

Funktionelle Bedeutung der Interaktion von Myc und Ash2 in Transformation und Genregulation

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Diplom-Biologin Gesa Walsemann
geboren am 24. November 1975 in Alfeld/Leine

2004

Referent:

Prof. Dr. Bernhard Lüscher

Ko-Referent:

Prof. Dr. Achim Gossler

Tag der Promotion:

26.11.2004

Schlagworte:

Deutsch:

c-Myc,
Histon-Methyltransferasen,
Transformation

Englisch:

c-Myc,
histone methyltransferases,
transformation

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 <u>EINLEITUNG</u>	3
2.1 Krebsentstehung und Transformation	3
2.2 Der Zellzyklus	7
2.3 Das Proto-Onkoprotein Myc	9
2.3.1 Funktion und Expression von Myc	9
2.3.2 Myc in der Transformation	10
2.3.3 Myc und sein obligatorischer Interaktionspartner Max	11
2.3.4 Transaktivierung durch Myc	12
2.3.5 Myc-vermittelte Gen-Repression	13
2.4 Chromatin- und Protein-Modifikationen	16
2.4.1 Chromatin	16
2.4.2 Chromatin-Modifikationen und Genexpression	16
2.4.3 Kovalente Histon-Modifikationen	17
2.4.4 Protein-Methylierung	22
2.5 Trithorax- und Polycomb-Proteine	23
2.5.1 Epigenetik durch Trithorax- und Polycomb-Proteine	24
2.6 Das Trithorax-Protein Ash2	25
2.6.1 Ash2 in <i>Drosophila</i>	25
2.6.2 Die Struktur von Ash2	26
2.6.3 Ash2-assoziierte Histon-Methyltransferase (HMT)-Komplexe	26
2.6.4 Ash2, ein neuer Myc-Interaktionspartner	29
2.7 Zielsetzung	30
3 <u>ERGEBNISSE</u>	31
3.1 Interaktion von Myc und Ash2	31
3.1.1 Kartierung der Ash2-Interaktionsdomäne in Myc <i>in vivo</i>	31
3.1.2 Kartierung der Myc-Interaktionsdomäne in Ash2 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	33
3.2 Interaktion von Myc und Ash2 mit Histon-Methyltransferasen (HMTs)	34
3.2.1 Ash2 bindet eine HMT	34
3.2.2 Myc bindet eine HMT	40

3.3	Ash2 wird methyliert	43
3.4	Transformation von Rattenembryo-Fibroblasten (REFs) durch Ash2 und Ras	46
3.4.1	Ash2 und Ras transformieren REFs	46
3.4.2	Charakterisierung der Ash2/Ras-transformierten Zellen	48
3.4.3	Ash2/Ras-Zellen entwickeln einen tetraploiden Karyotyp	50
3.4.4	Ash2/Ras-Zellen gehen unter Serumangel in die Apoptose	51
3.4.5	Ash2/Ras-Zellen wachsen langsamer als Myc/Ras-Zellen	53
3.4.6	Expression verschiedener Zellzyklus-relevanter und anderer Proteine in Ash2/Ras-Zellen	55
3.4.7	Der Zellzyklus-Inhibitor p21 ist in Ash2/Ras-Zellen überexprimiert	57
4	<u>DISKUSSION</u>	61
4.1	Kartierung der Interaktionsdomänen in Ash2 und Myc	61
4.1.1	Die Ash2-Interaktionsdomänen in Myc unterscheiden sich <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	61
4.1.2	Ash2 bindet über eine zentrale Region zwischen Zink-Finger und SPRY-Domäne <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> an Myc	63
4.2	Ash2 und Myc binden Histon-Methyltransferasen (HMTs)	64
4.2.1	Ash2 bindet eine Histon H3-Lysin-9-spezifische HMT	64
4.2.2	Myc bindet eine Histon H3-Lysin-9-spezifische HMT	70
4.3	Ash2 wird methyliert	78
4.4	Ash2 ist ein Onkoprotein, das mit Ras in der Transformation kooperiert	79
5	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	90
5.1	Material	90
5.1.1	Allgemeine Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	90
5.1.2	Vektoren	90
5.1.3	Antikörper	92
5.1.4	Material für das Arbeiten mit Bakterien	93
5.1.5	Bakterienstämme	93
5.1.6	Material für die Zellkultur	93
5.1.7	Eukaryotische Zellen	93
5.2	Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	95
5.2.1	Transformation	95
5.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	95
5.2.3	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	95
5.2.4	Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen	96
5.3	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen (Zellkultur)	97
5.3.1	Kryokonservierung	97
5.3.2	Transiente Transfektion	97

5.3.4	FACS-Analysen	97
5.3.5	Karyotyp-Analysen	98
5.4	Arbeiten mit DNA	98
5.4.1	Enzymatische Modifizierung von DNA	98
5.4.2	Elektrophorese von DNA und Extraktion aus Agarose-Gelen	99
5.5	Proteinchemische Methoden	99
5.5.1	Präparation von Zelllysaten	99
5.5.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	99
5.5.3	Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau	100
5.5.4	Western-Blot	100
5.5.5	Nachweis von Proteinen in der Immunofluoreszenz	101
5.5.6	Immunpräzipitation (IP)	102
5.5.7	Gekoppelte <i>in vitro</i> -Transkription /-Translation	102
5.5.8	Pulldown-Experimente mit GST-Fusionsproteinen	102
5.5.9	Kinase-Assays	102
5.5.10	HMT-Assays	103
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	104
7	<u>ANHANG</u>	112
7.1	Abkürzungen	112
7.2	Lebenslauf	115
7.3	Veröffentlichungen	116
7.4	Erklärung	117
7.5	Danksagungen	118

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Zusammenfassung

c-Myc ist ein Proto-Onkoprotein, das viele Aspekte des Zellverhaltens wie Proliferation, Transformation und Apoptose reguliert. Die Deregulation der c-Myc-Expression ist eine häufige Erscheinung in vielen humanen Tumoren und trägt zur Transformation von normalen zu malignen Zellen bei. Auf molekularer Ebene funktioniert Myc als Transkriptionsfaktor, der Zielgene aktiviert oder reprimiert. Die Aktivierung wird vermutlich durch die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen und Nukleosomen-*remodelling*-Enzyme ermöglicht, während der Mechanismus der Repression bisher kaum verstanden ist. Eines der c-Myc-bindenden Proteine, das Trithorax-Protein Ash2, kommt in mehreren Komplexen mit Histon-Methyltransferasen vor und könnte daher diese potenziellen Chromatin-modifizierenden Komplexe zu c-Myc dirigieren und die Regulation von Zielgenen beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war, die funktionelle Beziehung von c-Myc und Ash2 auf zwei Ebenen zu analysieren: Erstens wurde hier das mechanistische Zusammenspiel der zwei Proteine und mögliche assoziierte enzymatische Aktivitäten untersucht, zweitens wurde das onkogene Potenzial von Ash2 und seine Beziehung zu Myc in der Transformation analysiert.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass Myc und Ash2 *in vivo* mit Histon-Methyltransferase-Aktivitäten assoziiert sind, die von allen Core-Histonen nur H3 spezifisch methylierten, und zwar vorwiegend an Lysin-9 (H3-K9). Aus einer umfangreichen Kartierung der Interaktions-Domänen von c-Myc und Ash2 und den assoziierten Methyltransferasen konnte geschlossen werden, dass die Bindung einer Methyltransferase an Myc durch Ash2 vermittelt sein könnte. Da eine H3-K9-Methylierung bekanntermassen mit der Repression von Promotoren assoziiert ist, könnte die Rekrutierung eines Methyltransferase-Komplexes als neuer Mechanismus bei der c-Myc-vermittelten negativen Regulation von Zielgenen beteiligt sein.

Es ist bekannt, dass c-Myc zusammen mit onkogenem Ras Tumore bilden kann. Während Ash2 die Myc/Ras-abhängige Transformation nicht signifikant beeinflusste, konnte Ash2 mit Ras in der Transformation kooperieren und dadurch als potentielles Proto-Onkoprotein charakterisiert werden. Ausserdem konnte die Myc/Ras-Transformation durch die siRNA-abhängige Reduktion der Ash2-Proteinmenge inhibiert werden, was darauf hinweist, dass Ash2 einen wichtigen Beitrag bei dem c-Myc-vermittelten onkogenen Signalweg leisten könnte. Trotz der möglichen Rolle von Ash2 in der Myc/Ras-Transformation unterschieden sich die Ash2/Ras- und Myc/Ras-transformierten Zellen bezüglich mehrerer Kriterien: Ash2/Ras-Zellen entwickelten einen tetraploiden Karyotyp, wuchsen langsamer, und zeigten ein anderes Expressionsmuster von Zellzyklus-regulierenden Proteinen als Myc/Ras-Zellen. Zusammenfassend wird in der vorliegenden Arbeit postuliert, dass Ash2 mit Myc bei der Repression von Zielgenen und der Transformation von primären Zellen kooperieren könnte. Die Ergebnisse weisen aber darauf hin, dass Ash2 auch andere Funktionen in der Zelle unabhängig von Myc ausüben kann.

1.2 Abstract

c-Myc is a proto-oncoprotein that regulates many aspects of cell behavior including proliferation, transformation and apoptosis. Deregulated expression of c-Myc is a common feature of many human malignancies and contributes to the transformation of normal to malignant cells. At the molecular level, c-Myc acts as a transcription factor by activating or repressing target genes. Activation is at least in part achieved by recruiting histone-acetyltransferases and nucleosome remodelling complexes to target promoters. In contrast, the mechanism of c-Myc-dependent repression is presently poorly understood. One of the c-Myc binding proteins, the Trithorax protein Ash2, forms several complexes with histone methyltransferases and could therefore be a potential remodelling complex recruited by c-Myc, mediating transcriptional activation or repression of c-Myc target genes.

The aim of this work was to analyze the functional relationship between Ash2 and c-Myc proteins at two levels. Firstly, this study investigated the mechanistic interplay of the two proteins and associated enzymatic activities. Secondly, the oncogenic potential of Ash2 was examined and its relation to c-Myc in transformation.

In this study c-Myc and Ash2 could be shown to associate with histone methyltransferase activities in cells. Of the core histones only histone H3 served as a substrate and was preferentially methylated at lysine 9 (H3-K9). Extensive mapping of the interaction domains of c-Myc and Ash2 and their associated methyltransferases led to the conclusion that the binding of a H3-K9 specific methyltransferase to c-Myc might be mediated by Ash2. Since histone 3 lysine 9 methylation is known to be associated with promoter repression, this association might provide a novel mechanism that explains how c-Myc negatively regulates promoter activity.

It is well established that c-Myc co-operates with mutated Ras proteins in transformation. While the overexpression of Ash2 was unable to enhance or repress significantly Myc/Ras-transformation, Ash2 could co-operate with Ras suggesting that Ash2 has oncogenic activity. Moreover, c-Myc/Ras-dependent transformation was strongly inhibited by siRNA-mediated depletion of endogenous Ash2. This finding supports the notion that Ash2 is an essential part of the c-Myc oncogenic pathway. Despite the potential role of Ash2 in c-Myc/Ras-transformation, c-Myc/Ras and Ash2/Ras transformed cells differed in many aspects. Ash2/Ras cells grew slower than c-Myc/Ras cells, acquired a tetraploid karyotype and differed from c-Myc/Ras cells in the expression pattern of proteins involved in the regulation of the cell cycle.

Together, the present study suggests that Ash2 cooperates with c-Myc in the repression of target genes and in the transformation of primary cells. The results indicate, however, that Ash2 carries out also other functions in the cell that are independent of c-Myc.

2 EINLEITUNG

2.1 Krebsentstehung und Transformation

Krebsentstehung

Die Homöostase, das Gleichgewicht, einer Zelle wird durch ein ausbalanciertes Abstimmen von Zellteilung, Differenzierung, Seneszenz (Altern) und Apoptose (programmierter Zelltod) erreicht. Krebs entsteht, wenn dieses Gleichgewicht gestört ist und Zellen unkontrolliert wachsen und proliferieren können, was zur Tumorbildung führt. Die Ursache dafür ist eine Kombination an genetischen und epigenetischen Veränderungen, die entweder vererbt oder nicht vererbt sind, wobei die nicht-vererbten Mutationen meist durch Umwelteinflüsse, wie UV-Licht u.a. entstehen. Die genetischen Veränderungen umfassen Punktmutationen, Amplifikationen, Translokationen, Insertionen und Veränderungen der Chromosomenzahl (Aneuploidie). Eine Theorie der Tumorentstehung ist die der „Klonalen Evolution“, die postuliert, dass alle Krebszellen in einem Tumorgewebe von einer Zelle abstammen, die mehrere Mutationen angereichert hat (Nowell, 2002). Nagerzellen benötigen für eine Transformation mindestens zwei onkogene Mutationen, während dies für humane Zellen nicht ausreicht (Hanahan und Weinberg, 2000). Tumor-fördernde Mutationen können zur Aktivierung oder Inaktivierung von bestimmten Genen führen, wobei die aktivierten als Onkogene, die inaktivierten als Tumorsuppressoren bezeichnet werden. Proto-Onkogene sind die normalen zellulären Homologe der Onkogene, die Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Signaltransduktions-Proteine, Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren sein können (Henriksson und Luscher, 1996).

Transformation

Transformation ist ein Prozess aus mehreren Schritten von genetischen Veränderungen, der eine normale Zelle in eine tumorartige, grenzenlos wachsende Zelle umwandelt. Das Wachstum der transformierten Zellen ist nicht mehr abhängig von ihrer Verankerung an das Substrat oder limitiert durch die Kontaktinhibition, so dass transformierte Zellen in der Zellkultur hauptsächlich durch zwei Assays charakterisiert werden: durch den Focus-Bildungs-Assay (I) und den Weichagar-Assay (II) (Drayton und Peters, 2002): (I) Nicht-transformierte Zellen wachsen in der Zellkulturschale in einer Schicht (Monolayer) und beenden ihre Proliferation, wenn sie aufeinandergetroffen und zusammengewachsen, d.h. konfluent, sind. Transformierte Zellen lassen sich dagegen nicht durch Konfluenz im Zellzyklus arretieren, sondern wachsen über den Monolayer hinaus in mehreren Schichten. In einer Population von normalen Zellen bilden transformierte Zellen Zellhäufchen, sogenannte Foci. (II) Ausserdem ist das Wachstum nicht-transformierter Zellen abhängig von

ihrer Verankerung, so dass sie nicht im Weichagar wachsen können im Gegensatz zu transformierten Zellen.

Ein derzeitiges Modell schlägt vor, dass das maligne Wachstum durch folgende essentielle Veränderungen der Zellphysiologie bestimmt wird:

- 1) Unabhängigkeit von Wachstumssignalen,
- 2) Resistenz gegenüber Wachstums-hemmenden Signalen,
- 3) Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose),
- 4) Unlimitiertes replikatives Potenzial,
- 5) Stimulation und Aufrechterhaltung der Angiogenese und
- 6) Gewebeinvasion und Metastasenbildung.

1) Unabhängigkeit von Wachstumssignalen:

Normale Zellen benötigen für den Übergang von einem ruhenden in einen aktiven Zustand mitogene Wachstums-Faktoren von aussen, wohingegen Tumorzellen eigene Wachstumssignale generieren können und somit nicht von äusseren Faktoren abhängig sind. Dieses geschieht u. a. durch die Überexpression von Rezeptoren, wie z. B. von HER2/Neu, was in Brustkarzinomen zu beobachten ist, oder durch Veränderungen von zytoplasmatischen Signal-Kaskaden, v. a. der SOS-Ras-Raf-MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)-Kaskade (Medema und Bos, 1993; Slamon *et al.*, 1987). Beispielsweise ist in 25 % der humanen Tumoren *ras* derart mutiert, dass es ständig Wachstumssignale in die Zelle sendet.

Folglich sind viele transformierte Zellen unabhängig von äusseren Wachstumssignalen, indem sie ihre eigenen Signale generieren.

2) Resistenz gegenüber Wachstums-hemmenden Signalen:

Die meisten Tumor-fördernden Massnahmen gegen Wachstums-hemmende Signale sind mit dem Zellzyklus assoziiert und spielen oft bei dem Übergang von der G1- zur S-Phase, am Restriktionspunkt, eine Rolle. Daher sind viele Proteine, die diesen Punkt regulieren, in Tumoren aktiviert oder defekt (Hanahan and Weinberg, 2000).

Weiterhin wird häufig beobachtet, dass in Tumorzellen die terminale Differenzierung gehemmt wird, was u. a. durch die Überexpression von c-Myc erfolgen kann, denn Myc kann die Differenzierung inhibieren (Henriksson und Luscher, 1996).

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass Tumorzellen durch einen defekten Zellzyklus oder durch die Inhibierung der Differenzierung resistent gegen Wachstums-hemmende Signale sein können.

3) Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose):

Apoptose kann von jeder Zelle des Körpers durch Mitglieder der apoptotischen Maschinerie ausgelöst werden, die sich in die zwei Klassen der Sensoren und Effektoren unterteilen. Sensoren überwachen die extra- und intrazelluläre Umgebung auf Abnormalitäten, z. B. DNA-Schäden, Signalungleichgewichte aufgrund von Onkogen-Aktivierung, ungenügende Überlebensfaktoren oder Hypoxie (Sauerstoffmangel). Wenn Abnormalitäten auftreten, regulieren die Sensoren die Effektoren, die die apoptotischen Schritte einleiten und letztendlich Caspasen, intrazelluläre Proteasen, aktivieren, die die subzellulären Strukturen zerstören (Thornberry und Lazebnik, 1998). Eine Resistenz gegen Apoptose kann auf verschiedene Weise entstehen, oft durch die Aktivierung anti-apoptotischer oder Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine, z. B. ist der pro-apoptotische Faktor und Tumor-Suppressor p53 am häufigsten mutiert (in etwa 50 % der humanen Tumore).

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass fast alle Krebszellen zum Überleben die Apoptose umgehen müssen.

4) Unlimitiertes replikatives Potenzial:

Viele Zelltypen tragen ein Zell-autonomes Programm, das ihre Vermehrung limitiert und unabhängig von den oben genannten Signalwegen arbeitet. Unter normalen Umständen können sich Zellen nur eine bestimmte Zeit vermehren, bis sie ihr Wachstum einstellen und in ein G₀-ähnliches Stadium, in die sogenannte Seneszenz (Altern), eintreten. Seneszenten Zellen nehmen eine flache, vergrößerte Form an und proliferieren trotz Nährstoffzufuhr nicht mehr, obwohl sie noch metabolisch aktiv sind. Wenige Zellen gehen nicht in die Seneszenz, sondern vermehren sich, bis sie ein zweites Stadium, die *crisis*, erreichen, die durch massiven Zelltod und karyotypische Veränderungen charakterisiert ist. Auch diesem Szenario können nur wenige Zellen entgehen, die sich grenzenlos vermehren können und das Stadium der Immortalisierung erreicht haben (Hayflick, 1997). Die meisten Tumorzellen, die in Kultur gehalten werden, sind immortalisiert, was eine Voraussetzung für malignes Wachstum zu sein scheint. Molekularbiologisch kann dieser Übergang von einer normalen in eine immortalisierte Zelle folgendermassen erklärt werden: In einer normalen Zelle gehen den Telomeren (den Enden der Chromosomen) 50-100 Basenpaare bei jedem Zellzyklus verloren, weil die DNA-Polymerase die 3'-Enden nicht vollständig replizieren kann. Dadurch entstehen schliesslich ungeschützte DNA-Enden, die mit den Enden anderer Chromosomen fusionieren können, was zur *crisis* und chromosomalen Instabilität beitragen kann (Counter *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu sind die Telomere in fast allen Tumorarten erhalten, was durch die Überexpression des Telomerase-Enzyms ermöglicht werden kann, das die Telomer-DNA wieder vervollständigt.

