabel, ICN)

Die Zellen wurden 15 min in Methionin-freiem Medium vorinkubiert (37°C , 5% CO_2), das Medium wurde entfernt und durch 3 ml Methionin-freiem Medium mit [^{35}S]-Methionin ersetzt. Die Zellen wurden mit 250 μCi [^{35}S]-Methionin pro Platte für 20-45 min markiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit kaltem DMEM und einmal mit kaltem PBS gewaschen und in 300 μl des Frackelton- oder AB-Puffers aufgeschlossen. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und Zelltrümmer, ggf. nach Sonifizieren, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 15000 upm, 4°C , 20 min in einer

Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend für weitere Analysen verwendet.

2.2.7 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion adhärenter Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode (Chen und Okayama, 1988; Bousset *et al.*, 1994). Dabei kopräzipitiert die DNA in einem Komplex mit Calciumphosphat und wird von den Zellen vermutlich über Endozytose aufgenommen und im Zellkern extrachromosomal transkribiert. Die Effizienz der hier durchgeführten Transfektion ist abhängig vom Zelltyp mit etwa 5-10% einzuschätzen.

2 × Hebs-Puffer	274 mM NaCl
	42 mM HEPES
	9,6 mM KCl
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄
	pH 7,1

HEPES-Puffer	142 mM NaCl
	10 mM HEPES
	6,7 mM KCl
	pH 7,3

250 mM CaCl₂

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ pro 6 cm bzw. 8×10^5 pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gegen MEM mit 10% HS und 1% (w/v) Penicillin/Steptomycin gewechselt. Zur Transfektion der REFs wurde DMEM statt MEM verwendet. Die DNA für 6 cm Schalen wurde in 200 µl (500 µl für 10 cm Schalen) 2x Hebs-Puffer aufgenommen. Unmittelbar vor der Transfektion wurde 200 µl (500 µl) CaCl₂ tropfenweise innerhalb 10-15 sec zugegeben, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und direkt tröpfchenweise in das Kulturmedium gegeben. Die Schalen wurden kurz geschwenkt und sofort in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt. Nach 4-6 Stunden wurden die Zellen zweimal mit 4 ml (10 ml) HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 4 ml (10 ml) frisches Kulturmedium zugesetzt. REFs wurden über Nacht transfektiert.

2.2.8 Reinigung von Baculovirus HIS-CBP

H-Puffer	10 mM Tris pH 8,0
	0,5 M NaCl
	15 mM Imidazol
	0,1% NP-40
	10% Glycerin
	2 mM β -Mercaptoethanol
	1 mM PMSF
	2,5 U/ml Leupeptin
	2,5 U/ml Pepstatin

Talon-Agarose (Clontech)

Die Sf2-Zellen wurden 72 h nach der Infektion in 5 Volumen H-Puffer pro Gram Zellen geerntet und mit einem Dounce Homogenisator aufgeschlossen (12x). Anschließend wurden die Zelltrümmer für 10 min bei 10.000x g abzentrifugiert und der Überstand mit Talon-Agarose bei 4°C inkubiert. Nach 1 h wurde die Talon-Agarose dreimal für 5 min mit dem 20fachen Volumen W-Puffer (H-Puffer mit 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol) gewaschen. Die Talon-Agarose wurde in eine Chromatographiesäule überführt, das gebundene HIS-CBP wurde mit E-Puffer (H-Puffer mit 250 mM Imidazol und 0,2 M NaCl) eluiert und die gesammelten Fraktionen im Westernblot und HAT-Assay untersucht.

2.3 Arbeiten mit prokaryontischen Zellen

2.3.1 Kulturmedien

Agar-Platten	LB-Medium
	1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco)
	100 μ g/ml Ampicillin
LB-Medium	1% (w/v) Trypton (AppliChem)
	0,5% (w/v) Hefeextrakt (AppliChem)
	1% (w/v) NaCl
	pH 7,0
TB-Medium	1,2% (w/v) Trypton (AppliChem)
	2,4% (w/v) Hefeextrakt (AppliChem)

0,4% (w/v) Glycerin
17 mM KH₂PO₄

2.3.2 Bakterienstämme

HB101:

F⁻, thi-1, hsdS20 (r_B⁻, m_B⁻), supE44, ara-14, galK2, lacY1, ProA2, rpsL20(Str^r), xyl-5, mtl-1, recA13, leuBC, mcrB

XL10 gold:

Tet^r (mcrA)183, (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44 thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F'proAB lacI^qZ' M15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a

BL21(DE)pLysS:

F⁻, ompT, hsdS_B, (r_B⁻, m_B⁻), dcm, gal(DE3), pLysS(Cm^r)

2.3.3 Transformation

In einem 10 ml *snap cap* wurden 50 µl frisch aufgetaute transformationskompetente Bakterien mit 1 µl DNA für 20 min auf Eis inkubiert, diese anschließend für 47 sec bei 42°C hitzebehandelt und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium und Inkubation von 1 h bei 37°C auf einem Rotationsgerät, wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf Amp-LB-Agar-Platten (bzw. Tet-LB-Agar-Platten) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.4 Isolation von Plasmid-DNA

Lösung 1	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA
Lösung 2	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat, pH 4,8
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,4

1mM EDTA

Quick seal-Röhrchen

13 x 51 mm (Beckman)

In kleinem Maßstab:

Die Bakterienkultur in LB-Ampicillin-Medium (3 ml) wurde sedimentiert, in 100 µl Lösung 1 resuspendiert, durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert und nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 5 min bei 15000 upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand mit 900 µl 100% Ethanol gefällt. Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in TE aufgenommen.

Im mittleren Maßstab:

Plasmide aus 50-200 ml Bakterienkultur in LB-Medium wurden über Nucleobond AX-500-Säulen von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

In großem Maßstab (für Transfektionen):

Es wurden 200 ml TB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C für 12 - 18 h inkubiert. Nach Sedimentation der Bakterienkultur bei 4000 x g und 4°C für 20 min wurde diese in 12 ml Lösung 1 vorsichtig resuspendiert, durch Zugabe von 24 ml Lösung 2 lysiert und nach Zugabe von 18 ml Lösung 3 für 5 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 4000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 40 ml Isopropanol gefällt und das Pellet nach Zentrifugation in 10 ml TE aufgenommen. Nach Zugabe von 2 ml 10 M Ammoniumacetat wurde diese Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals mit 32 ml Ethanol gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml TE gelöst und mit 4,71 g CsCl und 200 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Danach wurde die Lösung in ein *Quick-seal* Röhrchen (Beckman) überführt, dieses wurde zugeschweißt und über Nacht bei 50.000 rpm und 22°C zentrifugiert (Beckman L860 M Ultrazentrifuge, VTI-65.2 Rotor).

Am nächsten Tag wurde die untere Plasmidbande unter UV-Licht aus dem *Quick-seal* Röhrchen isoliert. Dazu wurde eine Kanüle (0,9 x 40 mm) vorsichtig in das obere Ende des Röhrchens eingestochen, so dass die Plasmidbande nicht gestört wurde. Mit einer zweiten Kanüle auf einer 2 ml Spritze wurde nun einen halben Zentimeter unter der Plasmidbande eingestochen und diese dann vorsichtig abgezogen. Die so gewonnene DNA wurde in ein neues *Quick-seal* Röhrchen überführt. Dieses wurde mit einer CsCl-Lösung (0,85 g/ml) aufgefüllt, zugeschweißt und bei 56.000 rpm für mindestens 5 h wie beim ersten Gradienten zentrifugiert. Nach Isolation der Plasmid-DNA wurde das Ethidiumbromid durch Extraktion mit Isopropanol (gesättigt mit NaCl) bis zur Farblosigkeit der Plasmidlösung entfernt. Anschließend wurde noch zweimal extrahiert. Die DNA wurde dann für mindestens 1 h mit 100% Ethanol bei -20°C gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt.

Dabei entspricht 1 OD bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml. Der Quotient aus der OD bei 260 nm sollte bei 1,8 liegen.

2.3.5 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Puffer A	50 mM Tris-HCL, pH 8.0
	100 mM NaCl
	0,5% (v/v) Nonidet P-40
	5 mM EDTA
	10 mM DTT
	0,2 mM PMSF

Glutathion-Agarose (Sigma)

BL21-Bakterien wurden zunächst mit dem gewünschten pGEX-Konstrukt transformiert. Am nächsten Tag wurde eine 50 ml LB/Amicillin-Kultur mit 3-5 Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:10 in ein gewünschtes Volumen LB/Ampicillin verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 inkubiert. Schließlich wurde die Kultur für 3- 16 h mit 0,4 mM IPTG induziert, sedimentiert und in Puffer A durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Zelltrümmer werden sedimentiert (20 min bei 4°C/15000 upm/JA21-Rotor) und der Überstand für 30 min bei 4°C mit Glutathion-Agarose (Sigma), die zuvor durch mehrmaliges Waschen mit Puffer A äquilibriert worden war, inkubiert. Vor der Benutzung wurde das Säulenmaterial zunächst in PBS gequollen und dann dreimal mit demselben Puffer gewaschen, um den vom Hersteller zur trockenen Lagerung verwendeten Stabilisator zu entfernen. Die Glutathion-Agarose mit dem gebundenen Protein wurde zunächst dreimal mit Puffer A gewaschen und dann in eine Chromatographiesäule (Biorad) gefüllt. Die gebundenen Proteine wurden mit 10 mM Glutathion in Puffer A in 500 μ l Fraktionen eluiert. Zur Konzentrationsabschätzung wurden Aliquots der Fraktionen zusammen mit einer BSA Verdünnungsreihe auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

2.3.6 Aufreinigung von Maltose-bindendes-Protein-Fusionsproteinen

C-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
	200 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
	0,2 PMSF

1% (v/v) Apotinin

Amylose-Agarose (NEB)

BL21-Bakterien wurden mit den entsprechenden pMal-Myc Konstrukten transformiert. Am nächsten Tag wurde eine 20 ml LB/Ampicillin Kultur mit 3-5 Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:10 mit NZ Amin A Medium mit 0,2% (v/w) Glukose verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Glucose ist notwendig um die chromosomalen *E. coli* Maltose Gene zu reprimieren, da eine von diesen eine Amylase ist, die die Amylose auf der Affinitäts-Matrix abbauen kann.

Anschließend wurde die Kultur für 4 h bei 30°C induziert, sedimentiert und in Puffer C aufgenommen (10 ml Puffer C pro gram Zellen). Schließlich wurden die resuspendierten Zellen über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in kaltem Wasser aufgetaut und durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Zelltrümmer werden sedimentiert (30 min bei 4°C/10000x g/JA21-Rotor), der Überstand abgenommen und 1:5 mit C-Puffer verdünnt. Parallel wurde 3 ml Amylose-Agarose in eine Chromatographiesäule (Biorad) gegossen und mit 8 Bettvolumen C-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das verdünnte Zelllysate auf die Säule gegeben und mit 12 Bettvolumen Puffer-C gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 10 mM Maltose in Puffer-C in 1 ml Fraktionen eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden wie bei der GST-Fusionprotein Aufreinigung weiter untersucht.

2.4 Arbeiten mit DNA

2.4.1 Enzymatische Modifizierung von DNA

Die Spaltung von DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen, Phosphorylierung mit T4-Polynukleotidkinase, Deposphorylierung mit Kalbsdünndarm-Phosphatase und Ligationen wurde mit Enzymen der Firma Boehringer Mannheim und New England Biolabs in den mitgelieferten Puffer nach Herstellerangaben oder nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.4.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit passenden Oligonukleotidprimern amplifiziert. Die Denaturierungs-, *Annealing*- und Elongationszeiten waren abhängig von der DNA-Vorlage (genomische DNA oder Plasmid-DNA, GC-Gehalt des Fragments), den

Primern (wobei die optimale *Annealing*-Temperatur meist experimentell ermittelt wurde) und der Länge des zu erwartenden Fragments.

2.4.3 Elektrophorese von DNA und Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Ladepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA 50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) BPB 0,25% (w/v) XC
----------------	---

TBE	89 mM Tris-HCl pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
-----	--

Längenmarker "1kb-Leiter" (Gibco)
JETsorb-Kit (Genomed)

Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt und für analytische Zwecke elektrophoretisch in 0,5 - 1,5%igen Agarosegelen mit TBE als Laufaufgetrennt. Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des JETsorb-Kits nach Angaben des Herstellers

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Präparation von Zellysaten

Für die Analyse von Proteinen aus Zelllinien oder transient transfizierten Zellen wurden je nach Anwendung folgende Lysispuffer verwendet:

AB-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM NaCl 0,5% (w/v) NP-40 1 mM EDTA 0,5% (w/v) DOC 0,5% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Aprotinin 3 mM NaF
-----------	---

Frackelton-Puffer (F-Puffer)	10 mM Tris-HCl, pH 7,05
	50 mM NaCl
	30 mM Na ₄ P ₂ O ₇
	50 mM NaF
	5 μM ZnCl ₂
	100 μM Na ₃ VO ₄
	1% (wv) Triton X-100
	1 mM PMSF
	5 U/ml β-Makroglobulin
	2,5 U/ml Pepstatin A
	2,5 U/ml Leupeptin
	0,15 mM Benzamidin

AB-Pufferlysate wurden für Immunpräzipitationen unter hoher Stringenz eingesetzt. F-Pufferlysate wurden für Immunpräzipitationen unter niedriger Stringenz und Ko-Immunpräzipitationen benutzt. Für AB-Zelllysate wurden die Zellen in AB-Puffer lysiert, in ein Reaktionsgefäß überführt, ultraschallbehandelt bis die Lösung klar und nicht mehr viskos war und Zelltrümmer in einer Tischzentrifuge für 15 min bei 4°C und 15.000 upm sedimentiert. Für F-Pufferlysate wurden die Zellen in F-Puffer lysiert, 10 min auf Eis inkubiert, lysierte Zellen von der Platte geschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, 45 sec gevortext und für 20 min bei 4°C und 15.000 upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Wenn die Überstände der Lysate nicht sofort weiter eingesetzt wurden, wurden sie nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren.

2.5.2 Messung der Transaktivierung

Die Regulation verschiedener Promotoren wurde durch die Messung der Aktivität eines Reporterergenprodukts untersucht. Dazu wurden Promotorfragmente vor die Luziferase-cDNA kloniert. Erhöhte Transkription der cDNA korreliert mit einer erhöhten Luziferaseaktivität im Zelllysate (Nordeen, 1988). Da die Transfektionseffizienz innerhalb einer Transfektion stark variieren kann, wurde 1 μg des β-Galactosidase-Expressionsvektors pEQ176 pro 6 cm Schale ko-transfiziert. Die β-Galactosidaseaktivität war damit ein Maß für die Transfektionseffizienz und wurde zur Standardisierung der Luziferase benutzt. Da die Transfektionseffizienz auch von der Menge der transfizierten DNA abhängt, wurde in jeden Transfektionsansatz die Menge an transfizierter DNA konstant gehalten.

Extraktionspuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,8
	2 mM EDTA

	10 % (v/v) Glycerin
	1% (v/v) Triton X-100
	2 mM DTT
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄
	40 mM NAH ₂ PO ₄
	10 mM KCl
	1 mM MgSO ₄
	50 mM β -Mercaptoethanol
Meßpuffer	25 mM Glycylglycin
	15 mM MgSO ₄
	5 mM ATP, pH 7,0

1 M Na₂CO₃

25 mM Luziferinlösung

4 mg/ml ONPG in Z-Puffer

Die transient transfizierten Zellen wurden 36 h nach Entfernung des Präzipitats einmal mit PBS gewaschen und 10 min mit 400 μ l Extraktionspuffer inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Schalen gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden sedimentiert (3 min, 15.000 upm, Tischzentrifuge) und der Überstand für Luziferase- und β -Galactosidasemessung verwendet. Zur Messung der Luziferaseaktivität wurden 50 μ l Lysat zu 300 μ l Meßpuffer gegeben und sofort in einen Biolumaten (Berthold, LB1501) gestellt. Der Biolumat injiziert automatisch 100 μ l Luziferinlösung und bestimmt die Anzahl an Photonen, die innerhalb von 10 sec emittiert werden. Jede Messung wurde zweimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Zur Messung der β -Galactosidaseaktivität wurden 400 μ l Z-Puffer mit 20 μ l Lysat und 100 μ l ONPG-Lösung gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l 1 M Na₂CO₃ gestoppt, sobald eine deutliche Gelbfärbung vorhanden war. Der Färbegrad wurde photometrisch bei 405 nm in einem Titertek-Multiscan-Plus-gerät bestimmt. Aus dem Quotienten der Luziferasemessung und der β -Galactosidasemessung wurde die relative Luziferaseaktivität errechnet. Für die Angabe der Aktivierung eines Promotors wurde die relative Luziferaseaktivität des Reportergenkonstruktes ohne koexprimierte Transkriptionsfaktoren gleich eins gesetzt.

2.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die denaturierende Auftrennung von Proteingemischen wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine ein 7,5 bis 20%iges Polyacrylamidgele mit einem 5%igen Sammelgel gegossen.

Auftragspuffer	160 mM Tris-HCl, pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 10% (w/v) SDS 0,25% (w/v) BPB 100 mM β -Mercaptoethanol
Laufpuffer	50 mM Tris-Base 380 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS

Die Proteine wurden 1:2 in Ladepuffer verdünnt, 5 min bei 95°C erhitzt und auf das Gel geladen. Es wurden je nach Größenbereich zwei verschiedene Molekulargewichtsstandards benutzt:

Molekulargewichts-Standards	14.300 - 200.000 Da, vorgefärbt 2.850 - 43.000 Da, vorgefärbt
-----------------------------	--

2.5.4 Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau

Färbelösung	2 g/l Coomassie-Blau R250 0,5 g/l Coomassie G250 42,5% (v/v) Ethanol 5% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung 1	42,5% (v/v) Ethanol 5% (v/v) Methanol
Entfärbelösung 2	8% (v/v) Essigsäure 5% (v/v) Methanol

Zur Detektion von Proteinen nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele 20 min in Färbelösung geschwenkt, mit destilliertem

Wasser gespült und für 20 min in Entfärbelösung 1 inkubiert. Danach wurden die Gele mehrmals mit frischer Entfärbelösung 2 gewaschen, bis die Hintergrundfärbung der Gele entfernt war. Zur Aufbewahrung wurden die Gele auf ein Whatman Papier überführt und für 1 h bei 80°C getrocknet. Um die Proteinkonzentration von gereinigten bakteriellen Proteinen abzuschätzen, wurde parallel eine BSA Verdünnungsreihe im Gel aufgetrennt und die Färbungsintensitäten miteinander verglichen.

2.5.5 Western-Blot

Zelllysate wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt in einer Blotapparatur auf Nitrozellulose transferiert und die nicht besetzten Stellen der Membran mit Milchproteinen abgesättigt. Anschließend wurde die Position der Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers und eines gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörpers bestimmt. Letzterer hat kovalent die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, deren Umsetzung eines Substratgemisches aus Cumarsäure, Luminol und H₂O₂ ein fluoreszierendes Signal aussendet, welches mittels eines Filmes autoradiographisch detektiert werden kann.

Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminohexansäure 4 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base 4% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris-Base 4% (v/v) Methanol
ECL-Blockpuffer	0,05% (v/v) Tween-20 5% (w/v) Magermilchpulver (Applichem) in PBS
ECL-Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween-20 in PBS
ECL-Kit	
Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper gegen Kaninchen	
Whatman 3MM Papier	
Nitrozellulose: Porengröße 0,2 µM vliesverstärkt	
Semi-dry Blot "Pegasus" (Phase)	

Aus dem Polyacrylamidgel wurde ein Streifen mit dem zu detektierenden Protein ausgeschnitten und in Kathodenpuffer getränkt. Gleichzeitig wurden je ein Whatman Papier der Größe des Gelstreifens in Kathodenpuffer, Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2 getränkt. Nacheinander wurden das in Kathodenpuffer getränkte, sowie der Gelstreifen, die in Anodenpuffer 1 getränkte Nitrozellulosemembran und das Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2 getränkte Papier auf die Kathode der Blotapparatur blasenfrei aufgelegt. Die Blotapparatur wurde mit der Anodenplatte verschlossen und die Proteine wurden bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur in ECL-Blockpuffer abgesättigt, bevor sie mit einem entsprechenden Antikörper in ECL-Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit ECL-Waschpuffer gewaschen und für 1 h mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Für die Detektion mit dem ECL-Kit wurde die Membran erneut 3 x mit ECL-Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Inkubation der Membran für 1 min in ECL-Lösung und anschließender Belichtung mit einem Fuji RX Film für eine 1/2, 2 und 5 min.

2.5.6 Nachweis von Proteinen in der Immunfluoreszenz

3,7% Paraformaldehyd in PBS

0,2% Triton X-100 in PBS

20% Pferdeserum in PBS

Moviol 4-88 (Hoechst) mit Isopropylgallat

Hoechst 33258 (1 mg/ml Stammlösung in PBS)

Um überexprimierte Proteine über Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden am Boden von Zellkulturschalen runde Deckgläschen mit 1 cm Durchmesser plaziert. Diese waren vorher durch Einlegen in Ethanol entfettet und anschließend hitzesterilisiert worden. Dann wurden Zellen wie für eine Standardtransfektion ausgesät und wie üblich transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Platten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 3,7% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS gewaschen und dann 8 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Blocklösung (20% Pferdeserum in PBS) blockiert. Die Blocklösung wurde vor Verwendung 30 min bei $5.000 \times g$ zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Zur Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde dieser zunächst in Blocklösung verdünnt und dann in 30 μl Tropfen auf Parafilm plaziert. Die Deckgläschen wurden dann mit der Zell-Seite auf diese Tropfen gelegt und in einer

feuchten Kammer 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wie zuvor mit in Blocklösung verdünntem zweiten Antikörper inkubiert. Zuletzt wurde die DNA mit Hoechst 33258 in PBS gefärbt (1 µg/ml, 3 min, Raumtemperatur) und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden PBS Kristalle mit destilliertem Wasser von der Rückseite der Deckgläschen gewaschen und die Deckgläschen mit einem Tropfen Moviol (mit Isopropylgallat als Bleichschutz) auf Objektträger montiert. Das Betrachten und Fotografieren erfolgte mit einem Zeiss Axiophot Fotomikroskop (Integralmessung) und Kodak 200 ASA Diafilmen.

2.5.7 Immunopräzipitation

Hochsalz (HS)-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 2 M NaCl 1% (w/v) NP-40 0,5% (w/v) DOC
RIPA-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1% (w/v) NP-40 1% (w/v) DOC 0,1% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Aprotinin

Protein A-Sepharose CL4B (Pharmacia) oder Protein G-Sepharose (E. Kremmer), in PBS gequollen, mehrfach mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,1% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert.

Für Immunpräzipitationen wurden je nach Anwendung entweder AB-Puffer (hoch stringent) oder F-Puffer (niedrig stringent) für die Zelllysis und Inkubation eingesetzt. Die spezifischen Antikörper und 10-20 µl Protein A-Sepharose bei polyklonalen Antikörpern oder Protein G-Sepharose bei monoklonalen Antikörpern wurden 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend mindestens 1 h mit Zelllysaten bei 4°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf einer Wippe inkubiert. Bei Immunpräzipitationen unter hoher Stringenz wurde der an Protein A/G-Sepharose gekoppelte Immunkomplex zweimal mit RIPA-Puffer, einmal mit HS-Puffer und noch einmal mit RIPA-Puffer gewaschen. Bei Immunpräzipitationen unter niedriger Stringenz wurden die Immunkomplexe dreimal mit F-Puffer gewaschen.

2.5.8 Koimmunpräzipitation

Für die Analyse von direkten Protein-Protein Wechselwirkungen in der Zelle wurden HEK293 Zellen ($4-5 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Kulturschale) mit [^{35}S]-Methionin markiert und es wurden Lysate in F-Puffer hergestellt. Anschließend wurden die Lysate mit dem ersten Antikörper und 20 μl Protein A/G-Sepharose für mindestens 1 h bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Die an der Protein A/G-Sepharose gebundene Protein-Antikörper-Komplex wurde zunächst dreimal mit F-Puffer gewaschen. Dann wurden 200 μl des stringenten AB-Puffers zugegeben und wie zuvor für 30 min inkubiert. Bei diesem Schritt blieb das direkt von den Antikörpern erkannte Protein zusammen mit den Antikörpern an der Protein A/G-Sepharose gebunden, während indirekt gebundene Proteine abgegeben wurden. Nach 3-4facher Verdünnung in F-Puffer konnten diese Proteine mit einer zweiten Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die in beiden Reaktionen an die Antikörper gebundenen Proteine wurden anschließend auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, im Gel fixiert (30 min in 40% Ethanol/10% Essigsäure), in Amplify-Lösung für 30 min inkubiert und autoradiographisch nachgewiesen.

2.5.9 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zunächst wurde das zu reinigende Antiserum mit Ammoniumsulfat fraktioniert (Harlow und Lane, 1988). Zuvor waren 5 mg GST-hASH2 an Affigel-10 Sepharose (Biorad) nach Vorgabe des Herstellers kovalent gekoppelt worden. Das Binden/Eluieren der Antikörper durch Senken/Anheben des pH-Werts erfolgte ebenfalls wie bei Harlow und Lane. Die eluierten Antikörper wurden gegen PBS/10% Glycerin dialysiert und der Proteingehalt photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf 0,2 mg/ml durch Ultrafiltration in Centricon-Konzentratoren erhöht und die Antikörper bei -20°C eingefroren.

2.5.10 Gekoppelte *in vitro*-Transkription /-Translation

In vitro translatierte und [^{35}S]-markierte Proteine wurden mit dem TNT-System nach Vorgaben des Herstellers präpariert. Je 1 μl von jedem Ansatz wurde nach Beendigung der Reaktion über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die eingebaute Radioaktivität mit einem Phosphorimager (Fuji BAS 2000) und zugehöriger Software (Fuji MacBAS 2.2) quantifiziert.

2.5.11 *Pulldown*-Experimente mit GST-Fusionsproteinen

Bindungspuffer	20 mM Hepes, pH 8,0 100 mM NaCl 0,1 mM EDTA 0,05% (w/v) Triton X-100 0,1% Aprotinin 1 mM PMSF
----------------	--

Gluthation-Agarose

Es wurden 2-5 µg rekombinantes GST-Fusionsprotein an 15 µl Gluthation-Agarose gebunden und mit äquivalenten Mengen der *in vitro* translatierten und [³⁵S]-markierten Proteine für 90 min bei 4°C inkubiert. Die an die Gluthation-Agarose gebundenen Protein-Komplexe wurden dreimal mit Bindungspuffer gewaschen und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, im Gel fixiert (30 min in 40% Ethanol/10% Essigsäure), in Amplify-Lösung für 30 min inkubiert und autoradiographisch nachgewiesen.

2.5.12 Acetyltransferase-Assay

HAT-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 2 mM EDTA 1 mM DTT 1 mM PMSF 10 mM Na-Butyrat
------------	---

Es wurden 2-5 µg rekombinantes Proteine mit 0,2 µg GST-CBP-HAT oder 5 µl gereinigtem Baculovirus CBP in 30 µl HAT-Puffer zusammen mit [¹⁴C]-Acetyl-CoA für 45 min bei 30°C inkubiert. Die Proteine wurden anschließend auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, im Gel fixiert (30 min in 40% Ethanol/10% Essigsäure), in Amplify-Lösung für 30 min inkubiert und autoradiographisch nachgewiesen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung c-Myc assoziierter Faktoren

Um ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen der c-Myc Funktion zu erlangen, wurde von Matthias Austen in unserer Arbeitsgruppe eine Affinitätschromatografische Aufreinigung von c-Myc-interagierenden Proteinen aus Zellextrakten etabliert. Dieser Ansatz erlaubte die Aufreinigungen von Faktoren, die an natives, endogenes c-Myc binden, wie es in einem Hefe-2-Hybrid-Screen oder bei Verwendung von rekombinanten c-Myc nicht möglich wäre. In einem Hefe-2-Hybrid-Screen kann die komplette Transaktivierungsdomäne von c-Myc nicht eingesetzt werden, da diese in Hefe ein starker Transaktivator ist. Rekombinantes *full length* c-Myc läßt sich nur in sehr geringer Ausbeute mit einem großem Anteil an denaturiertem Protein gewinnen, was zu unspezifischen Interaktionen führen kann. Die Zellextrakte wurden aus der humanen Jurkat-T-Zelllinie gewonnen, da sich von diesen Suspensionszellen in kurzer Zeit große Mengen kultivieren lassen und sie über eine hohe Konzentration an endogenem c-Myc verfügen.

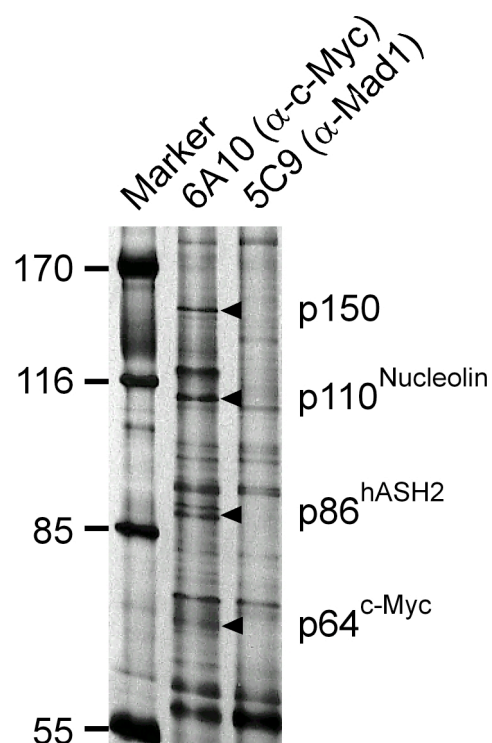


Abb. 4 Affinitätschromatographie. Lysate von 1×10^9 Jurkat-Zellen in F-Puffer wurden affinitätschromatografisch über eine α -c-Myc- (6A10) bzw. α -Mad1- (5C9) Säule aufgetrennt. Die eluierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt.

Für die Affinitätschromatografische Aufreinigung wurde der monoklonale c-Myc Antikörper 6A10 kovalent an eine Affigel-10 Säule gekoppelt. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte von Jurkat-Zellen in F-Puffer auf diese Säule aufgetragen, nicht gebundene Proteine gewaschen und die bindenden Proteine durch Zugabe von SDS eluiert. Das Eluat wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrollansatz wurde eine Affigel-10 Säule, an die der monoklonale Mad1-spezifische Antikörper 5C9 gekoppelt war, verwendet. Es konnten drei spezifisch an c-Myc bindende Polypeptide mit ungefähren Molekulargewicht von 150, 110 und 86 kDa identifiziert werden (Abb. 4). Diese Polypeptide wurden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und die Aminosäuresequenz einzelner Peptide wurde durch Edman-Abbau bestimmt (Tabelle 2). Anhand der Peptidsequenzen konnten p110 als Nucleolin und p87 als hASH2 identifiziert werden. Für p150 konnten nur cDNA Klone in den Datenbanken gefunden werden.

Zur Bestätigung der Signifikanz und Bedeutung dieser Interaktionen mußte zunächst *in vivo* und *in vitro* die Bindung an c-Myc untersucht werden. Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss auf das Zellwachstum und die c-Myc-vermittelte Transaktivierung und Transformation analysiert.

Tabelle 2: Interne Spaltpeptide der drei aufgereinigten Polypeptide nachgewiesen durch automatische N-terminale Edman-Sequenzierung nach tryptischen Verdau der einzelnen Polypeptide.