Demzufolge sollten alle transformierten Zellen die Fähigkeit besitzen, die Seneszenz und den Abbau der Telomer-Enden zu verhindern.

5) Stimulation und Aufrechterhaltung der Angiogenese:

Das Überleben und die Funktionen einer Zelle sind abhängig von Sauerstoff und Nährstoffen, die im Körper in den Blutgefäßen herantransportiert werden, so dass die Angiogenese (das Wachstum neuer Blutgefäße) essentiell für proliferierende Zellen ist (Bouck *et al.*, 1996). Angiogenese wird u.a. reguliert von Integrinen und Adhäsions-Molekülen, die die Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte vermitteln, und löslichen Faktoren und ihren Rezeptoren, z. B. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*).

6) Gewebeeinwanderung und Metastasierung:

Die Metastasierung wird durch die Aktivierung extrazellulärer Proteasen und durch veränderte Bindungsspezifitäten der Cadherine, CAMs (Zell-Zell Adhäsions-Moleküle) und Integrine gefördert. In vielen malignen Zellen, die die Fähigkeit zur Gewebeeinwanderung und Metastasierung besitzen, sind diese Faktoren mutiert (Johnson, 1991).

Neben diesen oben genannten notwendigen Veränderungen in der Zellphysiologie einer Tumorzelle können ihre tumorigenen Eigenschaften durch genomische Instabilität gefördert werden. Die genomische Stabilität wird durch die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden und durch eine korrekte Chromosomen-Trennung aufrechterhalten, kontrolliert z. B. durch p53 und andere Tumor-Suppressoren (Lengauer *et al.*, 1998). Wenn diese Faktoren mutiert sind, kann eine genomische Instabilität eintreten, die die Mutationsrate erhöhen kann und so das Eintreten der tumorigenen Veränderungen wahrscheinlicher macht. Die genomische Instabilität kann u. a. auch zum Abweichen der Anzahl der Chromosomen von der normalen Chromosomenzahl (Aneuploidie) oder zum Vervielfältigen des Genoms um einen oder mehrere Chromosomensätze (Polyploidie) führen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für den Übergang von einer normalen zu einer transformierten Tumorzelle mehrere genetische Veränderungen notwendig sind, die der malignen Zelle ermöglichen, unabhängig von Wachstumssignalen und resistent gegen Wachstums-hemmende Signale zu wachsen, sowie die Apoptose zu umgehen, sich unlimitiert zu replizieren und im Organismus die Bildung von Blutgefäßen zu fördern. Die Entstehung dieser essentiellen genetischen tumorigenen Veränderungen kann durch eine genomische Instabilität erleichtert werden.

2.2 Der Zellzyklus

Wenn es das genetische Programm erlaubt, kann sich eine Mutterzelle in zwei Tochterzellen teilen, was durch den kontrollierten Ablauf des Zellzyklus' reguliert wird. Der Zellzyklus besteht aus den vier Phasen G1, S, G2 und M, wobei die G1-, S- und G2-Phasen auch unter dem Begriff der Interphase zusammengefasst werden (Abb. 2.1).

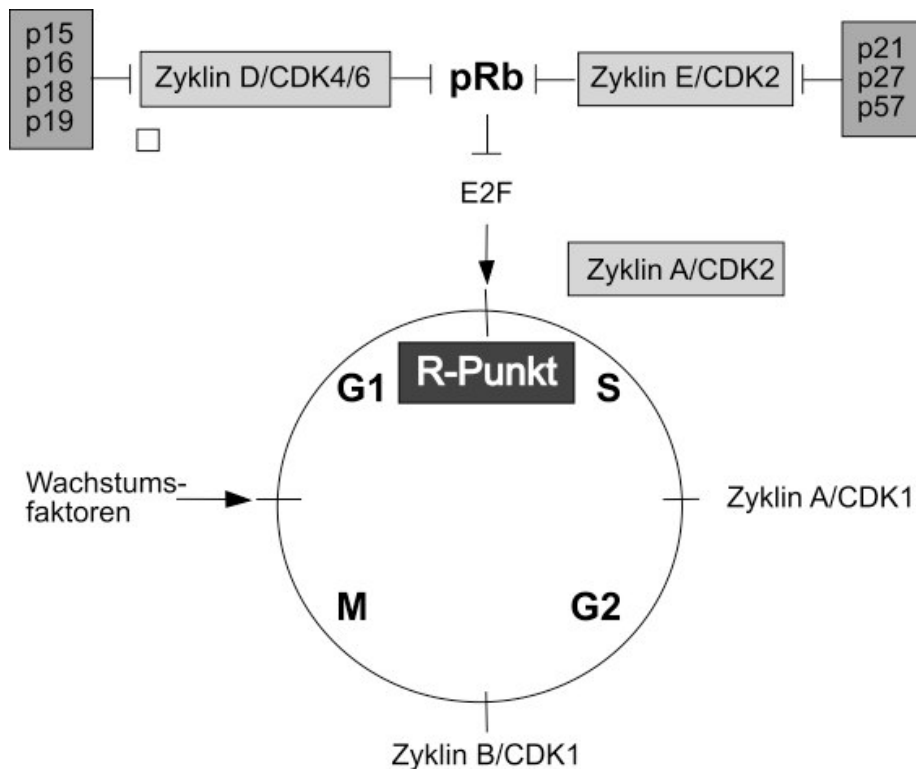


Abb. 2.1: Die Regulation des Zellzyklus'. Der Zellzyklus besteht aus den G1-, S-, G2- und M-Phasen, die durch bestimmte Zyklin/CDK-Komplexe, CDK-Inhibitoren und pRb kontrolliert sind. Weitere Erklärungen sind im Text zu finden.

Während der M (Mitose)-Phase findet die Mitose, d. h. die Kernteilung statt, an die sich die Zytokinese, die Zellteilung, anschliesst. Um sich zu teilen, muss die Zelle zuvor ihr Erbmateriale verdoppelt haben, was in der S (Synthese)-Phase erfolgt, in der die neue DNA durch Replikation synthetisiert wird. Die G (*gap*: engl. Lücke)-Phasen überbrücken die S- und M-Phasen und sind nötig, um den geregelten Ablauf zu kontrollieren. In der G1-Phase wird entschieden, ob überhaupt eine Zellteilung stattfinden kann. Ein Kriterium, das zu dieser Entscheidung beiträgt, ist z. B. ob genügend Wachstumsfaktoren vorhanden sind; wenn dies nicht zutrifft, kann die Zelle in eine Ruhephase, G0, gehen. Essentiell für die Regulation der G1-Phase ist der Restriktionspunkt (R-Punkt) am G1/S-Übergang, denn wenn dieser Punkt überschritten ist, hat sich die Zelle zur Teilung entschieden und tritt in die S-Phase ein.

Die verschiedenen Phasen des Zellzyklus' sind v. a. durch Zykline, Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs, *cyclin dependent kinases*) und ihre Inhibitoren kontrolliert. CDKs werden in einer bestimmten Zellzyklus-Phase durch die Bindung von Zyklinen aktiviert und phosphorylieren ihre Substrate, was den Fortlauf des Zellzyklus' begünstigt. Die CDKs werden durch die Bindung der Zykline, Phosphorylierung von CAK-Kinasen (CDK-aktivierende Kinasen) und durch die Dephosphorylierung durch die CDC25-Phosphatasen aktiviert. Die Zykline D1, D2 und D3 binden CDK4 und CDK6 und werden als frühe Antwort auf Mitogen-Stimulierung in der frühen bis mittleren G1-Phase synthetisiert. CDK2 wird durch Zyklin E aktiviert, das in der späten G1- und frühen S-Phase exprimiert wird, und durch Zyklin A, das später als Zyklin E am G1/S-Übergang und während der S-Phase gebildet wird. Somit werden CDK4/6 in der mittleren G1-Phase, CDK2 in der späten G1-Phase aktiviert. Das wichtigste Substrat für Zyklin D/CDK4/6-Komplexe ist der Tumor-Suppressor pRb (Retinoblastoma-Protein), denn durch die Phosphorylierung wird pRb inaktiviert und kann E2F nicht mehr reprimieren. E2F ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Bindung an Promotoren die Genexpression seiner Zielgene reguliert, was durch die Bindung von unphosphoryliertem pRb an E2F und seine Zielgene reprimiert werden kann. E2F ist für den Fortlauf des Zellzyklus am G1/S-Übergang notwendig, denn es kann z. B. das *Zyklin E*-Gen aktivieren. Zyklin E/CDK2-Komplexe phosphorylieren ebenfalls pRb, aber auch andere Substrate wie Histon H1 und den CDK-Inhibitor p27 (Coqueret, 2003). Die CDKs können durch CDK-Inhibitoren gehemmt werden, die in die INK4- und die Cip/Kip-Familie unterteilt werden (Sherr und Roberts, 1999). Die INK4 (Inhibitoren von CDK4)-Proteine, p15, p16, p18 und p19, inhibieren spezifisch CDK4/6-Komplexe, während die Mitglieder der Cip/Kip-Familie, p21, p27, p57, Zyklin D-, Zyklin E- und Zyklin A-abhängige Kinasen beeinflussen. Einerseits inhibieren p21, p27 und p57 die Zyklin A/E/CDK2-Komplexe, andererseits enthalten Zyklin D/CDK4/6-Komplexe viel p21 und p27 und werden nicht von ihnen inhibiert, sondern p21 und p27 fördern sogar die Stabilität der Zyklin D/CDK4/6-Komplexe. Es wird postuliert, dass durch die Bindung von p21 und p27 an Zyklin D/CDK4/6-Komplexe verhindert wird, dass diese die Zyklin E/CDK2-Komplexe inhibieren können. Diese Inhibition und Inaktivierung durch Bindung wird auch „Sequestrierung“ genannt. Zyklin D-Komplexe wirken also zum einen durch die Inhibition von pRb und zum zweiten durch die Sequestrierung von p21 und p27. Wenn Mitogene entfernt werden, werden diese Zykline nicht mehr synthetisiert, so dass p21 und p27 freigesetzt werden und so den Zellzyklus anhalten können.

Der Restriktionspunkt in der G1-Phase spielt eine grosse Rolle bei der Bildung von Krebs, denn viele Proteine, die diesen Punkt kontrollieren, sind in Tumoren dereguliert, wobei im Allg. Zykline und CDKs als potenzielle Onkogene, CDK-Inhibitoren als mögliche Tumor-Suppressoren angesehen werden (siehe auch 1.1 Krebs und Transformation).

Demzufolge kann der geregelte Ablauf des Zellzyklus' v. a. durch die Expression von Zyklinen und CDKs reguliert werden, die letztendlich die pRb-Phosphorylierung beeinflussen und somit den entscheidenden Punkt für die Zellteilung, den Restriktionspunkt am G1-S-Phasen-Übergang, kontrollieren können.

2.3 Das Proto-Onkoprotein Myc

2.3.1 Funktion und Expression von Myc

Das Proto-Onkogen *c-myc* wurde als das zelluläre Homolog des transformierenden Onkogens *v-myc* des Vogel-Leukämie-Virus' MC29 identifiziert, der in Vögeln die leukämische Krankheit Myelozytomatose (engl.: *Myelocytomatosis*) induziert. In Säugerzellen gibt es neben *c-myc* noch *N-myc* und *L-myc* (Henriksson und Lüscher, 1996). *Myc* wurde in Vertebraten, im Seestern *Asterias vulgaris* und in *Drosophila melanogaster* gefunden, jedoch nicht in der Hefe.

Myc ist ein Proto-Onkogen, das in vielen Tumoren durch chromosomale Translokationen, Genamplifikationen und retrovirale Insertionen fehlreguliert und überexprimiert ist. Chromosomale Translokationen treten z. B. in Burkitt-Lymphomen auf, bei denen das *c-myc*-Gen unter der Kontrolle eines der Immunglobulin-Loci gerät und dadurch überexprimiert wird. Diese Arbeit befasst sich nur mit c-Myc und daher wird dieses weiterhin Myc genannt.

Das Protein Myc hat in der Zelle u. a. Einfluss auf Proliferation, Wachstum, Differenzierung, Replikation, Metabolismus und Apoptose. In zellulären Systemen korrelieren Myc-Expression und Proliferation, denn Myc wird als sehr frühe Gen-Antwort auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mitogenen exprimiert, während es in ruhenden und differenzierenden Zellen nicht exprimiert ist (Grandori *et al.*, 2000). Eine Schlüsselfunktion von Myc scheint die Fähigkeit zu sein, den Zellzyklusablauf zu fördern, denn überexprimiertes Myc führt die Zellen schnell durch die G1- in die S-Phase, während die Inhibition von Myc zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase führt (Eilers *et al.*, 1991). Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der viele Zielgene aktivieren und reprimieren kann, wodurch das Fortschreiten des Zellzyklus' gefördert wird. Beispielsweise sind *Zyklin D2*, *cdk4* und *cdc25* transkriptionell aktivierte Zielgene von Myc, deren Expression zur Sequestrierung des CDK2-Inhibitors p27 bzw. zur dephosphorylierenden Aktivierung von CDK2 führt, so dass Zyklin E/CDK2-Komplexe durch Myc aktiviert werden. Obwohl *Zyklin E* vermutlich kein direktes Zielgen ist, kann Myc durch mehrere indirekte Mechanismen die Zyklin E/CDK2-Aktivität steigern, welche für das Myc-abhängige G1-S-Fortschreiten besonders wichtig ist (Pelengaris und Khan, 2003). Ausserdem kann Myc direkt Zellzyklus-inhibierende Zielgene reprimieren, z. B. die der CDK-Inhibitoren *p21*, *p15* und *p27*, und dadurch das Fortschreiten

des Zellzyklus' und die Proliferation fördern (Wu *et al.*, 2003; Staller *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001).

Überexprimiertes Myc kann die zelluläre Differenzierung in mehreren System hemmen, z. B. bei Adipozyten, Muskelzellen und Erythroleukämie-Zellen (Iritani und Eisenman, 1999). Wenn Myc in Abwesenheit von Überlebensfaktoren überexprimiert wird, kann es über den ARF-Mdm2-p53-Signalweg Apoptose induzieren.

2.3.2 Myc in der Transformation

Überexprimiertes Myc transformiert zwar immortalisierte Nagerzellen, doch in primären Nager-Zellen führt dies zur Apoptose (Stone *et al.*, 1987). Myc braucht für die Transformation die Expression eines zweiten kooperierenden Proto-Onkoproteins, z. B. Ha-Ras, das als G-Protein Wachstumssignale in die Zelle sendet (Land *et al.*, 1983). Es wird davon ausgegangen, dass Myc die Ras-vermittelte Wachstumsinhibition aufhebt, während Ras der Myc-abhängigen Apoptose entgegenwirkt. Dafür spricht, dass auch das anti-apoptotische Onkoprotein Bcl-2 mit Myc in der Maus-Lymphomagenese kooperiert (Vaux *et al.*, 1988). Ausserdem aktiviert Ras das anti-apoptotische Protein Survivin, während die Reduzierung von Survivin durch *antisense* die Myc/Ras-Transformation reduziert, so dass Ras wahrscheinlich über Survivin die Myc-Apoptose hemmen kann (Sommer *et al.*, 2003).

Viele Myc-regulierte Gene tragen zur Transformation bei, z. B. wird *TERT*, die katalytische Untereinheit der Telomerase, durch Myc hochreguliert und bewirkt durch den Schutz der Telomere eine Immortalisierung der Myc/Ras-transformierten Zellen. Myc kann auch durch die transkriptionelle Aktivierung der Onkogene *Zyklin D1*, *D2*, *CDK4* und *CDC25* transformieren, da deren Genprodukte letztendlich die pRb-Phosphorylierung erhöhen und dadurch eine Resistenz gegenüber Wachstums-hemmenden Signalen aufbauen, was zu einer Transformation führen kann (Perez-Roger *et al.*; 1999; Vlach *et al.*, 1996).

Die Kooperation von Myc und Ha-Ras in der Transformation wird z. T. dadurch erklärt, dass Myc mit dem Ras-Effektor PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) bei der Aktivierung des *Zyklin D2*-Promotors und anderer Promotoren zusammenarbeitet (Bouchard *et al.*, 2004). Es wird vorgeschlagen, dass dies über das Forkhead-Protein FoxO3a geschieht, das ohne Ras-Signal die Bildung eines Präinitiations-Komplexes auf dem *Zyklin D2*-Promotor verhindert, während der Ras-abhängige PI3K-Signalweg FoxO3a durch Phosphorylierung inaktiviert, so dass Myc die Expression aktivieren kann. Tatsächlich kann nicht-phosphorylierbares FoxO3a die Myc/Ras-vermittelte Transformation inhibieren, und dominant-negatives FoxO3a kann an Stelle von Ras mit Myc transformieren, so dass postuliert wird, dass die *Zyklin D2*-Aktivierung und letztendlich die Transformation durch Ras und Myc die Phosphorylierung von FoxO3a benötigt und dass dies ausreichend ist, um die Ras-Aktivität zu vermitteln.

2.3.3 Myc und sein obligatorischer Interaktionspartner Max

Myc ist ein Transkriptionsfaktor und besitzt u. a. eine N-terminale Transaktivierungs-Domäne (TAD) und eine bHLHZip (Basische Region-Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper)-Domäne (Henriksson und Lüscher, 1996; Abb. 2.2). Mit der HLHZip-Region interagiert Myc mit Max, das ebenfalls eine bHLHZip-Domäne besitzt, so dass Myc/Max-Heterodimere über die basische Region an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte E-Boxen (5'-CACGTG), binden können (Blackwood *et al.*, 1991). Da die DNA-Bindung nur in Abhängigkeit von Max stattfinden kann, ist Max als obligatorischer Interaktionspartner für die meisten Myc-abhängigen Funktionen notwendig. Die TAD und die bHLHZip-Domäne sind nötig für die Myc-abhängige Transformation, Apoptose und Transaktivierung (Oster *et al.*, 2002).