Polypeptid	tryptisches Fragment	Aminosäuresequenz	Protein oder cDNA-Klon (GI in GenBank)
p150	T52	TGPMG SLGQA EQVVS	EST-Klone (z.B. GI: 14042001; kodiert für die gesamte cDNA von p150)
	T57	LQGSE LSLVP HYDIL	
	T59	VLEEQ AQNLG LEGTL	
p110	T41	GFGFV DFNSE E	Nucleolin (GI: 128841)
	T59	TLVLS NLSYS ATEET	
p86	T36	YLYFE EKDFV DKAE	hASH2 (GI: 4009336)
	T39	FGLLD QDLSN IGPAY	

3.2 Charakterisierung des Trithorax-Proteins hASH2

3.2.1 Das Trithorax Protein ASH2

Das *ash2* Gen wurde ursprünglich in *Drosophila* bei einem Screen für Lethalität im späten larvalen oder frühen Puppenstadium mit Imaginalscheiben-Abnormalitäten identifiziert (Shearn *et al.*, 1971). Es ist ein Mitglied der Gruppe der Trithorax-Gene. Die Genprodukte der Trithorax-Gruppe sind während der Embryonalentwicklung für die korrekte Aufrechterhaltung der Expression einer Reihe von entwicklungsspezifischen Regulatoren,

wie den *Drosophila* Homöobox-Genen (HOM), verantwortlich (Kennison, 1995; Gould, 1997; Mahmoudi und Verrijzer, 2001). Mutationen im *ash2* Gen verursachen homeotische Transformationen, zusätzlich aber auch Defekte in der Musterbildung (Adamson und Shearn, 1996). Diese Abnormalitäten treten an den Beinen und Flügeln auf. An den Beinen ist ein vermehrtes Größenwachstum und die zusätzliche Bildung von kleinen überzähligen Beinen zu beobachten. An den Flügeln kommt es zu Duplikationen von Härchen und zur Transformation der kampaniformen Sensillen (sensorische Organe zum Fliegen) zu Härchen. Dieser transformierte Phänotyp wurde nur bei *ash2* Mutanten, nicht aber bei Mutationen anderer Trithorax Gene gefunden. Dies läßt darauf schließen, dass *ash2* nicht ausschließlich für eine korrekte Expression der HOM Gene verantwortlich ist. Sondern auch an der Kontrolle anderer wichtiger entwicklungsbiologischer Faktoren beteiligt ist, die das Zellwachstum koordinieren (Adamson und Shearn, 1996).

Das 2,0 kb große *ash2*-Transkript in *Drosophila* kodiert für ein 572 Aminosäuren großes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 64,8 kDa. Das kernständige Protein wird während der gesamten Embryonalentwicklung ubiquitär exprimiert. Während des Larvenstadiums ist es in den Imaginalscheiben nur in geringer Konzentration zu detektieren. Nach der Puppenbildung wird jedoch eine deutlich höhere Expression und eine Änderung der Proteingröße beobachtet. Während des Larvenstadiums besitzt ASH2 ein Molekulargewicht von 70 kDa, im Puppenstadium vom 53 kDa. Ob die Veränderung der Proteingröße aufgrund von unterschiedlichen Spleissvarianten oder posttranslationalen Modifikationen zustande kommt, ist bisher unbekannt (Adamson und Shearn, 1996).

Die humane ASH2 cDNA wurde in einer fötalen Gehirn cDNA Bibliothek (Wang *et al.*, 2001b) und im Rahmen des humanen Genomprojektes gefunden (Ikegawa *et al.*, 1999). Die 2381 bp lange mRNA kodiert für ein Protein von 628 Aminosäuren.

Expressionsanalysen von Wang *et al.* (2001) und Ikegawa *et al.* (1999) zeigten, dass hASH2 in adultem und fötalem Gewebe exprimiert wird. Dabei wurde hASH2 ubiquitär exprimiert und kommt vermehrt in adultem Testis und fötalem Lebergewebe vor. Eine geringe Expression ist in adulter Lunge, Leber, Niere, Prostata und peripheren Blut zu beobachten. Wang *et al.* (2001) konnten zusätzlich zeigen, dass hASH2 in den leukämischen Zelllinien K562, Hel und Dami um das 10 bis 20 fache höher exprimiert wird als in anderen lymphozytären, myeloiden oder monozytären Zelllinien. Desweiteren konnten sie in diesen drei Zelllinien zeigen, dass die hASH2 Expression durch Phorbolster-induzierte Differenzierung zu Megakaryozyten stark reduziert wird. Bei einer Hämin induzierten Differenzierung von K562-Zellen zu Erythrozyten ist hingegen keine Reduktion der hASH2 Expression zu beobachten (Wang *et al.*, 2001b).

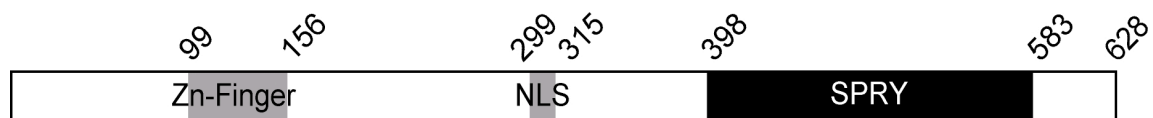
Die Länge des genomischen Lokus beträgt 34,2 kb und gliedert sich in 17 Exons auf Chromosom 8p11.2 (Ikegawa *et al.*, 1999). Wang *et al.* (2001) beschreiben zwei Spleiß-Varianten ASH2L1 und ASH2L2. ASH2L1, das in dieser Arbeit hASH2 genannt wird, besitzt kein Exon 2. Bei der alternativen Spleiß-Variante ASH2L2 werden Exon 1 und 15 aus der mRNA gespleißt. Dadurch entsteht ein Protein mit 501 Aminosäuren.

3.2.2 Sequenzanalyse von hASH2

Das hASH2 Protein ist 628 Aminosäuren lang. Es besitzt ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal zwischen Aminosäure 299 und 315 und eine SPRY-Domäne zwischen Aminosäure 398 und 583 (Ponting *et al.*, 1997; Ikegawa *et al.*, 1999). Diese Domäne wurde in sehr unterschiedlichen Proteinen gefunden. Dazu gehören die dualspezifische Kinase SplA aus *Dictyostelium discoideum*, Ryanodin-Rezeptoren, das RNA-bindende Protein hnRNPU und die putative RNA Helikase DDX1. SplA ist an der Sporendifferenzierung beteiligt, Ryanodin-Rezeptoren sind intrazelluläre Ca^{2+} -Kanälen, hnRNPU wirkt an der RNA-Prozessierung mit und DDX1 spielt eine Rolle beim Zellwachstum und bei der Zellteilung (Ponting *et al.*, 1997). Obwohl bisher keine Informationen über eine mögliche Funktion der SPRY-Domäne vorhanden sind, wird aufgrund des Vorkommens in den RNA-bindenden Proteinen hnRNPU und DDX1 vermutet, dass die Domäne an der Bindung von RNA beteiligt ist (Ponting *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu ASH2 aus *Drosophila* besitzt das humane Homologe im N-terminalen Bereich keine PHD-Domäne, die als ein doppelter Zink-Finger mit sieben Cysteinen und einem Histidin in der Anordnung $\text{Cys}_4\text{-His-Cys}_3$ definiert ist. Die PHD-Domäne wird als Protein-Protein-Interaktionsdomäne in zahlreichen eukaryontischen Proteinen beschrieben, die an der Chromatin-abhängigen Transkriptionsregulation beteiligt sind (Aasland *et al.*, 1995; Koken *et al.*, 1995; Capili *et al.*, 2001). So konnte kürzlich die Rekrutierung des NuRD-Histondeacetylasekomplexes über die PHD-Domäne des KRAB-Zink-Finger-Proteins gezeigt werden (Ponting *et al.*, 1997). Dem humanen ASH2 fehlen drei Cysteine und der Histidin-Rest für eine vollständige PHD-Domäne. Ob allerdings die verbleibenden vier Cysteine einen funktionellen Zink-Finger bilden, ist unklar.

A



B

```

1      GGTGATGGCGGCGGCAGGAGCAGGACCTGGCCAGGAAGCGGGTGCCGGGCTGGCCAGGAGCGGTGCGAAATGCAACAGGGGCAGAAGAG
1      M A A A G A G P G Q E A G A G P G P G A V A N A T G A E E

91     GGGGAGATGAAGCCGGTGGCAGCGGGAGCAGCCGCTCCTCCTGGAGAGGGGATCTCTGCTGCTCCGACAGTTGAGCCCAGTTCCGGGGAG
30     G E M K P V A A G A A A P P G E G I S A A P T V E P S S G E

181    GCTGAAGCGGGGAGGCAAACTTGGTCGATGTAAGCGGTGGCTTGGAGACAGAATCATCTAATGGAAAAGATACACTAGAAGGTGCTGGG
60     A E G G E A N L V D V S G G L E T E S S N G K D T L E G A G

271    GATACATCAGAGGTGATGGATACTCAGGCGGGCTCCGTGGATGAAGAGAATGGCCGACAGTTGGGTGAGGTAGAGCTGCAATGTGGGGATT
90     D T S E V M D T Q A G S V D E E N G R Q L G E V E L Q C G I

361    TGTACAAAATGGTTCACGGGTGACACATTTGGCATAGATACCTCATCTGTCTACCTTTCATGACCAACTACAGTTTTCATTGCAACGTC
120    C T K W F T A D T F G I D T S S C L P F M T N Y S F H C N V
      „Zn-Finger“

```

451	TGCCATCACAGTGGGAATACCTATTTCCCTCCGGAAGCAAGCAAACCTGAAGGAAATGTCCTTAGTGCTTTGGCCAACTGACATGGCAG
150	<u>C H H S G N</u> T Y F L R K Q A N L K E M C L S A L A N L T W Q
541	TCCCGAACACAGGATGAACATCCGAAGACAATGTTCTCCAAGATAAGGATATTATACCATTATTGATAAACTAGGGAGTGCATGACA
180	S R T Q D E H P K T M F S K D K D I I P F I D K Y W E C M T
631	ACCAGACACAGACCTGGGAAAACGACTTGGCCAAATAACATTGTTAAAACAATGAGTAAAGAAAGAGATGTATTCTTGGTAAAGGAACAC
210	T R Q R P G K M T W P N N I V K T M S K E R D V F L V K E H
721	CCAGATCCAGGCAGTAAAGATCCAGAAGAAGATTACCCCAAATTTGGACTTTTGGATCAGGACCTTAGTAACATTGGTCTGCTTATGAC
240	P D P G S K D P E E D Y P K F G L L D Q D L S N I G P A Y D
	T39
811	AACCAAAAACAGAGCAGTGTGTCTACTAGTGGGAATTTAAATGGGGAAATTGCAGCAGGAAGCAGCGGAAAAGGACGAGGAGCCAAG
270	N Q K Q S S A V S T S G N L N G G I A A G S S G K G R G A <u>K</u>
901	CGCAAAACAGCAGGATGGAGGGACCACAGGGACCACCAAGAAGGCCCGGAGTGACCCTTTGTTTCTGCTCAGCGCCTTCCCCCTCATGGC
300	<u>R K Q Q D G G T T G T T K K A R</u> S D P L F S A Q R L P P H G
	NLS
991	TACCCATTGGAACACCCGTTTAAACAAGATGGCTATCGGTATATTCTAGCTGAGCCTGATCCGCAAGCCCCTGACCCCGAGAAGCTGGAA
330	Y P L E H P F N K D G Y R Y I L A E P D P H A P D P E K L E
1081	ATTGACTGCTGGGCAGGAAACCTATTTCTGGAGACCTTTACAGAGCCTGCTGTATGAACGGGTTTTGTTAGCCCTACATGATCGAGCT
360	L D C W A G K P I P G D L Y R A C L Y E R V L L A L H D R A
1171	CCCCAGTTAAAGATCTCAGATGACCCGCTGACTGTGGTTGGAGAGAAGGGCTACTCTATGGTGAGGGCCTCTCATGGAGTACGGAAGGGT
390	P Q L K I S D D R L T V V G E K G Y S M V R A S H G V R <u>K G</u>
1261	GCCTGGTATTTTGAATCACTGTGGATGAGATGCCACCAGATACCCTGCCAGACTGGGTGGTCCAGCCCTAGGAAACCTTCAAGCT
420	<u>A W Y F E I T V D E M P P D T A A R L G W S Q P L G N L Q A</u>
1351	CCTTTAGGTTATGATAAAATTTAGCTATTCTTGGCGGAGCAAAAAGGAACCAAGTCCACCAGTCCATTGGCAAACTACTCTTCTGGC
450	<u>P L G Y D K F S Y S W R S K K G T K F H Q S I G K H Y S S G</u>
1441	TATGGACAGGGAGACGCTCTGGGATTTTATATTAATCTTCTGAAGACACAGAGACGCCAAGTCATTGCCAGACACATAAAGATAAG
480	<u>Y G Q G D V L G F Y I N L P E D T E T A K S L P D T Y K D K</u>
	SPRY-Domäne
1531	GCTTTGATAAAAATCAAGAGTTATTTGTATTTTGGAGAAAAGACTTTTGGGATAAAGCAGAGAAGAGCCTGAAGCAGACTCCCCATAGT
510	<u>A L I K F K S Y L Y F E E K D F V D K A E K S L K Q T P H S</u>
	T36
1621	GAGATAATATTTTATAAAAATGGTGTCAATCAAGGTGGCTTACAAGATATTTTTGAGGGGTTTACTTCCCAGCCATCTCACTGTAC
540	<u>E I I F Y K N G V N Q G V A Y K D I F E G V Y F P A I S L Y</u>
1711	AAGAGTGCACGGTTCCATTAACCTTGGACCATGCTTCAAGTATCCTCCGAAGGATCTCACTTACCGCCCTATGAGTGACATGGGCTGG
570	<u>K S C T V S I N F G P C F K Y P P K D L T Y R P M S D M G W</u>
1801	GGCGCGTGGTAGAGCACACCCTGGCTGACGCTTGTATCACGTGGAGACAGAAGTGGATGGGAGGCGCAGTCCCCATGGGAACCCCTGA
600	G A V V E H T L A D V L Y H V E T E V D G R R S P P W E P
1891	CCAGGTCCTCTTTTCTGTCAAGGACTTTCTGGGAATAACTGGGGGTTTTGTTTTGTTTTGAACTGTCTCAAATGTTCTCCCAAA
1981	GATGCTAAAAACACAGCCTCTCCTTTTAGCAAGTTAAAAGGCTGGGTAGGACTGCGGGAGACTGCCTGCCTTTACCATTCTCCCCAC
2071	TTCCAGTGACTGCTCTTATTTTGTGTACCATAAGCCAACAACCGCTGACTCCAGGATTGCATAAGCCCCCTGTGAAATCGGTGCTGTACT
2161	GCATACCCTGCCAGCTGTGACTTGTATCCTACTATATTTCTAAGGAGTGAATAATTTGTCAGTAACTAACTTATTAAAAGACAT
2251	TTCTTCTGTGGGCATTGACTGTATCCCACCTGTTTCCAAGGAAATGGTAACCTGTTTCTGAGAACACCTGAAATCAATGGCTATACAT
2341	TCCAAACCAATCTAAACGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Abb. 5 Struktur von hASH2. (A) Grafische Darstellung von hASH2 und seiner Domänen **(B)** Nukleotid- und translatierte Aminosäure-Sequenz von hASH2 (GI: 4210446). Das potentielle Zn-Finger-Motif, das Kernlokalisierungssignal (NLS) und die SPRY-Domäne sind unterstrichen. Die Sequenzen der Spaltpeptide T36 und T39 aus dem Edman-Abbau sind grau hinterlegt.

Neben *Drosophila* und humanem ASH2 wurde auch ein murines ASH2 beschrieben (Ikegawa *et al.*, 1999). Bei einer BLAST-Datenbanksuche mit dem humanen ASH2 werden zusätzlich noch homologe Proteine aus *C. elegans* und *S. pombe* gefunden. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die Aminosäuresequenz von ASH2 zwischen den verschiedenen Spezies hochkonserviert ist (Abb. 6, Tabelle 3A). Auch die Anordnung des

Zink-Fingers, des Kernlokalisierungssignals und der SPRY-Domäne ist in allen Spezies gleich. Ein Vergleich der Zink-Finger-Domäne zwischen den verschiedenen Spezies zeigt, dass im Gegensatz zu den Vertebraten, bei den Invertebraten der PHD-Zink-Finger mit der Anordnung Cys₄-His-Cys₃ konserviert ist. Die SPRY-Domäne ist dagegen bei allen Spezies hochkonserviert. Dies spiegelt sich auch im Homologievergleich wider. So ist zwischen den Spezies die Homologie des gesamten Proteins kleiner als die Homologie der SPRY-Domäne (vergleiche Tabelle 3 A mit B).

Tabelle 3: Homologievergleich der ASH2 Aminosäuresequenz aus verschiedenen Spezies. Die angegebenen Zahlen geben die homologen Aminosäuren zwischen zwei Spezies in Prozent wieder. Der Sequenzvergleich erfolgte mittels des ClustalW Programms vom European Bioinformatics Institute (www2.ebi.ac.uk/clustalw). (A) gesamtes Protein, (B) SPRY-Domäne, (C) PHD-Domäne.

A Gesamtes Protein				
	Mensch	Maus	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>
Mensch	-	-	-	-
Maus	94	-	-	-
<i>Drosophila</i>	55	55	-	-
<i>C. elegans</i>	45	44	51	-
<i>S. pombe</i>	34	35	37	33

B SPRY-Domäne				
	Mensch	Maus	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>
Mensch	-	-	-	-
Maus	97	-	-	-
<i>Drosophila</i>	74	72	-	-
<i>C. elegans</i>	61	60	64	-
<i>S. pombe</i>	43	43	43	43

C PHD-Domäne				
	Mensch	Maus	<i>Drosophila</i>	<i>C. elegans</i>
Mensch	-	-	-	-
Maus	100	-	-	-
<i>Drosophila</i>	32	32	-	-
<i>C. elegans</i>	31	31	56	-
<i>S. pombe</i>	28	28	59	42

Kürzlich wurde der Set1-Komplex mit Histon-Methyltransferase-Aktivität aus *Saccharomyces cerevisiae* aufgereinigt (Roguev *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2002). Eine der sieben Untereinheiten Bre2 weist eine Homologie zu der SPRY-Domäne von ASH2 auf. Allerdings erstreckt sich die Homologie zu hASH2 nur über den C-Terminus mit der SPRY-Domäne. Bre2 fehlt der PHD-Finger. Interessanterweise besitzt aber eine weitere Untereinheit des Set1-Komplexes, Spp1, einen PHD-Finger. Die größte Homologie hat der PHD-Finger von Spp1 jedoch zu dem PHD-Finger des *S. pombe* Proteins SPCC594.05c und zu dem humanen Protein CGBP, das an nicht-methylierte CpGs bindet (Voo *et al.*, 2000). Eine Homologie zu den PHD-Fingern der ASH2 Proteine konnte in einem BLAST-Datenbankvergleich nicht festgestellt werden.

Der Set1-Komplex ist in der Lage, Histon H3 an Lysin-4 zu methylieren. Mutationen einzelner Komponenten des Komplexes führen zur Verkürzung der Telomerlänge und zu Defekten beim Telomer *silencing* (Roguev *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist die katalytische Untereinheit Set1p auch am *silencing* des *mating-type* Locus, der Regulation des Metabolismus und der DNA-Reparatur beteiligt (Nislow *et al.*, 1997; Corda *et al.*, 1999; Schramke *et al.*, 2001). Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Methylierung von Histon H3 an Lysin-4 nicht nur mit transkriptioneller Inhibition, sondern auch mit Aktivierung assoziiert ist. So konnte gezeigt werden, dass transkriptionell aktive oder kompetente chromosomale Regionen überwiegend an Lysin-4 von Histon H3 methyliert sind (Litt *et al.*, 2001; Noma *et al.*, 2001).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von Histon H3 an Lysin4 durch die humane Histon-Methyltransferase Set9 die Bindung des NuRD Histon-Deacetylase-Komplexes inhibiert und dass in Gegenwart von Set9 die Transaktivierung durch Gal4-VP16 stimuliert wird (Nishioka *et al.*, 2002). Eine zweite Arbeitsgruppe zeigte, dass die Set9-Methylierung mit der transkriptionsstimulierenden Acetylierung durch CBP/p300 gekoppelt ist. Die Methylierung von Histon H3 an Lysin-4 in Histon-Oktameren stimuliert die anschließende Acetylierung durch CBP/p300 an Histon H3 und H4. Im Gegensatz dazu führt die Methylierung durch die Methyltransferase SUV39H1 an Lysin-9 von Histon H3 zur Inhibition der Acetylierung sowohl an H3 als auch an H4 (Wang *et al.*, 2001b).

Mensch MAAAGAGPGQEAGAGPGPGAVANATGAEEGEMKPV**AAGAAAP**PGEGIS**SAAP**TV**PSS**GEAE**GGEAN**LVDV**SG**GLETESSNGKDTLEGAGDTSEVMDT**QAGS**VDEEN**GRQL**GE**VELQ**CGICT**KWFT**
Maus MAAAGAGPGPGVSAGPGPGAAASATTAEDRETEPV**AAGAGEGP**----**SAAP**GA**PSS**GEAE**SGDAN**LVDV**SG**-LETESSNGKDTLEGTGDTSEVMDT**QAGS**VDEEN**GRQL**GE**VELQ**CGICT**KWFT**
Drosophila -----MCL**PAN**HSG**QPP**NFL**RAS**QMDT**SS**PT**ESSE**VNF**TAEED**-----K-----S-**QET**RS**AA**G**VCY**CG**KERN**LNI**VELL**CAT**CSR**W**VH**
C.elegans -----MR**SSK**GGR**GRQ**-----**AA**PK**TAP**TT-----**VCY**CDG**KREL**GS**VE**V**VC**ST**CL**K**W**F**H**
S.pombe -----ML**A**HGSNDY**GV**SL**KGN**K**TG**SS**PS**KASS**LN**--**WN**-----EP**H**T**LNE**Q**NTY****CY**CG**KDR**N**LRF**PD**LQ**CS**VL**CM**FH**
PHD-Finger -----**C-C**-----hh-**C**-----h**H**

Mensch ADTFGIDTSS---CL**PF**MT**NY**S**F**HC**NV**CH**H**SG**NTY**FL**RQ**AN**LK**EM**CL**S**ALAN**L**TW**Q**SRT**Q**DE**HP**KTM**F**SKD**-----**KD**I**IP**FI**DK**Y**W**EC**MT**TR**QR**PG**KMT**W**PNN**I**VK**T**MS**KE
Maus ADTFGIDTSS---CL**PF**MT**NY**S**F**HC**NV**CH**H**SG**NTY**FL**RQ**AN**LK**EM**CL**S**ALAN**L**TW**Q**SRT**Q**DE**HP**KTM**F**SKD**-----**KD**I**IP**FI**DK**Y**W**EC**MT**TR**QR**PG**KMT**W**PNN**I**VK**T**MS**KE
Drosophila ETCVSYQLGKG-KL**LP**FI**TNY**V**FV**CK**NCS**AS**GL**S**FR**K**SQ**AT**ISQ**MC**HCA**I**AN**M**QQA**AS-RD**GRR**Q**IQ**F**SKD**-----**KE**I**IP**Y**IE**Q**Y**W**EAM**TT**MP**RL**TQ**S**W**Y**ST**V**QR**SL**VKD**
C.elegans GR**CL**KE**FHEL**NS**NGV**PF**MIC**Y**TF**CK**Q**CR**PT**-**A**ED**WKA**K**KAD**L**V**MC**V**TL**AT**LS**AER**L**KAD**G**LS**AE**HV**PE**DFT**YL-----**SL**K**DE**I**V**Y**M**N**EN**W**Y**ML**TAI**K**Q**--**K**KE**W**H**ON**L**AP**T**LL**KE
S.pombe LS**CL**SP**PCT**S---MM**G**F**S**T**NY**Q**FV**CK**HC**T**ED**G**F**ER**F**ER**GV**SA**WKA**IT**ATA**M**AN**L**V**V**KR**Y**VE**T**NP**D**V**V**DS**F**NA**E**K**M**RN**F**Q**ANT**Y**F**FK**K**ED**L**IP**FI**EH**W**QL**LC**P**D**RE**K-V**Q**T**W**AT**LG**S**CL**V**AN**
PHD-Finger --Ch-----h-c--C---

Mensch RDVFLVKEHPD**PGSK**--D**PE**E**DY**PK**FGL**L**DQ**DL**SN**IG**PAY**DN**QK**SS**AV**ST**S**GN**LNG**IA**AG**SS**GK**GR**GAK**R**KQ**Q**D**GG**TG**T**TK**K**AR**-**SD**PL**F**SA**Q**R**L**PP**HG**-----**Y**PLE**H**PF**N**K**D**GY**R**Y
Maus RDVFLVKEHPD**PGSK**--D**PE**E**DY**PK**FGL**L**DQ**DL**SN**IG**PAY**DN**QK**SS**AV**S**AS**GN**LNG**IA**AG**SS**GK**GR**GAK**R**KQ**Q**D**GG**TG**T**TK**K**AR**-**SD**PL**F**SA**Q**R**L**PP**HG**-----**Y**PLE**H**PF**N**K**D**GY**R**Y
Drosophila V**Q**TL**F**TY**EE**H**A**EH**G**-----**A**MY**GL**F**H**Q**DL**R**I**K**PN**Y**ES**MS**K**S**G**AL**R**LT---**DD**GY**T**Q**AS**L**S**K**NN**R**Q**R**K**R**F**PG**T**D**SG**PT**G**K**K**GR**P**SS**D**I**T**AN**V**K**L**PP**HG**-----**Y**PLE**H**PF**N**K**D**GY**R**Y
C.elegans KN**I**F**V**QH**N**DD**DL**FA--**L**AE**KN**LS**L**GL**P**HE**AV**K**L**IG**K**R**P**IER**EN**RE**PR**H**I**EL**P**-----**P**IE**G**PK**TR**GA**S**K**RR**H**A**E**AP**V**T**G**K**K**Q**K--**L**A**D**Y**S**ST**A**AP**NG**-----**V**Q**I**D**I**PF**S**K**D**NY**R**Y
S.pombe RD**T**Y**R**AK**DE**TM**R**N**Q**SE**Y**AL**NN**PN**L**FD**FR**SG**Y**I**FF**Q**R**V**G**AT**V**PK**K**R**L**VE**TE**TF**PP**SS**S**KL**ED**Y**K**DS**K**RE**M**K**RS**NT**P**WS**NA**S**IK**K**NE**V**P**TV**F**IR**Y**K**PP**WR**D**S**F**ET**V**PK**L**P**I**F**Y**PN**SS**PN**F**F

Mensch IL**AE**PD**PH**APD-**PE**K**LE**L**D**C**W**AG**K**P**I**PG**D**LY**R**AC**LY**ER**V**LL**L**AL--**H**DR**AP**Q**L**K**I**S**DD**R**L**TV**G**E**K**GY**S**M**V**R**A**SH**G**V**R**K**G**A**W**Y**FE**IT**V**DE**M**--**PP**D**T**A**A**R**L**G**W**S**Q**P**L**GN**L**Q**AP**LG**Y**D**K**F**S**Y**S**W**R**SK
Maus IL**AE**PD**PH**APD-**PE**K**LE**L**D**C**W**AG**K**P**I**PG**D**LY**R**AC**LY**ER**V**LL**L**AL--**H**DR**AP**Q**L**K**I**S**DD**R**L**TV**G**E**K**GY**S**M**V**R**A**SH**G**V**R**K**G**A**W**Y**FE**IT**V**DE**M**--**PP**D**T**A**A**R**L**G**W**S**Q**P**V**GN**L**Q**AP**LG**Y**D**K**F**S**Y**S**LA**AS**
Drosophila IL**AE**PD**PH**AP**F**R**Q**E**F**DE**SS**D**W**AG**K**P**I**PG**W**LY**R**I**L**V**PH**S**V**LL**L**AL--**H**DR**AP**Q**L**K**I**S**ED**R**L**AV**T**GE**R**GY**CM**V**R**A**T**HS**V**N**R**GC**W**Y**FE**VT**I**E**E**M--**PD**GA**AT**RL**G**W**GRE**Y**GN**L**Q**AP**LG**Y**D**K**F**G**S**Y**S**W**R**SK
C.elegans YL**TE**V**D**PN**V**PE-**D**PA**WN**Q**N**Q**S**AY**V**I**PS**F**HY**RE**L**N**P**T**V**N**V**SS--**N**DR**AF**Q**L**S**I**NG**N**--**S**I**T**GF**E**GY**S**M**A**R**A**SH**G**V**S**K**T**W**Y**FE**V**N**F**DD**Q**--**P**DD**S**H**I**R**I**G**W**S**Q**S**Y**AS**L**Q**AC**V**G**Y**N**K**F**S**Y**G**W**R**SK**
S.pombe SL**SE**I**P**FN**RR**G---**F**RY**S**PC**E**A**AK**DL**PN**V**M**Y**RE**IE**L**PP**F**T**S**R**IN**W**H**D**I**ST**P**V**F**TD**H**S**AL**C**AT**V**E**K**G**FR**M**A**RS**N**V**F**M**T**S**GE**W**Y**FE**I**K**IE**K**GG**G**D**D**GA**H**V**R**I**G**V**S**R**R**E**AP**L**D**AP**V**G**Y**D**A**Y**S**Y**GL**R**DL**
SPRY-Domain -shhYaphph-----p-s-hh1Ghsp--h-----hGtt-hthtap--

Mensch **K**G**T**K**F**H**S**I**G**K**H**Y**S**S**G**-**Y**G**Q**D**V**LG**F**Y**I**N**L**PE**D**ET**E**T-----**A**K**S**L**P**D**TY**K**D**K**A**L**I**K**F**K**S**Y**L**Y**F**E**E**K**D**F**V**D**K**A**E**K**S**-----**L**K**Q**T**P**H**S**E**I**I**F**Y**K**N**G**V**N**Q**G**V**A**Y**K**D**I**F**E**G-----
Maus **K**G**T**K**F**H**S**I**G**K**H**Y**S**S**G**-**Y**G**Q**D**V**LG**F**Y**I**N**L**PE**D**ET**E**T-----**A**K**S**L**P**D**TY**K**D**K**A**L**I**K**F**K**S**Y**L**Y**F**E**E**K**D**F**V**D**K**A**E**K**S**-----**L**K**Q**T**P**H**S**E**I**I**F**Y**K**N**G**V**N**Q**G**V**A**Y**R**D**I**F**E**G-----
Drosophila **K**G**T**K**F**TES**H**G**K**H**Y**S**D**A-**Y**VE**G**DT**LG**FL**I**EL**P**EE**AS**T-----**L**D**Y**L**P**NT**F**K**D**R**PL**V**K**F**K**S**H**L**Y**E**D**K**D**K**I**T**E**T**L**KN-----**L**H**T**L**Q**S**R**I**E**FF**K**N**G**Q**S**Q**G**V**A**F**E**D**I**Y**AG**-----
C.elegans **H**G**T**K**F**HE**A**K**G**K**Y**H**F**G**G**F**K**Q**D**V**L**G**CL**I**H**L**P**V**D**K**L**Q**I**P**AN**L**P**SE**K**Y**L**P**V**SH**K**G**F**N**L**S**I**F**K**AN**Y**FE**V**Q**E**ES**A**D**I**A**K**T-----**L**V**E**M**P**G**S**Y**IE**FF**H**N**G**K**S**C**G**K**A**Y**E**N**I**Y**AG**-----
S.pombe **G**G**Q**V**H**M**S**R**PR**N**F**M**D**S-**F**G**T**G**D**I**I**GL**H**I**S**L**P**K**P**S**F**A**Q**H**T**T**L**PS**CH**D**R**I**P**IR**Y**K**Q**L**Y**FE**Q**P**D**V**PS**K**M**DE**L**M**I**PS**K**H**N**R**Y**I**D**L**P**Y**I**PG**S**F**I**K**V**Y**K**N**G**S**Y**M**G**T**A**F**E**N**L**L**D**FN**P**PN**S**I**N**S**N**H**Y**S**F**D
SPRY-Domain phhhhhsst-----ht-sDh1Gshlchptt-----pl-FshNGp-h-sshtht-s-----

Mensch ---**V**Y**F**PA**I**S**L**Y**K**S**C**T**V**S**I**N**F**GPC**F**K**Y**PP**K**DL**T**Y**R**P--**M**SD**M**G**W**AV**VE**HT**L**AD**V**L**Y**H**V**E**T**EV**D**G**R**R**S**PP**W**EP-----
Maus ---**V**Y**F**PA**I**S**L**Y**K**S**C**T**V**S**I**N**F**GPS**F**K**Y**PP**K**DL**T**Y**H**P--**M**SD**M**G**W**AV**VE**HT**L**AD**V**L**Y**H**V**E**T**EV**D**G**R**R**S**HP**G**NP**N**Q**S**LL**L**V**T**L-----
Drosophila ---**S**Y**F**PA**I**S**I**H**K**S**A**T**V**R**V**N**F**GP**A**F**K**Y**P**EV**L**VE**H**K**A**K**M**H**D**R**VE**E**L**I**T**E**Q**CL**AD**T**L**Y**L**T**E**H**D**GR**L**R**L**DN**M**GL-----
C.elegans ---**A**Y**P**S**I**S**I**F**K**S**A**T**A**M**N**L**G**P**K**F**R**N---**L**PR**G**AT**G**I**H**A**R**A**D**E**Q**Q**H**E**Q**T**L**S**D**M**L**Y**L**V**S**KE**V**N**L**D**H**PP**R**V**K**RE**DD**D**V**K**D**I**K**KE**I**K**Q**E**I**---
S.pombe D**G**SL**G**Y**P**S**I**S**M**Y**G**G**I**A**R**F**Q**F**G**P**Q**F**S**H**R**L**P**V**L**G**S**N**V**R**P**V**S**E**R**Y**E**NE**Q**IA**E**D**V**L**C**D**I**L**D**E**I**D**Y**A**E**D**P**NT**S**S**V**T**I**D**V**P**Q**E**P**N**A**G**I**T**I**I**P**E**I**K**D**I**T**E
SPRY-Domain -----hhPsh-htss--hph-hGt-

Abb. 6 Sequenzvergleich von ASH2. Es wurde ein ClustalW Sequenzvergleich (www2.ebi.ac.uk/clustalw) von ASH2 Sequenzen aus Mensch (BAA74520), Maus (BAA35128), *Drosophila* (AAC47328), *S. pombe* (CAA18661), *C. elegans* (CAC27517) durchgeführt. Homologe Aminosäuren sind grau hinterlegt, identische sind zusätzlich fettgedruckt. In den ersten beiden Zeilen ist die Homologiesequenz des PHD-Fingers angegeben, in den letzten drei Spalten die Homologiesequenz der SPRY-Domäne (a = aromatisch, c = geladen, h = hydrophob, p = polar, s = klein, t = sehr klein)

3.2.3 Klonierung von hASH2

Die gesamte hASH2 cDNA wurde aus den beiden cDNA Klonen AA378721 und N32725 zusammengesetzt, die vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin, bezogen wurden. AA378721 kodiert für den 5'-Bereich von Basenpaar 1 bis 686 und N32725 kodiert für den 3'-Bereich von Basenpaar 257 bis 2361. Im sich überlappenden Bereich beider Klone wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstelle BspE I (bp 480) die gesamte hASH2 cDNA zusammengesetzt. Die Sequenz der hASH2 cDNA wurde durch Sequenzierung überprüft und stimmt mit der Sequenz, die unter BAA74520 in der NCBI-Datenbank publiziert ist, überein.