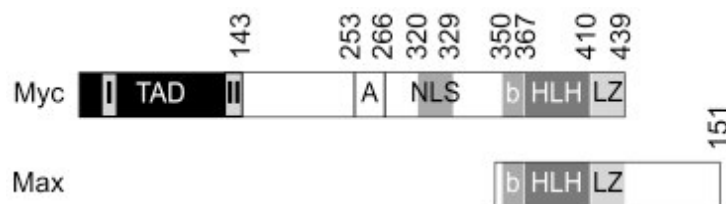


Abb. 2.2: Schematische Struktur von Myc und des obligatorischen Interaktionspartners Max. TAD: Transaktivierungs-Domäne; I: Myc-Box I; II: Myc-Box II; A: saure Region; NLS: nukleäres Lokalisierungs-Signal; b: basische Region; HLH: Helix-Loop-Helix-Region; LZ: Leucin-Zipper.

Max steht als zentraler Dimerisierungspartner im Mittelpunkt eines Netzwerkes aus bHLHZip-Proteinen, denn wie mit Myc kann Max Heterodimere mit Mad-Proteinen bilden, doch weder Myc noch Mads können Homodimere aufbauen (Henriksson und Lüscher, 1996). Ebenso wie Myc/Max- können auch Mad/Max-Heterodimere an dieselben E-Boxen binden. Allerdings werden Mad-Proteine als Antagonisten von Myc verstanden, denn sie sind im Gegensatz zu Myc in differenzierten und ruhenden, nicht in proliferierenden Zellen, exprimiert und hemmen die Myc/Ras-abhängige Transformation und die Myc-vermittelte Apoptose und Proliferation (Gehring *et al.*, 2000; Lahoz *et al.*, 1994). Dieser biologische Antagonismus von Myc- und Mad-Proteinen wird auf molekularer Ebene durch folgendes Modell erklärt: Myc/Max-Heterodimere können durch die Bindung an E-Boxen die Genexpression u. a. durch die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferase (HAT)-Komplexen und Nukleosomen-remodelling-Komplexe aktivieren, während Mad/Max-Heterodimere dieselben Myc-Zielgene durch die Assoziation mit Histon-Deacetylase (HDAC)-Komplexen reprimieren können (Cheng *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Sommer *et al.*, 1997; Abb. 2.3).

2.3.4 Transaktivierung durch Myc

Myc aktiviert Zielgene, die u.a. Protein-Biosynthese, Ribosomen-Biogenese, Zellzyklus, Zellwachstum, DNA-Metabolismus, Apoptose und Immortalität regulieren, hauptsächlich durch seine Transaktivierungs-Domäne (TAD) (Oster *et al.*, 2002). Die TAD wurde identifiziert, indem der Einfluss mehrerer Myc-Fragmente, die mit der DNA-bindenden Domäne vom Hefe-Gal4 fusioniert waren, auf Gal4-Element-Reporter-Gen-Konstrukten untersucht wurde (Kato *et al.*, 1990). Sie enthält zwei Myc-Boxen (MB I und MB II), die innerhalb der Myc-Familie konserviert und essentiell für alle biologischen Funktionen von Myc sind.

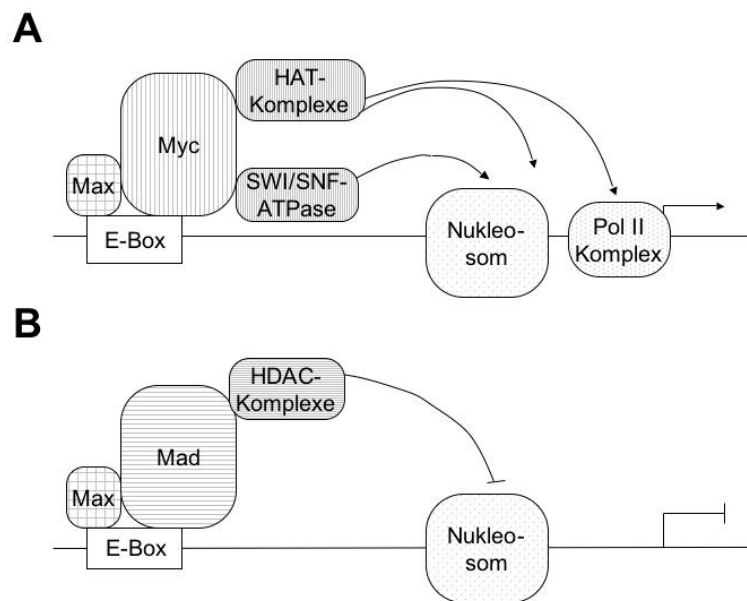


Abb. 2.3: Chromatin-Modifikationen an Myc- bzw. Mad-regulierten Genen. Erklärungen sind im Text zu finden. Pol II: Polymerase II.

Es gibt mehrere mögliche Mechanismen, durch die Myc transaktivieren könnte. Da im Allg. TADs durch die direkte oder indirekte Interaktion mit der basalen Transkriptions-Maschinerie aktivieren, wird angenommen, dass die TAD in Myc mit dem basalen Transkriptionsapparat interagieren könnte, denn sie bindet z. B. an TBP (TATA-Box-bindendes Protein) (Hateboer *et al.*, 1993). Ein zweiter Mechanismus wäre durch die Chromatin-Modifikation möglich. Tatsächlich bindet Myc durch die MB II an TRRAP, eine Untereinheit der HAT-Komplexe STAGA und Tip60 und an andere Mitglieder dieser Komplexe z. B. GCN5 aus dem STAGA-Komplex und Tip48/49 aus dem Tip-60-Komplex (McMahon *et al.*, 1998; Amati *et al.*, 2001). Ausserdem ist auf einigen Zielgenen nach der Bindung von Myc eine Histon-Acetylierung im Bereich der E-Boxen gezeigt, wie z. B. auf dem *Zyklin D2*-Promotor, die mit der Gen-Aktivierung korreliert, so dass postuliert werden könnte, dass Myc durch die Rekrutierung von HAT-Komplexen seine Zielgene aktiviert (Bouchard *et al.*, 2001). Ein weiterer Chromatin-modifizierender Komplex, der an Myc bindet, ist der SWI/SNF-Komplex. Myc

interagiert über seine bHLHZip-Domäne mit dem SNF5-Homolog INI1, einem Mitglied des SWI/SNF-Komplexes, und Reporter-Gen-Assays zeigten, dass dominant-negatives Brg1, die katalytische Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes, die Myc-Aktivierung hemmt (Cheng *et al.*, 1999). Es wird also angenommen, dass SWI/SNF-Komplexe an der Myc-Transaktivierung beteiligt sind, aber es ist noch unklar, wie INI1, das ein Tumor-Suppressor ist, die Funktion des Proto-Onkoproteins Myc aktivieren könnte. Es wird also postuliert, dass Myc seine Zielgene durch die Histon-Acetylierung und möglicherweise das *remodelling* von Nukleosomen aktivieren kann (Abb. 2.3). Weiterhin bindet Myc an die Ko-Aktivatoren CBP/p300, die die Myc-Transaktivierung stimulieren, möglicherweise indem sie durch die Acetylierung von Myc dessen Stabilität erhöhen (Vervoorts *et al.*, 2003). Da CBP/p300 auch Histone acetylieren können, wäre auch möglich, dass dadurch die Expression von Myc-Zielgenen aktiviert wird.

2.3.5 Myc-vermittelte Gen-Repression

Schon seit langem wurde beobachtet, dass die Überexpression von Myc bestimmte mRNAs herunterreguliert. Tatsächlich kann Myc einige Gene direkt reprimieren. Es wird postuliert, dass die Myc-abhängige Repression wichtig für die Transformation sein könnte (Claassen and Hann, 1999). Beispielsweise reprimiert Myc H-Ferritin, ein Eisen-bindendes Protein, das die Transformation inhibiert, so dass Myc die H-Ferritin-vermittelte Hemmung der Transformation aufheben und dadurch die Transformation einleiten könnte (Wu *et al.*, 1999, Wanzel *et al.*, 2003). Auch andere Myc-reprimierte Proteine könnten bei der Transformation eine Rolle spielen, denn sie sind u. a. wichtig für Zell-Adhäsion, Differenzierung und Zellzyklus-/Wachstumsarrest. Myc-reprimierte Zell-Adhäsions-Gene sind z. B. *LFA-1* (*Lymphozyt function associated antigen-1*), das eine Rolle bei Zell-Zell-Kontakten für die Immunantwort spielt, und *alpha3beta1-Integrin*, das die Adhäsion an die extrazelluläre Matrix vermittelt (Judware und Culp, 1997). Die Repression der Zelladhäsions-Gene könnte zur Transformation beitragen, denn durch die Repression von Adhäsions-Molekülen könnte Myc den Verlust von Kontaktinhibition bewirken. Zu den Myc-reprimierten Differenzierungs-Genen gehört z. B. *C/EBP*, durch dessen Repression Myc der Differenzierung entgegenwirken könnte (Li *et al.*, 1994). Ausserdem reprimiert Myc viele Gene, die den Wachstumsarrest fördern, wie z. B. die der CDK-Inhibitoren *p15*, *p21*, *p27*, *gas1* (*growth arrest specific 1*), *gadd34*, *gadd45*, *gadd153* (*growth arrest and DNA-damage inducible*). Die Myc-abhängige Repression ist auch ein Rückkopplungsmechanismus für die Expression seines eigenen Gens, *myc* (Penn *et al.*, 1990).

Es gibt mindestens zwei Bereiche in Myc, die im Allg. für die Repression notwendig sind: Die TAD und die bHLHZip-Domäne. Die bHLHZip-Domäne ist aufgrund der Bindung an den Transkriptionsfaktor Miz-1 wichtig für die Repression von Miz-1-aktivierten Genen (Peukert *et*

al., 1997). Innerhalb der TAD ist die MB II nötig für die Repression von *gas1*, *C/EBPalpha*, *albumin*, *p27* und *myc* (Yang *et al.*, 2001, Li *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 1997). Interessanterweise ist die MB II auch wichtig für die Bindung an TRRAP und die HAT-Aktivitäten (siehe oben). Daraus ergibt sich die interessante Frage, unter welchen Umständen aktivierende oder reprimierende Komplexe an Myc binden und somit Myc auf bestimmten Genen aktivieren und auf anderen reprimieren kann.

Es werden mehrere Mechanismen der Myc-Repression vorgeschlagen, was vermutlich abhängig vom Zielgen ist: So wird angenommen, dass Myc einerseits über die direkte Bindung an die DNA, andererseits über die Interaktion mit Proteinen, die ihrerseits DNA binden, reprimieren kann. Ein Beispiel für die direkte Myc-DNA-Interaktion ist der Promotor von *TMEFF2*, das für ein Transmembran-Protein und potenziellen Tumor-Suppressor kodiert, und durch Myc abhängig von den E-Boxen reprimiert wird (Gery und Koeffler, 2003). Weiterhin wird *p27* von Myc reprimiert, indem Myc/Max-Heterodimere direkt mit der Transkriptionsstartstelle interagieren (Wanzel *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2001).

Neben der direkten DNA-Interaktion kann Myc auch durch indirekte DNA-Interaktion über Protein-Wechselwirkungen reprimieren, was hauptsächlich im Zusammenhang mit Miz-1 beschrieben wurde: Miz-1 kann durch die Bindung an Initiator (INR)-Elemente die CDK-Inhibitor-Gene *p21* und *p15* aktivieren, was durch die Interaktion mit Myc reprimiert werden kann (Staller *et al.*, 2001; Claasen und Hann, 2000). Auch viele andere Myc-reprimierte Zielgene haben INR-Elemente, die im Allg. in TATA-Box-freien Genen vorkommen und von TFIID, TFII-I, YY1 und Miz-1 gebunden werden können. TFII-I, YY1 und Miz-1 ist ausserdem gemeinsam, dass sie mit der bHLHZip-Region von Myc interagieren und möglicherweise ähnliche Funktionen ausüben können (Grandori und Eisenman, 2000). So wurde zwar beschrieben, dass Myc durch die Interaktionen mit YY1 oder TFII-I den *Adenovirus major late promoter* (AdMLP) reprimieren kann, aber dies wurde nicht mit endogenen Zielgenen gezeigt und ist z. T. noch umstritten (Roy *et al.*, 1993; Shrivastava *et al.*, 1993, Zhao *et al.*, 1998; Austen *et al.*, 1998).

Im Gegensatz dazu gibt es für die Myc-vermittelte Repression von Miz-1 viele fundierte Hinweise: Beispielsweise aktiviert Miz-1 *p21* in der Differenzierung und in Anwesenheit von DNA-Schäden, z. B. durch UV, was durch Myc inhibiert werden kann (Herold *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Es wird postuliert, dass die Repression des *p21*-Promotors durch Myc eine Rolle bei der Entscheidung spielt, ob DNA-Schäden in einer Zelle zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose führen. Denn DNA-Schäden induzieren den Tumor-Suppressor *p53*, der Apoptose und Zellzyklusarrest fördern kann; letzterer wird durch *p21* vermittelt, dessen Gen von *p53* transkriptionell aktiviert werden kann. Bei der Anwesenheit von Myc bindet dieses

an den *p21*-Promotor und reprimiert ihn, wodurch der Zellzyklus-Arrest gehemmt und somit die Apoptose gefördert wird (Seoane *et al.*, 2001).

Allerdings kann die Myc-vermittelte Repression des *p21*-Promotors nicht nur über Miz-1 und ein INR-Element erfolgen, sondern auch über Sp1-Bindestellen, denn Sp1 aktiviert den *p21*-Promotor, was durch die Bindung von Myc antagonisiert wird (Gartel *et al.*, 2001).

Ausserdem aktiviert Miz-1 *p15*, was möglicherweise bei dem Altern von Zellen eine Rolle spielen könnte und ebenfalls von Myc gehemmt wird (Staller *et al.*, 2001). TGF-beta (*transforming growth factor beta*), ein anti-mitogenes Zytokin, hemmt die Myc-Repression, einerseits weil es die Myc-Expression herunterreguliert, andererseits durch die Bildung eines Smad-Aktivator-Komplexes, der über den Transkriptionsfaktor Sp1 an den *p15*-Promotor bindet und Myc inhibiert. Demnach ist Miz-1 ein wichtiger Punkt, an dem die antagonistischen Signale von TGF-beta und Myc zusammenlaufen (Gartel und Shchors, 2003).

Ebenso wie der *p21*-Promotor wird auch der *p15*-Promotor nicht nur über Miz-1 und ein INR-Element durch Myc reprimiert, sondern auch über Sp1-Bindestellen: Die TGF-beta-abhängige Induktion des *p15*-Promotors benötigt die Interaktion von Smad2, Smad3 oder Smad4 mit Sp1, die durch Myc gehemmt wird, weil Myc an Smad2/3 bindet und dadurch einen transkriptionell inaktiven Sp1/Smad/Myc-Komplex bildet (Feng *et al.*, 2002).

Ein Modell postuliert, dass der *p15*-Promotor durch zwei aufeinanderfolgende Mechanismen aktiviert werden kann: Der erste Schritt ist die Aktivierung durch Miz-1, die jedoch durch Myc in der Abwesenheit von TGF-beta gehemmt wird. Der zweite Schritt ist die Aktivierung durch TGF-beta, welches Myc herunterreguliert und die Bildung eines Smad-Aktivator-Komplexes auf dem *p15*-Promotors fördert, der sowohl Sp1 als auch Miz-1 kontaktiert (Seoane *et al.*, 2001).

Der Mechanismus der Myc-abhängigen Gen-Repression ist bisher nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass Myc nicht durch einen aktiven Mechanismus reprimiert, im Gegensatz zu Mad, das seine Zielgene durch die Rekrutierung von Ko-Repressor-Komplexen wie Sin3/HDACs unterdrückt (Amati *et al.*, 2001). Statt dessen wird postuliert, dass Myc die Gen-Aktivierung supprimiert, indem es die Funktion der Aktivatoren, wie z. B. Miz-1, hemmt. Miz-1 aktiviert den *p15*-Promotor durch die Rekrutierung des Ko-Aktivators p300, während Myc die Bindung von Miz-1 an p300 verhindert und somit die Transaktivierung des *p15*-Promotors reprimieren könnte (Staller *et al.*, 2001).

Zusammenfassend ist Myc ein Proto-Onkoprotein, das das Zellverhalten durch Stimulierung der Proliferation und Apoptose oder Inhibierung der Differenzierung beeinflussen kann, und dessen Überexpression zusammen mit Ras REFs transformieren kann. Als

Transkriptionsfaktor kann Myc zusammen mit Max seine Zielgene aktivieren und reprimieren, wobei die Aktivierung wahrscheinlich durch die Rekrutierung von HAT-Komplexen erfolgt, die Repression ist auch durch indirekte DNA-Bindung über andere Proteine, z. B. Miz-1, möglich, wobei bisher keine Chromatin-modifizierenden Komplexe bekannt sind.

2.4 Chromatin- und Protein-Modifikationen

2.4.1 Chromatin

Das Innere des Zellkerns ist mit einem Komplex aus DNA und Proteinen gefüllt, den man seit Beginn der zellbiologischen Forschung als Chromatin bezeichnet, weil er nach einer Färbung unter dem Mikroskop besonders deutlich anfärbt ist. Das Chromatin ist ein dichtes Fadenknäuel, das an manchen Stellen locker (Euchromatin) und anderen fest gepackt (Heterochromatin) ist. Im Gegensatz zum Gen-reichen Euchromatin ist das Heterochromatin arm an Genen, enthält viel repetitive DNA und repliziert spät im Zellzyklus (Rice und Allis, 2001). Das Chromatin besteht aus DNA, Nicht-Histon-Proteinen und Histonen, wovon es in Tier- und Pflanzenzellen fünf Arten gibt: Histon H1, H2A, H2B, H3 und H4. Histone bestehen aus einer globulären zentralen Domäne und einem flexiblen Amino-terminalen und oft auch einem Carboxy-terminalen Arm; sie sind basische Proteine, denn sie enthalten viele Arginine und Lysine, v. a. an den flexiblen Armen.

Eine Untereinheit des Chromatins sind die Nukleosomen, die aus der DNA und einem Nukleosomen-Kern (*Core*) bestehen, der sich aus zwei Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3 und H4 (dem sogenannten Histon-Oktamer) zusammensetzt. Die DNA ist fast zweimal um den Histon-Oktamer gewickelt und ist von einem Nukleosom zum anderen ungefähr 200 Basenpaare lang. Es wird angenommen, dass Histon H1 wichtig für die Ausbildung und Aufrechterhaltung übergeordneter Chromatinstrukturen ist, denn ohne Histone H1 bildet sich eine Faser mit einem Durchmesser von 10 nm, in seiner Anwesenheit entsteht eine 30 nm-dicke Faser.