3.2.4 Charakterisierung von hASH2 spezifischen Antikörpern

Zur näheren Charakterisierung von hASH2 wurden zwei hASH2-spezifische Antiseren hergestellt. Dazu wurde hASH2 als GST-Fusionsprotein in Bakterien exprimiert, aufgereinigt und zur Immunisierung von zwei Kaninchen eingesetzt. Beide Seren (547, 548) sind immunoreaktiv gegen hASH2. Für einen weiteren Einsatz in der Immunfluoreszenz und Chromatin-Immünpräzipitation (ChiP) wurden die Abnahmen 2, 3 und 4 des Serums 548 vereinigt und affinitätschromatografisch mit GST-hASH2 gereinigt. Wie Abb. 7A zeigt, wird in COS7-Zellen überexprimiertes HA-Epitop getagtes hASH2 mit dem gereinigten Serum 548 und dem anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert, nicht jedoch mit dem 548 Präimmunserum oder einem Antiserum gegen Mad1.

Neben den polyklonalen Seren wurden in Zusammenarbeit mit E. Kremmer (GSF, München) auch monoklonale Antikörper in Ratten erzeugt. Zur Immunisierung wurde ebenfalls GST-hASH2 eingesetzt. Wie Abb. 7B zeigt, immunpräzipitieren beide monoklonalen Antikörper, 4B5 und 4C5, und das polyklonale Antiserum 548 endogenes hASH2 aus Jurkat-Zellen. Dabei immunpräzipitieren das polyklonale Serum 548 und der monoklonale Antikörper 4B5 vergleichbare Mengen an hASH2. Der monoklonale Antikörper 4C5 immunpräzipitiert hingegen deutlich weniger hASH2. Da die eingesetzten monoklonalen Antikörper nicht aufgereinigte Zellkulturüberstände sind, kann noch keine Aussage über die Affinität zu hASH2 gemacht werden. Der Unterschied in der

Immunpräzipitation kann auch aufgrund unterschiedlicher Antikörpermengen in den Überständen zustande kommen.

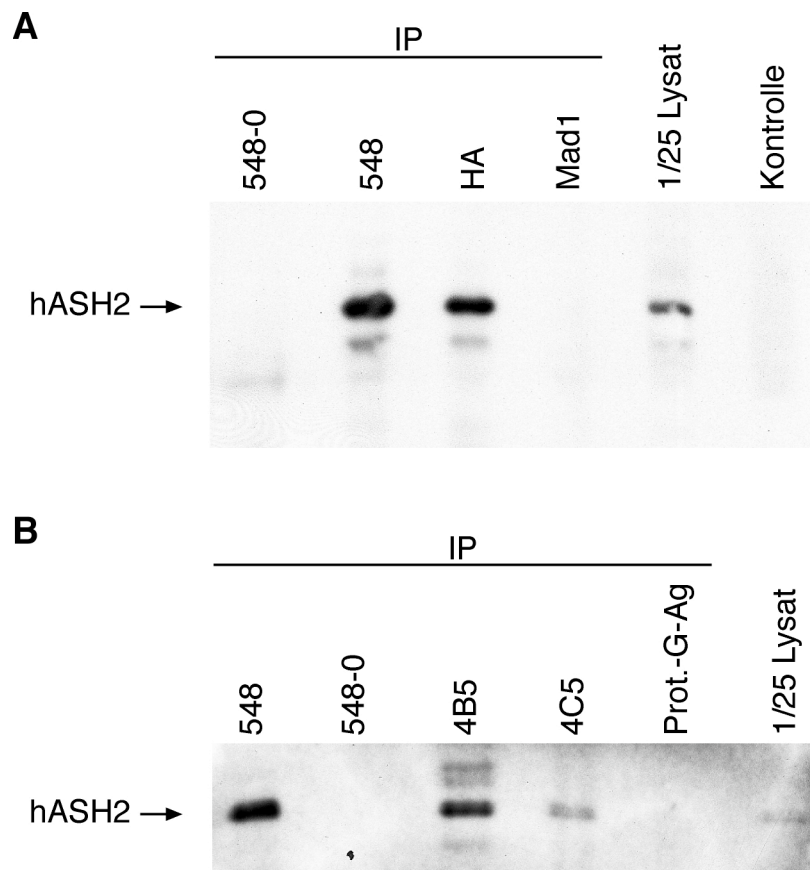


Abb. 7 Charakterisierung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen hASH2 in der Immunpräzipitation. (A) COS7-Zellen wurden mit pCB6⁺-hASH2-HA oder pCB6⁺ (Kontrolle) transfiziert und in RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurde hASH2 mit dem \square -hASH2 548-0 Präimmunsereum, dem \square -hASH2 affinitätsgereinigtem 548 Serum, dem monoklonalem \square -HA Antikörper 3F10 und dem polyklonalen \square -Mad1-Antikörper C-19 immunpräzipitiert und im Immunoblot mit dem monoklonalem \square -HA Antikörper 3F10 nachgewiesen. (B) Jurkat-Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurde endogenes hASH2 mit dem polyklonalem Antiserum 548, dem Präimmunsereum 548-0, den monoklonalen Antikörpern 4B5 und 4C5 und nur mit Protein-G-Agarose immunpräzipitiert und im Immunoblot mit dem monoklonalem \square -hASH2 Antikörper 4C5 nachgewiesen.

3.2.5 Expression von hASH2 in Zelllinien

Für humanes und murines ASH2 wurde auf mRNA Ebene gezeigt, dass es in embryonalem und adultem Gewebe ubiquitär exprimiert wird. Um mögliche Unterschiede in immortalisierten und transformierten Zellen feststellen zu können, aus denen sich erste Anhaltspunkte für die Funktion ableiten ließen, wurde in verschiedenen humanen Zelllinien die Expression von hASH2 auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden Ganzzellextrakte von 2×10^5 bzw. 4×10^5 Zellen jeder Zelllinie hergestellt und die

Expression von hASH2 im Immunoblot detektiert. Zum Vergleich der Proteinmengen wurde als Standard die Expression des ubiquitär exprimierten Nucleolins detektiert.

Dabei zeigte sich, dass in den untersuchten Zelllinien hASH2 ubiquitär exprimiert wird. Allerdings sind Unterschiede im Expressionslevel zu beobachten. Von Burkitt-Lymphomen abgeleitete Linien (Manca, Namalwa, CA46, Ramos) wird hASH2 im Vergleich zu den anderen Zelllinien nur sehr niedrig exprimiert. Auch in promyeloiden HL-60 Zellen ist die Expression niedrig. Eine hohe Expression zeigen hingegen die Mammakarzinom-Linien T47D, MCF7. Die Expression in der Jurkat T-Zelllinie, den Monoblastenlinie U-937, der Osteosarkom abgeleiteten Linie Saos-2 und der embryonalen Nieren Zelllinie HEK-293 ist vergleichbar.

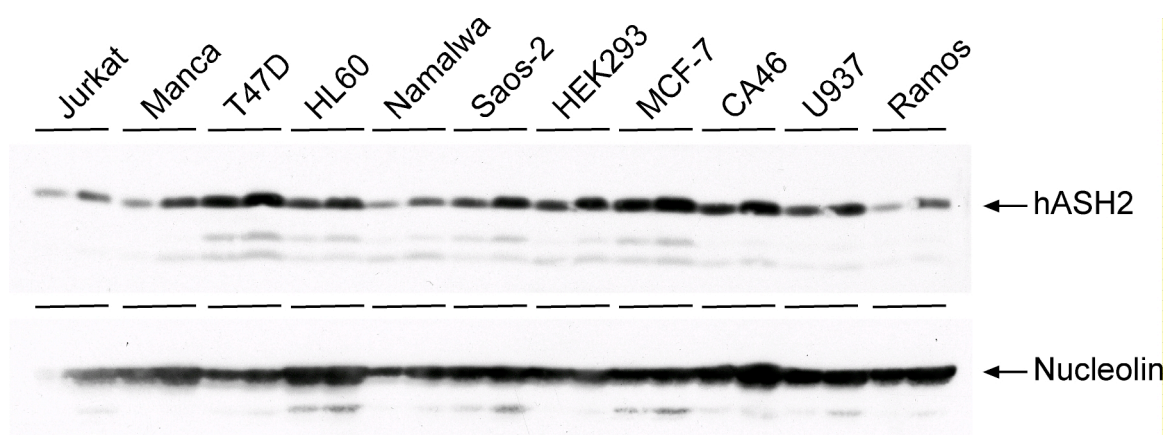


Abb. 8 Expression von hASH2 in verschiedenen Zelllinien. Es wurden von jeder Zelllinie Lysate in RIPA-Puffer von 2×10^5 (links) und 4×10^5 (rechts) Zellen durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und hASH2 im Immunoblot mit dem \square -hASH2 Serum 548 detektiert. Zum Abgleichen der eingesetzten Proteinmengen wurde parallel Nucleolin mit dem monoklonalem Antikörper MS-3 nachgewiesen.

3.2.6 Kernlokalisierung

Das *Drosophila* ASH2 Protein wurde als ein kernständiges Protein beschrieben (Adamson und Shearn, 1996). In Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit anti-hASH2 spezifischen Antikörpern wurde die zelluläre Lokalisation von humanem ASH2 analysiert. Dabei konnten die drei hASH2 Antikörper in einer weiteren Anwendung getestet werden. Zunächst wurde überexprimiertes, mit einem C-terminalen HA-Epitop versehenes hASH2 in COS7-Zellen durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Sowohl bei den beiden gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpern 3F10 und Y-11, als auch bei dem hASH2 spezifischen Serum und 548 und den monoklonalen Antikörpern 4B5 und 4C5 war eine spezifische Fluoreszenz im Zellkern zu beobachten (Abb. 9). Die mit den Antikörpern 548 und 4C5 beobachtete Kernfluoreszenz ließ sich durch Vorinkubation der Antikörper mit GST-hASH2 aufheben (nicht gezeigt).

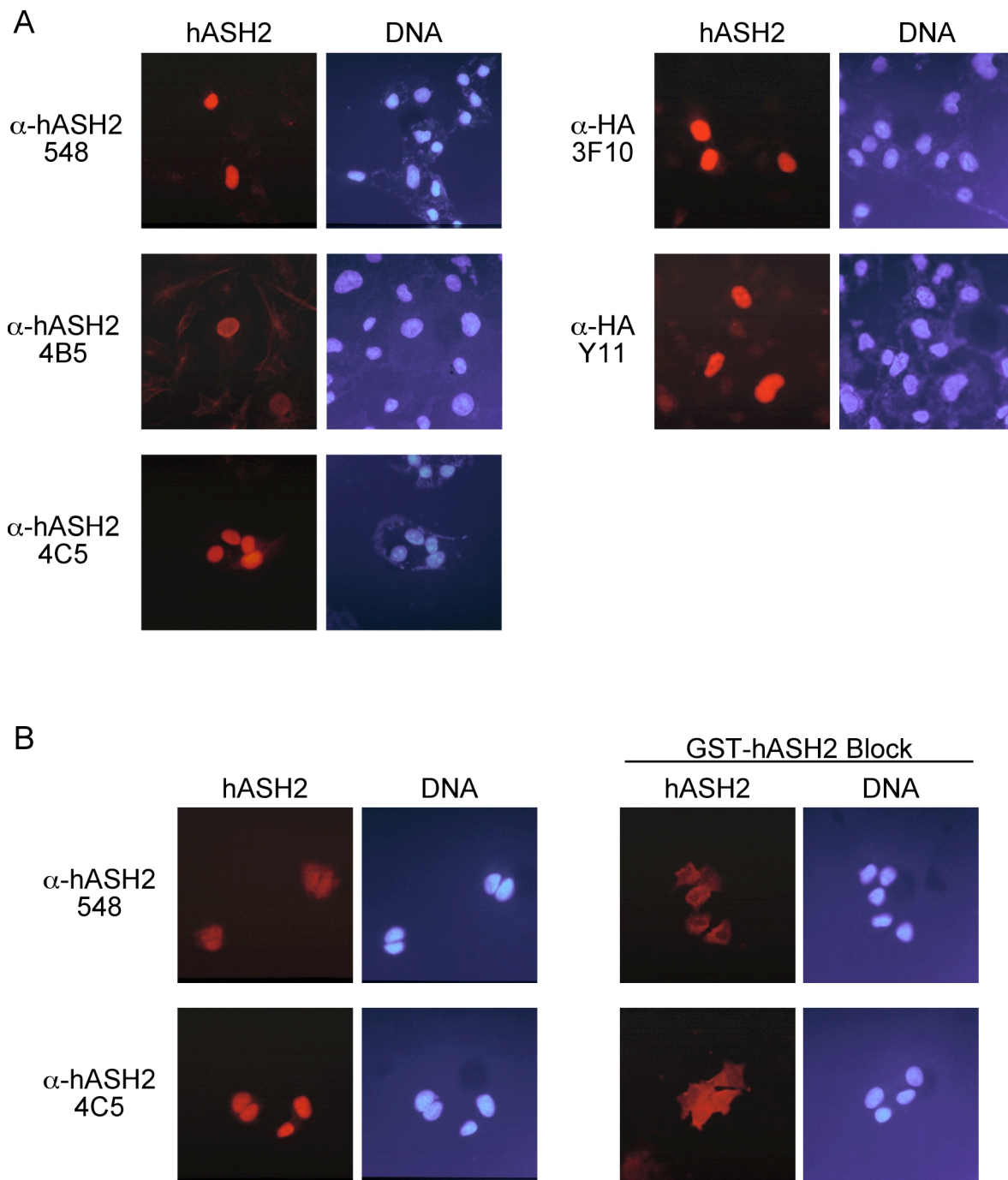


Abb. 9 Kernlokalisierung von hASH2. (A) COS7-Zellen wurden mit pCB6⁺-hASH2-HA transfiziert, fixiert und durch indirekte Immunfluoreszenz mit anti-hASH2-spezifischen (548, 4C5, 4B5) bzw. anti-HA-spezifischen (3F10, Y11) Antikörpern und den jeweiligen (□-Kaninchen, □-Ratte) sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper gefärbt. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt. (B) MCF-7 Zellen wurden fixiert und endogenes hASH2 durch indirekte Immunofluoreszenz mit den anti-hASH2-spezifischen Antikörpern 548 und 4C5 und sekundären Cy3-gekoppelten □-Kaninchen bzw. □-Ratte Antikörpern nachgewiesen. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt.

Die Expressionsuntersuchung von hASH2 in Kapitel 3.2.5 zeigte eine erhöhte Expression in den Mammakarzinom Zelllinien T47D und MCF-7. Daher wurde versucht, in MCF-7

Zellen endogenes hASH2 nachzuweisen. Mit dem Antiserum 548 trat nur eine schwache Kernfärbung auf, der Antikörper 4C5 zeigte hingegen eine deutliche Kernfärbung. Mit dem Antikörper 4B5 war kein Signal zu detektieren. Die Kernfärbung der Antikörper 548 und 4C5 ließ sich durch Vorinkubation mit GST-hASH2 blockieren. Dabei trat eine Art cytoplasmatische Färbung auf, die eine deutliche Aussparung des Zellkerns zeigt. Diese Färbung scheint durch das nicht ausreichende Abzentrifugieren der an GSH-Protein-Sepharose gebundenen GST-hASH2-Antikörper-Komplexe zu entstehen, die sich auf den Zellen niederschlagen.

3.2.7 Einfluss von hASH2 auf die Transaktivierung

Trithorax-Proteine wurden als transkriptionelle Aktivatoren beschrieben. Dies konnte in transienten Transfektionen für das Trithorax-Protein MLL1 als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne gezeigt werden (Zeleznik-Le *et al.*, 1994). Eine mögliche Transaktivierungsfunktion von hASH2 soll mit Hilfe eines Gal4-hASH2 Fusionsproteins untersucht werden. Dazu wurde das Fusionsprotein zusammen mit einem Luziferase-Reporterplasmid, das vier Gal4-DNA-Bindungsstellen besitzt, in U2OS-Zellen transfiziert. Es zeigte sich, dass hASH2 mit einer maximal dreifachen Stimulation nur ein sehr schwacher Transaktivator ist (Abb. 10A). Da transient transfizierte Reporterplasmide nicht vollständig in Chromatin verpackt werden und Trithorax-Proteine auf die Chromatinstruktur wirken, wurde die Transaktivierung von hASH2 auf einem chromosomal lokalisierten Reportergen untersucht. Von der Arbeitsgruppe von M. van Lohuizen wurden U2OS-Zellen, die einen stabil integrierten Thymidinkinase-Promotor Luziferasereporter, der fünf Gal4-DNA-Bindungsstellen trägt, zur Verfügung gestellt (Alkema *et al.*, 1997). Die Zellen wurden mit dem Gal4-hASH2 Fusionsprotein und einem Puromycinselektions-Marker kotransfiziert. Vor der Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden alle nicht transfizierten Zellen durch eine kurze Puromycinselektion eliminiert. Aber auch einen in Chromatin eingebetten Reporter aktivierte hASH2 nur sehr schwach (Abb. 10B). Als Kontrolle wurde das stark transaktivierende Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und der c-Myc-Transaktivierungsdomäne eingesetzt.

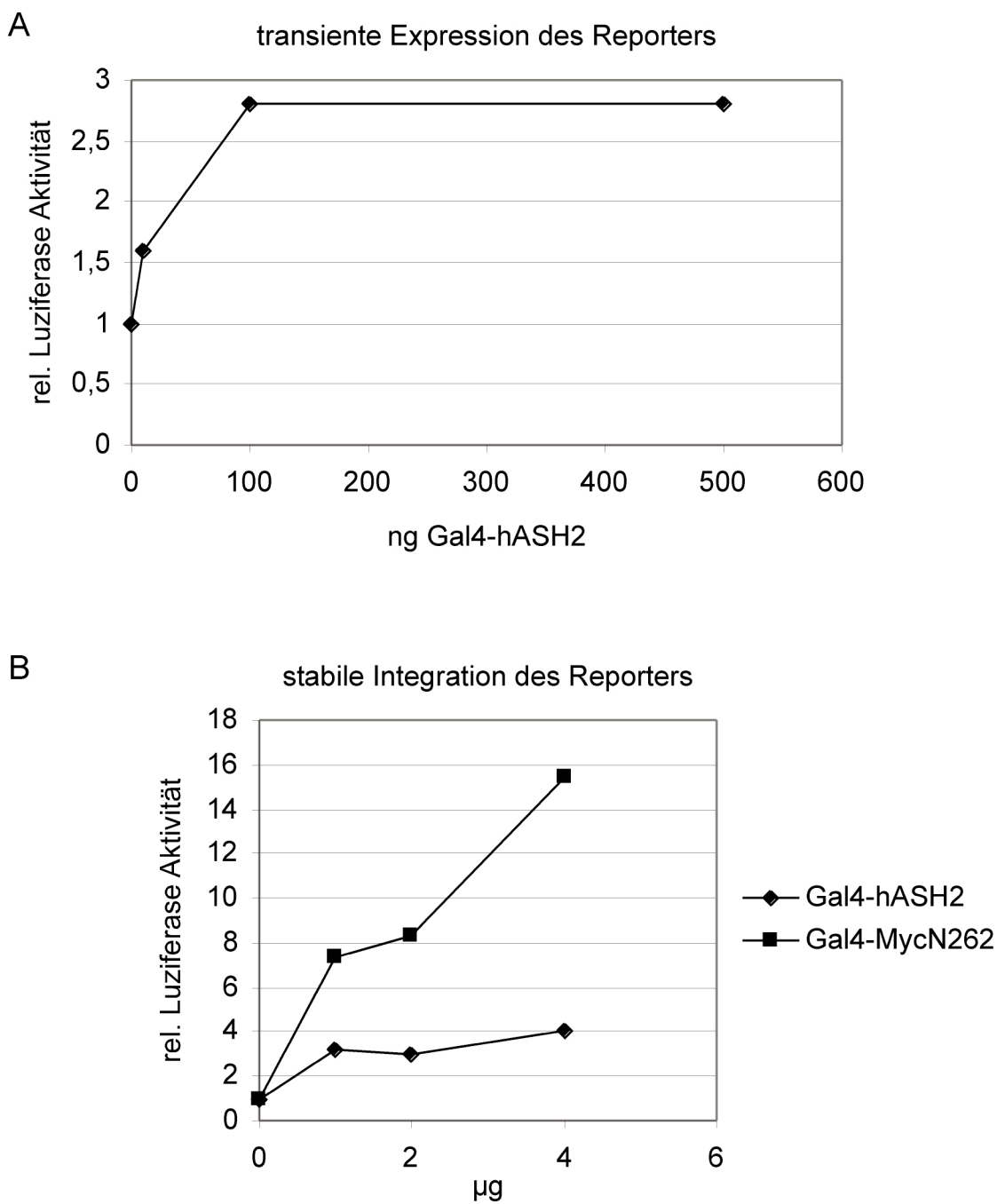


Abb. 10 hASH2 stimuliert Transaktivierung schwach. (A) U2OS-Zellen wurden mit 2 µg (Gal4)₄-tk-luc Luziferase-Reporterplasmid und den angegebenen Mengen pGal4-hASH2 transfiziert. **(B)** U2OS-Zellen mit einem stabil integrierten (Gal4)₅-tk-luc Luziferase-Reporter wurden mit den angegebenen Mengen pGal4-hASH2 bzw pGal4-MycN262 und 4 µg pBabe-puro transfiziert und 16 h nach der Transfektion für 24h mit 8 µg Puromycin/ml Medium selektiert. Nach einer weiteren 6-stündigen Wachstumsphase ohne Puromycin wurde die Luziferaseaktivität gemessen.

3.2.8 Einfluss von hASH2 auf Zellwachstum

In Kolonieformations-Experimenten kann der Einfluss von transfizierten Proteinen auf das Wachstum von immortalisierten oder transformierten Zellen untersucht werden. Um zu testen, ob hASH2 einen Einfluss auf das Zellwachstum ausübt, wurde hASH2 in Kolonieformations-Experimenten eingesetzt. Dabei wurden die humanen Osteosarkom-Linien Saos-2 und U2OS-Zellen mit einem Neomycinresistenz-Marker und hASH2 kotransfiziert und die Kolonienzahl nach 14 Tagen Selektionierung unter G418 bestimmt. Dabei zeigte hASH2 keinen Einfluss auf die Kolonienzahl in beiden untersuchten Zelllinien. Dies bedeutet, dass hASH2 in diesen Zellen Wachstum nicht inhibiert. Eine Aussage über die wachstumsstimulierende Wirkung von hASH2 ist in den eingesetzten Zellen aufgrund ihrer transformierenden Eigenschaften nur bedingt möglich. In weiterführenden Experimenten wäre die Untersuchung von hASH2-Mutanten interessant.

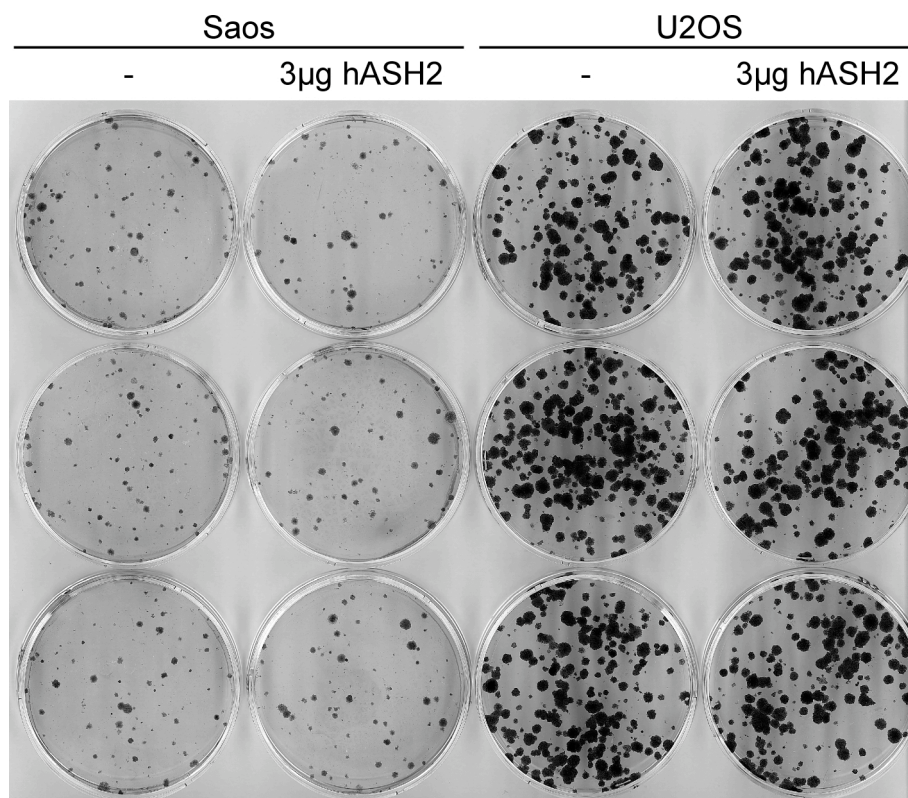


Abb. 11 hASH2 inhibiert nicht die Koloniebildung von Saos-2 und U2OS Zellen. Saos- und U2OS-Zellen wurden mit 2 µg pCMVneoBamHI und 3 µg pCMV-hASH2 cotransfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen 1:20 gesplittet und für 14 Tage mit 50 µg/ml G418 selektioniert. Anschließend wurden die Kolonien mit Giemsa gefärbt.

3.3 Interaktion von c-Myc mit hASH2

3.3.1 *In vivo* Interaktion und Charakterisierung der Interaktionsdomänen

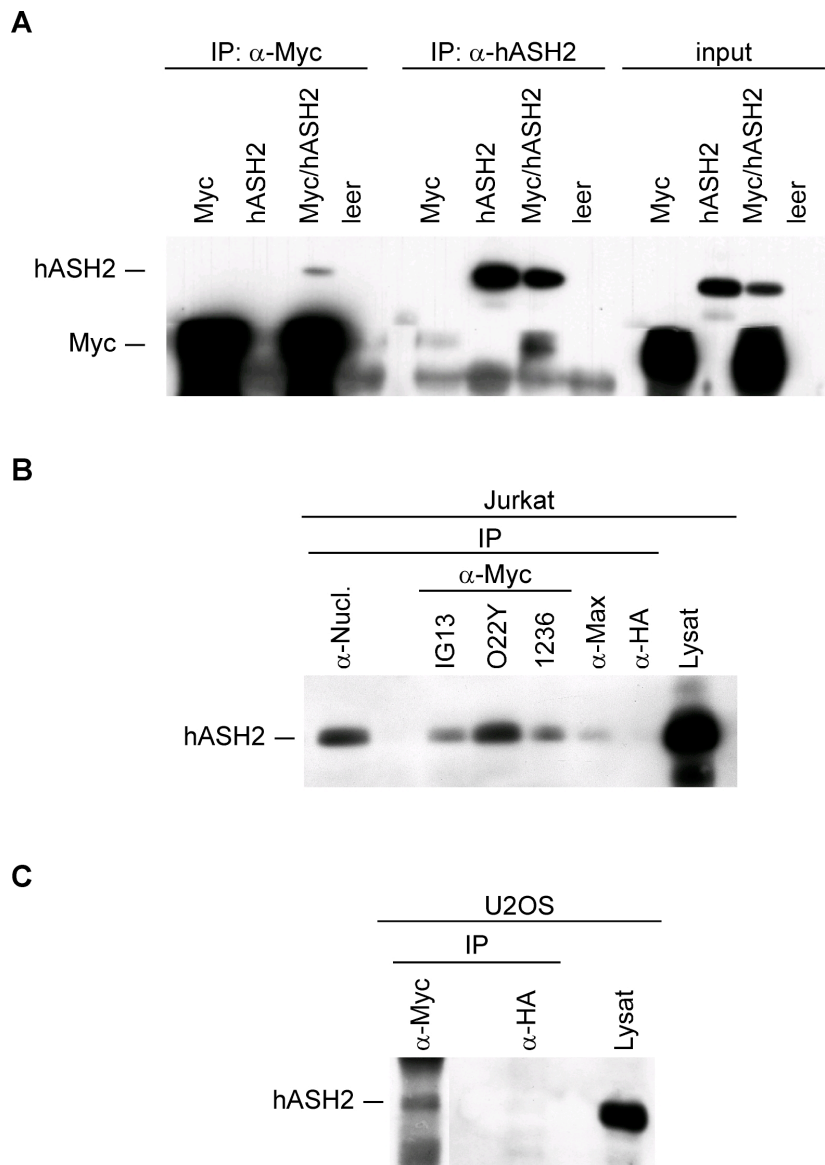


Abb. 12 Koimmunpräzipitation von hASH2 und c-Myc. (A) COS7-Zellen wurden mit den Plasmiden pCB6⁺-hASH2-HA, pcDNA3-Flag-c-Myc oder pCB6⁺ wie angegeben transfiziert. Die Zellen wurden in F-Puffer lysiert. Anschließend wurde Flag-c-Myc mit dem \square -Flag Antikörper M2 und hASH2-HA mit dem \square -HA-Antikörper 3F10 immunpräzipitiert. Die präzipitierten Komplexe wurden 3x mit F-Puffer gewaschen, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot wurde hASH2 mit dem Antiserum 548 und c-Myc mit dem Antiserum N-262 nachgewiesen. (B) 2×10^7 Jurkat-Zellen wurden in F-Puffer lysiert, mit den angegebenen Antikörpern (\square -Nucleolin: 134; \square -Myc: IG13 O33Y, 1236; \square -Max: C-17; \square -HA: 3F10) immunpräzipitiert, 3x mit F-Puffer gewaschen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde mit dem monoklonalem Antikörper 4B5 im Immunoblot immunpräzipitiertes hASH2 detektiert. Als Kontrollimmunpräzipitation wurde der \square -HA Antikörper eingesetzt. (C) Pro Immunpräzipitation wurden zwei zu 80% konfluente 15 cm Schalen mit U2OS-Zellen in F-Puffer lysiert. Zur Immunpräzipitation wurde der monoklonale \square -c-Myc Antikörper 4H3 eingesetzt, zur Kontrolle diente der \square -HA Antikörper 3F10.

Die in der Affinitätschromatografie gefundene Interaktion zwischen c-Myc und hASH2 sollte *in vivo* mittels Koimmunpräzitationen untersucht werden. Zunächst wurde die Interaktion von überexprimierten Proteinen in transient transfizierten COS7-Zellen untersucht. Dazu wurde hASH2 mit einem HA-Epitop und c-Myc mit einem Flag-Epitop in COS7-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden Immunpräzitationen mit Antikörpern gegen das HA- bzw. das Flag-Epitop durchgeführt. Dabei koimmunpräzitierte hASH2 mit c-Myc und umgekehrt (Abb. 12A). Um eine Interaktion zwischen endogenen Proteinen nachweisen zu können, wurden Immunpräzitationen aus Jurkat- und U2OS-Zellextrakten durchgeführt. Dabei konnte hASH2 sowohl mit verschiedenen c-Myc-spezifischen Antikörpern als auch mit einem Max-spezifischen Antikörper aus Jurkat-Zellen koimmunpräzitiert werden (Abb. 12B). Daneben konnte auch eine Interaktion zwischen hASH2 und Nucleolin in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden. Diese Bindung (Abb. 18) und die Bindung zwischen c-Myc und hASH2 (Abb. 12) konnte außerdem in U2OS-Zellen gezeigt werden.

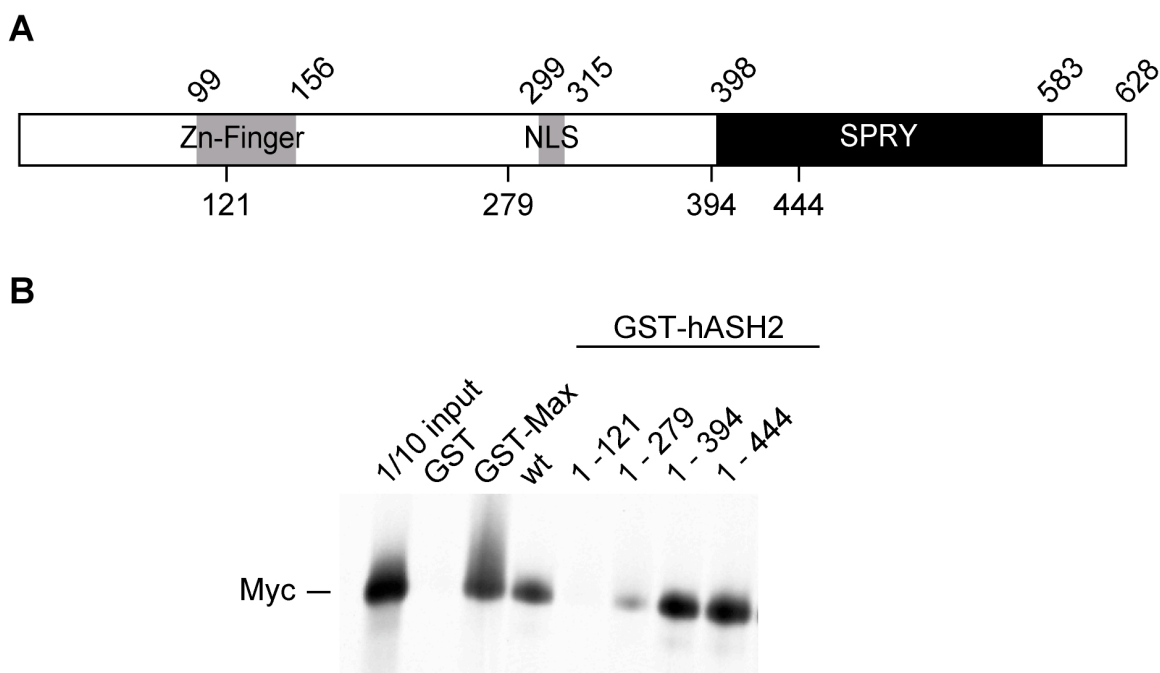


Abb. 13 Kartierung der Interaktionsdomäne von hASH2. (A) Graphische Darstellung von hASH2. Die oberen Zahlen beziehen sich auf die eingezeichneten Domänen, die unteren Zahlen beziehen sich auf das C-terminale Ende, der unter (B) eingesetzten C-terminalen Deletionsmutanten von hASH2. (B) Die unter (A) beschriebenen hASH2-Deletionsmutanten und Max wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in gleichen Mengen zusammen mit *in vitro* translatiertem, [^{35}S]-markiertem c-Myc in GST-Pull-down-Experimenten eingesetzt. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

Um zu untersuchen, ob eine direkte Interaktion zwischen c-Myc und hASH2 existiert und um die Interaktionsdomäne zu kartieren, wurden GST-Pull-down-Experimente

durchgeführt. Dazu wurden C-terminale Deletionsmutanten von hASH2 als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und zusammen mit *in vitro*-translatiertem, [³⁵S]-markiertem c-Myc in GST-Pulldown-Experimenten eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass c-Myc direkt mit hASH2 interagiert und an den N-terminalen Bereich zwischen Aminosäure 121 bis 394 von hASH2 bindet. Das GST-hASH2-Fragment mit den Aminosäuren 1-279 bindet c-Myc allerdings nur schwach, erst das Fragment 1-394 bindet c-Myc wie hASH2-Wildtyp. Dies läßt darauf schließen, dass im Fragment 1-279 nur ein Teil der Interaktionsdomäne liegt und dass erst im Fragment 1-394 die Interaktionsdomäne vollständig vorhanden ist. Als Negativkontrollen wurden GST alleine und als Positivkontrolle GST-Max eingesetzt. Wie erwartet, bindet c-Myc nicht an GST. Die Bindung von c-Myc an GST-Max ist vergleichbar mit der Bindung an GST-hASH2.

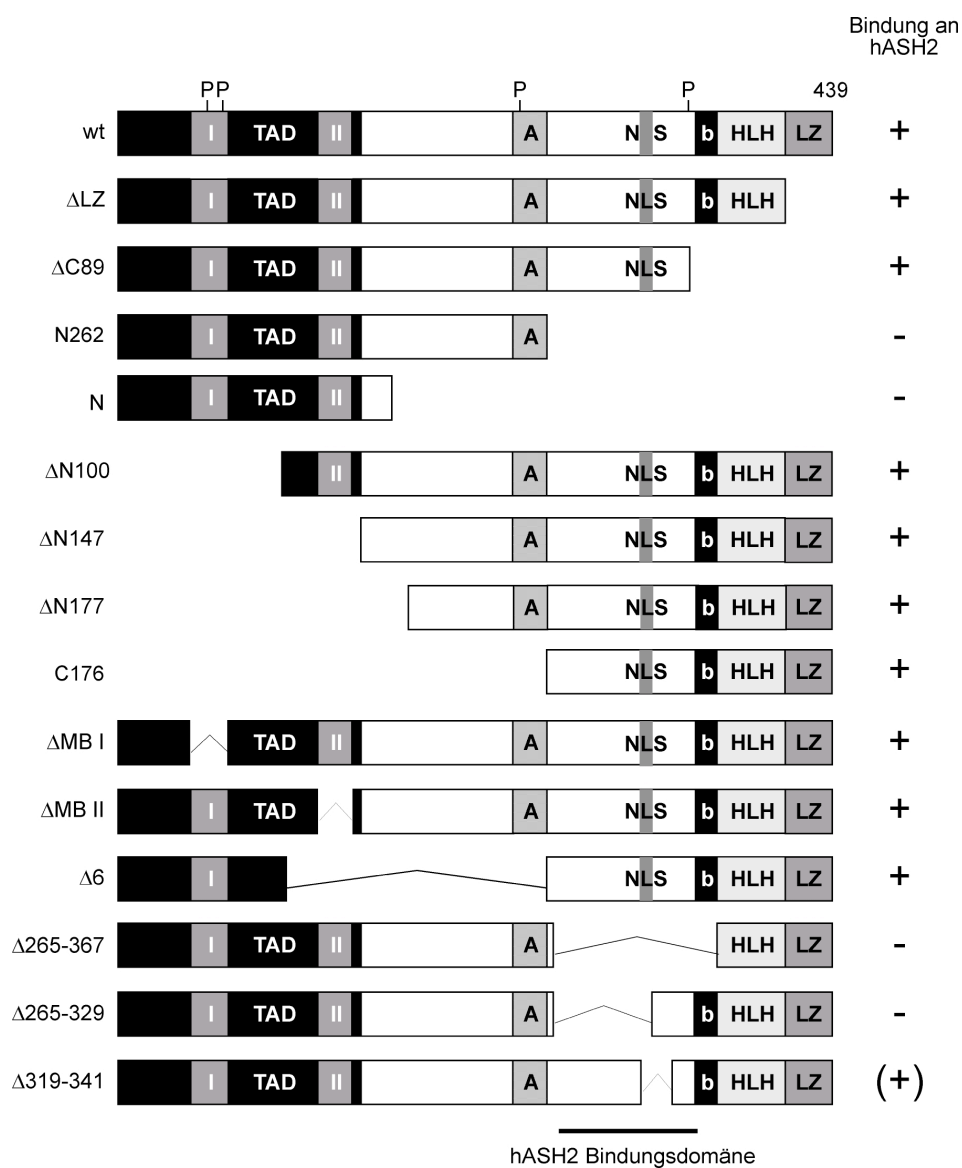


Abb. 14 c-Myc Deletionsmutanten. Aufgeführt sind die zur Kartierung der Interaktionsdomäne mit hASH2 eingesetzten c-Myc Deletionsmutanten.

Um die Interaktionsdomäne in c-Myc zu kartieren wurde das GST-hASH2 Fusionsprotein zusammen mit verschiedenen c-Myc-Mutanten (siehe Abb. 14) in GST-Pull-down-Experimenten eingesetzt. Aufgrund der eingesetzten c-Myc-Mutanten zeigte sich bei einer ersten groben Kartierung, dass die hASH2 Interaktionsdomäne zwischen der sauren und basischen-Domäne von c-Myc liegen muß (Abb. 15A, B). Dies konnte in einem weiteren Experiment mit c-Myc Deletions-Mutanten in diesem Bereich bestätigt werden (Abb. 16A). Die Mutante c-Myc Δ 265-367 bindet nicht mehr an hASH2 und bei der Mutante c-Myc Δ 265-329 ist nur eine schwache Bindung zu sehen. Die Mutante mit der kleinsten Deletion, c-Myc Δ 319-341, bindet, wenn auch schwächer als c-Myc, wieder deutlich an hASH2. Die Integrität und Funktionalität aller drei Mutanten konnte durch die Bindung an GST-Max bestätigt werden. In einem weiteren Experiment mit den GST-Myc Fragmenten N262 und C176 und *in vitro* translatiertem [³⁵S]-markiertem hASH2 wurde die Bindung von hASH an den C-Terminus von c-Myc bestätigt (Abb. 16B).

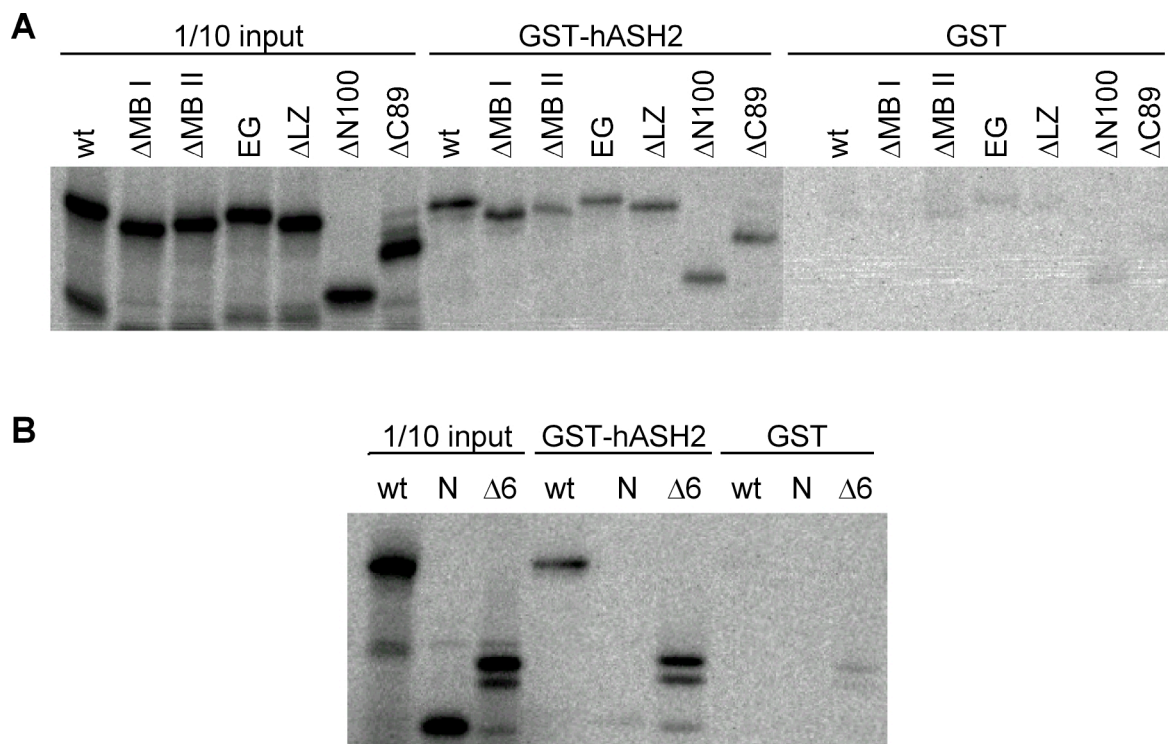


Abb. 15 Kartierung der Interaktionsdomäne von c-Myc. hASH2 wurden als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in gleichen Mengen zusammen mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem c-Myc-Mutanten (siehe **Abb. 14**) in GST-Pull-down-Experimenten eingesetzt. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. **(A)** GST-Pull-down-Experimenten mit den c-Myc-Mutanten Δ MB I, Δ MB II, EG, Δ LZ, Δ N100 und Δ C89. **(B)** GST-Pull-down-Experimenten mit den c-Myc-Mutanten N und Δ 6.

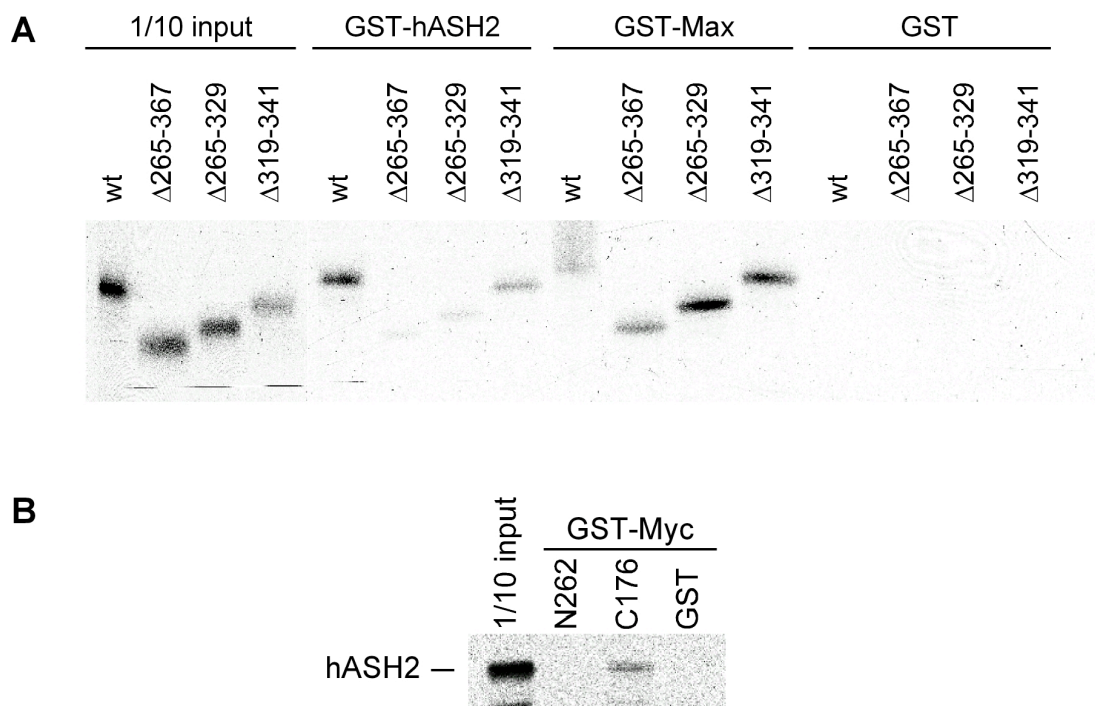


Abb. 16 hASH2 bindet den C-Terminus von c-Myc. (A) hASH2 wurden als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, gereinigt und zusammen mit *in vitro* translatiertem, [35 S]-markiertem c-Myc-Mutanten (siehe Abb. 14) in GST-Pull-down-Experimenten eingesetzt. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Als Kontrolle wurde neben GST auch GST-Max eingesetzt. (B) wie (A) allerdings wurden die GST-c-Myc Fragmente N262 und C176 zusammen mit *in vitro* translatiertem und [35 S]-markiertem hASH2 eingesetzt.

Da Myc und ASH2 auch in *Drosophila* exprimiert werden, wurde untersucht, ob eine Interaktion zwischen Myc und ASH2 in *Drosophila* besteht. Dazu wurde ein GST-Pull-down Experiment mit [35 S]-markiertem *Drosophila* dMyc und GST-hASH2 durchgeführt. Wie Abb. 17 zeigt, interagiert humanes GST-hASH2 *in vitro* mit dem *Drosophila* dMyc-Protein. Diese, über die Speziesgrenze hinweg bestehende, *in vitro* Interaktion deutet darauf hin, dass dMyc auch in *Drosophila* an *Drosophila* ASH2 binden könnte.

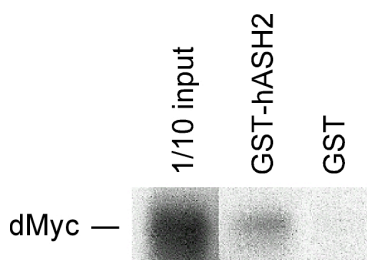


Abb. 17 hASH2 interagiert mit *Drosophila* Myc. hASH2 wurden als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in gleichen Mengen zusammen mit *in vitro* translatiertem, [35 S]-markiertem *Drosophila* dMyc in GST-Pull-down-Experimenten eingesetzt. Gebundenes dMyc wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

3.4 Interaktion von c-Myc mit Nucleolin

3.4.1 Nucleolin

Nucleolin ist ein evolutionär stark konserviertes, hoch exprimiertes Protein, das überwiegend im Nucleolus vorkommt, aber auch im übrigen Kern und im Cytoplasma vorliegt. Neben der Regulation der rRNA Transkription, prä-rRNA Prozessierung, Ribosomenbiosynthese und dem nukleozytoplasmatischen Transport werden Nucleolin auch Funktionen bei der Regulation von Zellwachstum, Replikation, Nukleogenese und Embryogenese zugesprochen (Tuteja und Tuteja, 1998; Ginisty *et al.*, 1999; Srivastava und Pollard, 1999).

Nucleolin lässt sich in eine N-terminale, zentrale und C-terminale Domäne einteilen. Die N-terminale Domäne besitzt Homologien zu HMG (*High Mobility Group*) Proteinen. Sie besteht aus sauren Abschnitten, die von basischen Sequenzen unterbrochen sind. Diese Domäne ist - ähnlich zu den HMG Proteinen - an der Chromatin-Dekondensation beteiligt, indem sie Histon H1 bindet und vom Chromatin verdrängt. Während die N-terminale Region an Chromatin bindet und zusätzlich die rRNA-Transkriptionsinitiation reguliert, ist die zentrale Domäne an der prä-rRNA Erkennung, Kondensation und Verpackung in Ribosomen beteiligt. Die Region besteht aus vier etwa 80 Aminosäure langen RNA-bindenden Domänen (RBD), die sequenzspezifisch RNA erkennen. Die C-terminale Domäne besitzt eine Vielzahl von Glycinresten, die von Dimethyl-Arginin- und Phenylalaninenresten unterbrochen sind. Die Domäne bindet sequenzunabhängig RNA, hebt RNA-Basenpaarung und Sekundärstrukturen auf. Dies erlaubt den RBD-Elementen der zentralen Domäne ihre Zielsequenzen innerhalb großer und komplexer rRNA Molekülen zu erkennen (Tuteja und Tuteja, 1998; Ginisty *et al.*, 1999; Srivastava und Pollard, 1999).

Neben der nukleolären Funktion bei der Ribosomenbiogenese und der Nukleogenese konnte Nucleolin auch mit einer Reihe weiterer Funktionen im Bereich der Transkriptionskontrolle in Verbindung gebracht werden. Nucleolin fungiert als ein transkriptioneller Repressor des alpha-1 sauren Glycoproteingens (APG), das durch eine als B-Motiv bezeichnete regulatorische DNA-Sequenz im Promotor reprimiert wird. Nucleolin konnte als B-Motiv-bindender Faktor identifiziert werden und reprimiert so die APG-Expression (Yang *et al.*, 1994). Zum anderen interagiert Nucleolin mit den Transkriptionsfaktoren Sp1, A-Myb und c-Myb und reprimiert deren transkriptionelle Aktivität (Novy *et al.*, 2000; Ying *et al.*, 2000). Nucleolin interagiert auch mit dem Glucocorticoid-Rezeptor und dem Transkriptionsfaktor E47, allerdings wurden bisher keine weiteren Funktionen beschrieben (Dear *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde Nucleolin auch als Teil des B-Zell spezifischen DNA-

Rekombinationskomplexes SWAP beschrieben, der am Immunglobulin-Klassenwechsel während der Reifung von B-Lymphozythen beteiligt ist (Borggreffe *et al.*, 1998). Zudem wurde Nucleolin als Teil des ebenfalls am Immunglobulin-Klassenwechsel beteiligten, B-Zell spezifischen Transkriptionskomplexes LR1 identifiziert (Hanakahi *et al.*, 1997). LR1 stimuliert neben dem Intron-Enhancer E μ der schweren Ketten auch den *c-myc* P1- und EBV-F-Promotor (Brys und Maizels, 1994; Bulfone-Paus *et al.*, 1995; Hanakahi und Maizels, 2000).

Neben den Funktionen auf transkriptioneller Ebene konnte auch gezeigt werden, dass Nucleolin an der Stabilisierung der Interleukin-2 (IL-2) mRNA nach T-Zell Aktivierung beteiligt ist. Nucleolin bindet zusammen mit YB-1 das JNK-Element (JRE) im 5'-untranslatierten Bereich der IL-2 mRNA. Die Bindung beider Proteine ist für die IL-2 mRNA-Stabilisierung nach T-Zell-Aktivierung notwendig (Chen *et al.*, 2000a).

3.4.2 *In vivo* Interaktion und Charakterisierung der c-Myc Interaktionsdomäne

Für Nucleolin wurde die Interaktion mit c-Myc in Koimmunpräzipitationen bestätigt. Dazu wurden wie für hASH2 Immunpräzipitationen in Jurkat und U2OS-Zellen durchgeführt. Dabei konnte Nucleolin sowohl mit den c-Myc-spezifischen Antiseren als auch mit einem Max-spezifischen Antikörper aus Jurkat-Zellen immunpräzipitiert werden (Abb. 18A). Diese Interaktion konnte in U2OS-Zellen mit zwei c-Myc-spezifischen Antikörpern bestätigt werden (Abb. 18B). Eine direkte Interaktion der beiden Proteine konnte in GST-*Pulldown*-Experimenten mit GST-c-Myc Fragmenten und *in vitro* translatiertem Nucleolin nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass Nucleolin wie hASH2 an den C-terminalen Bereich von c-Myc bindet. Eine genauere Eingrenzung der Interaktionsdomäne von Nucleolin in c-Myc und der Kartierung der Bindungsdomäne von c-Myc in Nucleolin bedarf weiterer Untersuchungen. Leider gestaltet sich dies schwierig, da die Expression von Nucleolin in *E. coli* letal ist.

In U2OS-Zellen konnte die Interaktion zwischen Nucleolin und hASH2 bestätigt werden (vgl. Abb. 12B). Eine Untersuchung der direkten Bindung von Nucleolin und hASH2 steht jedoch noch aus.

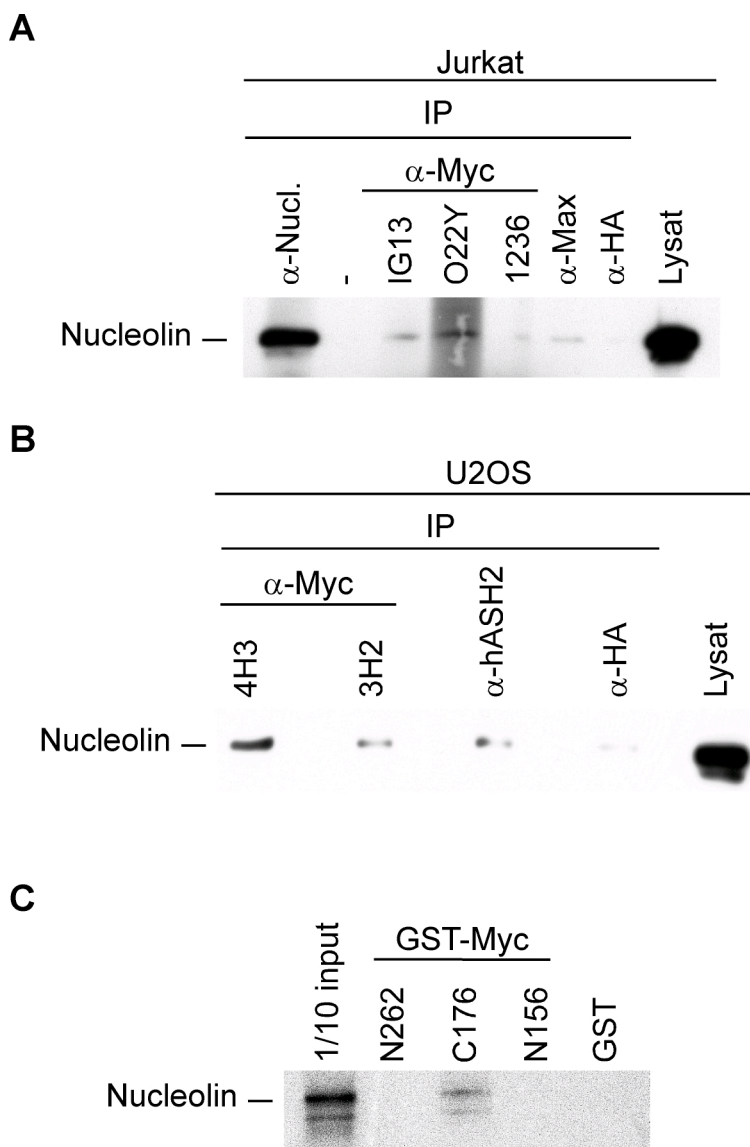


Abb. 18 Charakterisierung der *in vivo* und *in vitro* Interaktion von c-Myc und Nucleolin. (A) 2×10^7 Jurkat-Zellen wurden in F-Puffer lysiert, mit den angegebenen Antikörpern (α -Nucleolin 134, α -Myc IG13, O33Y, 1236, α -Max C-17) immunpräzipitiert, 3x mit F-Puffer gewaschen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde mit dem monoklonalen Antikörper MS-3 im Immunoblot immunpräzipitiertes Nucleolin detektiert. Als Kontrolle diente der monoklonale α -HA-Antikörper 3F10. (B) Pro Immunpräzipitation wurden zwei zu 80% konfluente 15 cm Schalen mit U2OS-Zellen in F-Puffer lysiert. Zur Immunpräzipitation wurden die monoklonalen α -c-Myc Antikörper 4H3 und 3H2 sowie der monoklonale Antikörper α -hASH2 4B5 eingesetzt, zur Kontrolle diente der α -HA Antikörper 3F10. Das koimmunpräzipitierte Nucleolin wurde im Immunoblot mit dem α -Nucleolin Antikörper MS-3 nachgewiesen. (C) c-Myc-Fragmente wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in gleichen Mengen zusammen mit *in vitro* translatiertem, [35 S]-markiertem Nucleolin in GST-Pulldown-Experiment eingesetzt. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

3.4.3 Nucleolin stimuliert die c-Myc abhängige Transaktivierung

Um die funktionelle Relevanz der Bindung von c-Myc an Nucleolin zu untersuchen, wurde der Einfluss von Nucleolin auf die c-Myc-abhängige Transaktivierung mit Hilfe von transienten Transfektionen untersucht. Dazu wurden steigende Mengen Nucleolin zusammen mit c-Myc und dem Reporterkonstrukt M4-tk-luc in U2OS-Zellen kotransfiziert. Das Reporterkonstrukt kodiert für Luziferase und besitzt vier c-Myc-DNA-Bindungsstellen vor einem minimalem TK-Promotor. Wie Abb. 19 zeigt, wird das Reporterplasmid M4-tk-luc nur in Gegenwart von c-Myc durch Nucleolin konzentrationsabhängig stimuliert. In Gegenwart von Max findet keine Stimulation statt. Das Reporterplasmid min-tk-luc ohne die vier c-Myc DNA-Bindungsstellen wird nicht durch Nucleolin aktiviert.

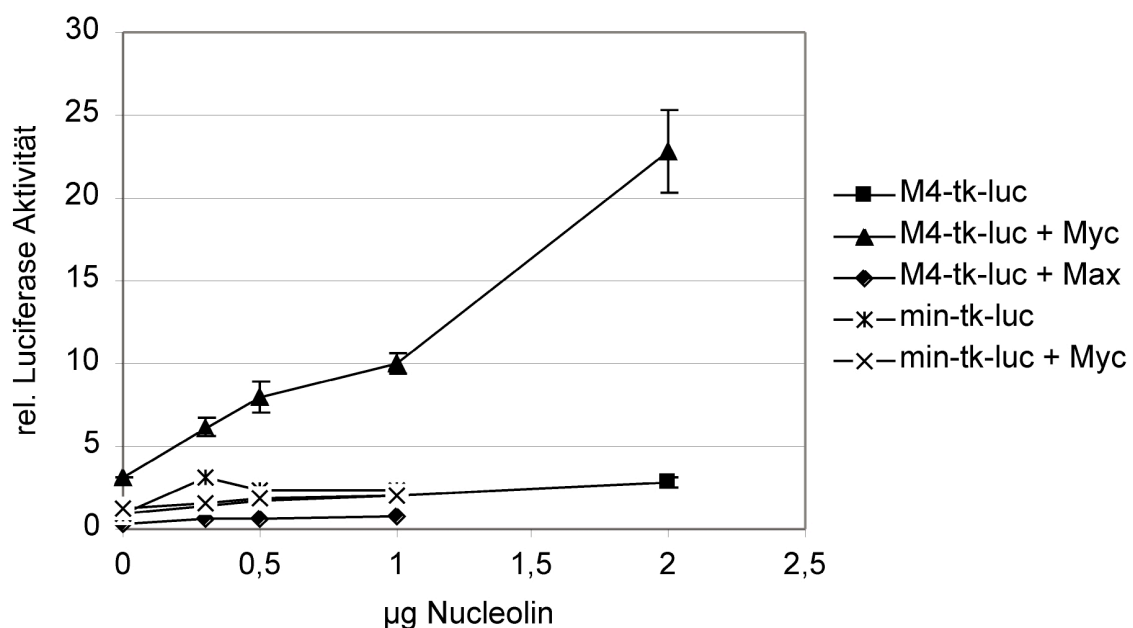


Abb. 19 Nucleolin stimuliert die c-Myc abhängige Transaktivierung. U2OS-Zellen wurden mit 2 µg min-tk-luc bzw. M4-tk-luc Luziferase-Reporterplasmiden und 1 µg pCMV-c-Myc bzw. pSP-Max p22 und steigenden Mengen pEV-HA-Nucleolin wie angegeben transfiziert. Die Aktivität der Reporter in Abwesenheit von kotransfiziertem c-Myc, Max oder Nucleolin wurde gleich eins gesetzt.

Nucleolin wurde von Ying *et al.* (2000) als Repressor von c-Myb und A-Myb beschrieben. Um die sich daraus ergebende duale Funktion von Nucleolin als Aktivator und Repressor zu untersuchen, wurde der Einfluss von Nucleolin auf die c-Myc- und c-Myb-abhängige

Transaktivierung verglichen. Dabei zeigte sich, dass Nucleolin auch die c-Myb-abhängige Transaktivierung stimuliert. Diese fällt im Vergleich zu c-Myc aber deutlich schwächer aus und steht damit im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ying *et al.* (2000).