2.4.2 Chromatin-Modifikationen und Genexpression

Die Genexpression wird auf vielfältige Weise reguliert, z. B. durch aktivierende oder reprimierende Transkriptionsfaktoren, die sequenzspezifisch an die DNA binden können, oder durch die Epigenetik, d. h. die Regulation der Genexpression aufgrund der Chromatinstruktur unabhängig von der DNA-Sequenz. Die Chromatinstruktur kann durch zwei enzymatische Mechanismen verändert werden: Erstens kann durch ATP-abhängiges Chromatin-*remodelling* die Struktur, Stabilität und Position der Nukleosomen umgestaltet werden (Varga-Weisz, 2001; Vignali *et al.*, 2000), zweitens können die Histone post-

transkriptionell kovalent modifiziert werden. Diese Modifikationen führen dazu, dass die Nukleosomen an manchen Stellen fest in die DNA eingebunden sind, z. B. im Heterochromatin, an anderen etwas lockerer, z. B. im Euchromatin. Es wird angenommen, dass fest gepacktes Chromatin die Genexpression verhindert, v. a. weil den Transkriptionsfaktoren die Bindung an die DNA verwehrt wird (Kornberg und Lorch, 1999; Kuras und Struhl, 1999). Auch innerhalb des Euchromatins, wo die meisten Gene liegen, kommen Nukleosomen in unterschiedlicher Dichte vor. Aber die Anwesenheit von Nukleosomen kann nicht nur die Genexpression inhibieren, sondern z. T. auch aktivieren. Erstens können bestimmte kovalente Histon-Modifikationen Histon-DNA- und Histon-Histon-Interaktionen verändern, was die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren erleichtert. Zweitens postuliert ein hypothetisches Modell, dass die Aktivierung bzw. Repression durch eine bestimmte Kombination von kovalenten Histon-Modifikationen kontrolliert wird, den sogenannten Histon-Code. Dieser Code wird von Histon-modifizierenden Enzymen geschrieben und von anderen Proteinen gelesen, indem sie einerseits spezifisch an modifizierte Reste binden und andererseits Chromatinstruktur und Genexpression positiv oder negativ beeinflussen können.

2.4.3 Kovalente Histon-Modifikationen

Zu den kovalenten Histon-Modifikationen gehören Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitin-Anheftung und Poly(ADP-Ribosylierung), wobei Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen hauptsächlich an den N-terminalen Armen stattfinden (Abb. 2.4).

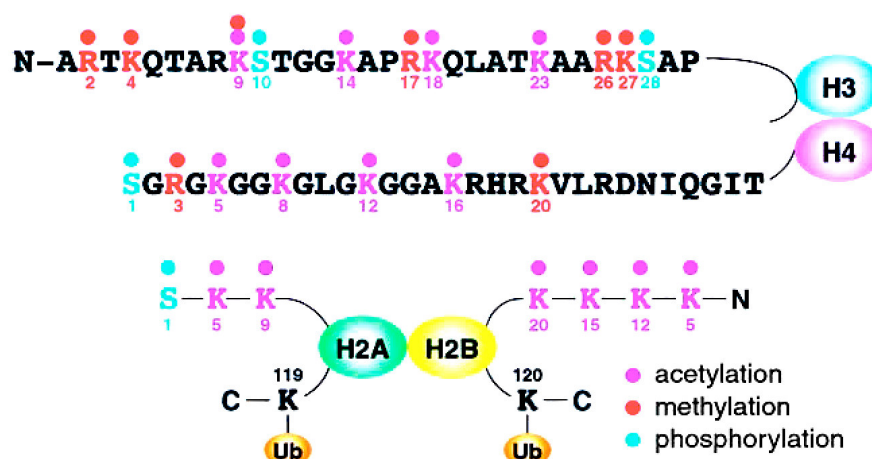


Abb. 2.4: Post-translationale Modifikationen der N-terminalen Histon-Arme. pink: Acetylierung; rot: Methylierung; grün: Phosphorylierung (nach Zhang und Reinberg, 2001).

Acetylierung

Die Acetylierung von Histonen wurde zunächst am intensivsten erforscht. Sie erfolgt durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) mithilfe des Acetyl-Donors Acetyl-Koenzym A an Lysin-Resten, v. a. in den flexiblen Histon-Armen, und wird durch die Histone-Deacetylasen (HDACs) antagonisiert, die die Acetyl-Reste wieder entfernen können. Acetylierte Histone sind meist mit transkriptionell aktiven Genen assoziiert, und viele HATs sind transkriptionelle Ko-Aktivatoren, z. B. Gcn5, p300/CBP, PCAF, TAF250 und die p160-Familie der nukleären Rezeptoren (Zhang und Reinberg, 2001). Im Gegensatz dazu sind die HDACs im Allg. mit transkriptionellen Ko-Repressoren assoziiert, z. B. Sin3 und NcoR/SMRT.

Methylierung

Histone können an den Seitenketten-Stickstoff-Atomen der Arginin- und Lysin-Reste methyliert werden, auf die eine Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) übertragen wird. Ob Histone wieder demethyliert werden können, ist bislang umstritten. Einerseits wird postuliert, dass die Histon-Methylierung stabil und irreversibel ist, da die Halbwertszeit von Histonen genauso gross ist wie die von Methyl-Resten an Histonen (Byvoet *et al.*, 1972; Duerre und Lee, 1974). Ausserdem wurden bisher noch keine demethylierenden Enzyme, also Histon-Demethylasen (HMDs), entdeckt. Andererseits kommt Histon-Methylierung auf regulierten Genen vor, z. B. dem *Zyklin E*-Promotor, dessen Aktivität durch H3-K9-Methylierung in der G1-Phase gehemmt wird (Nielsen *et al.*, 2001). Dementsprechend müsste während des G1/S-Übergangs, wenn *Zyklin E* aktiviert ist, die H3-K9-Methylierung rückgängig gemacht werden. Es gibt mehrere Vorschläge, wie die H3-K9-Methylierung im Allg. entfernt werden könnte: entweder durch bisher unbekannte Demethylasen, durch Ersetzen des modifizierten Histons mit einem unmethylierten oder indem die flexiblen Arme proteolytisch abgeschnitten werden (Bannister *et al.*, 2002).

Arginin-Methylierung

Bei der Arginin-Methylierung spielen Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) eine Rolle, die neben Histonen z. T. auch andere Proteine methylieren können (siehe unten). Es gibt drei verschiedene Arten von methyliertem Arginin: Mono-Methyl-Arginin, symmetrisches Di-Methyl-Arginin und asymmetrisches Di-Methyl-Arginin. Welche Arginin-Methylierung erfolgt, ist abhängig von der Erkennungssequenz des Histons und den Methyltransferasen, wobei die meisten bisher beschriebenen PRMTs Arginine mit asymmetrischen Di-Methyl-Resten modifizieren (McBride und Silver, 2001). Die beiden meistuntersuchten PRMTs CARM1 und PRMT1 sind als transkriptionelle Ko-Aktivatoren von nukleären Hormon-Rezeptoren bekannt. Beispielsweise kann PRMT1 Histon H4 an Arginin-3 (H4-R3) methylieren, was die

darauffolgende Acetylierung von Histon H4 durch p300 ermöglicht, welches im Allg. eine Aktivierung der Genexpression zur Folge hat (Wang *et al.*, 2001). CARM1 methyliert Histon H3 an mehreren verschiedenen Arginin-Resten (Chen *et al.*, 1999). Bei beiden ist die enzymatische Aktivität für die transkriptionelle Aktivität notwendig.

Lysin-Methylierung

Eine andere Gruppe von HMTs methyliert spezifisch die Lysin-Reste H3-K4, H3-K9, H3-K27, H3-K36, H3-K79 oder H4-K20 (Sims *et al.*, 2003). Diesen HMTs ist die SET-Domäne gemeinsam, welche nach ihrem Vorkommen in Su(var)3-9, im Polycomb-Gruppen-Protein E(Z) (*Enhancer of Zeste*) und Trithorax-Gruppen-Protein Trithorax benannt wurde (Zhang und Reinberg, 2001). Die Lysin-Methylierung kontrolliert im Allg. die Genexpression durch Aktivierung (H3-K4, H3-K36, H3-K79) oder Reprimierung (H3-K9, H3-K27, H4-K20).

Lysine können mit ein, zwei oder drei Methylgruppen modifiziert werden, was in einer Mono-, Di- Tri-Methylierung resultiert (Dutnall, 2003). Die Anzahl der Methylgruppen an einem Lysin ist abhängig von den jeweiligen Enzymen, z. B. kann DIM-5 H3-K9 tri-methylieren, während SET7/9 H3-K4 nur mono-methylieren kann. Es wird angenommen, dass die Di-Methylierung von H3-K4 ein allgemeiner Mechanismus ist, um die Stilllegung zu verhindern, denn di-methyl-H3-K4 ist eine globale epigenetische Markierung in euchromatischen Genen, während die Tri-Methylierung von H3-K4 mit aktiver Transkription korreliert (Sims *et al.*, 2003). Auch die Anzahl der Methylreste an H3-K9 kann sich auf die Transkription auswirken. Ein aufgereinigter Komplex der H3-K9-HMT ESET/SETDB1 enthält u. a. das humane Ortholog des transkriptionellen Repressors mAM aus der Maus, der die ESET-abhängige Repression verstärkt. Da mAM ESET dazu stimuliert, nicht mehr zu di-methylieren, sondern statt dessen zu tri-methylieren und in Anwesenheit von mAM ein ESET-Zielpromotor H3-K9-trimethyliert ist, wird postuliert, dass mAM ein Modulator der ESET-Aktivität ist, der durch die Stimulierung der Tri-Methylierung die Repression fördern kann (Wang *et al.*, 2003). Daher wird postuliert, dass im Allg. die erhöhte Anzahl der Methylreste an H3-K4 bzw. H3-K9 die Aktivierungs- bzw. Repressionsfähigkeit steigern kann.

Lysin-Methylierung und Gen-Repression

Als erste Lysin-HMT wurde Su(var)3-9 identifiziert, die spezifisch H3-K3 methyliert (Rea *et al.*, 2000). Su(var)3-9 wurde bereits zuvor in *Drosophila* in einem *screen* gefunden, der Suppressoren von PEV (*position effect variegation*) isolieren sollte, wobei die künstliche Fusion eines euchromatischen Gens mit heterochromatischen Bereichen zu einem mosaikartigem Expressionsmuster führen kann, wahrscheinlich weil die heterochromatische Region das euchromatische Gen beeinflusst (Tschiersch *et al.*, 1994). Daher wurde angenommen, dass die HMT-Aktivität von Su(Var)3-9 bei dem Aufbau und Erhalt von

Heterochromatin eine Rolle spielen könnte (Zhang und Reinberg, 2001). Tatsächlich interagiert das Säuger-Ortholog Suv39H1 mit HP1 (Heterochromatin-Protein 1), das mit seiner Chromo-Domäne methyliertes Lysin-9 an Histon H3 bindet, was abhängig von der Bindung an Suv39H1 und dessen enzymatischer Aktivität ist. HP1-Proteine können sich ausserdem durch Selbst-Assoziation aneinanderlagern. Ein Modell zur Bildung von Heterochromatin postuliert, dass zunächst H3-Lysin-9 deacetyliert werden muss, um dann durch Suv39H1 methyliert werden zu können. Die methylierten Lysine kann dann HP1 durch die Rekrutierung von Suv39H1 binden und die Bildung von Heterochromatin initiieren, welches entlang der DNA fortgesetzt wird, indem sich HP1 durch Selbst-Assoziation aneinanderreicht. Dadurch wird die DNA zusammengezogen, fester in Chromatin verpackt und unzugänglich für Transkriptionsfaktoren gemacht, so dass keine Genexpression mehr stattfinden kann (Abb. 2.5.A).

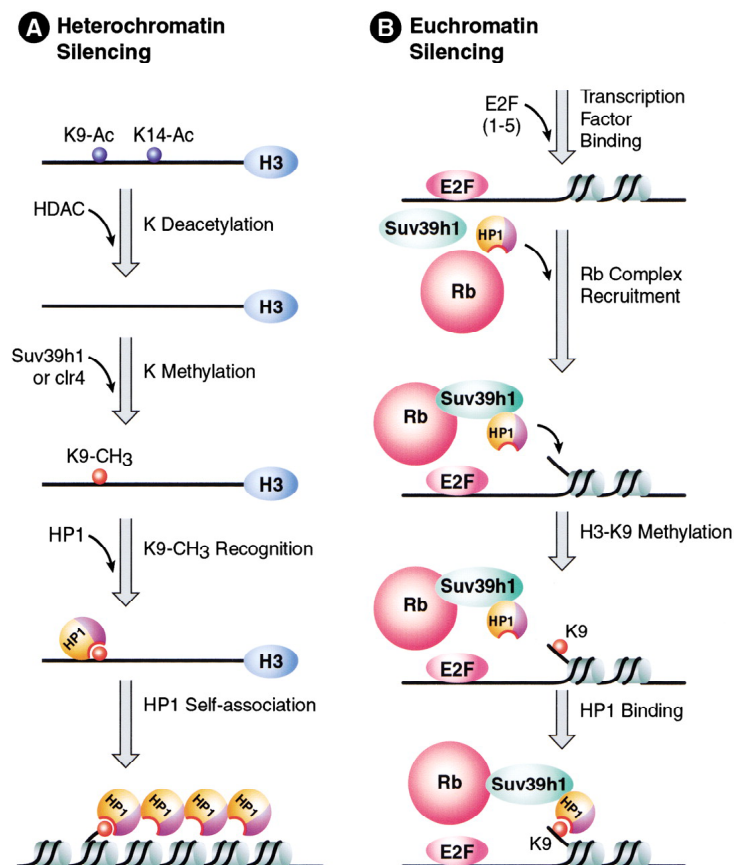


Abb. 2.5: Modell der schrittweisen Stilllegung von heterochromatischen und euchromatischen Genen. (A) Heterochromatische Gene. (B) Euchromatische Gene. (nach Zhang und Reinberg, 2001)

Zunächst wurde H3-K9-Methylierung an zentromeren, heterochromatischen Regionen und bei der Inaktivierung des X-Chromosoms gefunden, aber Suv39H1 kann auch Gene im Euchromatin stilllegen. Beispielsweise wird das *Zyklin E*-Gen durch den Transkriptionsfaktor E2F aktiviert und durch pRb (der durch E2F an die DNA rekrutiert wird) reprimiert, was

abhängig von der Bindung von pRb an Suv39H1 und HP1 ist (Nielsen *et al.*, 2001). Zweitens spielt Suv39H1 bei der Zellzyklus-abhängigen Repression des *DHFR* (*Dihydrofolat-Reduktase*)-Promotors eine Rolle, denn *DHFR* wird durch die Bindung von E2F aktiviert, und durch p107 und p130 reprimiert, die ebenfalls zur pRb-Familie gehören und Suv39H1 binden können. In der G0-Phase ist dieser Promotor H3-K9-hypermethyliert, was am G1-S-Phasen-Übergang verloren geht und durch Hyperacetylierung ersetzt wird (Nicolas *et al.*, 2003). Drittens wurde ein H3-K9-HMT-Komplex beschrieben, der E2F- und Myc-responsive Gene in G0-Zellen besetzt (Ogawa *et al.*, 2002). Die H3-K9-Methylierung scheint also nicht nur bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin eine Rolle zu spielen, sondern ist auch an der dynamischen Regulation von euchromatischen Genen beteiligt (Abb. 2.5.B).

Lysin-Methylierung und Gen-Aktivierung

Während die H3-K9-Methylierung hauptsächlich mit transkriptioneller Repression korreliert, ist die H3-K4-Methylierung vermutlich an der Aktivierung der Genexpression beteiligt, was durch mehrere Mechanismen erfolgen kann: Erstens ist H3-K4-di-Methylierung eine globale Markierung für euchromatische Regionen, so dass angenommen wird, dass sie im Allg. die transkriptionelle Repression durch die H3-K9-Methylierung verhindern kann (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Zweitens kann die HMT Set1 H3-K4 tri-methylieren, welches nahe der 5'-mRNA-codierenden Region von Set1-Zielgenen vorkommt und mit frühen Stadien der Transkription korreliert, so dass postuliert wird, dass die H3-K4-tri-Methylierung bei der aktiven Transkription beteiligt ist (Ng *et al.*, 2003). Drittens di-methyliert die HMT Set2 H3-K4 und bindet spezifisch an die elongierende Form der RNA-Polymerase II, so dass die H3-K4-di-Methylierung eine Rolle bei der Elongation spielen könnte (Li *et al.*, 2002).

Zusammenspiel der Histon-Modifikationen

Die Modifikationen von verschiedenen Aminosäuren der Histone können sich gegenseitig beeinflussen, indem sie Modifikationen fördern oder verhindern. Im Allg. fördern Modifikationen andere, die gleiche Effekte auf die Genexpression haben, und behindern solche, die entgegengesetzte Funktionen haben. Beispielsweise wird davon ausgegangen, dass sich die H3-K4- und H3-K9-Methylierungen gegenseitig ausschließen, denn die eine bewirkt Aktivierung, die andere Repression. Tatsächlich verhindert die Methylierung von H3-K4 die Suv39H1-abhängige Methylierung an H3-K9, und umgekehrt kann der HCF-1/HMT/Ash2-Komplex nicht mehr H3-K4 methylieren, wenn bereits H3-K9 methyliert worden ist (Nishioka *et al.*, 2002; Sims *et al.*, 2003; Wysocka *et al.*, 2003). Weiterhin kann die aktivierende Phosphorylierung an Histon H3 Serin-10 (H3-S10) die aktivierende Acetylierung von H3-K14 fördern, inhibiert aber die reprimierende H3-K9-Methylierung, die ihrerseits die H3-S10-Phosphorylierung verhindert (Cheung *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2000).

Dieses Zusammenspiel von Histon-Modifikationen lässt sich durch die Hypothese des Histon-Codes erklären: Verschiedene Histon-Modifikationen ergeben eine bestimmte Kombination, den Histon-Code, der letztendlich für die Aktivierung oder Repression codiert. Dieser Code wird von Proteinen gelesen, die über ihre Bromo-Domänen mit Acetyl-Resten oder über Chromo-Domänen mit Methyl-Resten assoziieren können und die Bindung anderer Proteine fördern oder verhindern, so dass diese weitere Modifikationen einleiten können oder nicht. Viele Proteine besitzen Bromo- oder Chromo-Domänen, z. B. die HATs GCN5, TAFII250 und PCAF (p300/CBP-assoziiertes Faktor) bzw. HP1 und Polycomb, doch nur für wenige wurde die Bindung an modifizierte Histone bestätigt, z. B. bei PCAF, HP1 und Polycomb (Jenuwein und Allis, 2001; Dhalluin *et al.*, 1999). Im Speziellen ist noch nicht bekannt, welcher Code zu der Bindung welcher Proteine führt, die dann verschiedene Effekte auf die Genexpression haben können.

Demzufolge spielt die Epigenetik und das Chromatin bei der Genexpression eine Rolle, u. a. indem möglicherweise eine bestimmte Kombination an Histon-Modifikationen, der Histon-Code, die Rekrutierung von Protein-Komplexen bestimmt, die die Aktivierung oder Repression der Gene beeinflussen können.

Histone können u. a. an Lysinen und Argininen methyliert werden, was im Allg. zu einer Aktivierung (an H3-K4) oder Repression (H3-K9) der Genexpression führen kann.

2.4.4 Protein-Methylierung

Neben Histonen können noch andere Proteine methyliert werden, z. B. viele RNA-bindende Proteine, v.a. hnRNPs und *Myelin basic protein* (McBride und Silver, 2001). Die Protein-Methylierung findet hauptsächlich an Argininen statt, und bisher ist nicht bekannt, dass Proteine - abgesehen von Histonen - an Lysinen modifiziert werden. Wie bereits oben erwähnt, sind wichtige Vertreter der Arginin-MTs PRMT1 und CARM1, die Arginine asymmetrisch di-methylieren.