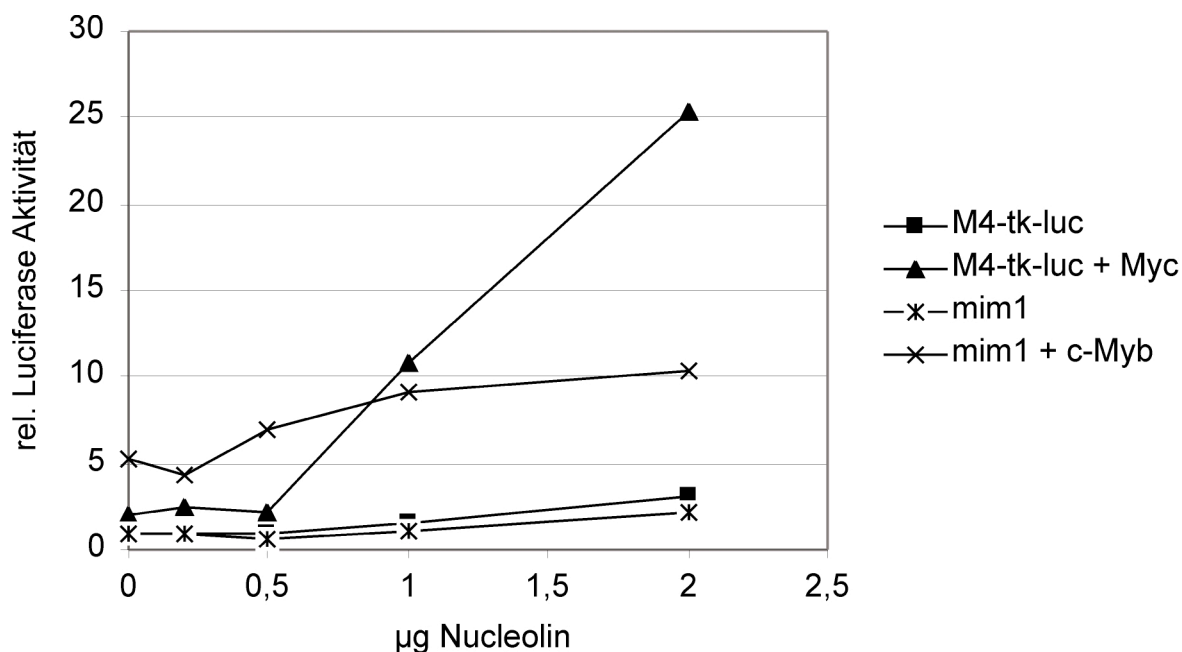


Abb. 20 Nucleolin stimuliert die c-Myb abhängige Transaktivierung. U2OS-Zellen wurden mit 2 µg M4-tk-luc (c-Myc-Reporter) bzw. mim-luc (c-Myb-Reporter) Luziferase-Reporterplasmiden und 1 µg pCMV-c-Myc bzw. pCMV-c-Myb und steigenden Mengen pEV-HA-Nucleolin wie angegeben transfiziert. Die Aktivität der beiden Reporter in Abwesenheit von c-Myc, c-Myb und Nucleolin wurde gleich eins gesetzt.

Bei den Untersuchungen zur *in vivo* Interaktion von c-Myc mit Nucleolin wurde eine Interaktion zwischen Nucleolin und hASH2 gefunden. Dabei stellt sich die Frage, ob beide Faktoren gleichzeitig an c-Myc binden und wie sie die Funktion von c-Myc beeinflussen. Da Nucleolin die Transaktivierung von c-Myc stimuliert, liegt es nahe, den Einfluss von hASH2 auf diese Wechselwirkung zu untersuchen. Dazu wurden c-Myc und Nucleolin mit steigenden Mengen hASH2 in U2OS-Zellen kotransfiziert, um die Aktivität des M4-tk-luc Reporterplasmids zu messen. Nucleolin aktiviert die c-Myc Transaktivierung bei beiden eingesetzten Konzentrationen (0,5 und 1,0 µg) in gleicher Weise wie in den zuvor gezeigten Experimenten. hASH2 alleine ist erst bei einer Konzentration von 5 µg in der Lage, die c-Myc Transaktivierung schwach zu stimulieren. Die Kombination beider Faktoren zeigt, dass Nucleolin und hASH2 die c-Myc abhängige Transaktivierung kooperativ stimulieren.

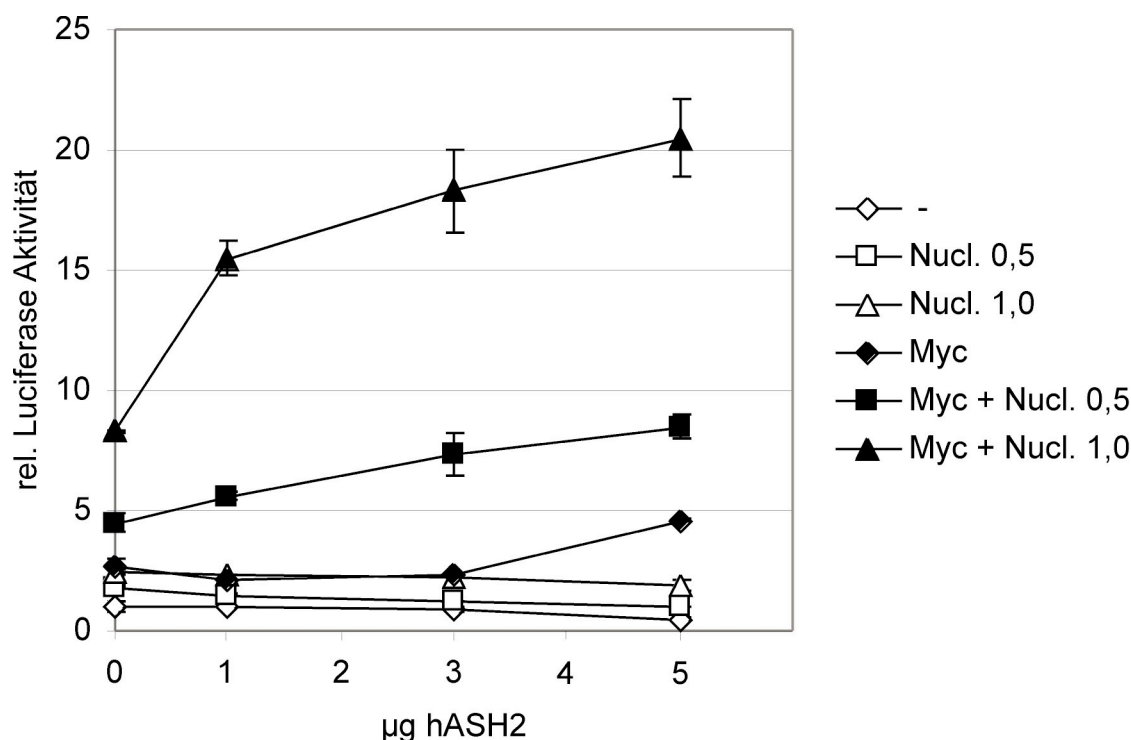


Abb. 21 Nucleolin und hASH2 stimulieren kooperativ die c-Myc abhängige Transaktivierung. U2OS-Zellen wurden mit 2 µg M4-tk-luc Luziferase-Reporterplasmide, 1 µg pCMV-Myc, und 0,5 bzw. 1 µg pEV-HA-Nucleolin und 1, 3 und 5 µg pCMV-hASH2 wie angegeben transfiziert. Die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von c-Myc, hASH2 und Nucleolin wurde gleich eins gesetzt.

3.5 Interaktion von c-Myc mit dem CREB-Binding-Protein (CBP)

3.5.1 CREB-Binding-Protein (CBP)

CBP und das homologe Protein p300 sind große kernständige Proteine und gehören zur Gruppe der transkriptionellen Koaktivatoren, die Histonacetyltransferaseaktivität besitzen. Durch ihre Interaktion mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren spielen sie eine zentrale Rolle bei der Koordination und Integration unterschiedlichster Signale auf transkriptioneller Ebene. Durch diese Funktion sind sie an der Regulation vieler biologischer Prozesse wie Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Giordano und Avantaggiati, 1999).

Das CREB-bindende-Protein (CBP) wurde ursprünglich als Koaktivator des Transkriptionsfaktors CREB isoliert (Chrivia *et al.*, 1993). Das homologe Protein p300 wurde durch die Interaktion mit dem adenoviralen Protein E1A identifiziert (Eckner *et al.*, 1994). Beide Proteine sind über 2400 Aminosäuren lang und zu 63% identisch. Größere Homologien werden jedoch in funktionellen Domänen der beiden Proteine gefunden (Arany *et al.*, 1994). Zu diesen Domänen gehören eine Bromodomäne, drei Zink-Finger

(CH1, CH2 und CH3) eine KIX-Domäne und die zentrale Histonacetyltransferasedomäne. Die CH1-, CH3- und KIX-Domänen sind Bindungsstellen für die unterschiedlichsten mit CBP/p300-interagierenden Faktoren (siehe Abb. 22). Kristallographische Untersuchungen über die Bromodomäne des Koaktivators P/CAF und des TBP-assoziierten Faktors TAF_{II}250 deuten darauf hin, dass die Bromodomäne acetylierte Aminosäurereste der Histone erkennt (Dhalluin *et al.*, 1999; Jacobson *et al.*, 2000). Für p300 konnte gezeigt werden, dass es über die Bromodomäne in der Lage ist Chromatin zu binden und mit der acetylierten Form des muskelspezifischen Transkriptionsfaktors MyoD interagiert (Polesskaya *et al.*, 2001). Als Substrate der Histonacetyltransferasedomäne wurden zuerst die N-terminalen Enden der vier Core-Histone identifiziert, inzwischen konnte aber auch eine wachsende Zahl an Nicht-Histon-Proteinen als Substrate identifiziert werden (Sternier und Berger, 2000; Roth *et al.*, 2001).

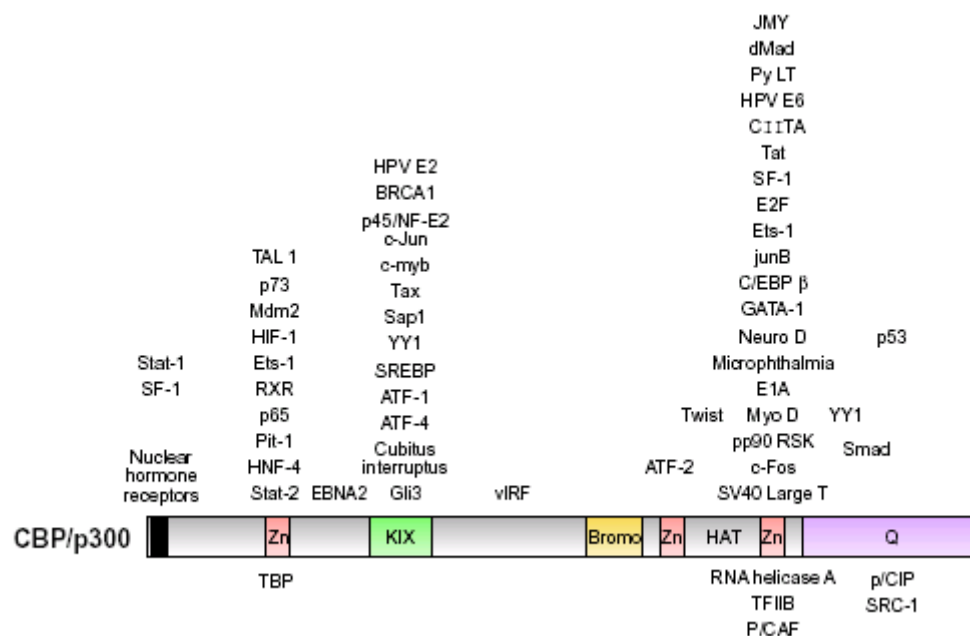


Abb. 22 CBP/p300 Organisation und Interaktionspartner. CBP/p300 assoziierte Transkriptionsfaktoren sind auf der Oberseite dargestellt, generelle Transkriptionsfaktoren und Histonacetyltransferasen auf der Unterseite. Die Zn-Finger CH1, CH2 und CH3 (Zn), die KIX-Domäne, die Bromodomäne (Bromo), HAT-Domäne und eine Glutaminreiche Domäne (Q) sind gekennzeichnet (Vo und Goodman, 2001).

CBP/p300 interagiert mit einer Vielzahl transkriptionsregulatorischer Faktoren (siehe Abb. 22). Den überwiegenden Anteil bilden DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, aber auch Koaktivatoren und Histonacetyltransferasen, sowie generelle Transkriptionsfaktoren und auch die RNA-Polymerase II binden an CBP/p300 (Giordano und Avantaggiati, 1999; Goodman und Smolik, 2000). Dies verdeutlicht die Funktion von CBP/p300 als ein nukleäres Adaptermolekül (Janknecht und Hunter, 1996). Durch die gleichzeitige Interaktion von CBP/p300 mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und Untereinheiten der basalen Transkriptionsmaschinerie besitzt CBP/p300 eine brückenbildende Funktion,

die zur Weiterleitung des transkriptionsregulatorischen Stimulus dient (Chan und La Thangue, 2001).

Durch diese brückenbildende Funktion kann es bei gleichzeitiger Interaktion mit weiteren Faktoren an einem Promotor zu einem transkriptionellen Synergieeffekt kommen. Dabei kann CBP/p300 die Zusammenlagerung verschiedener Proteine zu einem Komplex initiieren. CBP/p300 wirkt als ein Gerüst, durch das die Konzentration von Faktoren am Zielpromotor erhöht wird und Protein-Protein- und Protei-DNA-Interaktionen ermöglicht werden (Chan und La Thangue, 2001).

Ein gut charakterisiertes Beispiel für die Vermittlung eines Synergieeffektes durch CBP/p300 ist der virusinduzierbare Interferon- α Promotor (IFN- α). Hier dient CBP/p300 zur Bildung eines Multiproteinkomplexes, dem sogenannten Enhanceosome, indem es die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren und des RNA-Polymerase-II-Komplexes in kooperativer Weise koordiniert (Kim *et al.*, 1998; Wathelet *et al.*, 1998). Dadurch gewährleistet CBP/p300 die rasche Bildung eines Präinitiations- und Reinitiationskomplexes, was zu einer hohen Transkriptionsrate führt (Yie *et al.*, 1999).

Durch die Bindung von CBP/p300 dirigieren Transkriptionsfaktoren neben der brücken- und gerüstbildenden Funktion auch Histonacetyltransferaseaktivität zu Nukleosomen in Zielpromotoren. Allerdings konnte bisher *in vivo* nicht geklärt werden, ob die CBP/p300-Acetyltransferaseaktivität direkt nukleosomale Histone acetyliert und Transkription durch *Chromatin-Remodeling* reguliert. Obwohl CBP/p300 alle vier Core-Histone *in vitro* acetyliert, ist nicht klar, ob Histone auch *in vivo* das bevorzugte Ziel der CBP/p300-Acetyltransferaseaktivität sind und welche Lysinreste der Histone acetyliert werden (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996).

Erste Hinweise, dass die Acetylierung von Histonen durch CBP/p300 für die Transaktivierung von Bedeutung ist, konnte mittels *in vitro* Transkriptionsexperimenten gezeigt werden. Die CBP/p300 vermittelte Transaktivierung durch den Estrogenrezeptor (ER), dem viralen Tax-Protein und einem synthetischen Transkriptionsfaktor aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und der VP16-Transaktivierungsdomäne (Gal4-VP16) ist auf rekonstituiertem Chromatin von der CBP/p300-Acetyltransferaseaktivität abhängig und führt zur Acetylierung von Histonen im Promotorbereich (Kraus *et al.*, 1999; Kundu *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Georges *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass die enzymatische Funktion von CBP/p300 essentiell im Kontext einer Chromatinstruktur ist, da für die Transkription auf nackter DNA die Histonacetylierung nicht notwendig ist.

In einem weiteren *in vitro* Transkriptionsansatz konnte gezeigt werden, dass die Acetylierung von Histonen durch p300 den Transfer des Histondimers H2A/H2B vom Nukleosom auf das Chaperon Protein NAP1 ermöglicht (Ito *et al.*, 2000). Ob die H2A/H2B Freisetzung durch deren direkte Acetylierung oder durch die Acetylierung anderer nukleosomaler Komponenten erfolgt, muss noch geklärt werden.

Für eine wachsende Zahl an Transkriptionsfaktoren, wie p53, E2F-1, E2F-2 und E2F-3, Myb, MyoD, GATA-1, EKLF, HNF-4, NF-Y, TFIIE, TFIIIF und HMGI(Y) konnte gezeigt werden, dass sie durch CBP/p300 acetyliert werden (Kouzarides, 2000; Sterner und Berger, 2000). Diese Acetylierung von Transkriptionsfaktoren stellt einen weiteren Mechanismus der Genregulation durch CBP/p300 dar, der in vielen Fällen zur Stimulation der DNA-Bindung und Transkription führt. Durch die Acetylierung von p53 an seinem C-Terminus wird eine konformationelle Veränderung verursacht, wodurch die reprimierende Wirkung des C-Terminus auf die DNA-Bindung von p53 aufgehoben wird (Gu und Roeder, 1997). Die Acetylierung kann aber auch Protein-Protein-Wechselwirkungen regulieren und reprimierend auf die Transkription wirken. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass durch die Acetylierung des *high mobility proteins* LEF/TCF der *wingless* Signaltransduktionsweg inhibiert wird. Durch die Acetylierung von LEF/TCF wird die Bindung zu Armadillo inhibiert, was zur Runterregulation der Transkription führt (Waltzer und Bienz, 1998).

Durch seine vielfältigen Interaktionen ist CBP/p300 an vielen Signaltransduktionswegen beteiligt, allerdings ist es im Zellkern nur in limitierender Menge vorhanden. Aufgrund dessen wurde ein Modell vorgeschlagen, dass eine koordinierte Genantwort auf ein Signal durch eine Neuverteilung von CBP/p300 zwischen verschiedenen Klassen von Faktoren erreicht wird (Kamei *et al.*, 1996). Die Rekrutierung von CBP/p300 durch nukleäre Hormonrezeptoren inhibiert die AP1-Transaktivierung (Kamei *et al.*, 1996). In einem anderen Modell reprimiert die p53-Überexpression TRE-regulierte Promotoren. Diese Inhibition beruht auf der physiologischen Interaktion zwischen p53 und p300 (Avantaggiati *et al.*, 1997). Dies deutet darauf hin, dass verschiedene Signaltransduktionswege um eine limitierte Menge an CBP/p300 kompetieren. Daraus stellt sich die Frage, wie wird die Aktivität von CBP/p300 in einer Zelle reguliert und zugeordnet. Dabei scheinen post-translationale Modifikationen und die Konkurrenz um Protein-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Reihe von Studien konnte für verschiedene Transkriptionsfaktoren zeigen, dass deren Phosphorylierung ein Erkennungssignal für die Rekrutierung von CBP/p300 ist. Dies konnte für CREB, c-Jun, p53, Smad3, ATF2 NF- κ B und E2F-5 gezeigt werden (Giordano und Avantaggiati, 1999; Morris *et al.*, 2000).

Eine Regulation der CBP/p300 Phosphorylierung wurde schon in sehr frühen Studien beschrieben. Unterschiede im Phosphorylierungsstatus wurden beim Durchlaufen des Zellzykluses, beim Vergleich von differenzierten zu nicht-differenzierten Zellen und in verschiedenen Typen von transformierten Zelllinien festgestellt (Giordano und Avantaggiati, 1999). Allerdings ist die Regulation von CBP/p300 durch Phosphorylierung größtenteils noch nicht verstanden worden, da die meisten Phosphorylierungsstellen in CBP/p300 nie präzise bestimmt wurden und es zum Teil widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Auswirkung einer Phosphorylierung gibt.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass neben der Phosphorylierung auch die Methylierung einen regulatorischen Einfluss auf CBP/p300 hat. Die Histon-Methyltransferase CARM1 methyliert CBP/p300 nahe der KIX-Domäne, die für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor CREB verantwortlich ist. Die Methylierung führt zur Inhibition der Interaktion zwischen CBP/p300 und CREB und blockiert die CREB-abhängige Transkription. Auf der anderen Seite steigert CARM1 die Transaktivierung von kernständigen Hormonrezeptoren (Xu *et al.*, 2001). Diese rekrutieren nach Hormonstimulation über den Koaktivator p160 CBP/p300 und CARM1, deren Acetyltransferase bzw. Methyltransferase die Transkription durch Acetylierung und Methylierung von Histonen stimuliert (Chen *et al.*, 1999a; Chen *et al.*, 2000b; Xu *et al.*, 2001).

Neben der Frage nach der Regulation der interagierenden Bindungspartner, stellt sich auch die Frage nach der Regulation der Acetyltransferasedomäne. Ait-Si-Ali *et al.* (1998) konnten zeigen, dass die Acetyltransferaseaktivität von CBP während des Zellzykluses beim Übergang von der G1- in die S-Phase ihr Maximum erreicht. Des weiteren scheint die Phosphorylierung von CBP durch Cyclin E/CDK2 Komplexe die Acetyltransferaseaktivität zu stimulieren. Dieser stimulatorische Effekt wird auch durch das adenovirale Onkogen E1A verursacht (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). Zudem immunopräzipitiert rekombinantes E1A aus Zellextrakten CBP/p300, das in Acetyltransferase-Experimenten Histone sehr effizient acetyliert (Ogryzko *et al.*, 1996; Fax *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die CBP-Acetyltransferaseaktivität an der Regulation des Zellzykluses beteiligt ist und dass das virale Onkogen E1A das Signal durch die Cyclin E/CDK2 Phosphorylierung nachahmen kann. Das Bild stellt sich durch die Resultate zweier weiterer Studien jedoch komplizierter da. Diese Studien demonstrierten, dass rekombinantes E1A die Acetyltransferaseaktivität von p300 *in vitro* reprimieren kann (Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999). Dies steht im Kontrast zu der von Ait-Si-Ali *et al.* (1998) beschriebenen E1A-vermittelten Stimulation der Acetyltransferaseaktivität von CBP, und eröffnet die Möglichkeit, dass E1A p300 und CBP in unterschiedlicher Weise reguliert. Alternativ dazu könnten die eingesetzten Proteine bei den *in vitro* Acetylierungs-Experimenten um die Acetylierung kompetieren. Chakravarti *et al.* (1999) zeigen, dass E1A die Acetylierung von p53 inhibiert, es gleichzeitig aber zur Acetylierung von E1A kommt. Dies bedeutet, dass nicht die Acetyltransferaseaktivität inhibiert wird, sondern sich die Präferenz für das Substrat verschoben hat.

Auf biologischer Ebene scheint CBP/p300 gegenläufige Funktionen auszuüben. So wird CBB/p300 auf der einen Seite als Tumorsuppressor beschrieben, der an Apoptose und Differenzierung beteiligt ist. Auf der anderen Seite ist CBP/p300 essentiell für die Aktivierung vieler Onkogene. Ob CBP/p300 Apoptose oder Zellproliferation unterstützt, scheint stark vom Kontext abhängig zu sein.

Für die Funktion als Tumorsuppressor spielen mehrere Befunde eine wichtige Rolle. Die Funktion von CBP/p300 ist notwendig für die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, Keratinozyten und Myoblasten. Die viralen Onkogene großes T-Antigen, E6 und E1A induzieren durch die Bindung an CBP/p300 den Eintritt in den Zellzyklus. Gleichzeitig inhibieren die viralen Proteine die transkriptionelle Aktivität von CBP/p300 auf zahlreichen zellulären Enhancer- und Promotor-Elementen. Deletionen, Translokationen und Punktmutationen innerhalb des *p300* oder *cbp* Gens wurden in humanen Tumoren gefunden. So scheint in Analogie zu anderen Tumorsuppressoren die wachstumsinhibitorische Aktivität von CBP/p300 durch die Bindung viraler Onkogene oder durch genetische Veränderungen gestört zu werden (Giordano und Avantaggiati, 1999; Goodman und Smolik, 2000).

CBP/p300 kann aber auch einen positiven Einfluss auf Zellproliferation ausüben. Dies wird dadurch ersichtlich, dass das transkriptionelle Potential einer Reihe zellulärer Protoonkoproteine wie c-Fos, c-Jun, c-Myb, E2F-1 und E2F-5 durch die Interaktion mit CBP/p300 stimuliert wird (Goodman und Smolik, 2000). Daneben gibt es mehrere virale Onkogene, die nicht wie E1A und das große T-Antigen die Funktion von CBP/p300 inhibieren, sondern CBP/p300 für ihre transkriptionelle Aktivität benötigen. Zu diesen viralen Faktoren zählen das humane T-Zell-Leukämie-Virus Tax-Protein, das Kaposi-Sarkoma assoziierte Herpesvirus-Protein vIRF und das Epstein-Barr-Virus induzierte nukleäre Antigen EBVNA2 (Goodman und Smolik, 2000). Ein weiteres Indiz für den Einfluss von CBP/p300 auf Zellwachstum liefert die Untersuchung von *p300 knockout* Mäusen. Die *p300^{-/-}* Embryonen sind kleiner und besitzen Defekte bei der Zellproliferation. Primäre Fibroblasten aus den *p300^{-/-}* Embryonen wachsen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen langsamer und besitzen einen Phänotyp, der an gealterte Zellen erinnert (Yao *et al.*, 1998).

3.5.2 *In vivo* Interaktion und Charakterisierung der Interaktionsdomänen

Bei Untersuchungen zu c-Myc-Interaktionspartnern wurde bei Koimmunpräzipitationen ein CBP-spezifischer Antikörper in Kontrollversuchen eingesetzt. Dabei immunpräzipitierte CBP überraschenderweise zusammen mit c-Myc. Diese Interaktion konnte in mehreren unabhängigen Experimenten in HEK293-Zellen reproduziert werden.

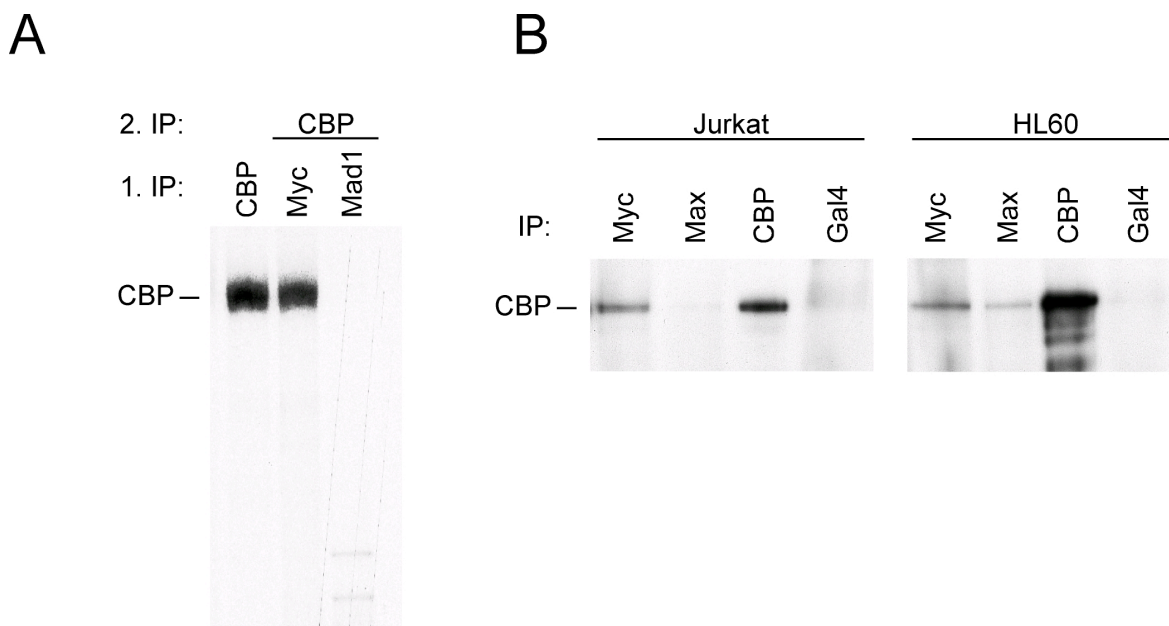


Abb. 23 Ko-Immunpräzipitation von c-Myc und CBP. (A) HEK293-Zellen wurden nach der *in vivo* Markierung mit [35 S]-Methionin/Cystein in F-Puffer lysiert und mit den angegebenen Antikörpern (\square -Myc 6A10, \square -Mad1 5C9) immunpräzipitiert. An Myc bzw. Mad1 gebundene Proteine wurden mit AB-Puffer freigesetzt und mit dem CBP-spezifischen Antiserum C-20 repräzipitiert. Für eine direkte CBP Immunpräzipitation wurden die Zellen nach *in vivo* Markierung in AB-Puffer lysiert und 1/10 des Lysats mit dem polyklonalen CBP Antiserum C-20 immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden unter hochstringenten Bedingungen gewaschen (2x mit RIPA-, 1x mit HS- und 1x mit RIPA-Puffer), über SDS-PAGE aufgetrennt und eine Autoradiografie durchgeführt. (B) 1×10^7 Jurkat- und 5×10^7 HL60-Zellen wurden in F-Puffer lysiert und mit den angegebenen Antikörpern (\square -Myc N262, \square -Max C-17, \square -CBP AC238, \square -Gal4) immunpräzipitiert, 3 x mit F-Puffer gewaschen und über SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde mit dem Antiserum C-20 im Immunoblot immunpräzipitiertes CBP detektiert.

Dafür wurden die Zellen mit [35 S]-Methionin/Cystein markiert und Immunpräzipitationen aus Gesamtzell-Lysaten durchgeführt. Endogenes CBP ließ sich sowohl in der direkten Immunpräzipitation mit einem CBP-Antikörper als auch in der indirekten Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen c-Myc nachweisen. In der Kontroll-Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper gegen Mad1 konnte kein CBP nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass endogenes CBP und c-Myc miteinander interagieren.

Dieses Ergebnis konnte auch in Jurkat- und HL60-Zellen bestätigt werden. Dazu wurden aus 1×10^7 Jurkat- bzw. 5×10^7 HL60-Zellen Lysate hergestellt und in Immunpräzipitationen eingesetzt. CBP konnte hier sowohl mit einem c-Myc- als auch Max-Antikörper immunpräzipitiert werden. Dabei ist die Immunpräzipitation von CBP mit dem Max-Antikörper deutlich schwächer als mit dem c-Myc-Antikörper. Dies ist mit der Interpretation konsistent, dass die Wechselwirkung von CBP mit Max über c-Myc vermittelt wird. In Jurkat-Zellen ist zudem die Interaktion zwischen CBP und Max nur schwer zu erkennen. Dies mag an der geringeren Zahl eingesetzter Zellen liegen. Dies spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Menge an direkt immunpräzipitiertem CBP wider.

In einem sogenannten Säugerzellen-zwei-Hybrid-Experiment konnte die *in vivo* Interaktion unabhängig demonstriert werden. Hierbei werden ähnlich wie beim Hefe-zwei-Hybrid-Experiment die Proteine, von denen untersucht werden soll, ob sie miteinander interagieren, mit einer DNA-bindenden bzw. Transaktivierungsdomäne versehen und die Aktivierung eines Reporterplasmids gemessen.

CBP wurde mit der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 fusioniert (Gal-CBP), c-Myc mit der Transaktivierungsdomäne des viralen Proteins VP16 (c-Myc-VP16). Die Expression von c-Myc-VP16 oder Gal-CBP allein bewirkt eine 2 bis 4fache Aktivierung des Reporters Gal4-mintk-luc in U2OS-Zellen. Die Koexpression von VP16 mit Gal-CBP führt nicht zu einer Verstärkung der Luciferase-Aktivität. Bei der Koexpression von Gal-CBP mit c-Myc-VP16 wird hingegen die Transaktivierung um das 40fache stimuliert.

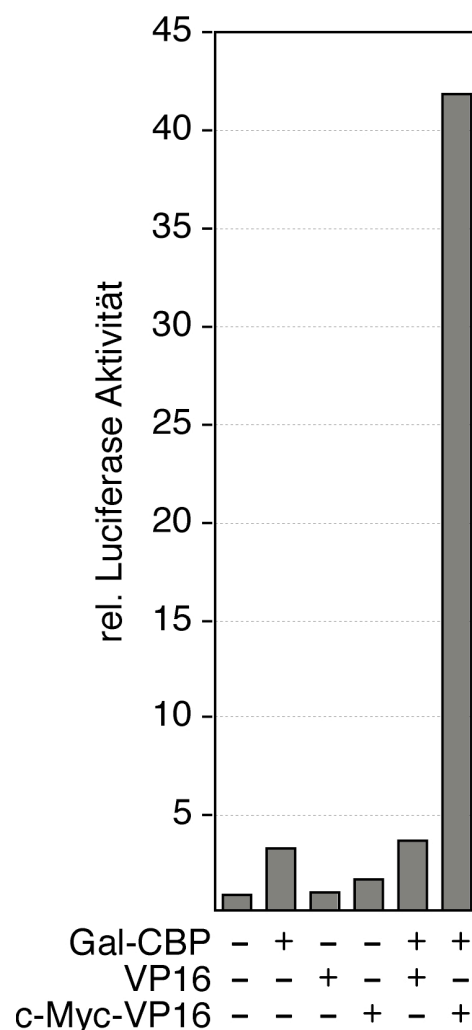


Abb. 24 Säugerzellen-zwei-Hybrid. U2OS-Zellen wurden mit 2 μg (Gal4)₄-tk-luc Luciferase-Reporterplasmid und 50 ng pVR1012-Gal4-CBP, 2 μg pSV-flag-VP16, 2 μg pSV-flag-c-Myc-VP16 wie angegeben transfiziert. Die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von Gal-CBP, VP16 oder c-Myc-VP16 wurde gleich eins gesetzt.

Zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen c-Myc und CBP und zur Kartierung der Interaktionsdomänen beider Proteine wurden *GST-Pulldown* Experimente durchgeführt. CBP-Fragmente, die das ganze Protein abdecken, wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und zusammen mit *in vitro*-translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem c-Myc in *GST-Pulldown* Experimenten eingesetzt. c-Myc bindet direkt an CBP, wobei die Bindung an mehreren Domänen von CBP möglich ist. Eine starke Bindung ist zwischen c-Myc und dem CBP-Fragment mit den Aminosäuren 451-721 zu sehen, gefolgt von dem Fragment mit den Aminosäuren 1-451. Eine sehr schwache Bindung mit c-Myc zeigen die Fragmente 1099-1460 und 1891-2441.

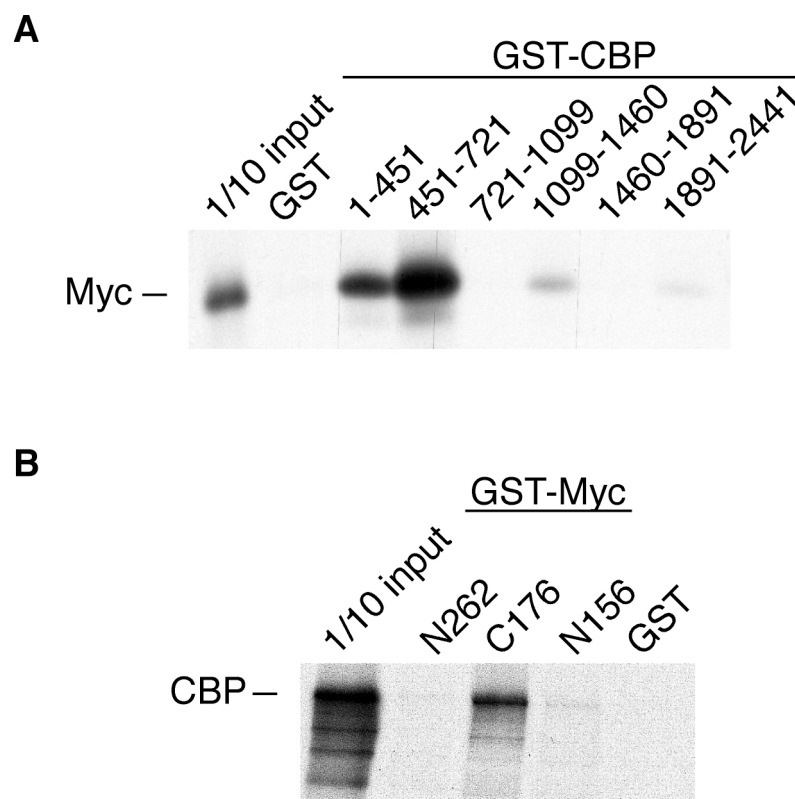


Abb. 25 Kartierung der Interaktionsdomänen in c-Myc und CBP. (A) CBP-Fragmente wurden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, gereinigt und in gleichen Mengen zusammen mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem c-Myc in *GST-Pulldown*-Experimenten eingesetzt. Gebundene Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. (B) Wie in (A) nur wurden diesmal c-Myc Fragmente als GST-Fusionsproteine mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem CBP in *GST-Pulldown* Experimenten eingesetzt

Zur Kartierung der c-Myc Interaktionsdomäne wurden die GST-Myc-Fragmente N262, N156 und C176 zusammen mit *in vitro*-translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem CBP eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass CBP den C-terminalen Bereich von c-Myc bindet.

3.5.3 CBP stimuliert die c-Myc abhängige Transaktivierung

CBP bindet und kooperiert mit einer Vielzahl von kernständigen Faktoren um Transkription zu stimulieren (Goodman und Smolik, 2000). Daher wurde der Einfluß von CBP auf die c-Myc-abhängige Transaktivierung in transienten Transfektionen untersucht. Dazu wurde das M4-tk-luc-Luziferase-Reporterplasmid zusammen mit c-Myc und CBP oder p300 in U2OS-Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente das Reporterplasmid min-tk-luc ohne c-Myc-Bindungsstellen.

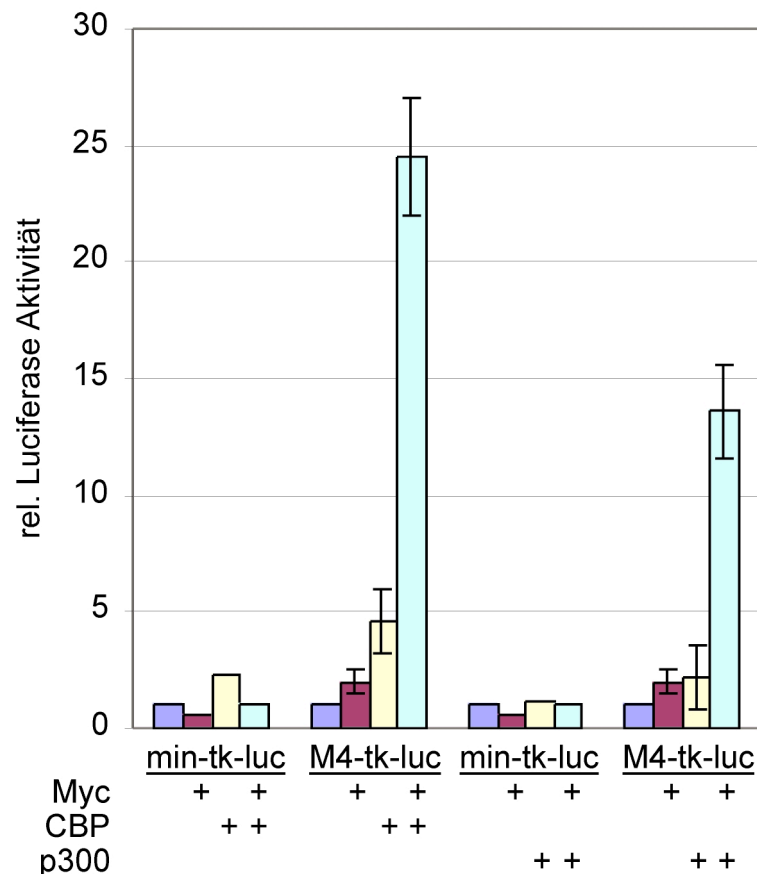


Abb. 26 CBP stimuliert die c-Myc-abhängige Transaktivierung. U2OS-Zellen wurden mit 2 µg min-tk-luc bzw. M4-tk-luc Luziferase-Reporterplasmiden und 1 µg pCMV-c-Myc, 5 µg pVR1012-Gal4-CBP, 5 µg pVR1012-Gal4-p300 wie angegeben transfiziert. Die Aktivität der Reporters in Abwesenheit von c-Myc, CBP oder p300 wurde gleich eins gesetzt.

Wie Abb. 26 zeigt, stimuliert CBP die c-Myc-abhängige Transaktivierung stark. Diese Stimulation erfolgt spezifisch über die c-Myc DNA-Bindung, da das Reporterplasmid min-tk-luc ohne c-Myc-DNA-Bindungsstellen nicht durch c-Myc und CBP aktivierbar ist. Auch das CBP-homologe Protein p300 kooperiert mit c-Myc, wenn auch in geringerem Maße.

3.5.4 Acetylierung von c-Myc durch CBP

CBP besitzt Histoneacetyltransferaseaktivität, durch die eine Reihe von Promotoren stimuliert werden. Neben der Fähigkeit Histone zu acetylieren, ist CBP aber auch in der Lage Nicht-Histon-Proteine wie Transkriptionsfaktoren zu acetylieren. Die Acetylierung von p53 erhöht dessen Fähigkeit, DNA zu binden und Transkription zu stimulieren (Gu und Roeder, 1997). Die Acetylierung von HMGI/Y inhibiert dessen DNA-Bindung, wodurch die Dauer des aktiven Transkriptionssignals limitiert wird (Munshi *et al.*, 2001). Daher wurde *in vitro* mit rekombinanten Proteinen die Acetylierung von c-Myc durch CBP untersucht.

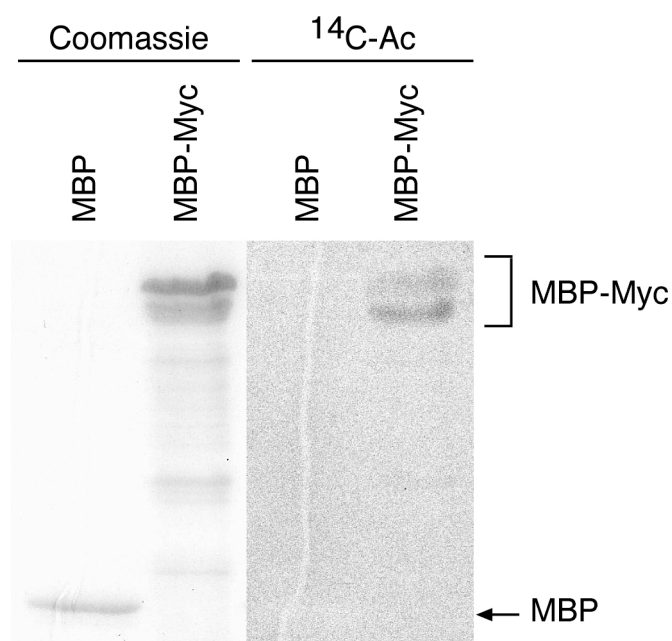


Abb. 27 c-Myc wird *in vitro* von CBP acetyliert. In *E. coli* exprimiertes und gereinigtes MBP und MBP-Myc wurde zusammen mit [^{14}C]-Acetyl-CoA in Gegenwart von gereinigtem, baculoviral exprimiertem HIS-CBP inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie Blau (links) und durch Autoradiographie (rechts) detektiert.

Dazu wurde das Maltose-bindende-Protein (MBP) mit c-Myc als ein MBP-c-Myc-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und zusammen mit rekombinantem, gereinigtem baculoviral exprimiertem His-CBP in Gegenwart von [^{14}C]-Acetyl-CoA inkubiert. Wie Abb. 27 zeigt, wird MBP-Myc von CBP *in vitro* spezifisch acetyliert. Das als Kontrolle in gleicher molarer Menge eingesetzte MBP wird hingegen nicht acetyliert. MBP-Myc ist sowohl im Coomassie gefärbten Gel als auch in der Autoradiographie als Doppelbande zu erkennen. Warum die untere Bande besser acetyliert wird, ist unbekannt. Es handelt sich bei der schneller migrierenden Bande um ein C-terminales Degradationsprodukt von MBP-Myc. Die Bande wird von dem monoklonalen Antikörper C-33 (Santa Cruz), der die N-

terminale Transaktivierungsdomäne bindet, und von einem anti-MBP Antikörper erkannt (Kitaura *et al.*, 2000; Takayama *et al.*, 2000). Der monoklonale Antikörper 9E10, der die Aminosäuren 410 bis 419 im Leucin-Zipper am C-terminalen Ende von c-Myc bindet, erkennt diese Bande hingegen nicht (Kitaura *et al.*, 2000; Abb. 29).

Um einen Zugang zur physiologischen Relevanz der c-Myc Acetylierung zu bekommen, wurde die *in vivo* Acetylierung von c-Myc untersucht. Dazu wurde ein Flag-Epitop getaggt c-Myc und Myc-Mutanten mit Deletion von MB I und MB II (Δ MB I, Δ MB II) in COS7-Zellen überexprimiert. Die überexprimierten Proteine wurden mit einem Flag-Antikörper immunpräzipitiert und die Acetylierung anschließend mittels eines Acetyl-Lysin-spezifischen Antikörpers im Immunoblot nachgewiesen. Dabei konnte bei allen drei c-Myc Proteinen eine *in vivo* Acetylierung nachgewiesen werden. Allerdings ist bei der Mutante Δ MB I, bei leicht erhöhter Expression gegenüber Myc wildtyp und Δ MB II eine geringere Acetylierung zu beobachten (siehe Input Abb. 28).

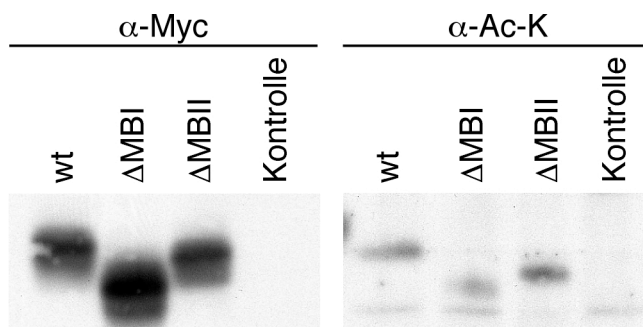


Abb. 28 c-Myc wird *in vivo* acetyliert. COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren pcDNA3-Flag-c-Myc, pcDNA3-Flag-c-Myc Δ MBI, pcDNA3-Flag-c-Myc Δ MBII transfiziert und in F-Puffer lysiert. Anschließend wurden die Lysate mit Δ -Flag Antikörper M2 immunpräzipitiert und im Immunoblot mit dem Δ -Acetyl-Lysin Antikörper auf Acetylierung untersucht.

Die Spezifität des Acetyl-Lysin Antikörpers gegen acetyliertes c-Myc wurde mit *in vitro* acetyliertem MBP-Myc demonstriert. Dabei wies der Acetyl-Lysin Antikörper nur acetyliertes MBP-Myc nach. Der äquivalente Einsatz von acetyliertem und nicht acetyliertem MBP-Myc wurde anschließend mit dem Myc-spezifischen Antikörper 9E10 gezeigt.

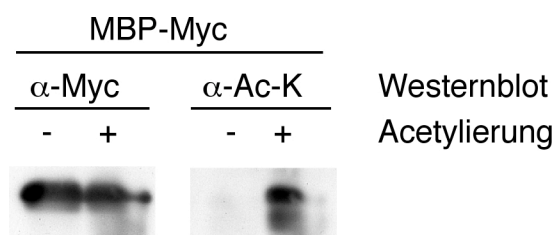


Abb. 29 Der Acetyl-Lysin Antikörper erkennt spezifisch acetyliertes c-Myc. Nicht acetyliertes und mit baculoviralem HIS-CBP acetyliertes MBP-Myc wurde im Immunoblot mit dem Δ -Acetyl-Lysin Antikörper und dem Δ -Myc Antikörper 9E10 untersucht.

Um zu untersuchen, ob CBP *in vivo* für die Acetylierung von c-Myc verantwortlich ist, wurde Flag-c-Myc allein und in Gegenwart von CBP, einer dominant negativen CBP-Mutante ohne Histonacetyltransferase-Aktivität (CBP Δ HAT) und Cyclin E/CDK2 in COS7-Zellen überexprimiert. Cyclin E/CDK2 wurde eingesetzt, da es laut Ait Si Ali *et al.* (1998) die HAT-Aktivität von CBP stimulieren soll. Nach Immunpräzipitation wurde die Acetylierung von c-Myc mit dem Acetyl-Lysin spezifischen Antikörper nachgewiesen.

In Gegenwart von CBP konnte eine deutliche Zunahme der Acetylierung von c-Myc nachgewiesen werden. In Anwesenheit von CBP Δ HAT war keine Acetylierung zu erkennen. Dies läßt darauf schließen, dass die Acetylierung von c-Myc von CBP abhängig ist. Das fehlende Acetylierungssignal in der Spur, in der c-Myc alleine exprimiert wurde, wurde durch die geringeren Menge an transfiziertem c-Myc im Gegensatz zu Abb. 27 verursacht.

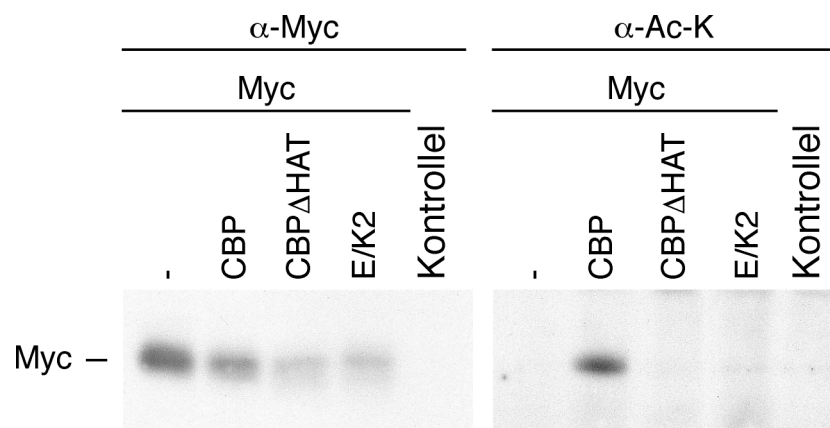


Abb. 30 Einfluss von CBP auf die *in vivo* Acetylierung von c-Myc. COS7-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmiden pcDNA3-Flag-c-Myc, pVR1012-Gal4-CBP, pVR1012-Gal4-CBP Δ HAT, pCMV-Cyclin E und pCMV-CDK2 wie angegeben transfiziert. Die Zellen wurden in F-Puffer lysiert, mit dem \square -Flag Antikörper M2 immupräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Immunoblot wurde mit dem \square -Acetyl-Lysin Antikörper die Acetylierung untersucht.

Um den Einfluss der Acetyltransferase-Aktivität von CBP auf die c-Myc-abhängige Transaktivierung zu untersuchen, wurde die Aktivierung des M4-tk-luc Reporterplasmids durch c-Myc in Abhängigkeit von CBP und CBP Δ HAT untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Deletion der Acetyltransferase-Aktivität zu einer Halbierung der Transaktivierung durch c-Myc und CBP führt. Diese Abnahme der Transaktivierung beruht nicht auf Unterschieden in der Expression von CBP und CBP Δ HAT, da deren Expression gleich stark war (Abb. 31 B).

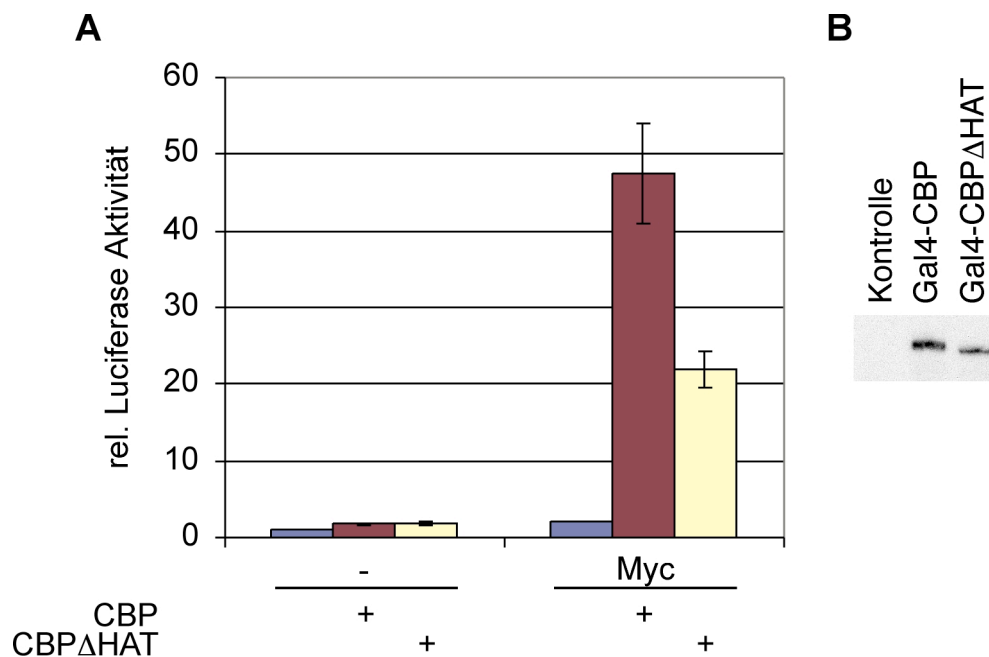


Abb. 31 Die CBP-Acetyltransferase-Domäne stimuliert die Myc Transaktivierung. (A) U2OS-Zellen wurden mit 2 μ g M4-tk-luc Luziferase-Reporterplasmiden und 1 μ g pCMV-c-Myc, 5 μ g pVR1012-Gal4-CBP, 5 μ g pVR1012-Gal4-CBP Δ HAT wie angegeben transfiziert. Die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von c-Myc, CBP und CBP Δ HAT wurde gleich eins gesetzt. (B) COS7-Zellen wurden mit pVR1012-Gal4-CBP, pVR1012-Gal4-CBP Δ HAT transfiziert, in F-Puffer lysiert und im Immunoblot auf die Expression von CBP und CBP Δ HAT mit dem \square -Gal4 DBD Antikörper untersucht.

3.5.5 Einfluss von Cyclin E/CDK2 auf die Myc Transaktivierung

Ait-Si-Ali *et al.* (1998) konnte zeigen, dass die CBP-Acetyltransferase-Aktivität *in vitro* durch CyclinE/CDK2 stimuliert wird. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass am G1/S-Phasenübergang die CBP-Acetyltransferase-Aktivität parallel zur Cyclin E/CDK2-Kinase-Aktivität steigt. Durch den Block der Cyclin E/CDK2 Kinase mit Roscovitin wird die Acetyltransferase-Aktivität inhibiert. Aufgrund dieser Beobachtung und der Fähigkeit von CBP, die c-Myc Transaktivierung acetyltransferaseabhängig zu stimulieren und der zellzyklusabhängigen Regulation der CBP-Acetyltransferase-Aktivität, stellte sich die Frage, ob Cyclin E/CDK2 mit c-Myc und CBP kooperiert.

Dazu wurden die c-Myc vermittelte Transaktivierung auf dem Reporterplasmid M4-tk-luc in Abhängigkeit von Cyclin E/CDK2 und der Acetyltransferase-Domäne von CBP untersucht. Es wurde deutlich, dass Cyclin E/CDK2 die c-Myc-vermittelte Transaktivierung nur geringfügig stimulieren kann. Bei der durch c-Myc- und CBP-vermittelten Transaktivierung zeigt Cyclin E/CDK2 einen sehr deutlichen Effekt, der zu einer Verdoppelung der Aktivierung führt. Die durch die CBP Δ HAT-Mutante vermittelte Transaktivierung wird durch Cyclin E/CDK2 stimuliert, sie führt ebenfalls zu einer Verdoppelung der Transaktivierung.

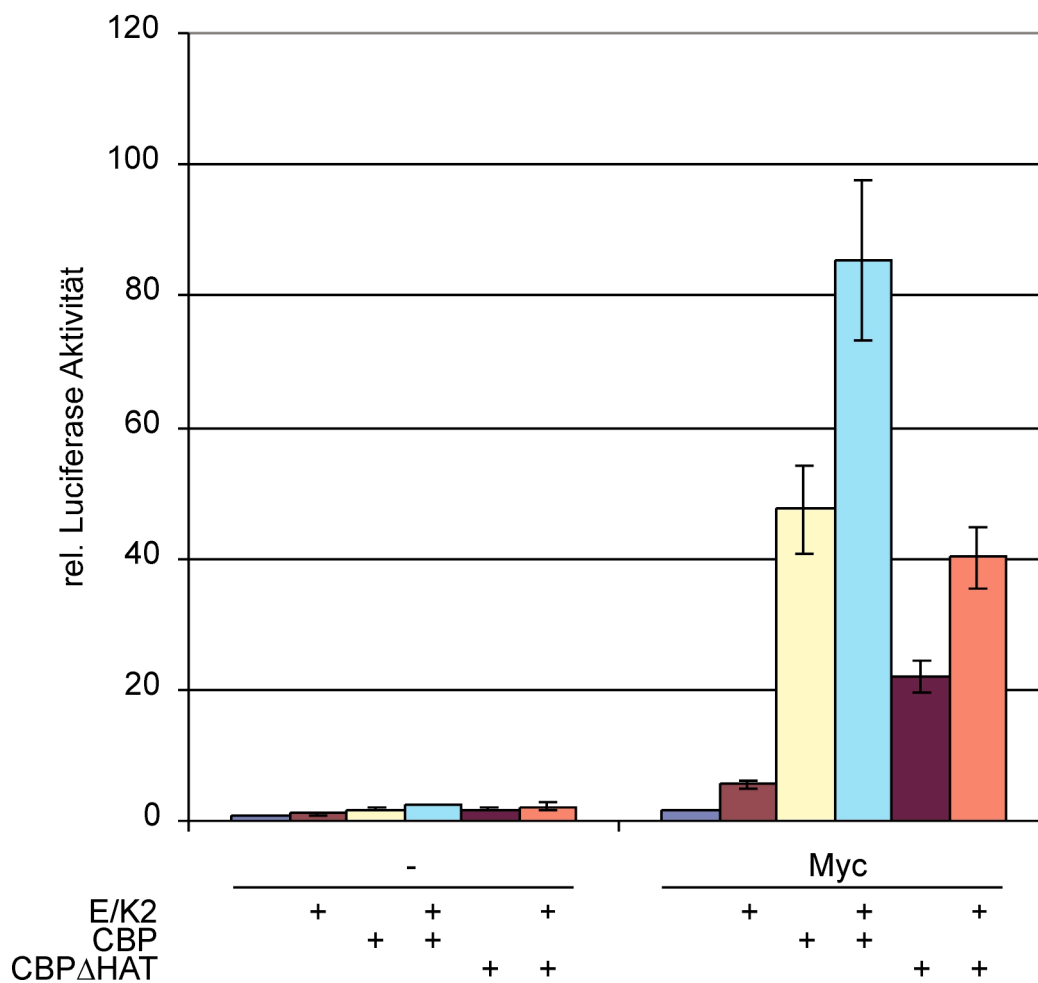


Abb. 32 Cyclin E/CDK2 stimuliert die c-Myc-Transaktivierung. U2OS-Zellen wurden mit 2 μ g M4-tk-luc Luziferase-Reporterplasmid und 1 μ g pCMV-c-Myc, 5 μ g pVR1012-Gal4-CBP, 5 μ g pVR1012-Gal4-CBP Δ HAT, 0,5 μ g pCMV-Cyclin E und pCMV-CDK2 wie angegeben transfiziert. Die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von c-Myc, CBP, CBP Δ HAT und Cyclin E/CDK2 wurde gleich eins gesetzt.

Aufgrund der oben gemachten Beobachtungen scheint der Cyclin E/CDK2-Effekt nicht ausschließlich über die Stimulation der CBP-Acetyltransferase-Aktivität zu laufen, sondern möglicherweise über einen von CBP-unabhängigen Mechanismus. Ein möglicher Mechanismus kann über Phosphorylierung von c-Myc durch Cyclin E/CDK2 vermittelt werden. Zumal c-Myc schon als Substrat für Cyclin A/CDK2 beschrieben wurde und sich an Serin 62 eine potentielle Cyclin E/CDK2 Konsensus-Stelle befindet (Hoang *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung könnte möglicherweise zur Stabilisierung der Interaktion zwischen c-Myc und CBP führen. So binden CREB, NF κ B und E2F5 abhängig von der Phosphorylierung ihrer Transaktivierungsdomänen an CBP/p300 (Chrivia *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2000). In Kinase-Experimenten wurde daher die Phosphorylierung von c-Myc durch Cyclin E/CDK2 getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass c-Myc im N-Terminus phosphoryliert wird. Dort befindet sich an Serin 62

eine Cyclin E/CDK2 Phosphorylierungsstelle. Um zu untersuchen, ob Serin 62 von Cyclin E/CDK2 phosphoryliert wird, wurde die Phosphorylierung von Myc mit c-Myc-Mutanten verglichen. Dabei zeigte sich, dass Serin 62 spezifisch von Cyclin E/CDK2 phosphoryliert wird.

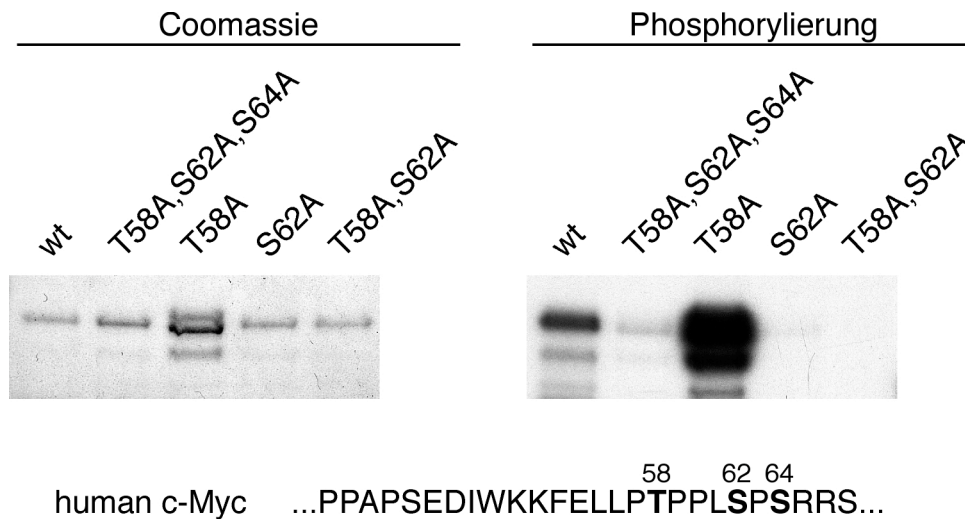


Abb. 33 Cyclin E/CDK2 phosphoryliert c-Myc an Serin 62. In *E. coli* exprimierte und gereinigte GST-c-MycN166-Fusionsproteine mit den angegebenen Mutationen wurde zusammen mit [³²P]-ATP in Gegenwart von gereinigtem, baculoviral exprimiertem Cyclin E/CDK2 inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie Blau (links) und durch Autoradiographie (rechts) detektiert.

Da c-Myc von Cyclin E/CDK2 phosphoryliert wird und dies den Einfluss von Cyclin E/CDK2 auf die Myc-Transaktivierung erklären kann, wurde der Einfluss der Serin-62-Alanin Mutante auf die Transaktivierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass Cyclin E/CDK2 die Transaktivierung durch c-Myc in ähnlicher Weise stimuliert wie die der Mutanten. Auch CBP- und die HAT-Mutante von CBP stimulieren die Transaktivierung von c-Myc und den drei eingesetzten Mutanten im gleichen Maße. Die Kombination von Cyclin E/CDK2 und CBP zeigt bei den Mutanten wie bei c-Myc eine Kooperation zwischen allen Faktoren. Allerdings ist diese Kooperation bei den Mutanten weniger ausgeprägt als bei c-Myc selber. Der kooperative Effekt nimmt von der c-Myc-Mutante T58A über die S62A-Mutante zur T58A,S62A-Doppelmutante hin ab. Dieser Effekt ist bei der Kombination von Cyclin E/CDK2 und CBP/HAT jedoch nicht zu sehen, da alle vier c-Myc-Konstrukte in ähnlicher Weise stimuliert werden.