Es wird angenommen, dass die Protein-Methylierung im Allg. durch sterische Hinderung die Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen könnte, z. B. reduziert die Methylierung von Sam68 (eines mitotischen Substrates der Src-Kinase) die Bindung an SH3-Proteine; die Methylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 erniedrigt dessen Affinität zu seinem Inhibitor PIAS1; andererseits verstärkt die Methylierung von SmD1 und SmD3 die Bindung zu SMN (dem Produkt des spinalen Muskel-Atrophie-Gens) (Bedford *et al.*, 2000; Mowen *et al.*, 2001; Friesen *et al.*, 2001).

Bisher sind noch nicht viele biologische Funktionen der Protein-Methylierung bekannt: Die Methylierung kann wichtig für die zelluläre Lokalisation sein, denn in *S. cerevisiae* ist das PRMT1-Ortholog Hmt1/Rmt1 notwendig für den nukleären Export und Import seiner

Substrate Npl1 und Hrp1 (Shen *et al.*, 1998; Yun und Fu, 2000). Die Arginin-Methylierung könnte bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, denn PRMTs binden den Typ-I-Interferon-Rezeptor, STAT1 und die Janus-Kinase (Abramovich *et al.*, 1997; Mowen *et al.*, 2001; Pollack *et al.*, 1999).

Zusammenfassend ist die Protein-Methylierung v. a. an Arginen bekannt, die Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen kann und möglicherweise eine Rolle bei der zellulären Lokalisierung und Signaltransduktion spielen könnte.

2.5 Trithorax- und Polycomb-Proteine

Homöobox (Hox)-Gene wurden in *Drosophila* identifiziert und sind als Transkriptionsfaktoren verantwortlich für die erste Segmentierung und Entwicklung der Segmente im Embryo (Caldas und Aparicio, 1999). Die Expression der *Hox*-Gene verläuft kaskadenartig und wird zunächst bis Mitte der Embryogenese durch die Segmentations-Gene *pair rule* und *gap* reguliert, die dann nach der Gastrulation durch zwei antagonistische Gen-Gruppen ersetzt werden, den *Polycomb (PcG)*-Genen und den *Trithorax (TrxG)*-Genen. *PcG*-Gene sind wichtig für den Erhalt des an den *Hox*-Genen aufgebauten reprimierten Status', wohingegen *TrxG*-Gene für die ständige Expression oder Aktivierung von Zielgenen notwendig sind. Die Kontrolle der Zielgene erfolgt durch den Einfluss auf das Chromatin und bleibt über viele Runden der Zellteilung erhalten. *PcG*- und *TrxG*-Proteine bilden untereinander grosse Multi-Protein-Komplexe und binden an DNA-Elemente, sogenannte PREs (*polycomb response elements*) bzw. TREs (*trithorax response elements*). Die DNA-Bindung erfolgt bei vielen *PcG*- und *TrxG*-Proteinen indirekt über ihre Komplexpartner, während bisher nur wenige direkt DNA binden und somit die Komplexe zu den Zielgenen dirigieren können, z. B. das *PcG*-Protein PHO (Pleiohomeotic, ortholog zum humanen YY1, Yin Yang 1) und die *TrxG*-Proteine GAGA und Zeste. Da die PREs und TREs weit, bis zu 10 kbs, von ihrem Zielgen entfernt sein können, wird angenommen, dass die *PcG*- bzw. *TrxG*-Komplexe über *spreading* oder Schleifenbildung mit dem Transkriptions-Komplex in Verbindung treten können.

Sowohl in *Drosophila* als auch in Säugetieren sind zwei *PcG*-Komplexe bekannt: Der Komplex *PcGi* scheint früh in der Entwicklung bei der Initiations-Phase wichtig zu sein, wenn die *PcG*-Repression die frühen Repressoren, z. B. *hunchback*, ablöst, während der zweite Komplex, *PcGm* oder auch *PRC-1 (PcG repressive complex 1)* genannt, für den ständigen Erhalt der Repression nötig ist (Jacobs und van Lohuizen, 2002). Diese beiden Komplexe sind in Säugern und *Drosophila* sehr ähnlich, so dass sich hier nur auf die Säuger-Komplexe

bezogen wird. Dort enthält der PcGi-Komplex EzH1 und EzH2 (Enhancer of Zeste), EED (embryonic ectoderm development), Su(z)12, YY1 (Yin Yang 1) und HDAC1 und -2, der PcGm/PRC-1-Komplex besteht u. a. aus HPC2 (humanes Polycomb), Bmi-1, HPH1/2 (humanes Polyhomeotic), RING1, dem Ko-Repressor CtBP (C-terminal binding Protein) und wahrscheinlich auch YY1 (Satijn und Otte, 1999). Die Zusammensetzung der PcG-Komplexe kann sich in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Entwicklungsphase ändern (Lund und van Lohuizen, 2004; Otte und Kwaks, 2003).

2.5.1 Epigenetik durch Trithorax- und Polycomb-Proteine

Eine wichtige Frage ist, wie TrxG- und PcG-Proteine die kontrollierte Expression ihrer Zielgene im Laufe der Entwicklung über viele Zellteilungen aufrechterhalten können. Es wird angenommen, dass sie dafür epigenetische Eigenschaften, z. B. Histon-Modifikationen, nutzen, die nach der Zellteilung nicht verloren gehen (Muyrers-Chen und Paro, 2001). Zu den TrxG- und PcG-abhängigen Histon-Modifikationen gehören v. a. Acetylierungen bzw. Deacetylierungen und Methylierungen, vermittelt durch Histon-Acetyltransferasen (HATS), Histon-Deacetylasen (HDACs) bzw. Histon-Methyltransferasen (HMTs). Es wird angenommen, dass aktivierende Histon-Modifikationen (Methylierung an Histon H3 Lysin-4 (H3-K4) und Acetylierung) mit TrxG-Komplexen assoziiert sind, reprimierende (Methylierung an H3-K9 und H3-K27 und Deacetylierung) mit PcG-Komplexen. Tatsächlich binden die PcGm-Komplex-Mitglieder HPC2 und Bmi-1 die H3-K9-HMT Suv39H1, während der PcGi-Komplex mit H3-K27-HMT-Aktivitäten assoziiert ist, die bei der Regulation von *Hox*-Genen und der X-Inaktivierung beteiligt sind (Cao *et al.*, 2004; Sewalt *et al.*, 2002). Ausserdem ist das PcG-Chromatin v. a. mit H3-K9- und H3-K27-methylierten Histonen besetzt. Ein Modell über das Zusammenspiel der verschiedenen PcG-Komplexe schlägt vor, dass frühe Repressoren, wie hunchback, den PcGi-Komplex rekrutieren, der durch assoziierte HDACs das Chromatin deacetyliert und an H3-K27 methyliert. PcGi rekrutiert dann durch eine transiente Interaktion den PcGm-Komplex, der H3-K27 bindet und die Repression des Chromatins durch Histon-Methylierung an H3-K9 aufrechterhält (Jacobs und van Lohuizen, 2002).

Andererseits binden TrxG-Proteine an H3-K4-HMTs, z. B. Ash2, bzw. besitzen selbst H3-K4-HMT-Aktivität, z. B. MLL (Trithorax) und Ash1, und erhalten dadurch das Chromatin in einem aktiven Zustand.

Zusammenfassend sind die antagonisierenden TrxG- und PcG-Proteine durch die Bindung von Multi-Protein-Komplexen an PREs oder TREs an der Regulation der Hox-Gene beteiligt, indem TrxG-Proteine die Aktivierung und PcG-Proteine die Repression dieser Gene im Laufe der Entwicklung aufrechterhalten. Es gibt zwei PcG-Komplexe, die ihre Funktionen in

verschiedenen Entwicklungsphasen erfüllen: der PcGi-Komplex ist in der frühen Entwicklung wichtig und wird später von dem PcGm-Komplex abgelöst, der für den ständigen Erhalt der Repression notwendig ist.

Das Aufrechterhalten der Genexpression über viele Zellteilungen wird durch Histon-Modifikationen erreicht, wobei die TrxG-Proteine im Allg. mit aktivierenden H3-K4-HMTs und HATs, PcG-Proteine mit reprimierenden H3-K9- und H3-K27-HMT und HDACs assoziiert sein können.

2.6 Das Trithorax-Protein Ash2

2.6.1 Ash2 in *Drosophila*

Das *ash2*-Gen wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* bei einem screen für Lethalität im späten larvalen oder frühen Puppenstadium mit Imaginalscheiben-Abnormalitäten identifiziert (Shearn *et al.*, 1971). *Ash2* wird als TrxG-Gen klassifiziert, weil es die typischen Kriterien eines solchen erfüllt: Mutationen im *ash2*-Gen verursachen homöotische Transformationen, die Beine und Flügel betreffen, ausserdem kann Ash2 das *Hox*-Gen *Ultrabithorax* hochregulieren (Adamson und Shearn, 1996). Einige *ash2*-Mutationen unterscheiden sich in der Ausprägung ihres Phänotyps von denen anderer TrxG-Mutationen, so dass postuliert wurde, dass Ash2 nicht nur für die Expression von Homöobox-Genen, sondern auch anderer Gene wichtig sein könnte.

Drosophila-Ash2 interagiert mit SKTL, einer nukleären Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase, die im Allg. Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PIP) zu Phosphatidylinositol-4,5,-Phosphat (PIP₂) phosphoryliert, welches als *second messenger* im Zytoplasma und Nukleus viele Aspekte des Zellverhaltens reguliert (Cheng und Shearn, 2004). Im Nukleus können Phosphoinositide eine Rolle bei der post-transkriptionellen Modifikation und Chromatin-abhängigen Genregulation spielen. Da SKTL und Ash2 an polythäne Chromosomen binden und in *Drosophila* mit mutiertem Ash2 und SKTL Histon H1 hyperphosphoryliert ist, welches mit transkriptioneller Repression korreliert, wird angenommen, dass Ash2 und SKTL am Aufrechterhalten des transkriptionell aktiven Chromatins durch Histon H1-Modifikation beteiligt sind.

Weiterhin ist Ash2 für die normale Entwicklung der *Drosophila*-Flügel notwendig, indem es die Aktivierung von Genen, die die Entstehung von Gewebe zwischen den Blutgefässen fördern, und die Repression von Differenzierungs-Genen aufrechterhält (Angulo *et al.*, 2004). Ob die Ash2-abhängige Aktivierung und Repression dieser Gene direkt oder indirekt sind, ist unbekannt.

2.6.2 Die Struktur von Ash2

Das humane Ash2 ist 628 Aminosäuren lang und Sequenzvergleiche postulieren, dass es einen N-terminalen Zink-Finger, eine C-terminale SPRY-Domäne, und ein zweigeteiltes Kernlokalisierungs-Signal (NLS) besitzt (Ikegawa *et al.*, 1999; Abb. 2.6).

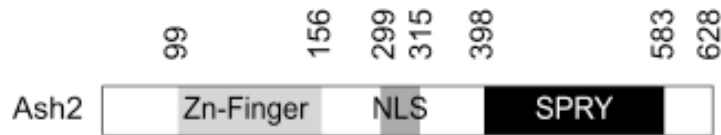


Abb. 2.6: Schematische Struktur von Ash2. Zn-Finger: Zink-Finger; NLS: nukleäres Lokalisierungs-Signal; SPRY: SPRY-Domäne.

An Stelle des Zink-Fingers im humanen Ash2 tritt im *Drosophila*-Ortholog ein PHD (*plant homeodomain*)-Finger, der im Allg. als doppelter Zink-Finger aus sieben Cysteinen und einem Histidin in der Anordnung Cys4-His-Cys3 besteht. Dem humanen Ash2 fehlen drei Cysteine und ein Histidin für einen vollständigen PHD-Finger. Eine allgemeine Funktion des PHD-Fingers ist zwar nicht bekannt, aber es wird angenommen, dass er als Protein-Protein-Interaktionsdomäne an der Chromatin-abhängigen Transkriptions-Regulation beteiligt sein könnte (Aasland *et al.*, 1995). Einzelne oder mehrere PHD-Finger wurden u.a. auch in dem TrxG-Protein Trithorax, PcG-Protein Polycomb-like, CBP (CREB-bindendes Protein) und TIF1 gefunden. Ob der Zink-Finger in Ash2 noch die Funktion eines PHD-Fingers erfüllen kann, ist unklar.

SPRY (SP1A und Ryanodin-Rezeptor)-Domänen sind nach ihrem Vorkommen in SP1A und Ryanodin-Rezeptoren benannt. SP1A ist in der Hefe an der Sporendifferenzierung beteiligt, Ryanodine Rezeptoren (RYR) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der intrazellulären Ca(2+)-Konzentration (Ponting *et al.*, 1997). Die allgemeine Funktion der SPRY-Domäne ist zwar bisher unbekannt, doch es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei RNA-Bindung oder Protein-Protein-Interaktionen spielt. Auch die SPY-Domäne in Ash2 könnte für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sein, denn sie ist in *Drosophila*-Ash2 für die Bindung an SKTL ausreichend (Cheng *et al.*, 2004).

Humanes Ash2 tritt in den zwei Spleissvarianten Ash2L1 und Ash2L2 auf (Wang *et al.*, 2001); da in dieser Arbeit nur mit dem humanen Ash2L1 gearbeitet wird, wird dies weiterhin Ash2 genannt.

2.6.3 Ash2-assoziierte Histon-Methyltransferase (HMT)-Komplexe

Ash2 wurde in mehreren Histon H3 Lysin-4 (H3-K4) HMT-Komplexen in *Saccharomyces cerevisiae* und im Menschen identifiziert, die ähnliche Komplexpartner, aber unterschiedliche HMTs enthalten:

- 1) Set1-Komplex (*Saccharomyces cerevisiae*)
- 2) ASCOM (*Homo sapiens*)
- 3) hSet1/HCF-1-Komplex (*Homo sapiens*)
- 4) MLL1/HCF-2/Menin-Komplex (*Homo sapiens*)
- 5) MLL2/Menin-Komplex (*Homo sapiens*)

1) Set1-Komplex (*Saccharomyces cerevisiae*)

Ein *Saccharomyces cerevisiae*-Homolog von *ash2*, *bre2*, wurde in einem screen für Mutationen identifiziert, die resistent gegen Brefeldin sind (ein Toxin, das den Golgi-Apparat zerstört) (Dinter und Berger, 1998). Bre2 wurde in einem Komplex mit Set1 gefunden, das im Allg. eine Rolle bei dem Erhalt der Telomer-Längen und der DNA-Reparatur spielt und H3-K4-HMT-Aktivität besitzt (Nagy *et al.*, 2002; Roguev *et al.*, 2001; Nislow *et al.*, 1997). Bre2 gleicht Ash2 in der SPRY-Domäne, besitzt aber keinen PHD-Zink-Finger, so dass postuliert wurde, dass der Komplex-Partner Spp1 mit seinem PHD-Finger diesen Zink-Finger ersetzt. In dem Set1-Komplex wurde ausserdem Sdc1 identifiziert, ein Homolog zu DPY-30, das in *C. elegans* für die Geschlechts-spezifische Bindung von Chromosomen-Kondensations-Faktoren während der X-Chromosom-Dosiskompensation notwendig ist (Lieb *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 1995). Es wird postuliert, dass der Set-1-Komplex am Erhalt der Telomerlängen beteiligt ist, denn die Deletion einiger Mitglieder des Set1-Komplexes, z. B. auch Bre2, führt zu verkürzten Telomeren (Roguev *et al.*, 2001).

2) ASCOM (*Homo sapiens*)

Das humane Ash2 wurde als Bestandteil des ASC-2-Komplexes (ASCOM) charakterisiert, wobei ASC-2 (*activating signal coactivator 2*) ein Brückenprotein ist, das die nukleären Rezeptoren mit der basalen Transkriptions-Maschinerie verbindet (Goo *et al.*, 2003). Der ASCOM besitzt H3-K4-HMT-Aktivität, die wahrscheinlich durch die TrxG-Proteine ALR-1 und HALR vermittelt wird und möglicherweise eine Rolle bei der Aktivierung durch nukleäre Rezeptoren spielt.

3) hSet1/HCF-1-Komplex (*Homo sapiens*)

Der HCF-1/hSet1/-Komplex ist ein weiterer humaner Komplex, der Ash2 enthält (Wysocka *et al.*, 2003). HCF-1 (host-cell factor-1) bindet Chromatin und ist für die Transkription des *Herpes Simplex*-Virus für Zellwachstum und -teilung notwendig. Der HCF-1-Komplex besteht aus mindestens zwei Sub-Komplexen, einem Sin3-HDAC-Komplex und einem HMT-Komplex, die beide durch HCF-1 zusammengehalten werden. Der HCF-1/HMT-Komplex enthält ein humanes Set1-Homolog hSet1 und methyliert H3-K4, was die Transkription aktivieren könnte, während HDAC-Komplexe mit Genrepression korrelieren. Daher wird

postuliert, dass das Zusammenhalten von HMT- und HDAC-Komplexen durch HCF-1 wichtig für ein oszillierendes An- und Abschalten der Transkription sein könnte.

4) MLL1/HCF-2/Menin-Komplex (*Homo sapiens*)

Ash2 wurde in einem humanen Komplex identifiziert, der u.a. HCF-2 und MLL1 (*mixed-lineage leukemia 1*) enthält, ein funktionelles Ortholog des *Drosophila*-Trithorax und Proto-Onkoprotein, das in vielen Leukämien mutiert ist (Yokoyama *et al.*, 2004). MLL1 kann im Allg. die Transkription durch eine H3-K4-spezifische HMT-Aktivität aktivieren, andererseits kann es die Genexpression reprimieren, was von der Interaktion mit dem Ko-Repressor CtBP und den PcG-Proteinen HPC2 und BMI-1 abhängig ist (Xia *et al.*, 2003). Der MLL1-Komplex enthält ausserdem Menin, ein Tumor-Suppressor, dessen Gen in vielen Tumoren mutiert ist und der die Transkription sowohl aktivieren als auch reprimieren kann (Yokoyama *et al.*, 2004). Die Reduzierung von MLL1 und Menin durch siRNA, aber nicht von Ash2, führt zur reduzierten Expression des *Hox*-Gens *HoxA9*, so dass vorgeschlagen wird, dass das Proto-Onkoprotein MLL1 und der Tumor-Suppressor Menin in der MLL1-abhängigen Leukämogenese kooperieren.

5) MLL2/Menin-Komplex (*Homo sapiens*)

Desweiteren ist Ash2 in einem MLL2/Menin-Komplex vorhanden, der H3-K4 wahrscheinlich durch MLL2 methyliert, das eine SET-Domäne enthält (Hughes *et al.*, 2004). Menin bindet an das *Hoxc8*-Gen, das die Differenzierung reguliert, und aktiviert es vermutlich durch die Bindung des MLL2-HMT-Komplexes. Es wird postuliert, dass manche Menin-Mutationen die HMT-Bindung verhindern, so dass Differenzierungs-regulierende Gene nicht mehr aktiviert werden können, was zur Tumorbildung führen kann.