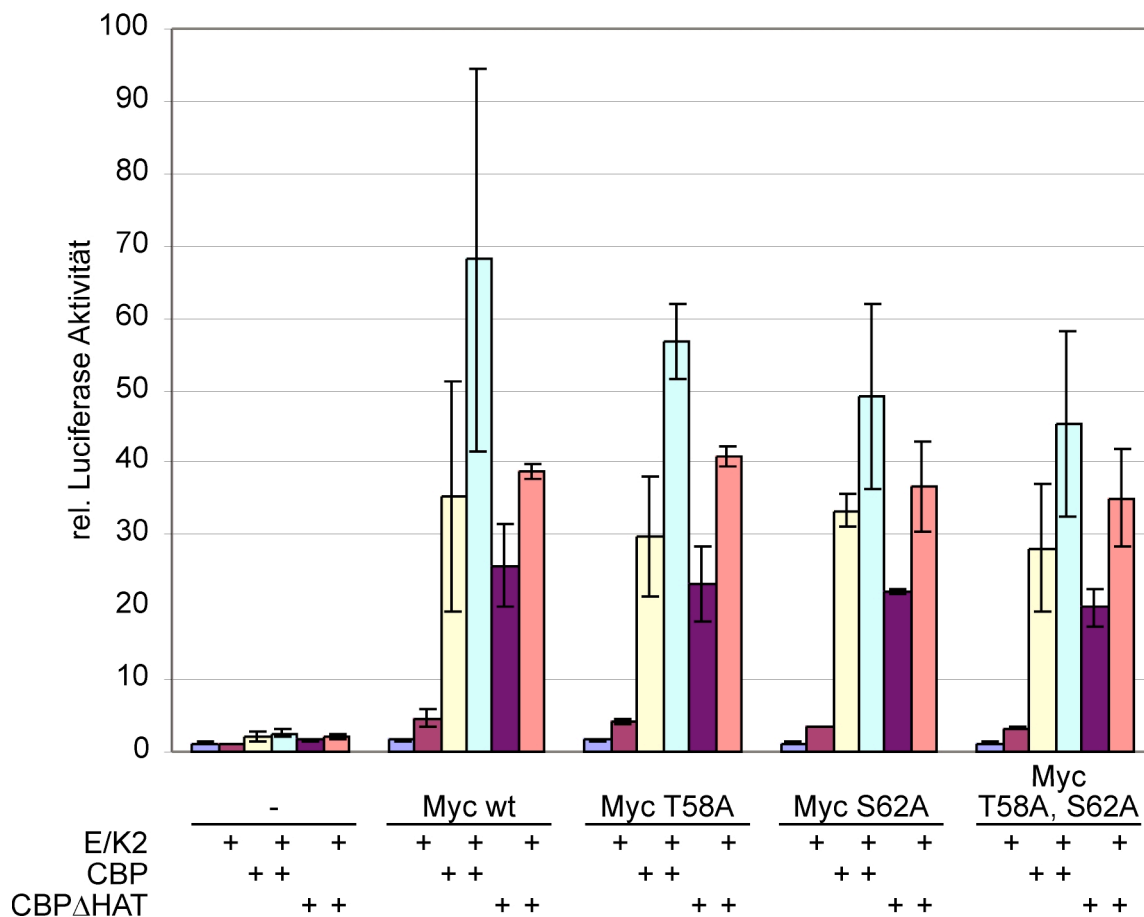


Abb. 34 Einfluss der c-Myc Phosphorylierungsmutanten auf die Transaktivierung. U2OS-Zellen wurden mit 2 μ g M4-tk-luc Luziferase-Reporterplasmid und 1 μ g pCGN-c-Myc wt, T58A, S62A, T86A/S62A, 5 μ g pVR1012-Gal4-CBP, 5 μ g pVR1012-Gal4-CBP Δ HAT, 0,5 μ g pCMV-Cyclin E und pCMV-CDK2 wie angegeben transfiziert. Die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von c-Myc und dessen Mutanten, CBP, CBP Δ HAT und Cyclin E/CDK2 wurde gleich eins gesetzt.

4 Diskussion

Das Protoonkogen c-Myc kann auf molekularer Ebene als Transkriptionsfaktor beschrieben werden. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der transkriptionellen Aktivierung und Repression durch c-Myc erst ansatzweise verstanden. Daher war es Ziel meiner Arbeit neue c-Myc bindende Faktoren zu identifizieren und die Funktionalität der Interaktion mit c-Myc zu untersuchen.

4.1 Interaktion von c-Myc mit hASH2 und Nucleolin

Die Interaktion von hASH2 und Nucleolin als c-Myc-interagierende Faktoren konnte nach affinitätschromatografischer Aufreinigung *in vivo* durch Koimmunpräzipitationen bestätigt werden. Sowohl für endogenes hASH2 als auch Nucleolin konnte die Interaktion mit endogenem c-Myc in Jurkat- und U2OS-Zellen nachgewiesen werden. Für hASH2 konnte zusätzlich eine Interaktion mit überexprimierten c-Myc in COS7-Zellen gezeigt werden.

Eine direkte Interaktion *in vitro* von c-Myc mit hASH2 und Nucleolin wurde unter Zuhilfenahme von rekombinanten Proteinen untersucht. Des weiteren wurden die Interaktionsdomänen in c-Myc und hASH2 kartiert. Dadurch können Mutationen in den Bindungsdomänen eingeführt werden, die dann in funktionellen Untersuchungen Aufschluss über den Einfluss von hASH2 auf die c-Myc Funktion wie Zellwachstum, Transformation und Transkription geben. Bei der Kartierung der Interaktion zeigte sich, dass hASH2 und Nucleolin beide mit dem C-Terminus von c-Myc interagieren. Für hASH2 wurde die Interaktionsdomäne weiter auf den Bereich von Aminosäure 265 bis 355 zwischen saurer und basischer-Region von c-Myc eingegrenzt. Damit konnten hASH2 und Nucleolin als direkte *in vivo* Interaktionspartner von c-Myc identifiziert werden.

Für die Region von Aminosäure 265 bis 355 in c-Myc wurden von anderen Arbeitsgruppen verschiedene biologische Funktionen beschrieben. So ist diese Region in c-Myc zwischen verschiedenen Spezies konserviert und zwischen Aminosäure 290 und 318 auch zwischen c-Myc, N-Myc und L-Myc (Marcu *et al.*, 1992). Die Deletion von Aminosäure 265 bis 353 führt zur Abnahme der Transformation primärer embryonaler Ratten Fibroblasten durch c-Myc und aktiviertem Ras. Auch für die Transformation von Rat1-Zellen ist diese Region notwendig. (Stone *et al.*, 1987). Für die Region von Aminosäure 265 bis 317 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass sie an der Induktion der S-Phase in ruhenden NIH3T3-Fibroblasten beteiligt ist (Goruppi *et al.*, 1994). Des weiteren befinden sich an Serin-347 und Serin-348 kurz vor der basischen Region zwei *in vivo* Phosphorylierungsstellen, die *in vitro* durch die Proteinkinase CK2 phosphoryliert werden können (Lüscher *et al.*, 1989).

Die CK2- Phosphorylierungsstellen sind sowohl evolutionär in verschiedenen Spezies als auch zwischen den verschiedenen c-Myc-Proteinen konserviert. Allerdings ist bisher nichts über die Funktion dieser Phosphorylierungsstellen bekannt. Da diese Region Homologien zu einer Klasse von Proteinen mit transformierenden Eigenschaften besitzt, wurde vermutet, dass die Phosphorylierung Einfluss auf die c-Myc-abhängige Zelltransformation hat. Zu den homologen Proteinen gehört das papovavirale große T-Antigen, das adenovirale E1A-, das papillomvirale E7- und das Cdc25-Protein (Figge und Smith, 1988; Figge *et al.*, 1988b). Der Einfluss der CK2-Phosphorylierung auf Zelltransformation konnte bisher noch nicht bestätigt werden. So zeigte c-Myc mit Punktmutationen an den Phosphorylierungsstellen keinen Unterschied in der Transformation der etablierten Rat-1-Zelllinie in Kooperation mit dem Onkogen Bcr-Abl (Street *et al.*, 1990).

Diese publizierten Daten deuten auf einen Einfluss der Region zwischen saurer und basischer Domäne auf die c-Myc vermittelte Transformation hin. Daher sollte in weiteren Experimenten festgestellt werden, ob hASH2 einen Einfluss auf die c-Myc-abhängige Transformation hat. Dazu sollten Transformations-Assays in primären embryonalen Ratten-Fibroblasten (REF) etabliert werden. Dies war jedoch nicht möglich, da die Transformationsrate in Kontrollexperimenten mit c-Myc und aktiviertem Ras zu klein war, um aussagekräftige Resultate zu erhalten. Grund dafür mag eine zu schlechte Transfektionsrate der isolierten Fibroblasten gewesen sein. Daher werden nun Transformationsexperimente in Kooperation mit Christa Cerni in Wien durchgeführt. Erste Untersuchungen in Kolonienformationsexperimenten in REFs deuten darauf hin, dass hASH2 mit aktiviertem Ras kooperiert (persönliche Mitteilung von C. Cerni). Im Einklang damit stehen auch die Ergebnisse, dass hASH2 die Transformation von REFs durch c-Myc und Ras in Fokusbildungsexperimenten (persönliche Mitteilung von C. Cerni) und das Wachstum der transformierten Zelllinien U2OS und Saos im Kolonien-Formations-Experiment nicht inhibiert (Abb. 11).

Durch diese vorläufigen Ergebnisse können hASH2 onkogene Eigenschaften zugewiesen werden. Dabei stellt sich die Frage, ob diese Eigenschaft über c-Myc allein oder beispielsweise durch die Bindung von hASH2 an andere Faktoren vermittelt wird. So ist TRRAP nicht nur ein c-Myc Bindungspartner und Mediator der c-Myc-abhängigen Transformation, sondern bindet auch E1A und ist für dessen transformierende Eigenschaften verantwortlich (McMahon *et al.*, 1998; Deleu *et al.*, 2001). Des Weiteren stellt sich die Frage, wie die Interaktion zwischen c-Myc und hASH2 reguliert wird, da hASH2 ubiquitär exprimiert wird. Ein möglicher Mechanismus mag über die CK2-Phosphorylierungsstellen in c-Myc laufen. Dabei könnte hASH2 phosphorylierungsabhängig an c-Myc binden.

Neben hASH2 wurde MSSP als ein weiterer Faktor beschrieben, der c-Myc in dieser Region bindet. MSSP wurde ursprünglich als ein Protein identifiziert, das an eine Region im humanen *c-myc* Gen bindet, die ein potentieller Replikationsursprung und *Enhancer* ist

(Negishi *et al.*, 1994). Zudem konnte kürzlich auch die Bindung von MSSP an c-Myc beschrieben werden (Niki *et al.*, 2000). MSSP stimuliert die c-Myc/Ras-abhängige Transformation in NIH3T3-Zellen, die in Softagar im Vergleich zur Kontrolle sehr große Kolonien bilden. Konträr dazu ist MSSP aber in der Lage, die DNA-Bindung von Myc/Max-Komplexen und die c-Myc-abhängige Transkription zu inhibieren (Niki *et al.*, 2000). Eine mögliche Erklärung für diese zunächst widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass MSSP c-Myc zu Zellwachstums inhibierenden Genen dirigiert, die von c-Myc reprimiert werden (Niki *et al.*, 2000). Möglicherweise stabilisiert MSSP die Interaktion zwischen c-Myc und YY1 bzw. Smad2 und Smad3, die ebenfalls in dieser Region von c-Myc binden und deren transkriptionelle Aktivität durch c-Myc reprimiert wird (Shrivastava *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 2002). Da hASH2 die c-Myc-abhängige Transaktivierung stimuliert und auch die DNA-Bindung von c-Myc/Max Heterodimeren nicht inhibiert (Daten nicht gezeigt), scheint diese Region von c-Myc unterschiedliche Funktionen auszuführen. Detaillierte Untersuchungen über die c-Myc Bindung von hASH2, MSSP, Smad2, Smad3 und YY1 könnten Aufschluss darüber geben, ob sich die Interaktionsdomänen dieser Faktoren überschneiden oder ob zwei unabhängige Domänen in c-Myc nebeneinander liegen, die durch gegenläufige Mechanismen einen Einfluss auf die Transformation haben. Dass hASH2 und MSSP mit unterschiedlichen Effekten auf die Transaktivierung gleichzeitig an c-Myc binden, scheint sehr unwahrscheinlich. Vielmehr scheint c-Myc promotor-spezifisch unterschiedliche Faktoren zu rekrutieren, abhängig davon ob es einen Promotor aktiviert oder reprimiert. Diese Hypothese könnte vergleichend an c-Myc aktivierten und reprimierten Genen mit Chromatin-Immunpräzipitationen untersucht werden.

Weitere Untersuchungen zur Funktion der Interaktionen bezogen sich auf die c-Myc abhängige Transkriptionsregulation durch hASH2 und Nucleolin. Dabei ist hASH2 im Gegensatz zu Nucleolin allein nicht in der Lage, die c-Myc-abhängige Transaktivierung zu stimulieren. Auch die direkte Rekrutierung von hASH2 als Gal4-hASH2-Fusionsprotein an einen Promotor führte nur zu einer schwachen Transaktivierung eines Reportergenes. Dies war unabhängig davon, ob der Reporter transient ko-transfiziert wurde oder stabil ins Genom integriert worden war. Für Nucleolin hingegen konnte eine starke Aktivierung beobachtet werden, die spezifisch von der c-Myc Anwesenheit und dem Vorhandensein der c-Myc DNA-Bindungsstellen abhängig ist. Dadurch bildet sich gleichzeitig auch eine Rückkopplungsschleife, da Nucleolin ein Zielgen von c-Myc ist (Coller *et al.*, 2000; Greasley *et al.*, 2000).

Erst in Gegenwart von Nucleolin stimuliert hASH2 die c-Myc-abhängige Transaktivierung. Somit können Nucleolin und hASH2 als kooperierende Faktoren beschrieben werden, die die schwache c-Myc-abhängige Transaktivierung stimulieren. Diese Kooperation spiegelt sich auch in der *in vivo* Interaktion zwischen Nucleolin und

hASH2 wider, die durch eine direkte Interaktion beider Faktoren oder gleichzeitige Bindung an c-Myc zustande kommen kann. Dies ließe sich mit *in vitro* Bindungsstudien untersuchen. Der limitierende Einfluss von Nucleolin auf hASH2 und die Interaktion zwischen beiden Proteinen deuten darauf hin, dass hASH2 in einem Komplex mit Nucleolin agiert, an den höchst wahrscheinlich noch weitere Faktoren beteiligt sind. Möglicherweise stabilisiert Nucleolin die durch hASH2 rekrutierten Faktoren. Hinweise dafür, dass hASH2 in einem größeren Komplex vorliegt, der an Transkriptionsregulation beteiligt ist, liefern Daten aus *Drosophila* und Hefe. Gelfiltrations-Chromatografien von embryonalen *Drosophila*-Extrakten zeigen, dass ASH2 in einen Komplex mit einem Molekulargewicht von ungefähr 500 kDa eluiert wurde (Papoulas *et al.*, 1998). Aus Hefe konnte kürzlich der Set1-Methyltransferase-Komplex aufgereinigt werden, der Histon H3 an Lysin4 methyliert und dessen Bre2 Untereinheit als ASH2 homologes Protein identifiziert wurde (Roguev *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2002). Ob hASH2 und Nucleolin in einem größeren Komplex an c-Myc binden, wäre durch proteinbiochemische Aufreinigung eines solchen Komplexes zu zeigen. Das solch ein Komplex möglicherweise Histon-Methyltransferase-Aktivität besitzt und dadurch Einfluss auf die c-Myc-abhängige Transaktivierung nimmt, ist sehr attraktiv und sollte überprüft werden. Auch wenn in Hefe der Set1-Komplex mit dem *Silencing* an Telomeren, am *mating typ locus* und an der rDNA einen negativen Einfluss auf die Transkription nimmt (Nislow *et al.*, 1997; Briggs *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 2002). Eine Reihe von Daten zeigen, dass Histon H3 Methylierung an Lysin-4 mit transkriptionell aktiven Chromatinbereichen verknüpft ist (Litt *et al.*, 2001; Noma *et al.*, 2001; Boggs *et al.*, 2002; Kouzarides, 2002). Durch die Identifikation der Histon H3 Lysin-4-spezifischen humanen Methyltransferase Set9 konnte ein direkter Effekt der Methylierung auf die Aktivierung der Transkription gezeigt werden. Set9 stimuliert die Transaktivierung durch ein Gal4-VP16-Fusionprotein in Abhängigkeit seiner Methyltransferaseaktivität. Die Methylierung von Lysin-4 durch Set9 inhibiert die Bindung des Histondeacetylase-Komplexes NuRD an die N-terminalen Schwänze von Histon H3 und stimuliert die Acetylierung von Histonen durch CBP/p300 (Nishioka *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001a).

Die Assoziation von Trithorax-Proteinen mit Histon-Methyltransferaseaktivität ist aber nicht nur auf ASH2 begrenzt. So besitzen die Proteine Trithorax und ASH1 wie Set1 eine SET-Methyltransferasedomäne (Jenuwein *et al.*, 1998). Für die SET-Domäne von ASH1 konnte Histon-Methyltransferase Aktivität nachgewiesen werden (Roguev *et al.*, 2001).

Sehr unerwartet ist die Beobachtung, dass Faktoren, die den C-Terminus von c-Myc binden, transkriptionsaktivierend wirken, da die Transaktivierungsdomäne von c-Myc am N-Terminus lokalisiert ist (Kato *et al.*, 1990; Min und Taparowsky, 1992). Allerdings wird der Swi2/Snf2 Komplex ebenfalls an den C-Terminus von c-Myc rekrutiert und scheint die c-Myc- Transaktivierung positiv zu beeinflussen (Cheng *et al.*, 1999). Auch CBP, das ein

starker Koaktivator von c-Myc ist, bindet an den C-Terminus von c-Myc. Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch mag das Vorhandensein einer reprimierenden Region im C-Terminus zu sein. Diese reprimierende Wirkung müsste dann zur vollständigen Stimulation der Transaktivierungsdomäne überwunden werden. Dabei könnten Faktoren wie Nucleolin, hASH2, CBP und der Swi2/Snf2 Komplex reprimierende Faktoren von c-Myc verdrängen, durch posttranskriptionelle Modifikation wie Acetylierung oder Methylierung die Transaktivierung von c-Myc regulieren oder aber die DNA-Bindung von c-Myc modulieren.

Unerwartet ist auch die Beobachtung, dass hASH2 REFs transformiert, aber alleine keinen Einfluss auf die c-Myc-abhängige Transaktivierung ausübt. Der Grund dafür ist unklar. Möglicherweise unterscheidet sich die Expression von hASH2 in primären Zellen zu der in etablierten Zelllinien. Auch eine signalabhängige Aktivierung von hASH2 wäre denkbar, die in den primären Zellen durch die Ko-Transfektion mit aktiviertem Ras vermittelt wird.

Als Kontrollexperiment wurde parallel zur stimulierenden Wirkung von Nucleolin auf c-Myc die in der Literatur beschriebene reprimierende Wirkung auf c-Myb untersucht. Allerdings aktiviert in dieser Arbeit Nucleolin c-Myb und wirkt nicht wie bei Ying *et al.* (2000) beschrieben als Repressor. Ein möglicher Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse können die verwendeten Zellen oder Reporterplasmide sein. Bei Ying *et al.* (2000) wurden Phoenix-Zellen und ein künstlicher Reporter mit acht Myb-Bindungsstellen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die Osteosarkom-Zelllinie U2OS und ein Reporterkonstrukt mit den Basenpaaren -242 bis +150 des *mim-1* Promotor benutzt, der durch c-Myb reguliert wird (Oelgeschläger *et al.*, 1996).

4.2 Interaktion von c-Myc mit CBP

Als ein weiterer c-Myc-interagierender Faktor konnte CBP identifiziert werden. Die Interaktion konnte in mehreren unabhängigen Experimenten *in vivo* und *in vitro* bestätigt werden. So war es möglich, die Bindung auf endogener Ebene in HEK293-, Jurkat- und HL60-Zellen und mittels eines Säugertier-zwei-Hybrid-Experimentes in U2OS-Zellen nachzuweisen. Desweiteren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen den Proteinen direkt ist. Dabei bindet CBP ebenfalls wie Nucleolin und hASH2 an die C-terminalen 176 Aminosäuren von c-Myc.

Ob es bei der Interaktion mit c-Myc auch zu Wechselwirkungen mit Nucleolin und hASH2 kommt und ob es Überschneidungen mit deren Interaktionsdomäne gibt, ist nicht weiter untersucht worden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen hASH2 und CBP könnte allerdings bestehen, da für die beiden Trithoraxproteine ASH1 und Trithorax in *Drosophila*

eine Interaktion mit CBP nachgewiesen wurde (Bantignies *et al.*, 2000; Petruk *et al.*, 2001). Zudem wurde von Roguev *et al.* (2001) eine funktionelle Klassifizierung der verschiedenen Trithoraxproteine vorgenommen. Dabei wurden ASH1, ASH2 und Trithorax aufgrund ihrer postulierten Assoziation mit einer Methyltransferase-Aktivität in eine Klasse eingeteilt.

Bei der Kartierung der c-Myc-Bindungsstelle in CBP stellte sich heraus, dass c-Myc mehrere CBP-Fragmente bindet. Am stärksten interagiert es mit den CBP-Aminosäuren 451 bis 721. Daneben bindet c-Myc mit abnehmender Affinität an die Fragmente 1 bis 451, 1099 bis 1460 und 1891 bis 2441. Das Fragment 451 bis 721 mit der KIX-Domäne bindet eine Vielzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren wie CREB, Jun, Myb, Sab-1a, ER81 und das virale Tax-Protein (Goodman und Smolik, 2000). Allerdings ist unklar, ob c-Myc parallel mit einem oder mehreren dieser Faktoren an CBP bindet oder ob c-Myc in der Lage ist, die oben genannten Faktoren von CBP zu verdrängen und somit negativ auf deren Funktion zu wirken. Die Bindung von verschiedenen Faktoren an die selbe Domäne von CBP kann aber auch über posttranslationale Modifikationen reguliert werden. So wie die Methylierung der KIX-Domäne von CBP durch die Methyltransferase CARM1 die Bindung von CREB reguliert (Xu *et al.*, 2001). Ein ähnliches Bild stellt sich auch für die anderen mit c-Myc- interagierenden Fragmente dar, die ebenfalls von einer Vielzahl von Faktoren gebunden werden. Möglicherweise interagiert c-Myc promotorspezifisch mit unterschiedlichen Regionen von CBP oder benötigt zur stabilen Ausbildung eines Komplexes mit CBP die Interaktion mit mehreren CBP-Regionen.

Im Weiteren wurde der Einfluss von CBP auf die c-Myc-abhängige Transaktivierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass CBP und das CBP-homologe Protein p300 die c-Myc-abhängige Transaktivierung stark stimulieren und dass die HAT-Aktivität von CBP zu einem wesentlichen Teil (ca. 50%) an der Transkriptionsstimulation beteiligt ist. Da CBP neben GCN5 und TIP60 der dritte Koaktivator mit HAT-Aktivität ist, der von c-Myc an Promotoren rekrutiert wird, sollte untersucht werden, in welcher Weise die Acetyltransferaseaktivität von CBP die c-Myc-Transaktivierung stimuliert (McMahon *et al.*, 2000; B. Amati, persönliche Mitteilung). Der Einfluss der HAT-Aktivität auf die Transaktivierung kann auf zweierlei Weise geschehen. CBP ist in der Lage die reprimierende Wirkung von Chromatin durch die Acetylierung von Histonen aufzuheben (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996). Andererseits ist CBP aber auch in der Lage, Transkriptionsfaktoren direkt zu acetylieren und dadurch deren transkriptionelle Aktivität zu modulieren (Kouzarides, 2000; Sterner und Berger, 2000). Daher wurde überprüft, ob c-Myc durch CBP acetyliert wird.

Dabei konnte gezeigt werden, dass CBP c-Myc *in vitro* acetyliert und die *in vivo* Acetylierung von c-Myc stimuliert. Die Stimulation der *in vivo* Acetylierung war unabhängig von Myc Box I und II und somit auch unabhängig von der Rekrutierung von Acetyltransferasen durch TRRAP. Die Kartierung der exakten Acetylierungsstelle war

bisher noch nicht möglich, da c-Myc über mehrere im gesamten Protein verteilte Acetylierungsstellen verfügt. So konnte sowohl ein N- als auch ein C-terminales GST-Myc-Fusionsprotein durch CBP acetyliert werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine Eingrenzung aufgrund von Sequenzinformationen war nicht möglich, da es keine Konsensussequenzen für die bisher beschriebenen Acetyltransferasen und deren Substrate gibt.

Erste Untersuchungen zur Funktion der Acetylierung bezogen sich auf die oben angesprochene Transaktivierung und DNA-Bindung von c-Myc. Allerdings konnte kein Einfluss auf die DNA-Bindung festgestellt werden. So veränderte die Acetylierung von rekombinanten c-Myc/Max-Komplexen nicht deren DNA-Bindung. Auch die Behandlung von COS7-Zellen, die c-Myc/Max überexprimieren, mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA), zeigte keinen Einfluss auf die DNA-Bindung von c-Myc/Max-Komplexen (Daten nicht gezeigt). Möglicher Weise ist zur Erkennung von Effekten eine stöchiometrische Acetylierung notwendig. Dies kann wiederum durch den Einsatz von c-Myc mit den mutierten Acetylierungsstellen umgangen werden. Für den eindeutigen Beweis, dass die Acetylierung von c-Myc Einfluss auf dessen Funktion hat, müssen die acetylierten Lysine bestimmt, mutiert und deren Bedeutung experimentell untersucht werden.

Im Kontrast zu den beiden Acetyltransferasen GCN5 und TIP60, deren primäres Ziel Histone in c-Myc regulierten Genen sind, scheint das Ziel der Acetyltransferase CBP c-Myc selbst zu sein. In welcher Weise die Acetylierung von c-Myc auf dessen Transaktivierung wirkt, ist noch zu klären. Mögliche Mechanismen, auf die die Acetylierung einen Einfluss haben kann, sind Proteinstabilität, zelluläre Lokalisation und Interaktion mit weiteren Faktoren (Waltzer und Bienz, 1998; Chen *et al.*, 1999b; Martinez-Balbas *et al.*, 2000; Soutoglou *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang wäre es von Interesse, ob die Interaktion zwischen c-Myc und INI1, der c-Myc bindenden Komponente des SWI/SNF-Komplexes (Cheng *et al.*, 1999), mittels Acetylierung reguliert wird. Hinweise für einen möglichen Mechanismus liefert die acetylierungsabhängige Stimulation der Interaktion zwischen dem Erythroid Krüppel-Like Faktor und dem SWI/SNF-Komplex (Zhang *et al.*, 2001).

Untersuchungen von Ait-Si-Ali *et al.* (1998) zeigten, dass die CBP Acetyltransferaseaktivität zellzyklusabhängig durch die Phosphorylierung von Cyclin E/CDK2 reguliert wird. Da CBP die c-Myc Transaktivierung Acetyltransferase-abhängig stimuliert, sollte der Einfluss von Cyclin E/CDK2 auf die Transaktivierung durch c-Myc und CBP untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass Cyclin E/CDK2 und CBP die c-Myc-abhängige Transaktivierung kooperativ stimulieren. Der Mechanismus, über den Cyclin E/CDK2 auf c-Myc wirkt, war nicht zu identifizieren. Cyclin E/CDK2 stimulierte

unabhängig von der CBP-Acetyltransferaseaktivität und der Phosphorylierung von c-Myc die Transaktivierung durch c-Myc und CBP.

Möglicherweise existiert im C-terminalen Bereich von c-Myc, der nicht in Kinase-Experimenten eingesetzt wurde, eine weitere Cyclin E/CDK2 Phosphorylierungsstelle. Diese könnte für eine phosphorylierungsabhängige Interaktion zwischen CBP und c-Myc verantwortlich sein. Ein solcher Mechanismus ist für die Interaktion einer Reihe von CBP-bindenden Faktoren, wie CREB, NF κ B, E2F5, beschrieben worden (Chrivia *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1998). Eine Konsensus Cyclin E/CDK2 Phosphorylierungsstelle konnte im C-Terminus allerdings nicht gefunden werden. Alternativ dazu könnte aber auch die Phosphorylierung von CBP durch Cyclin E/CDK2 unabhängig von der Acetyltransferaseaktivität zu einer Stimulation der c-Myc-Transaktivierung führen. Eine Konkurrenz von verschiedenen Faktoren um die Bindung an CBP könnte durch die Phosphorylierung zu Gunsten von c-Myc verschoben werden. Als einen weiteren Mechanismus könnte Cyclin E/CDK2 aber auch die Funktion eines dritten unbekanntes Faktors modulieren, der die c-Myc-abhängige Transkription beeinflusst. Dieser Faktor müßten über CBP die c-Myc-Transaktivierung regulieren, da Cyclin E/CDK2 in Abwesenheit von CBP c-Myc nur geringfügig aktiviert.

5 Literaturverzeichnis

Aalfs, J. D., und Kingston, R. E. (2000). What does 'chromatin remodeling' mean?, *Trends Biochem Sci* 25, 548-55.

Aasland, R., Gibson, T. J., und Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation, *Trends Biochem Sci* 20, 56-9.

Adamson, A. L., und Shearn, A. (1996). Molecular genetic analysis of *Drosophila ash2*, a member of the trithorax group required for imaginal disc pattern formation, *Genetics* 144, 621-33.

Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., und Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter, *Cell* 103, 667-78.

Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., *et al.* (1998). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle- dependent kinases and oncoprotein E1A, *Nature* 396, 184-6.

Albert, T., Urlbauer, B., Kohlhuber, F., Hammersen, B., und Eick, D. (1994). Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines, *Oncogene* 9, 759-763.

Alkema, M. J., Jacobs, J., Voncken, J. W., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Satijn, D. P., Otte, A. P., Berns, A., und van Lohuizen, M. (1997). MPC2, a new murine homolog of the *Drosophila polycomb* protein is a member of the mouse polycomb transcriptional repressor complex, *J Mol Biol* 273, 993-1003.

Allfrey, V. G., Faulkner, R., und Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-94.

Amati, B., Dalton, S., Brooks, M. W., Littlewood, T. D., Evan, G. I., und Land, H. (1992). Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max, *Nature* 359, 423-426.

Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G. I., und Land, H. (1993a). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max, *Cell* 72, 233-245.

Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G. I., und Land, H. (1993b). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max, *EMBO J* 12, 5083-5087.

Amati, B., Frank, S. R., Donjerkovic, D., und Taubert, S. (2001). Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription, *Biochim Biophys Acta* 1471, M135-45.

Arany, Z., Sellers, W. R., Livingston, D. M., und Eckner, R. (1994). E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators, *Cell* 77, 799-800.

Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S., und Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways, *Cell* 89, 1175-84.

Axelsson, H., Henriksson, M., Wang, Y., Magnusson, K. P., und Klein, G. (1995). The aminoterminal phosphorylation sites are frequently mutated in Burkitt Lymphomas but not in mouse plasmacytomas, *Eur J Cancer* 31, 2099-2104.

Ayer, D. E., Kretzner, L., und Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity, *Cell* 72, 211-22.

Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., und Larsson, L. G. (2000). c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased, *Blood* 95, 2104-2110.

Bannister, A. J., und Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase, *Nature* 384, 641-3.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., und Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain, *Nature* 410, 120-4.

Bantignies, F., Goodman, R. H., und Smolik, S. M. (2000). Functional interaction between the coactivator Drosophila CREB-binding protein and ASH1, a member of the trithorax group of chromatin modifiers, *Mol Cell Biol* 20, 9317-30.

Barone, M. V., und Courtneidge, S. A. (1995). Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase- inactive Src, *Nature* 378, 509-12.

Beijersbergen, R. L., Hijmans, E. M., Zhu, L., und Bernards, R. (1994). Interaction of c-Myc with the pRb-related protein p107 results in inhibition of c-Myc-mediated transactivation, *EMBO J* 13, 4080-4086.

Berger, S. L. (2001). An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation, *Oncogene* 20, 3007-13.

Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation, *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-8.

Bhatia, K., Huppi, K., Spangler, G., Siwarski, D., Iyer, R., und Magrath, I. (1993). Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphomas and mouse plasmacytomas, *Nature genetics* 5, 56-61.

Bhatia, K., Spangler, G., Gaidano, G., Hamdy, N., Dalla-Favera, R., und Magrath, I. (1994). Mutations in the coding region of c-myc occur frequently in acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas, *Blood* 84, 883-888.

Billin, A. N., Eilers, A. L., Queva, C., und Ayer, D. E. (1999). Mlx, a novel Max-like BHLHZip protein that interacts with the Max network of transcription factors, *J Biol Chem* *274*, 36344-50.

Billin, A. N., Eilers, A. L., Coulter, K. L., Logan, J. S., und Ayer, D. E. (2000). MondoA, a novel basic helix-loop-helix-leucine zipper transcriptional activator that constitutes a positive branch of a max-like network, *Mol Cell Biol* *20*, 8845-54.

Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., und Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein, *Science* *250*, 1149-1151.

Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., und Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences, *Mol Cell Biol* *13*, 5216-24.

Blackwood, E. M., und 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.