Zusammenfassend kommt humanes Ash2 in mehreren H3-K4-HMT-Komplexen vor, die unterschiedliche HMTs enthalten, z. B. HALR/ALR-1, hSet1, MLL1 und MLL2, während in S. cerevisiae bisher nur ein Ash2-HMT-Komplex identifiziert wurde. Die Zusammensetzung der humanen und Hefe-Komplexe ähnelt sich in dem Auftreten von Ash2, Dpy-30 und WD40-Domänen-Proteine, wie z. B. RBQ3 (Retinoblastoma-Protein-bindendes Protein) (Tab. 2.1). Die H3-K4-Methylierung dieser Komplexe kann notwendig sein für den Erhalt der Telomerlängen (in S. cerevisiae) und die Aktivierung der Genexpression, z. B. von Zielgenen der nukleären Rezeptoren oder von Hox-Genen (in H. sapiens).

	Set1-Komplex (COMPASS)	ASCOM	hSet1/HCF-1- Komplex	MLL1/HCF- 2/Menin- Komplex	MLL2/Menin- Komplex
Org.	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>H. sapiens</i>
HMT	Set1	HALR, (1) ALR-1 (2)	hSet1	MLL1	MLL2
	Bre2	Ash2	Ash2	Ash2	Ash2
	Spp1				
	Swd1	Rbbp5 (RBQ3)	?	Rbbp5 (RBQ3)	Rbbp5 (RBQ3)
	Swd2	?	?	?	?
	Swd3	?	WDR5	WDR5	WDR5
	Sdc1	?	?	?	hDPY-30
				Menin	Menin
Ref.	Nagy <i>et al.</i> , 2002; Roguev <i>et al.</i> , 2001	Goo <i>et al.</i> , 2003	Wysocka <i>et al.</i> , 2003	Yokoyama <i>et al.</i> , 2004	Hughes <i>et al.</i> , 2004

Tab. 2.1: Vergleich der verschiedenen H3-K4-spezifischen HMT-Komplexe, die Ash2 enthalten. (1) HALR (MLL3) ist homolog zu ALR, (2) ALR-1 (MLL2) ist homolog zu Trx, ALL-1 und MLL1; Org.: Organismus; Ref.: Referenzen.

2.6.4 Ash2, ein neuer Myc-Interaktionspartner

Ash2 wurde als neues Myc-interagierendes Protein chromatographisch aufgereinigt und charakterisiert und bindet *in vivo* und *in vitro* an Myc (Dissertation von Dr. Vervoorts). *In vitro* bindet Ash2 an einen zentralen Teil in Myc ausserhalb der TAD und der bHLHZip-Domäne, an die Aminosäuren 265 bis 350, und diese Bindung wird durch die Deletion von Aminosäure 265 bis 367 aufgehoben. Weiterhin Ash2 kann schwach die Myc-abhängige Transaktivierung stimulieren.

Folglich ist Ash2 ein TrxG-Protein, dessen Verlust in Drosophila homöotische Transformationen erzeugt und Hox-Gene dereguliert, aber auch die Entwicklung der Blutgefässe in den Flügeln beeinflusst. Ash2 wurde in mehreren Komplexen mit H3-K4-HMTs identifiziert, in S. cerevisiae in dem Set1-Komplex, im Menschen in bisher vier orthologen Komplexen. Da Ash2 auch ein neuer Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors und Proto-Onkoproteins Myc ist, könnte es bei der Gen-Transkription und Transformation eine Rolle spielen.

2.7 Zielsetzung

Myc kann als Proto-Onkoprotein viele Aspekte des Zellverhaltens wie Proliferation, Transformation und Apoptose regulieren und als Transkriptionsfaktor auf molekularer Ebene seine Zielgene aktivieren oder reprimieren. Für die Aktivierung kann Myc u. a. Histon-modifizierende Enzyme rekrutieren, wie Histon-Acetyltransferasen und Nukleosomen-*remodelling*-Komplexe. Eines der Myc-bindenden Proteine ist Ash2, ein Trithorax-Gruppe-Protein, das in mehreren Komplexen mit Histon-Methyltransferasen (HMTs) vorkommt. Bisher ist nicht bekannt, welche Bedeutung die Myc-Ash2-Interaktion hat, insbesondere welche Rolle Ash2 für die molekularen und biologischen Funktionen von Myc spielt, z. B. bei der Regulation von Zielgenen und der Transformation.

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob erstens Myc ebenso wie Ash2 eine HMT bindet und durch diese weitere enzymatische Aktivität seine Zielgene regulieren könnte und zweitens ob Ash2 bei diesem möglichen Genregulations-Mechanismus eine Rolle spielt, was die molekulare Bedeutung der Myc-Ash2-Interaktion klären könnte. Da die Histon-Methylierung an verschiedenen Aminosäuren entweder aktivierende oder reprimierende Effekte auf die Genexpression hat, sollte die Spezifität der Ash2- und Myc-assoziierten HMTs untersucht werden, um auf die Funktion der HMT schliessen zu können.

Neben der molekularen Funktion der Ash2-Myc-Interaktion sollte die biologische Bedeutung von Ash2 und Myc ermittelt werden. Da Myc ein Proto-Onkoprotein ist und zusammen mit Ras Rattenembryo-Fibroblasten (REFs) transformieren kann, sollte untersucht werden, ob erstens auch Ash2 zusammen mit Ras in der Transformation kooperiert und zweitens, ob Ash2 einen Einfluss auf die Myc/Ras-Transformation haben könnte. Wenn tatsächlich Ash2 und Ras transformieren könnten, sollten die Myc/Ras- und Ash2/Ras-transformierten Zellen miteinander verglichen werden, um Hinweise auf gemeinsame Regulationsmechanismen von Ash2 und Myc zu erhalten.

3 ERGEBNISSE

3.1 Interaktion von Myc und Ash2

3.1.1 Kartierung der Ash2-Interaktionsdomäne in Myc *in vivo*

In dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Myc und Ash2 *in vivo* und *in vitro* interagieren (Dissertation von Dr. Vervoorts). Dies führte zu der Frage, ob Ash2 eine Rolle bei den biologischen Funktionen von Myc, wie Transformation und Regulation von Zielgenen, spielt. Für ihre Beantwortung könnten bestimmte Myc-Mutanten, die nicht mehr Ash2 binden, in biologischen Assays (Transformations-Assays, Reporter-Gen-Experimenten usw.) überprüft werden. Diese Myc-Mutanten sollten durch eine Kartierung der Ash2-Interaktionsdomäne *in vivo* gefunden werden.

In vitro wurde mit Deletionsmutanten die Interaktionsdomäne in Myc definiert, die die Aminosäuren 262 bis 350 umspannt (Dissertation von Dr. Vervoorts). Ausserdem geht durch die Deletion der Region 265 bis 367 die Bindung verloren. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob diese Interaktionsdomäne auch *in vivo* relevant ist. Dazu wurden einige der Myc-Deletionsmutanten verwendet, die auch in den *in vitro*-Interaktions-Assays eingesetzt worden sind, und die mit einem Flag-Tag versehen waren. Diese wurden in 293-Zellen transient exprimiert und aus Zellextrakten mit Flag-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Die Bindung von Ash2 an diese Myc-Mutanten wurde im Western-Blot mit Ash2-spezifischen Antikörpern untersucht. Sowohl die Deletionen der ersten 177 Aminosäuren (d177) als auch der Aminosäuren 410 bis 439 (1-410) interagierten mit Ash2, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die Aminosäuren 178 bis 410 in Myc ausreichend für die Bindung an Ash2 waren, was mit der vorhergehenden Kartierung übereinstimmte (Dissertation von Dr. Vervoorts und Abb. 3.1.A). Unerwartet war, dass ein Verlust der Aminosäuren 265 bis 367 (d265-367) eine Bindung an Ash2 *in vivo* erlaubte, denn *in vitro* band diese Mutante nicht mehr.

Um weiterhin die Ash2-bindende Region von Myc zu kartieren, wurden C- und N-terminale Deletionsmutanten von Myc eingesetzt (Salghetti *et al.*, 1999). Diese waren mit einem HA-Tag fusioniert und wurden in Zellen mit Flag-getagtem Ash2 ko-exprimiert. Nach einer HA-IP konnte die Bindung von Flag-Ash2 im Western-Blot nachgewiesen werden. Die Myc-Aminosäuren 1 bis 366 (1-366) interagierten mit Ash2, 1 bis 293 (1-293) jedoch nicht mehr, was auf eine Bindungsdomäne zwischen 293 bis 366 hinwies (Abb. 3.1.B). Erstaunlicherweise sah man auch eine Bindung von 367 bis 439 (367-439), die zwar sehr schwach war, was sich aber mit der geringen Expression dieser Mutante begründen liess.

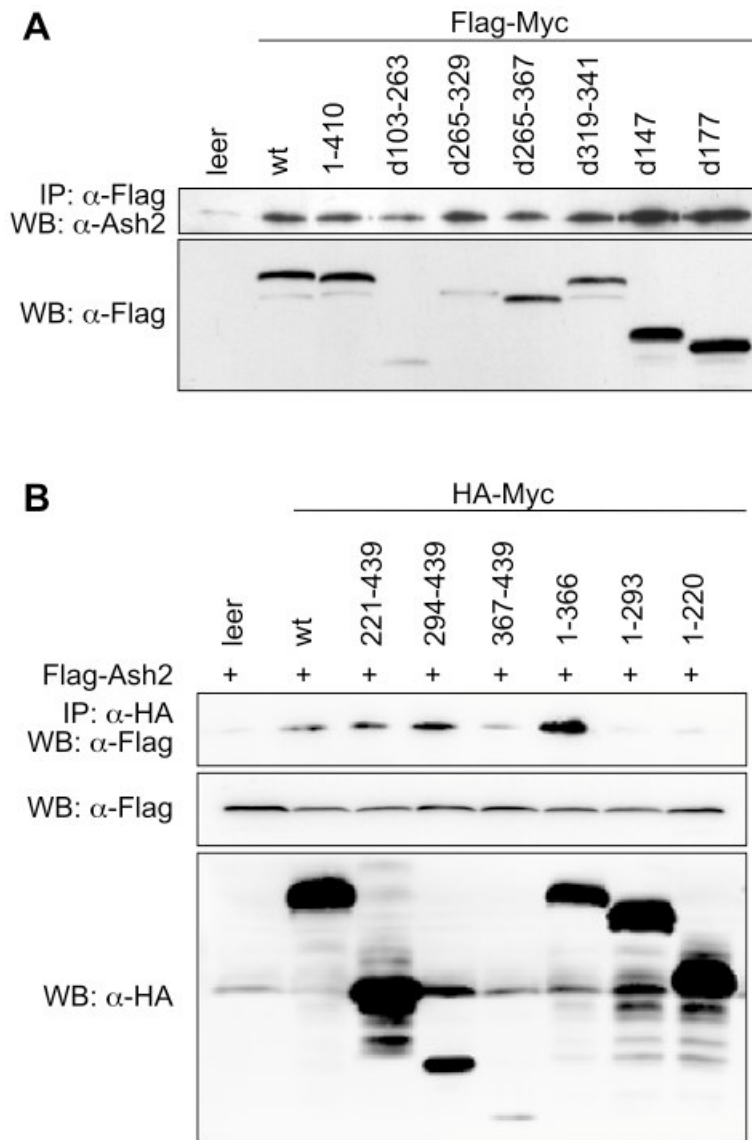


Abb. 3.1: Kartierung der Ash2-bindenden Region in Myc in vivo. (A) 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3Flag-Myc (wt), pcDNA3Flag-Myc-dLZ (1-410), pcDNA3Flag-Myc(d265-329), pcDNA3Flag-Myc(d265-367), pcDNA3Flag-Myc(d319-341), pcDNA3Flag-Myc-d147 oder pcDNA3Flag-Myc-d177 transfiziert und im F-Puffer lysiert. Anschliessend wurde Flag-Myc mit den Flag-Antikörpern M2 immunpräzipitiert (IP). Die gefällten Komplexe wurde durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, und im Western-Blot (WB) wurde Ash2 mit den Antikörpern 4C5 detektiert. Die Ausgangsmenge an Flag-Myc wurde direkt im WB mit den Flag-Antikörpern nachgewiesen. (B) 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3Flag-Ash2, pCGN-Myc-dN3 (221-439), pCGN-Myc-dN4 (294-439), pCGN-Myc-dN5 (367-439), pCGN-Myc-dC1 (1-366), pCGN-Myc-dC2 (1-293) oder pCGN-Myc-dC3 (1-220) transfiziert. Die F-Puffer-Lysate wurden in eine IP mit den HA-Antikörpern 3F10 eingesetzt. Die Proteine aus der IP und dem Lysat wurden im WB mit HA 3F10- und Flag M2-Antikörpern nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich die Myc-Ash2-Bindung in vivo und in vitro unterscheiden: Die Region zwischen den Aminosäuren 265 bis 367 in Myc ist in vitro notwendig, in vivo jedoch nicht ausschliesslich. Vielmehr kann postuliert werden, dass Myc über zwei Regionen an Ash2 bindet: erstens über die bereits in vitro definierten Aminosäuren 294 bis 367, zweitens über die Aminosäuren 367 bis 439 (Abb. 3.10). Da Ash2 an zwei Domänen in Myc bindet, ist es schwierig, Myc-Mutanten herzustellen, die nicht mehr mit Ash2 interagieren und die Ash2-spezifische Effekte in biologischen Assays zeigen würden.

3.1.2 Kartierung der Myc-Interaktionsdomäne in Ash2 *in vitro* und *in vivo*

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Domänen in Ash2 an Myc binden. Dazu wurden N-terminale Deletionsmutanten von Ash2 *in vitro* translatiert und in einen GST-*pull-down* mit einem bakteriell hergestellten, rekombinanten GST-getaggen Myc-Fragment von den Aminosäuren 263 bis 439 (GST-Myc-C176) eingesetzt. Während das Ash2-Fragment 156 bis 626 (156-626) mit Myc interagierte, band 393 bis 626 (393-626) nicht mehr (Abb. 3.2.A). Demzufolge müsste die Myc-Binderegion in Ash2 zwischen 156 und 393 liegen.

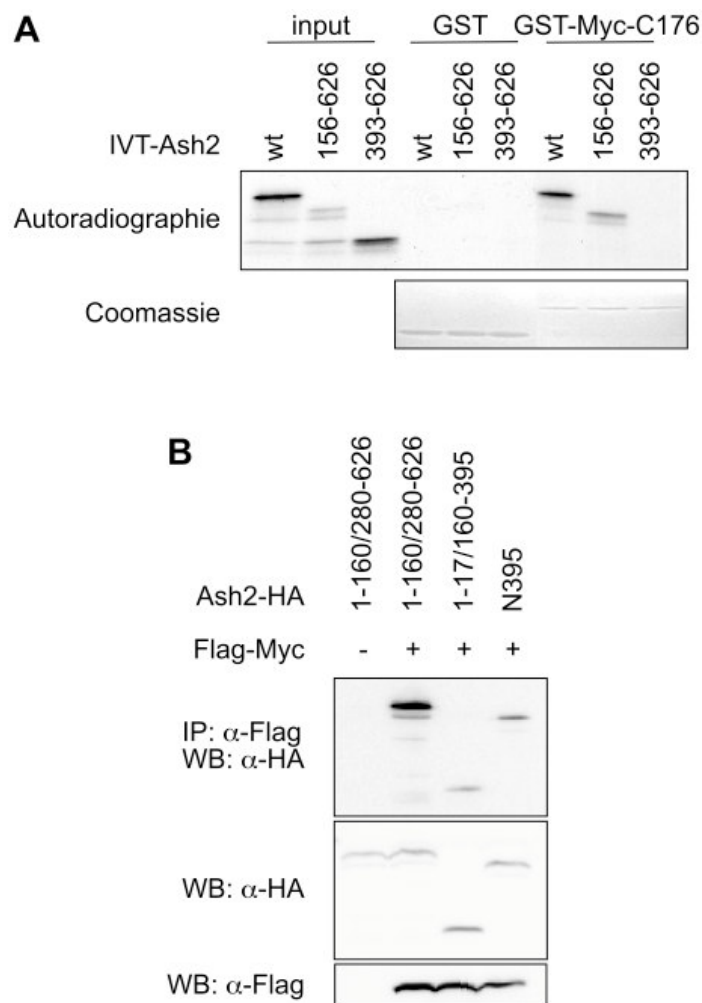


Abb. 3.2: Kartierung der Myc-bindenden Region in Ash2 *in vitro* und *in vivo*. (A) Die Plasmide pT7T3-Ash2-HA, pT7T3-Ash2(156-628)HA und pT7T3-Ash2(393-628)-HA wurden *in vitro* translatiert und mit ^{35}S markiert. Zusammen mit in *E. coli* exprimiertem und aufgereinigtem GST-Myc-C176 wurde ein GST-pull-down durchgeführt. Gebundene Proteine wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassie-Färbung oder Autoradiographie detektiert. (B) 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3Flag-Myc, pEQ172P2-Ash2(1-160/280-626)-HA, pEQ176P2-Ash2(1-17/160-395)-HA und pEQ176P2-Ash2(1-17/160-626)-HA transfiziert. Die F-Puffer-Lysate wurden in eine IP mit den Flag-Antikörpern M2 eingesetzt. Die Proteine aus der IP und dem Lysat wurden im WB mit HA 3F10- und Flag M2-Antikörpern nachgewiesen.

Dieser Befund sollte *in vivo* überprüft werden. Dazu wurden HA-getaggte Ash2-Deletionsmutanten in 293-Zellen mit Flag-Myc ko-exprimiert und nach einer Flag-IP im

Western-Blot detektiert. Es war zu beobachten, dass die N-terminalen 395 Aminosäuren (N395) für eine Interaktion ausreichen; auch wenn von diesem Fragment die Aminosäuren 18 bis 159 (1-17/160-395) deletiert waren, konnte Myc noch binden (Abb. 3.2.B). Die Deletion der Aminosäuren 161 bis 279 und der letzten beiden Aminosäuren (1-160/280-626) in Ash2 konnte ebenfalls Myc ko-immunpräzipitieren, was in einem stärkeren Masse erfolgte als die Ko-Immünpräzipitation (Ko-IP) der N-terminalen 395 Aminosäuren (Abb. 3.7). Davon lässt sich ableiten, dass die Aminosäuren 279 bis 395 in Ash2 wichtig für die Myc-Interaktion sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl in vitro als auch in vivo die Aminosäuren 156 bis 393 in Ash2 für die Bindung an Myc ausreichen.

3.2 Interaktion von Myc und Ash2 mit Histon-Methyltransferasen (HMTs)

3.2.1 Ash2 bindet eine HMT

Da mehrere Gruppen zeigten, dass Ash2 in verschiedenen Komplexen mit HMTs vorkommt (Goo *et al.*, 2003; Wysocka *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2004), sollte zunächst ermittelt werden, ob Ash2 eine HMT binden kann, wenn man die vorliegenden Antikörper und Extraktions-Bedingungen, die eine Myc-Bindung zulassen, einsetzt (Dissertation von Dr. Vervoorts). Jurkat-Zellen wurden mit dem Frackelton-Puffer lysiert und Ash2 mit spezifischen polyklonalen (548-8) und monoklonalen Antikörpern (4B5 und 4C5) immunpräzipitiert. Dann erfolgte ein HMT-Assay mit Core-Histonen und SAM (S-Adenosyl-Methionin). Die Methylgruppe des SAMs ist Tritium-markiert und kann durch eine HMT auf ein Histon übertragen werden. Ob diese Übertragung stattgefunden hatte, d. h. ob eine HMT in der Immunpräzipitation (IP) vorhanden war, konnte nach einer SDS-PAGE in der Autoradiographie ermittelt werden. Tatsächlich sah man eine radioaktive Markierung nach einer IP mit Ash2-spezifischen Antikörpern, aber nicht mit den Negativkontroll-Antikörpern gegen Caspase 5 (Cas. 5) und Mad1 (5F4) (Abb. 3.3.A). Die Markierung betraf Histon H3, ein schwaches Signal war auch bei Histon H4 zu erkennen. Folglich kann man aus Jurkat-Zellen mit Ash2-spezifischen Antikörpern eine HMT immunpräzipitieren, die H3-spezifisch ist. Weiterhin stellte sich die Frage, ob diese Ash2-assoziierte HMT-Aktivität auch aus anderen Zelllinien oder Zellen immunpräzipitiert werden kann. Aus Zelllysaten der Zelllinien HL-60, U-937, 293, Hela und den primären (Tig3-LO3273) oder immortalisierten (Tig3-LO923) humanen Fibroblasten wurde Ash2 immunpräzipitiert und in HMT-Assays eingesetzt. Als Substrate wurden entweder Core-Histone oder die N-terminalen 57 Aminosäuren von H3 eingesetzt, die an einen GST-Tag fusioniert waren und bakteriell hergestellt werden konnten (GST-H3N; Tachibana *et al.*, 2001). Diese N-terminalen Aminosäuren sind Bestandteil des

flexiblen Arms von Histon H3, an dem hauptsächlich Histon-Modifikationen stattfinden. Aus allen überprüften Zelllinien und den humanen Fibroblasten liess sich eine Ash2-spezifische HMT-Aktivität immunpräzipitieren, die H3 oder GST-H3N methylierte (Abb. 3.3.B).

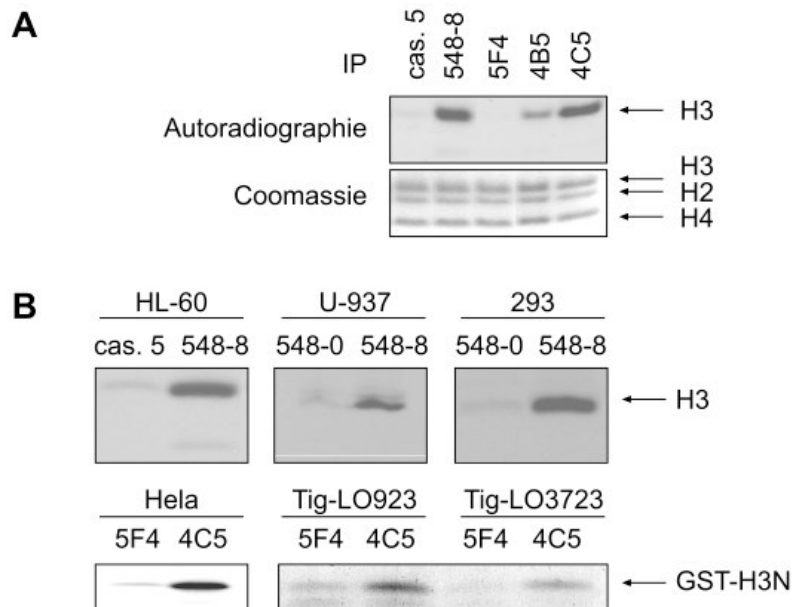


Abb. 3.3: Ash2 bindet eine Histon-Methyltransferase-Aktivität. (A) 2×10^7 Jurkat-Zellen wurden im F-Puffer lysiert und mit Antikörpern gegen Ash2 (548-8, 4B5 und 4C5), Caspase 5 (cas. 5) und Mad1 (5F4) als Negativkontrollen immunpräzipitiert. Dann folgten HMT-Assays mit Core-Histonen und radioaktivem S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Substrate. Die markierten Histone wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung und Autoradiographie detektiert. (B) 2×10^7 HL-60-, U-937-, 293- oder HeLa-Zellen oder humane Fibroblasten Tig-LO923 oder Tig-LO3723 wurden mit dem F-Puffer lysiert und mit Antikörpern gegen Ash2 (548-8, 4C5) oder Caspase 5 (cas. 5) und Mad1 (5F4) als Negativkontrollen immunpräzipitiert. Nach HMT-Assays mit Histon H3 oder GST-H3-N-Termini (GST-H3N) wurden die markierten Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Ash2-assoziierte HMT-Aktivität auch aus differenzierenden Zellen immunpräzipitierbar ist. Dazu wurden HL-60-Zellen eingesetzt, die durch die Behandlung mit dem Phorbol-ester 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) zu Monozyten differenzieren. Dass die Zellen differenziert waren, zeigte eine parallele Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP), bei der Myc nicht mehr an den *Zyklin D2*-Promoter band und das mit Differenzierung korreliert (Daten nicht gezeigt und Bouchard *et al.*, 2001). Lysate von TPA-behandelten HL-60-Zellen wurden nach einer Ash2-IP in einen HMT-Assay eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass sowohl die logarithmisch wachsenden als auch die differenzierenden Zellen die gleiche Menge an Ash2 und Ash2-assoziiierter HMT-Aktivität enthielten (Abb. 3.4). Folglich ändert sich die Ash2-Proteinmenge und die Ash2-assoziierte HMT-Aktivität nicht durch die Differenzierung.

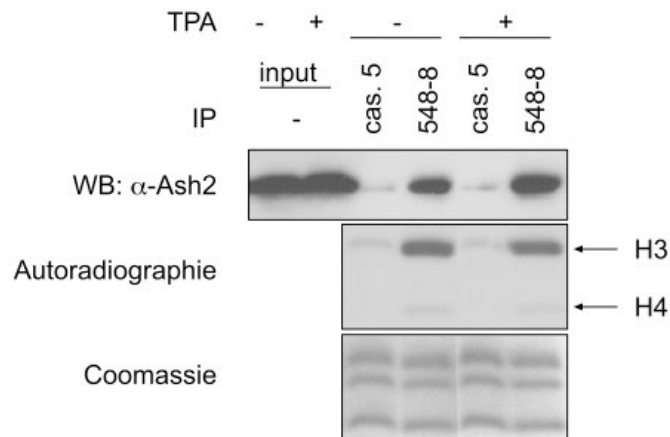


Abb. 3.4: Die Ash2-assozierte HMT-Aktivität in der Differenzierung. $2,75 \times 10^7$ HL60-Zellen wurden mit TPA für 21 Stunden behandelt. Dann wurden sie mit F-Puffer lysiert und in eine IP mit den Antikörpern gegen Ash2 (548-8) oder Caspase 5 (cas. 5) als Negativkontrolle eingesetzt. Die Komplexe wurden entweder direkt oder nach einem HMT-Assay mit Core-Histonen in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbung oder Autoradiographie oder nach einem Western-Blot mit Ash2-spezifischen Antikörpern (4C5) detektiert.

Die Ash2-assozierte HMT methyliert spezifisch Histon H3 Lysin-9 (H3-K9)

Der Histon-Code, also die Kombination von kovalenten Modifikationen an Aminosäuren verschiedener Histone, beeinflusst die Chromatin-Struktur und letztendlich die Transkription der Gene (Strahl *et al.*, 2000). Daher ist interessant, welche Aminosäuren eines Histons von der Ash2-assozierten HMT methyliert werden. Zunächst sollte untersucht werden, wie die Core-Histone methyliert werden, wenn sie der Ash2-bindenden HMT einzeln angeboten werden. Während H3 sowohl in der Mischung von Core-Histonen als auch einzeln Ash2-abhängig methyliert wurde, wurden H2A und H4 zwar als individuelle Substrate genutzt, jedoch nicht in der Core-Histon-Mischung (Abb. 3.5.A). Da die Methylierung von H2A und H4 auch mit Negativkontroll-Antikörpern sichtbar war, war sie wahrscheinlich unspezifisch. Demzufolge ist H3 das eigentliche Substrat für die Ash2-HMT, denn es wird sowohl in der Mischung als auch einzeln Ash2-abhängig methyliert. H4 und H2A spielen als Substrate eine untergeordnete Rolle, denn die Methylierung ist nicht Ash2-spezifisch.

Als nächstes sollte untersucht werden, welche Aminosäuren an Histon H3 durch die Ash2-assozierte HMT methyliert werden. Ash2 wurde bereits in Komplexen mit Histon H3 Lysin-4 (H3-K4)-spezifischen HMTs gefunden, so dass diese Aminosäure auch hier als Methylierungsstelle wahrscheinlich war (Goo *et al.*, 2003; Wysocka *et al.*, 2003). Dafür wurden die bereits erwähnten GST-getaggten N-terminalen 57 Aminosäuren von H3 eingesetzt, von denen es mehrere Varianten gab, bei denen die Lysine-4, -9, -27 entweder einzeln, doppelt oder dreifach in verschiedenen Kombinationen zu Argininen mutiert waren (K4R, K9R, K27R in Abb. 3.5.B; Tachibana *et al.*, 2001). Unerwarteterweise war zu beobachten, dass bei der Mutation von Lysin-9 die Ash2-assozierte HMT das Substrat nicht mehr methylierte, während mutierte Lysine-4 und -27 die HMT-Aktivität nicht

beeinträchtigten, wovon abgeleitet werden kann, dass die Ash2-assoziierte HMT vorwiegend H3-K9-spezifisch ist.

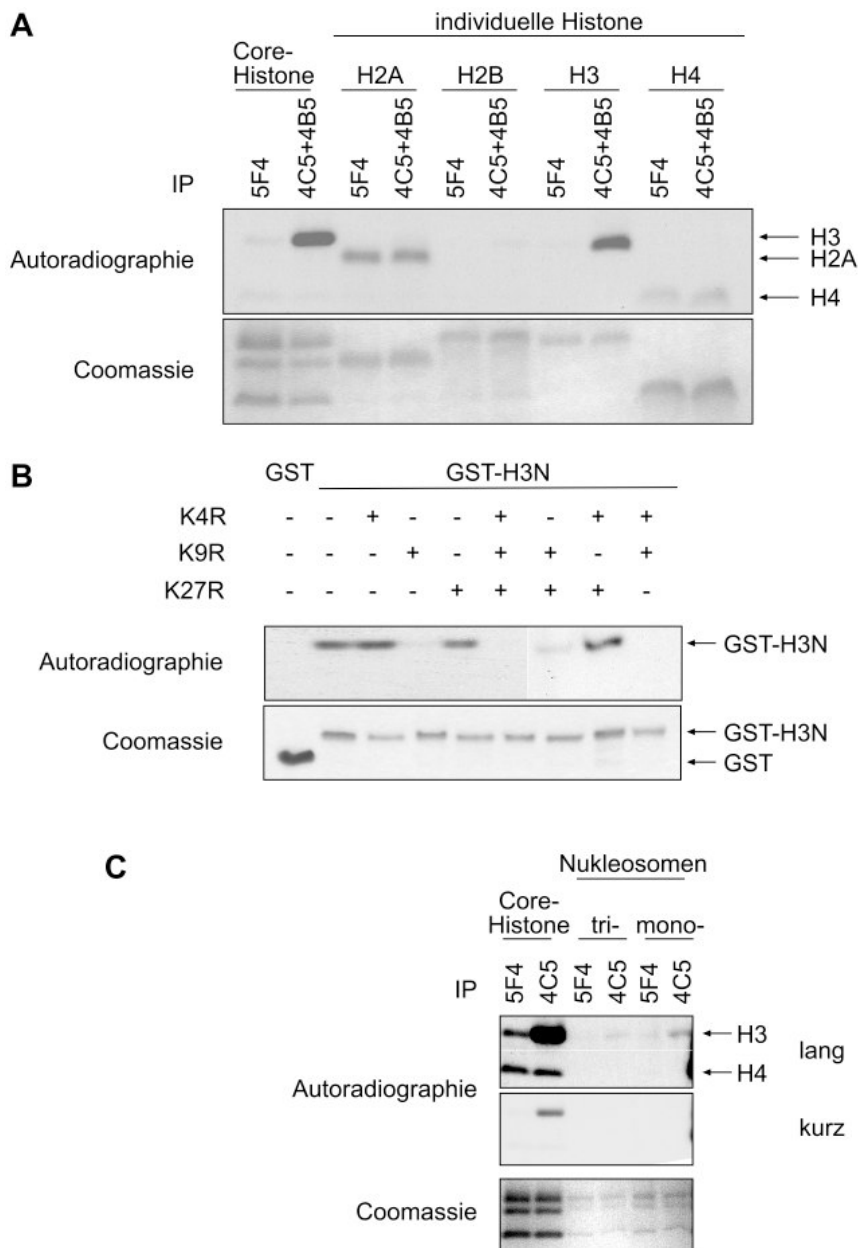


Abb. 3.5: Die Ash2-assoziierte HMT ist spezifisch für Histon H3 Lysin-9. (A) 3×10^7 Jurkat-Zellen wurden im F-Puffer lysiert und mit Antikörpern gegen Ash2 (4C5 + 4B5) oder Mad1 (5F4) als Negativkontrolle immunpräzipitiert. Anschließend wurden HMT-Assays mit Core-Histonen oder individuellen Histonen H2A, H2B, H3 oder H4 durchgeführt. Nach einer SDS-PAGE wurden die Histone durch eine Coomassie-Färbung oder Autoradiographie detektiert. **(B)** 3×10^7 Jurkat-Zellen wurden im F-Puffer lysiert und mit den Ash2-Antikörpern 548-8 immunpräzipitiert. In die anschließenden HMT-Assays wurden in *E. coli* exprimierte und aufgereinigte GST-H3-N-Termini (mutiert an verschiedenen Lysinen) eingesetzt. Die radioaktiven Proteine wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Parallel dazu wurden gleiche Mengen nichtmarkierter GST-Proteine nach einer SDS-PAGE mit Coomassie angefärbt. **(C)** 2×10^7 Jurkat-Zellen wurden im F-Puffer lysiert und mit Antikörpern gegen Ash2 (4C5) oder Mad1 (5F4) immunpräzipitiert. In den anschließenden HMT-Assays wurden Nukleosomen als Substrate eingesetzt. Die radioaktiven Proteine wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Mono: Fraktion 39 der aufgereinigten Nukleosomen, die hauptsächlich Mono-Nukleosomen enthält (Diplomarbeit von Dr. Vervoorts); tri: Fraktion 25 der aufgereinigten Nukleosomen, die hauptsächlich Tri-Nukleosomen enthält (Diplomarbeit von Dr. Vervoorts); lang: längere Exponierung; kurz: kürzere Exponierung.

Allerdings wurden die GST-H3-N-Termini etwas methyliert, wenn Lysin-9 und -27 oder nur Lysin-9 mutiert waren, was darauf hinweisen könnte, dass Ash2 möglicherweise auch mit einer sehr schwachen H3-K4-HMT-Aktivität assoziiert ist. Erst Mutationen von Lysin-9 und Lysin-4 liessen keine Methylierung mehr zu. Diese Beobachtungen zeigen also, dass Ash2 mit den hier verwendeten Antikörpern und unter diesen Bedingungen hauptsächlich mit einer H3-K9-spezifischen HMT-Aktivität assoziiert ist, die sich daher von den in der Literatur beschriebenen H3-K4-HMTs unterscheidet. Ausserdem könnte Ash2 hier möglicherweise mit einer äusserst schwachen H3-K4-HMT-Aktivität interagieren, die durch eine der publizierten HMTs erfolgen könnte.

Da im Zellkern Histone mit DNA zu Nukleosomen verpackt vorliegen, war eine weitere Frage, ob die Ash2-assoziierte HMT-Aktivität auch Nukleosomen methylieren kann. So wurden in Ash2-spezifischen HMT-Assays Nukleosomen als Substrate eingesetzt (Diplomarbeit von Dr. Vervoorts). Als Positivkontrolle diente eine Mischung an Core-Histonen als Substrat. Die Autoradiographie zeigte, dass die Nukleosomen Ash2-abhängig methyliert wurden, allerdings sehr schwach (Abb. 3.5.C). Ein genauer quantitativer Vergleich mit der Positivkontrolle war nicht möglich, da sich die eingesetzten Substratmengen unterschieden. Weil die Nukleosomen nur sehr schwach methyliert sind, ist nicht auszuschliessen, dass diese Methylierung nur auf Histonen stattfindet, die nicht mehr im Nukleosomen-Verband, sondern frei vorkommen.

Kartierung der HMT-Interaktionsdomäne in Ash2

Weiterhin sollte die HMT-bindende Region in Ash2 definiert werden. Zunächst muss dafür untersucht werden, ob auch transient überexprimiertes Ash2 mit HMT-Aktivität assoziiert ist. Flag- oder HA-getaggte Ash2-Proteine wurden in 293-Zellen transient exprimiert und nach Flag- bzw. HA-IPs in HMT-Assays eingesetzt. Sowohl mit Flag- als auch mit HA-Ash2 konnte HMT-Aktivität immunpräzipitiert werden, die H3-spezifisch war (Abb. 3.6.A). Zwar wurde mit der Flag-IP auch HMT-Aktivität präzipitiert, die H2A und H4 methylierte. Dies trat jedoch auch in der Negativkontrolle (leer), nicht aber in der Ash2-HA-IP auf und ist somit wahrscheinlich eine unspezifische Modifikation, die wahrscheinlich durch die Bindung weiterer Enzyme an die Flag-beads erfolgte.

Nun stellte sich die Frage, welche Regionen in transient überexprimiertem Ash2 die HMT-Bindung vermitteln. In Ash2 sind zwei potentielle Domänen bekannt: ein Zink-Finger (Aminosäure 99 bis 156) und eine SPRY-Domäne (Aminosäure 398 bis 538). Also wurden in HMT-Assays Ash2-Deletions-Mutanten eingesetzt, die entweder den Zink-Finger und eine zentrale Region enthielten (N395) oder die zentrale Domäne und die SPRY-Domäne (1-17/160-626) oder nur die zentrale Domäne (1-17/160-395) (Abb. 3.7).