Boggs, B. A., Cheung, P., Heard, E., Spector, D. L., Chinault, A. C., und Allis, C. D. (2002). Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes, *Nat Genet* *30*, 73-6.

Borggreffe, T., Wabl, M., Akhmedov, A. T., und Jessberger, R. (1998). A B-cell-specific DNA recombination complex, *J Biol Chem* *273*, 17025-35.

Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., und Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc- dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter, *Genes Dev* *15*, 2042-7.

Bousset, K., Henriksson, M., Lüscher-Firzlaff, J. M., Litchfield, D. W., und Lüscher, B. (1993). Identification of casein kinase II phosphorylation sites in Max: effects on DNA-binding kinetics of Max homo- and Myc/Max heterodimers, *Oncogene* *8*, 3211-3220.

Brewer, C. B. (1994). Cytomegalovirus plasmid vectors for permanent lines of polarized epithelial cells, *Methods Cell Biol* *43*, 233-45.

Briggs, S. D., Bryk, M., Strahl, B. D., Cheung, W. L., Davie, J. K., Dent, S. Y., Winston, F., und Allis, C. D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev* *15*, 3286-95.

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., und Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation, *Cell* *84*, 843-51.

Brys, A., und Maizels, N. (1994). LR1 regulates c-myc transcription in B-cell lymphomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4915-9.

Bulfone-Paus, S., Dempsey, L. A., and Maizels, N. (1995). Host factors LR1 and Sp1 regulate the Fp promoter of Epstein-Barr virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 8293-7.

Burley, S. K., Xie, X., Clark, K. L., and Shu, F. (1997). Histone-like transcription factors in eukaryotes, *Curr Opin Struct Biol* *7*, 94-102.

Cairo, S., Merla, G., Urbinati, F., Ballabio, A., and Reymond, A. (2001). WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network, *Hum Mol Genet* *10*, 617-27.

Capili, A. D., Schultz, D. C., Rauscher, I. F., and Borden, K. L. (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains, *Embo J* *20*, 165-77.

Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H. Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1999). A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity, *Cell* *96*, 393-403.

Chan, H. M., and La Thangue, N. B. (2001). p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds, *J Cell Sci* *114*, 2363-73.

Chen, C. Y., Gherzi, R., Andersen, J. S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H. D., Mann, M., and Karin, M. (2000a). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation, *Genes Dev* *14*, 1236-48.

Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., and Stallcup, M. R. (1999a). Regulation of transcription by a protein methyltransferase, *Science* *284*, 2174-7.

Chen, D., Huang, S. M., and Stallcup, M. R. (2000b). Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300, *J Biol Chem* *275*, 40810-6.

Chen, H., Lin, R. J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R. M. (1999b). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase, *Cell* *98*, 675-86.

Cheng, S. W. G., Davies, K. P., Yung, E., Beltran, R. J., Yu, J., and Kalpana, G. V. (1999). c-Myc interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for activation function, *Nat Genet* *22*, 102-5.

Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M., and Allis, C. D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation, *Mol Cell* *5*, 905-15.

Chrivia, J. C., Kwok, R. P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., and Goodman, R. H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP, *Nature* *365*, 855-9.

-
- Claassen, G. F., und Hann, S. R. (1999). Myc-mediated transformation: the repression connection, *Oncogene 18*, 2925-2933.
- Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N., und 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*, 3260-5.
- Corda, Y., Schramke, V., Longhese, M. P., Smokvina, T., Paciotti, V., Brevet, V., Gilson, E., und Geli, V. (1999). Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions, *Nat Genet 21*, 204-8.
- Corona, D. F., Langst, G., Clapier, C. R., Bonte, E. J., Ferrari, S., Tamkun, J. W., und Becker, P. B. (1999). ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor, *Mol Cell 3*, 239-45.
- Cosma, M. P., Tanaka, T., und Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter, *Cell 97*, 299-311.
- Dang, C. V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism, *Mol Cell Biol 19*, 1-11.
- Dasso, M., Dimitrov, S., und Wolffe, A. P. (1994). Nuclear assembly is independent of linker histones, *Proc Natl Acad Sci U S A 91*, 12477-81.
- Dear, T. N., Hainzl, T., Follo, M., Nehls, M., Wilmore, H., Matena, K., und Boehm, T. (1997). Identification of interaction partners for the basic-helix-loop-helix protein E47, *Oncogene 14*, 891-8.
- Deleu, L., Shellard, S., Alevizopoulos, K., Amati, B., und Land, H. (2001). Recruitment of TRRAP required for oncogenic transformation by E1A, *Oncogene 20*, 8270-5.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., und Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain, *Nature 399*, 491-6.
- Dilworth, F. J., Fromental-Ramain, C., Yamamoto, K., und Chambon, P. (2000). ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro, *Mol Cell 6*, 1049-58.
- DiRenzo, J., Shang, Y., Phelan, M., Sif, S., Myers, M., Kingston, R., und Brown, M. (2000). BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation, *Mol Cell Biol 20*, 7541-9.
- Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B., und Livingston, D. M. (1994). Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor, *Genes Dev 8*, 869-84.

- Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R., and Bishop, J. M. (1989). Chimaeras of Myc onco-protein and steroid receptors cause hormone dependent transformation of cells, *Nature* 340, 66-68.
- Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J. M. (1991). The Myc protein activates transcription of the \square -prothymosin gene, *EMBO J* 10, 133-141.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto- oncogene product, *Mol Cell Biol* 5, 3610-6.
- Facchini, L. M., and Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights, *FASEB J* 12, 633-651.
- Fax, P., Lehmkuhler, O., Kuhn, C., Esche, H., and Brockmann, D. (2000). E1A12S-mediated activation of the adenovirus type 12 E2 promoter depends on the histone acetyltransferase activity of p300/CBP, *J Biol Chem* 275, 40554-60.
- Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999). Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3940-3944.
- 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, 133-43.
- Figge, J., and Smith, T. F. (1988). Cell-division sequence motif, *Nature* 334, 109.
- Figge, J., Webster, T., Smith, T. F., and Paucha, E. (1988b). Prediction of similar transforming regions in simian virus 40 large T, adenovirus E1A, and myc oncoproteins, *J Virol* 62, 1814-8.
- Firzlaff, J. M., Luscher, B., and Eisenman, R. N. (1991). Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5187-91.
- Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation, *Genes Dev* 15, 2069-82.
- Fry, C. J., and Peterson, C. L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first?, *Curr Biol* 11, R185-97.
- Gallant, P., Shiio, Y., Cheng, P. F., Parkhurst, S. M., and Eisenman, R. N. (1996). Myc and Max homologs in *Drosophila*, *Science* 274, 1523-1527.
- Gaubatz, S., Imhof, A., Dosch, R., Werner, O., Mitchell, P., Buettner, R., and Eilers, M. (1995). Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2, *EMBO J* 14, 1508-1519.

-
- Georges, S. A., Kraus, W. L., Luger, K., Nyborg, J. K., and Laybourn, P. J. (2002). p300-mediated tax transactivation from recombinant chromatin: histone tail deletion mimics coactivator function, *Mol Cell Biol* 22, 127-37.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999). Structure and functions of nucleolin, *J Cell Sci* 112, 761-72.
- Giordano, A., and Avantaggiati, M. L. (1999). p300 and CBP: partners for life and death, *J Cell Physiol* 181, 218-30.
- Goodman, R. H., and Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development, *Genes Dev* 14, 1553-77.
- Goruppi, S., Gustincich, S., Brancolini, C., Lee, W. M. F., and Schneider, C. (1994). Dissection of *c-myc* domains involved in S phase induction of NIH3T3 fibroblasts, *Oncogene* 9, 1537-1544.
- Gould, A. (1997). Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes, *Curr Opin Genet Dev* 7, 488-94.
- Grandori, C., and Eisenman, R. N. (1997). Myc target genes, *Trends Biochem Sci* 22, 177-181.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior, *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-99.
- Greasley, P. J., Bonnard, C., and Amati, B. (2000). Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis, *Nucleic Acids Res* 28, 446-53.
- Gregory, M. A., and Hann, S. R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells, *Mol Cell Biol* 20, 2423-35.
- Grunstein, M. (1998). Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones, *Cell* 93, 325-8.
- Gu, W., Cechova, K., Tassi, V., and Dalla-Favera, R. (1993). Opposite regulation of gene transcription and cell proliferation by c-Myc and Max, *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2935-2939.
- Gu, W., Bhatia, K., Magrath, I. T., Dang, C. V., and Dalla-Favera, R. (1994). Binding and suppression of the Myc transcriptional activation domain by p107, *Science* 264, 251-254.
- Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain, *Cell* 90, 595-606.
- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P. L., Wu, H. Y., Wang, J. Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A, *Cell* 96, 405-13.

-
- Hamiche, A., Sandaltzopoulos, R., Gdula, D. A., and Wu, C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF, *Cell* *97*, 833-42.
- Hanakahi, L. A., Dempsey, L. A., Li, M. J., and Maizels, N. (1997). Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3605-10.
- Hanakahi, L. A., and Maizels, N. (2000). Transcriptional activation by LR1 at the Emu enhancer and switch region sites, *Nucleic Acids Res* *28*, 2651-7.
- Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L., and Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A., *Cell* *89*, 341-347.
- Henriksson, M., Bakardjiev, A., Klein, G., and Luscher, B. (1993). Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential, *Oncogene* *8*, 3199-209.
- Henriksson, M., and Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation, *Adv Cancer Res* *68*, 109-82.
- Hill, C. S., and Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity, *Cell* *80*, 199-211.
- Hoang, A. T., Lutterbach, B., Lewis, B. C., Yano, T., Chou, T. Y., Barrett, J. F., Raffeld, M., Hann, S. R., and Dang, C. V. (1995). A link between increased transforming activity of lymphoma-derived MYC mutant alleles, their defective regulation by p107, and altered phosphorylation of the c-Myc transactivation domain, *Mol Cell Biol* *15*, 4031-42.
- Hurlin, P. J., Quéva, C., Koskinen, P. J., Steingrímsson, E., Ayer, D. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. (1995). Mad3 and Mad4: Novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-Myc-dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation, *EMBO J* *14*, 5646-5659.
- Hurlin, P. J., Queva, C., and Eisenman, R. N. (1997). Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites, *Genes Dev* *11*, 44-58.
- Hurlin, P. J., Steingrímsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif, *Embo J* *18*, 7019-28.
- Ikegawa, S., Isomura, M., Koshizuka, Y., and Nakamura, Y. (1999). Cloning and characterization of ASH2L and Ash2l, human and mouse homologs of the *Drosophila ash2* gene, *Cytogenet Cell Genet* *84*, 167-72.
- Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis, *Cell* *102*, 463-73.

-
- Iritani, B. M., and Eisenman, R. N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development, *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13180-5.
- Ito, T., Ikehara, T., Nakagawa, T., Kraus, W. L., and Muramatsu, M. (2000). p300-mediated acetylation facilitates the transfer of histone H2A-H2B dimers from nucleosomes to a histone chaperone, *Genes Dev* *14*, 1899-907.
- Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S., and Tjian, R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module, *Science* *288*, 1422-5.
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., and Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases, *EMBO J* *12*, 5097-5104.
- Janknecht, R., and Hunter, T. (1996). Versatile molecular glue. Transcriptional control, *Curr Biol* *6*, 951-4.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R., and Reuter, G. (1998). SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin, *Cell Mol Life Sci* *54*, 80-93.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the Histone Code, *Science* *293*, 1074-80.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell* *85*, 403-14.
- Karin, M., and Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus, *Curr Biol* *5*, 747-57.
- Kato, G. J., Barrett, J., Villa-Garcia, M., and Dang, C. V. (1990). An amino-terminal c-Myc domain required for neoplastic transformation activates transcription, *Mol Cell Biol* *10*, 5914-5920.
- Kato, G. J., Lee, W. M. F., Chen, L., and Dang, C. V. (1992). Max: functional domains and interaction with c-Myc, *Genes Dev* *6*, 81-92.
- Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function, *Annu Rev Genet* *29*, 289-303.
- Kim, M. Y., Hsiao, S. J., and Kraus, W. L. (2001). A role for coactivators and histone acetylation in estrogen receptor alpha-mediated transcription initiation, *Embo J* *20*, 6084-94.
- Kim, T. K., Kim, T. H., and Maniatis, T. (1998). Efficient recruitment of TFIIB and CBP-RNA polymerase II holoenzyme by an interferon-beta enhanceosome in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 12191-6.
- Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity, *Genes Dev* *13*, 2339-52.

-
- Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Arigo, S. M., and Arigo, H. (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription, *J Biol Chem* 275, 10477-83.
- Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression, *Cell* 99, 447-50.
- Kohl, N. E., Kanda, N., Schreck, R. R., Bruns, G., Latt, S. A., Gilbert, F., and Alt, F. W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas, *Cell* 35, 359-367.
- Koken, M. H., Saib, A., and de The, H. (1995). A C4HC3 zinc finger motif, *C R Acad Sci III* 318, 733-9.
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome, *Cell* 98, 285-94.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?, *Embo J* 19, 1176-9.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control, *Curr Opin Genet Dev* 12, 198-209.
- Kraus, W. L., Manning, E. T., and Kadonaga, J. T. (1999). Biochemical analysis of distinct activation functions in p300 that enhance transcription initiation with chromatin templates, *Mol Cell Biol* 19, 8123-35.
- Krebs, J. E., Kuo, M. H., Allis, C. D., and Peterson, C. L. (1999). Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene, *Genes Dev* 13, 1412-21.
- Kundu, T. K., Palhan, V. B., Wang, Z., An, W., Cole, P. A., and Roeder, R. G. (2000). Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300, *Mol Cell* 6, 551-61.
- Kuo, M. H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E., and Allis, C. D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo, *Genes Dev* 12, 627-39.
- Kuras, L., and Struhl, K. (1999). Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme, *Nature* 399, 609-13.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins, *Nature* 410, 116-20.
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression, *Cell* 89, 349-56.

-
- Lefstin, J. A., und Yamamoto, K. R. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators, *Nature* 392, 885-8.
- Lemon, B., und Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control, *Genes Dev* 14, 2551-69.
- Litt, M. D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C. D., und Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus, *Science* 293, 2453-5.
- Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., Marmorstein, R., und Berger, S. L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14, *Mol Cell* 5, 917-26.
- Lorch, Y., Zhang, M., und Kornberg, R. D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex, *Cell* 96, 389-92.
- Lu, H., Pise-Masison, C. A., Fletcher, T. M., Schiltz, R. L., Nagaich, A. K., Radonovich, M., Hager, G., Cole, P. A., und Brady, J. N. (2002). Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template, *Mol Cell Biol* 22, 4450-62.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., und Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature* 389, 251-60.
- Lüscher, B., Kuenzel, E. A., Krebs, E. G., und Eisenman, R. N. (1989). Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II, *EMBO J* 8, 1111-1119.
- Lüscher, B., und Larsson, L. G. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto- oncoproteins: function and regulation, *Oncogene* 18, 2955-66.
- Lüscher, B. (2001). Function und regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network, *Gene* 277, 1-14.
- Lutterbach, B., und Hann, S. R. (1994). Hierarchical phosphorylation at N-terminal transformation-sensitive sites in c-Myc protein is regulated by mitogens and in mitosis., *Mol Cell Biol* 14, 5510-5522.
- Mahmoudi, T., und Verrijzer, C. P. (2001). Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins, *Oncogene* 20, 3055-66.
- Marcu, K. B., Bossone, S. A., und Patel, A. J. (1992). *myc* function and regulation, *Annu Rev Biochem* 61, 809-860.
- Marmorstein, R. (2001). Structure and function of histone acetyltransferases, *Cell Mol Life Sci* 58, 693-703.
- Martinez-Balbas, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., und Kouzarides, T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription, *Embo J* 17, 2886-93.

Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U. M., Nielsen, S. J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation, *Embo J* 19, 662-71.

Matthias, P., Muller, M. M., Schreiber, E., Rusconi, S., und Schaffner, W. (1989). Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins, *Nucleic Acids Res* 17, 6418.

McBride, A. E., und Silver, P. A. (2001). State of the arg: protein methylation at arginine comes of age, *Cell* 106, 5-8.

McKenna, N. J., und O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators, *Cell* 108, 465-74.

McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., und Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c- Myc and E2F oncoproteins, *Cell* 94, 363-74.

McMahon, S. B., Wood, M. A., und Cole, M. D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc, *Mol Cell Biol* 20, 556-62.

Meroni, G., Cairo, S., Merla, G., Messali, S., Brent, R., Ballabio, A., und Reymond, A. (2000). Mlx, a new Max-like bHLHZip family member: the center stage of a novel transcription factors regulatory pathway?, *Oncogene* 19, 3266-77.

Min, S., und Taparowsky, E. J. (1992). v-Myc, but not Max, possesses domains that function in both transcription activation and cellular transformation, *Oncogene* 7, 1531-1540.

Mori, K., Maeda, Y., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M., und Ariga, H. (1998). MM-1, a novel c-Myc-associating protein that represses transcriptional activity of c-Myc, *J Biol Chem* 273, 29794-800.

Morris, L., Allen, K. E., und La Thangue, N. B. (2000). Regulation of E2F transcription by cyclin E-Cdk2 kinase mediated through p300/CBP co-activators, *Nat Cell Biol* 2, 232-9.

Munshi, N., Agalioti, T., Lomvardas, S., Merika, M., Chen, G., und Thanos, D. (2001). Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation, *Science* 293, 1133-6.

Nagy, P. L., Griesenbeck, J., Kornberg, R. D., und Cleary, M. L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 90-4.

Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., und Grewal, S. I. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly, *Science* 292, 110-3.

Narlikar, G. J., Fan, H. Y., und Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription, *Cell* 108, 475-87.

- Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O. W., Bertness, V., Hollis, G. F., and Minna, J. D. (1985). *L-myc*, a new *myc*-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer, *Nature* *318*, 69-73.
- Negishi, Y., Nishita, Y., Saegusa, Y., Kakizaki, I., Galli, I., Kihara, F., Tamai, K., Miyajima, N., Iguchi-Arigo, S. M., and Ariga, H. (1994). Identification and cDNA cloning of single-stranded DNA binding proteins that interact with the region upstream of the human *c-myc* gene, *Oncogene* *9*, 1133-43.
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M., and Prochownik, E. V. (1999). *MYC* oncogenes and human neoplastic disease, *Oncogene* *18*, 3004-3016.
- Nielsen, S. J., Schneider, R., Bauer, U. M., Bannister, A. J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R. E., and Kouzarides, T. (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters, *Nature* *412*, 561-5.
- Niki, T., Izumi, S., Saegusa, Y., Taira, T., Takai, T., Iguchi-Arigo, S. M., and Ariga, H. (2000). MSSP promotes *ras/myc* cooperative cell transforming activity by binding to *c-Myc*, *Genes Cells* *5*, 127-41.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). *Set9*, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation, *Genes Dev* *16*, 479-89.
- Nislow, C., Ray, E., and Pillus, L. (1997). *SET1*, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes, *Mol Biol Cell* *8*, 2421-36.
- Noma, K., Allis, C. D., and Grewal, S. I. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries, *Science* *293*, 1150-5.
- Nordeen, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers, *Biotechniques* *6*, 454-8.
- Novy, M., E., H., Weiland, T., and Rothender, H. (2000). Interaction of transcription factor Sp1 with the multifunctional protein nucleolin. Paper presented at: 4th EMBL Transcription meeting (EMBL Heidelberg).
- Oelgeschläger, M., Krieg, J., Luscher-Firzlaff, J. M., and Luscher, B. (1995). Casein kinase II phosphorylation site mutations in *c-Myb* affect DNA binding and transcriptional cooperativity with NF-M, *Mol Cell Biol* *15*, 5966-74.
- Oelgeschläger, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S., and Luscher, B. (1996). Interaction of the co-activator CBP with *Myb* proteins: effects on *Myb*- specific transactivation and on the cooperativity with NF-M, *Embo J* *15*, 2771-80. abs.html.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell* *87*, 953-9.

-
- Orphanides, G., und Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression, *Cell* *108*, 439-51.
- Papoulas, O., Beek, S. J., Moseley, S. L., McCallum, C. M., Sarte, M., Shearn, A., und Tamkun, J. W. (1998). The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes, *Development* *125*, 3955-66.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., und Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion, *Mol Cell* *3*, 565-77.
- Pelengaris, S., Rudolph, B., und Littlewood, T. (2000). Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis, *Curr Opin Genet Dev* *10*, 100-105.
- Peterson, C. L., und Workman, J. L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex, *Curr Opin Genet Dev* *10*, 187-92.
- Petruk, S., Sedkov, Y., Smith, S., Tillib, S., Kraevski, V., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M., und Mazo, A. (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene, *Science* *294*, 1331-4.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hänel, F., und Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc, *EMBO J* *16*, 5672-5686.
- Poleskaya, A., Naguibneva, I., Duquet, A., Bengal, E., Robin, P., und Harel-Bellan, A. (2001). Interaction between Acetylated MyoD and the Bromodomain of CBP and/or p300, *Mol Cell Biol* *21*, 5312-20.
- Pollard, K. J., und Peterson, C. L. (1997). Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression, *Mol Cell Biol* *17*, 6212-22.
- Ponting, C., Schultz, J., und Bork, P. (1997). SPRY domains in ryanodine receptors (Ca²⁺)-release channels), *Trends Biochem Sci* *22*, 193-4.
- Prendergast, G. C., Lawe, D., und Ziff, E. B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of Max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and Ras cotransformation, *Cell* *65*, 395-407.
- Prendergast, G. C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc, *Oncogene* *18*, 2967-87.
- Pulverer, B. J., Fisher, C., Vousden, K., Littlewood, T., Evan, G., und Woodgett, J. R. (1994). Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated *in vivo*, *Oncogene* *9*, 59-70.
- Ramakrishnan, V. (1997). Histone structure and the organization of the nucleosome, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *26*, 83-112.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., und Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases, *Nature* 406, 593-9.

Roberts, S. M., und Winston, F. (1997). Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes, *Genetics* 147, 451-65.

Roeder, R. G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II, *Trends Biochem Sci* 21, 327-35.

Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W. W., Wilm, M., Aasland, R., und Stewart, A. F. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4, *Embo J* 20, 7137-48.

Roth, S. Y., Denu, J. M., und Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases, *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.

Roussel, M. F., Cleveland, J. L., Shurtleff, S. A., und Sherr, C. J. (1991). Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling, *Nature* 353, 361-363.

Roy, A. L., Carruthers, C., Gutjahr, T., und Roeder, R. G. (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I, *Nature* 365, 359-361.

Sadowski, I., und Ptashne, M. (1989). A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells, *Nucleic Acids Res* 17, 7539.

Sakamuro, D., Elliott, K. J., Wechsler-Reya, R., und Prendergast, G. C. (1996). BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor, *Nat Genet* 14, 69-77.

Salghetti, S. E., Kim, S. Y., und Tansey, W. P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc, *Embo J* 18, 717-26.

Schramke, V., Neecke, H., Brevet, V., Corda, Y., Lucchini, G., Longhese, M. P., Gilson, E., und Geli, V. (2001). The set1Delta mutation unveils a novel signaling pathway relayed by the Rad53-dependent hyperphosphorylation of replication protein A that leads to transcriptional activation of repair genes, *Genes Dev* 15, 1845-58.

Schreiber-Agus, N., Stein, D., Chen, K., Goltz, J. S., Stevens, L., und DePinho, R. A. (1997). *Drosophila* Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1235-40.

Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U. H., Bornkamm, G. W., Eick, D., und Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division, *Curr Biol* 9, 1255-8.

Schulz, M., Schneider, S., Lottspeich, F., Renkawitz, R., und Eggert, M. (2001). Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein, *Biochem Biophys Res Commun* 280, 476-80.

Sears, R., Leone, G., DeGregori, J., and Nevins, J. R. (1999). Ras enhances Myc protein stability, *Mol Cell* 3, 169-79.

Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability, *Genes Dev* 14, 2501-14.

Seth, A., Gonzalez, F. A., Gupta, S., Raden, D. L., and Davis, R. J. (1992). Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase, *J Biol Chem* 267, 24796-24804.

Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription, *Cell* 103, 843-52.

Shearn, A., Rice, T., Garen, A., and Gehring, W. (1971). Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of *Drosophila*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 2594-8.

Shen-Li, H., O'Hagan, R. C., Hou, H., Jr., Horner, J. W., 2nd, Lee, H. W., and DePinho, R. A. (2000). Essential role for Max in early embryonic growth and development, *Genes Dev* 14, 17-22.

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, 1889-92.

Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation, *Mol Cell Biol* 20, 2676-86.

Sommer, A., Hilfenhaus, S., Menkel, A., Kremmer, E., Seiser, C., Loidl, P., and Luscher, B. (1997). Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase activity, *Curr Biol* 7, 357-65.

Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels, *Mol Cell* 5, 745-51.

Srivastava, M., and Pollard, H. B. (1999). Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights, *Faseb J* 13, 1911-22.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1, *Nat Cell Biol* 3, 392-9.

Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors, *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-59.

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.

Strahl, B. D., und Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications, *Nature* *403*, 41-5.

Street, A. J., Blackwood, E., Lüscher, B., und Eisenman, R. N. (1990). Mutational analysis of the carboxy-terminal casein kinase II phosphorylation site in human c-Myc, *Curr Top Microbiol Immunol* *166*, 251-258.

Takayama, M., Taira, T., Iguchi-Arigo, S. M., und Ariga, H. (2000). CDC6 interacts with c-Myc to inhibit E-box-dependent transcription by abrogating c-Myc/Max complex, *FEBS Lett* *477*, 43-8.

Tuteja, R., und Tuteja, N. (1998). Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein, *Crit Rev Biochem Mol Biol* *33*, 407-36.

Varga-Weisz, P. (2001). ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions, *Oncogene* *20*, 3076-85.

Vassilev, A., Yamauchi, J., Kotani, T., Prives, C., Avantaggiati, M. L., Qin, J., und Nakatani, Y. (1998). The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily, *Mol Cell* *2*, 869-75.

Versteeg, I., Sevenet, N., Lange, J., Rousseau-Merck, M. F., Ambros, P., Handgretinger, R., Aurias, A., und Delattre, O. (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer, *Nature* *394*, 203-6.

Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., und Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes, *Mol Cell Biol* *20*, 1899-910.

Vo, N., und Goodman, R. H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation, *J Biol Chem* *276*, 13505-8.

Voo, K. S., Carlone, D. L., Jacobsen, B. M., Flodin, A., und Skalnik, D. G. (2000). Cloning of a mammalian transcriptional activator that binds unmethylated CpG motifs and shares a CXXC domain with DNA methyltransferase, human trithorax, and methyl-CpG binding domain protein 1, *Mol Cell Biol* *20*, 2108-21.

Waltzer, L., und Bienz, M. (1998). Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling, *Nature* *395*, 521-5.

Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., und Zhang, Y. (2001a). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4- specific methyltransferase, *Mol Cell* *8*, 1207-17.

Wang, J., Zhou, Y., Yin, B., Du, G., Huang, X., Li, G., Shen, Y., Yuan, J., und Qiang, B. (2001b). ASH2L: alternative splicing and downregulation during induced megakaryocytic differentiation of multipotential leukemia cell lines, *J Mol Med* *79*, 399-405.

Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K., und Greene, M. I. (1998). BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells, *Oncogene* *17*, 1939-1948.

- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M., und Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo, *Mol Cell* *1*, 507-18.
- Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B. R., White, M. F., Workman, J. L., und Owen-Hughes, T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex, *Nature* *400*, 784-7.
- Widom, J. (1997). Chromatin: the nucleosome unwrapped, *Curr Biol* *7*, R653-5.
- Wolffe, A. P., und Guschin, D. (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription, *J Struct Biol* *129*, 102-22.
- Workman, J. L., und Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation, *Annu Rev Biochem* *67*, 545-79.
- Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B. M., Montminy, M., und Evans, R. M. (2001). A transcriptional switch mediated by cofactor methylation, *Science* *294*, 2507-11.
- Yang, T. H., Tsai, W. H., Lee, Y. M., Lei, H. Y., Lai, M. Y., Chen, D. S., Yeh, N. H., und Lee, S. C. (1994). Purification and characterization of nucleolin and its identification as a transcription repressor, *Mol Cell Biol* *14*, 6068-74.
- Yano, T., Sander, C. A., Clark, H. M., Dolezal, M. V., Jaffe, E. S., und Raffeld, M. (1993). Clustered mutations in the second exon of the *myc* gene in sporadic Burkitt's lymphomas, *Oncogene* *8*, 2741-2748.
- Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M., und Eckner, R. (1998). Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300, *Cell* *93*, 361-72.
- Yie, J., Senger, K., und Thanos, D. (1999). Mechanism by which the IFN-beta enhanceosome activates transcription, *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13108-13.
- Ying, G. G., Proost, P., van Damme, J., Bruschi, M., Introna, M., und Golay, J. (2000). Nucleolin, a novel partner for the Myb transcription factor family that regulates their activity, *J Biol Chem* *275*, 4152-8.
- Zelevnik-Le, N. J., Harden, A. M., und Rowley, J. D. (1994). 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 10610-4.
- Zervos, A. S., Gyuris, J., und Brent, R. (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites, *Cell* *72*, 223-232.

Zhang, W., Kadam, S., Emerson, B. M., und Bieker, J. J. (2001). Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Kruppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex, *Mol Cell Biol* 21, 2413-22.

Zhong, H., Voll, R. E., und Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300, *Mol Cell* 1, 661-71.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., und Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization, *Genes Dev* 12, 2424-33.

6 Anhang

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Jörg Vervoorts

Hannover, den 28.10.2002

Lebenslauf

Name	Vervoorts
Vorname	Jörg
Geburtsdatum	16.01.1970
Geburtsort	Bochum
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	katholisch
Anschrift	Schleidenstr. 4 30177 Hannover
Telefon	0511 / 3 52 40 18

Schulbildung

1976 - 1980	Grundschule, Bochum
1980 - 1989	Gymnasium, Märkische-Schule Bochum

Studium

1990 - 1993	Biologiestudium (Dipl.), Universität Braunschweig
September 1992	Vordiplom Biologie
1993 – 1997	Biochemiestudium (Dipl.), Universität Hannover
Dezenber 1997	Diplom Biochemie

Berufserfahrung

1998 - 2001	Promotion im Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover, AG Prof. B. Lüscher
seit Oktober 2001	wissenschaftlicher Mitarbeit in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie AG Dr. N. Malek

Veröffentlichungen

Publikationen:

Vervoorts, J., und Luscher, B. (1999). DNA binding of Myc/Max/Mad network complexes to oligonucleotides containing two E box elements: c-Myc/Max heterodimers do not bind DNA cooperatively, *Biol Chem* 380, 1121-6.

Al-Azzeh, E., Dittrich, O., Vervoorts, J., Blin, N., Gott, P., und Luscher, B. (2002). Gastroprotective peptide trefoil factor family 2 gene is activated by upstream stimulating factor but not by c-Myc in gastrointestinal cancer cells, *Gut* 51, 685-690.

Vervoorts, J., Lüscher-Firzlaff, J. M., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., und Lüscher, B. (2003). Stimulation of c-Myc transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP, *EMBO Reports* (im Druck).

Posterpräsentation:

Schreek, S., Austen, M., Kraft, R., Kremmer, R., Lesniewicz, K., Mehrain, Y., Mertsching, J., Vervoorts, J., und Lüscher, B. (2001). p150PARP, a novel poly(ADP-ribose)polymerase, that interacts with the proto-oncoprotein c-Myc. Paper presented at: 13th International Symposium on ADP-ribosylation (New York).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Lüscher möchte ich für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit, sowie für seine Diskussionsbereitschaft danken.


Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn und Herrn Prof. Dr. Walter H. Müller danke ich für die Übernahme des Referats.

Den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lüscher- Matthias Austen, Tone Berger, Dominique Brand, Hannelore Burkhardt, Oliver Dittrich, Karen Dohmann, Kolja Eckhard, Anja Krippner, Stefanie Hilfenhaus, Juliane Lüscher-Firzlaff, Annette Menkel, Jürgen Mertsching, Sabine Rottmann, Sabine Schreek, Anette Sommer und Gesa Walsemann danke ich für die angenehme Atmosphäre, Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft.

Hannelore Burkhardt danke ich besonders für die sehr gute technische und persönliche Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Bei Anette Sommer, Lilly Weber, Nisar Malek, Andre Schneider, Antje Bürger und Ralf Cordes bedanke ich mich für das Korrekturlesen.

Einen ganz besonderen Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung während meines Studiums und der Doktorarbeit.

Ruth danke ich für die  !