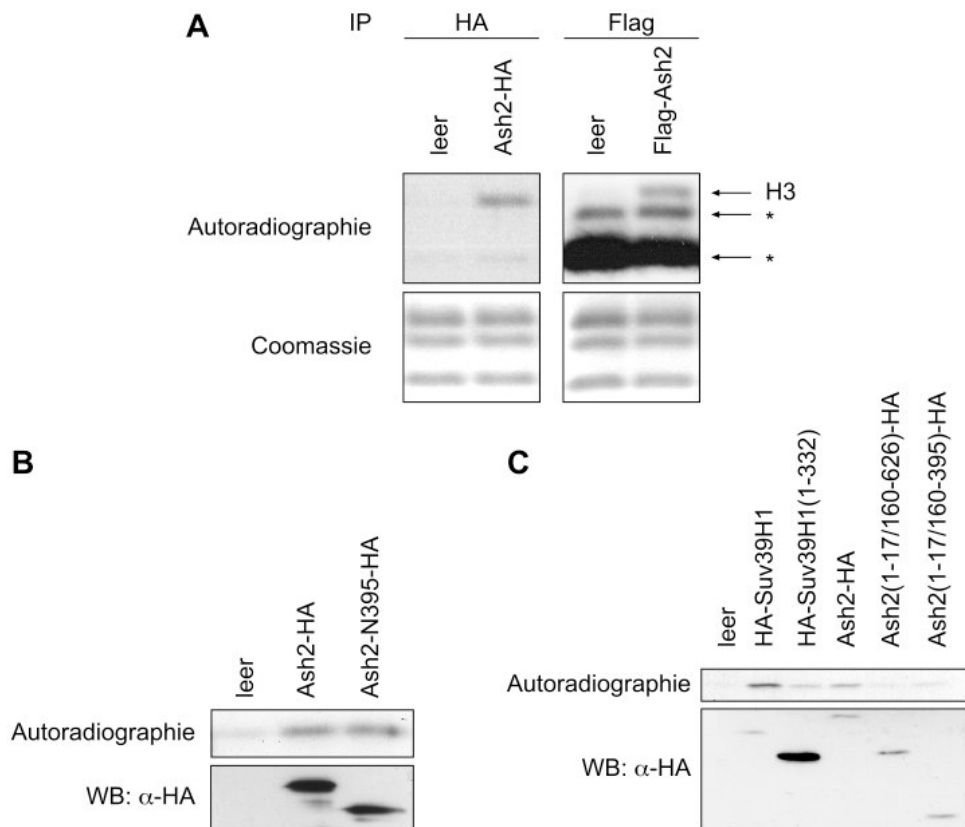


Abb. 3.6: Kartierung der HMT-bindenden Region in Ash2. 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pEQ176P2-Ash2-HA, pcDNA3Flag-Ash2, pEQ176P2-Ash2-N395-HA, pEQ176P2-Ash2(1-17/160-626)-HA, pEQ176P2-Ash2(1-17/160-395)-HA, pCMV2N3T-Suv39H1, pCMV2N3T-Suv39H1(1-332) transfiziert und im F-Puffer lysiert. Anschliessend wurden IPs mit HA 3F10- oder Flag M2-Antikörpern durchgeführt. Nach HMT-Assays mit Core-Histonen **(A)** oder Histon H3 **(B)** oder GST-H3-N-Termini **(C)** wurden die Proteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe einer Coomassie-Färbung oder Autoradiographie dargestellt. Die Ausgangsmenge an Ash2-HA wurde im Western-Blot mit HA 3F10-Antikörpern untersucht. *: unspezifische Markierung; H3: Histon H3; WB: Western-Blot; IP: Immunpräzipitation; Suv39H1(1-332) ist eine enzymtisch inaktive Deletions-Mutante.

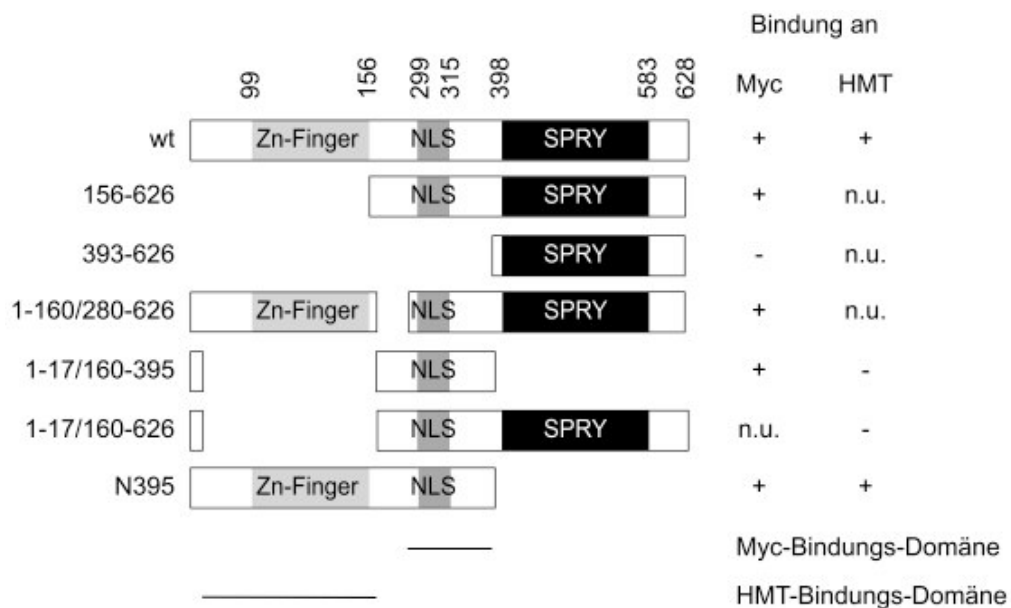


Abb. 3.7: Ash2-Deletionsmutanten. Dargestellt sind Deletionsmutanten von Ash2 und die Bindung an Myc bzw. die HMT-Aktivität, die durch GST-pull-downs, Ko-Immunpräzipitationen bzw. HMT-Assays ermittelt wurde. Ausserdem zeigen die schwarzen Striche die postulierten Myc- bzw. HMT-Bindungs-Domänen. Zn-Finger: Zink-Finger; NLS: nukleäres Lokalisierungs-Signal; SPRY: SPRY-Domäne; n.u.: nicht untersucht.

Die HMT-Aktivität, die mit den Aminosäuren 1 bis 395 (N395) in Ash2 immunpräzipitiert wurde, war genauso hoch wie mit dem Wildtyp (Abb. 3.6.B). Bei der Deletion der Aminosäuren 18 bis 159 (1-17/160-626) war allerdings die Methylierung reduziert (Abb. 3.6.C). Die H3-K9-spezifische HMT Suv39H1 wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Demzufolge kann angenommen werden, dass die Region 1 bis 160 in Ash2 wichtig für die Interaktion mit der HMT-Aktivität ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Ash2 eine HMT-Aktivität ko-immunpräzipitiert, die spezifisch Histon H3 an Lysin-9 methyliert und aus mehreren Zelllinien und Zellen isoliert werden kann. Die Bindung an die HMT erfolgt wahrscheinlich über die N-terminalen 160 Aminosäuren von Ash2.

3.2.2 Myc bindet eine HMT

Da Ash2 eine H3-K9-spezifische HMT und Myc bindet (Abb. 3.2 und 3.5.B), sollte untersucht werden, ob auch Myc mit einer HMT assoziiert ist und welche Spezifität diese hat. Dies könnte darüber Aufschluss geben, ob Ash2 und Myc dieselbe HMT binden. Dafür wurde Flag-Myc in 293-Zellen transient exprimiert und nach einer Flag-IP ein HMT-Assay mit den N-terminalen GST-H3-Armen (Wildtyp oder H3-K4 oder H3-K9 mutiert) durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die H3-K9-spezifische HMT EMT (Ogawa *et al.*, 2002).

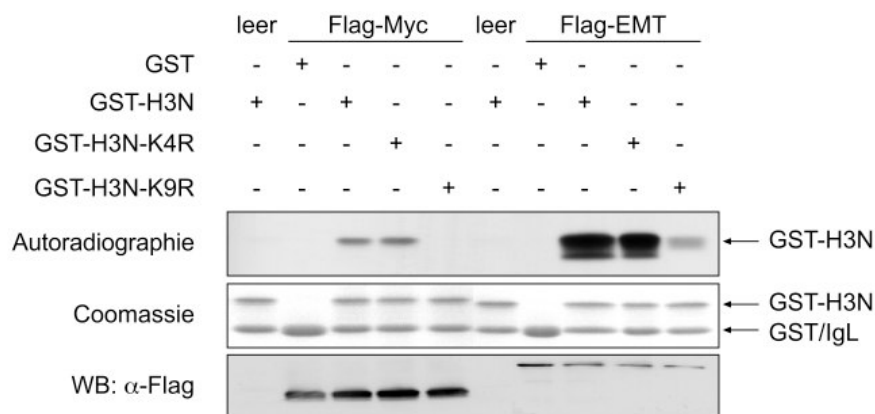


Abb. 3.8: Myc bindet eine H3-K9-spezifische HMT. 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3Flag-Myc und pcDNA3Flag-EMT transfiziert und im F-Puffer lysiert. Dann wurden IPs mit Flag M2-Antikörpern durchgeführt. In die HMT-Assays wurden in *E. coli* exprimierte und aufgereinigte GST-H3-N-Termini (mutiert an verschiedenen Lysinen) eingesetzt. Die radioaktiven Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung oder Autoradiographie nachgewiesen. Die Ausgangsmenge der Flag-Proteine wurde im Western-Blot mit Flag M2-Antikörpern überprüft.

Die Methylierung wurde reduziert, wenn K9 mutiert war, aber nicht bei der K4-Mutation (Abb. 3.8). Folglich kann transient überexprimiertes Myc eine HMT binden, die, ebenso wie bei Ash2, H3-K9-spezifisch ist. Es ist also möglich, dass die Ash2- und Myc-bindenden HMTs dieselben sind.

Kartierung der HMT-Interaktionsdomäne in Myc

Eine Frage ist, ob die Ash2- und Myc-assoziierten HMTs identisch sind, d. h. ob Ash2 und Myc in demselben Komplex mit einer HMT vorkommen. Eine Hypothese wäre, dass Myc über Ash2 an die HMT binden könnte. Wenn dies zutreffen würde, müsste die HMT-bindende Region in Myc identisch mit der Ash2-Interaktionsdomäne sein. Die Ash2-Binde-Region in Myc liegt zwischen den Aminosäuren 294 bis 439 (Abb. 3.1.B). Zur Kartierung der HMT-Interaktionsdomäne wurden Flag-Myc-Wildtyp und Myc-Deletionsmutanten in 293-Zellen transient exprimiert und nach einer Flag-IP in einen HMT-Assay eingesetzt.

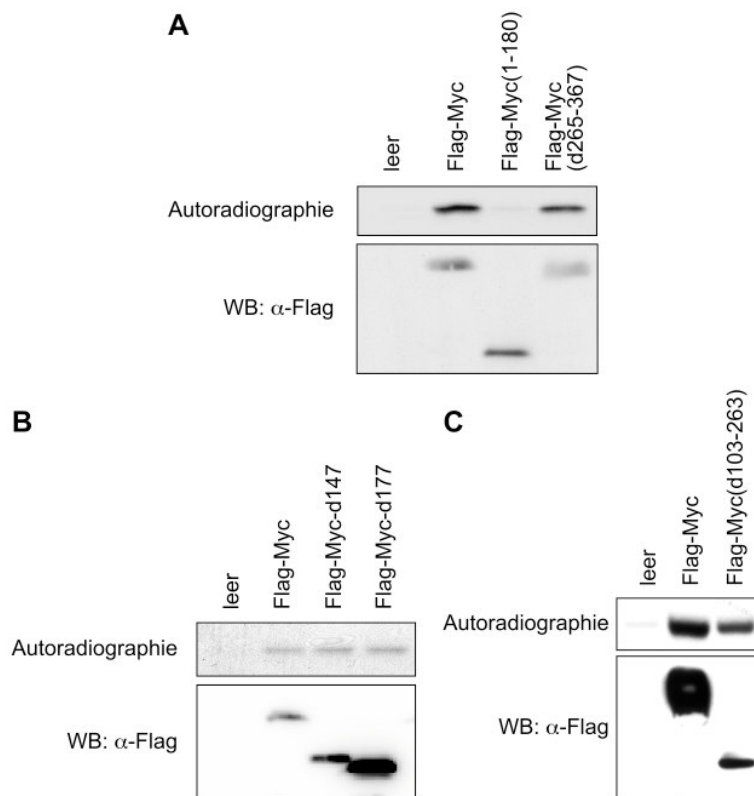


Abb. 3.9: Kartierung der HMT-bindenden Region in Myc. 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3Flag-Myc, pcDNA3Flag-Myc-N (1-180), pcDNA3Flag-Myc(d265-367), pcDNA3Flag-Myc-d147, pcDNA3Flag-Myc-d177, pcDNA3Flag-Myc-d6 (d103-263) transfiziert und im F-Puffer lysiert. Anschliessend wurden IPs mit Flag M2-Antikörpern durchgeführt. Nach HMT-Assays mit GST-H3-N-Termini wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und mithilfe einer Autoradiographie dargestellt. Die Ausgangsmenge an Flag-Myc wurde im Western-Blot mit Flag M2-Antikörpern detektiert.

Während die Aminosäuren 178 bis 439 (d177) und eine Deletion von 103 bis 263 (d103-263) und von 265 bis 367 (d265-367) mit der HMT assoziierten, banden 1 bis 180 (1-180) nicht (Abb. 3.9 und 3.10). Demzufolge sind die Aminosäuren 367 bis 439 in Myc für die Bindung sowohl an Ash2 als auch an die HMT wichtig. Folglich wäre denkbar, dass Myc über Ash2 mit der HMT interagiert.

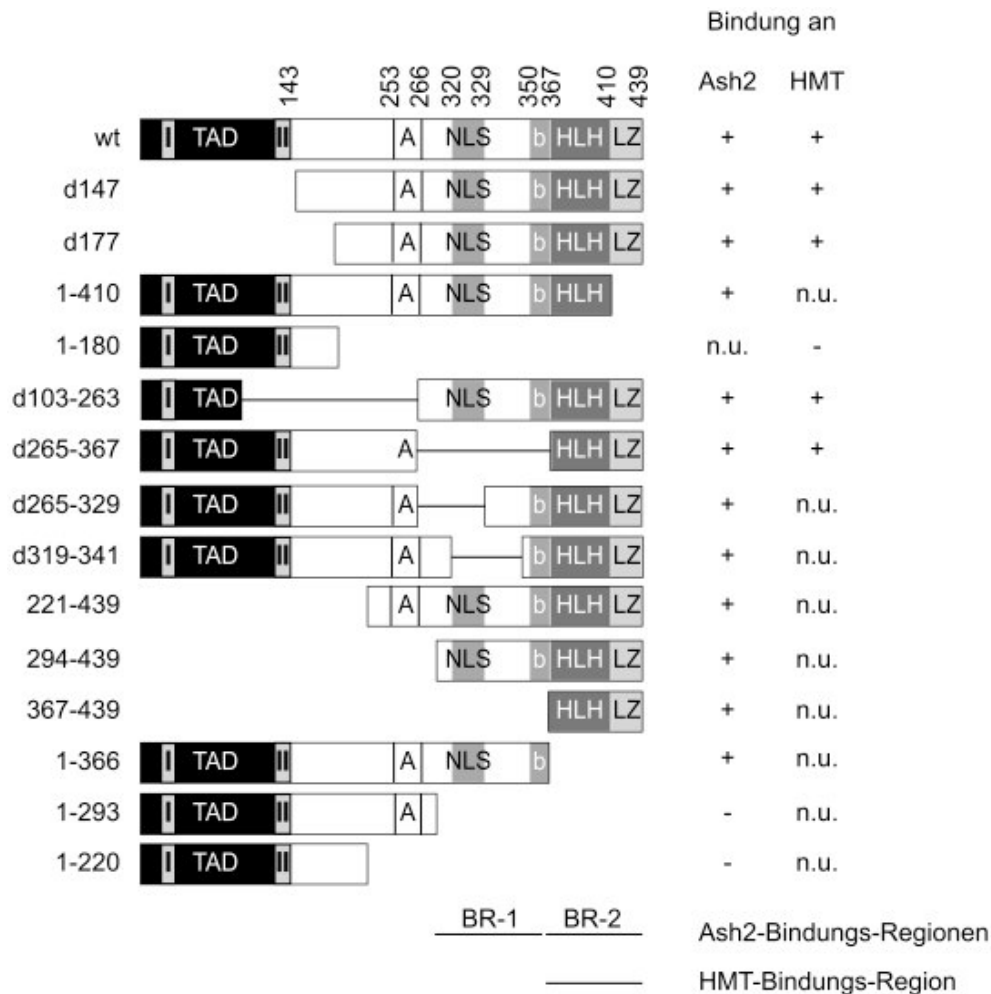


Abb. 3.10: Myc-Deletionsmutanten. Dargestellt sind Deletionsmutanten von Myc und die Bindung an Ash2 bzw. die HMT-Aktivität, die durch Ko-Immunpräzipitationen bzw. HMT-Assays ermittelt wurde. Ausserdem zeigen die schwarzen Striche die postulierten Ash2- bzw. HMT-Bindungs-Regionen. TAD: Transaktivierungs-Domäne; I: Myc-Box I; II: Myc-Box II; A: saure Region; NLS: nukleäres Lokalisierungs-Signal; b: basische Region; HLH: Helix-Loop-Helix-Region; LZ: Leucin-Zipper; n.u.: nicht untersucht; BR-1: Bindungs-Region-1; BR-2: Bindungs-Region-2.

Die Reduktion von Ash2 durch RNAi hat keinen Einfluss auf die Myc-assoziierte HMT

Ob die Myc-assoziierte HMT abhängig von Ash2 ist, sollte weiterhin überprüft werden, indem die Ash2-Proteinmenge durch RNAi reduziert wurde. Es wurden Plasmide konstruiert, die kurze Ash2-spezifische siRNA-Oligos exprimierten, und die transient in 293-Zellen transfiziert wurden. Diese siRNA-Oligos sollen den Abbau der endogenen Ash2-mRNA durch das Prinzip der sogenannten „RNA interference“ (RNAi) bewirken. RNAi ist Teil des zellulären Abwehrsystems gegen doppelsträngige (ds) RNA-Viren: Der Dicer-Komplex schneidet die dsRNA in siRNAs (*small interfering RNAs*), die dann im RISC (*RNA-induced silencing complex*)-Komplex mit homologen RNAs hybridisieren und zum Abbau aller komplementären RNAs führen. Ebenso können artifizielle, in Zellen eingebrachte siRNA-Oligos durch dieses System die mRNA- und somit Proteinmenge endogener Proteine

reduzieren. Dass siRNA-Oligos gegen Ash2 dessen Abbau bewirken, wurde mit überexprimiertem Ash2 bestätigt (Daten nicht gezeigt). Flag-Myc wurde ko-transfiziert, die Zelllysate wurden mit Flag-Antikörpern immunpräzipitiert und die assoziierte Ash2-Menge im Western-Blot detektiert.

Abb. 3.11.A zeigt, dass in Anwesenheit der siRNA-Ash2-Oligos die Menge an endogenem Ash2, die mit Myc ko-immunpräzipitierte, reduziert war.

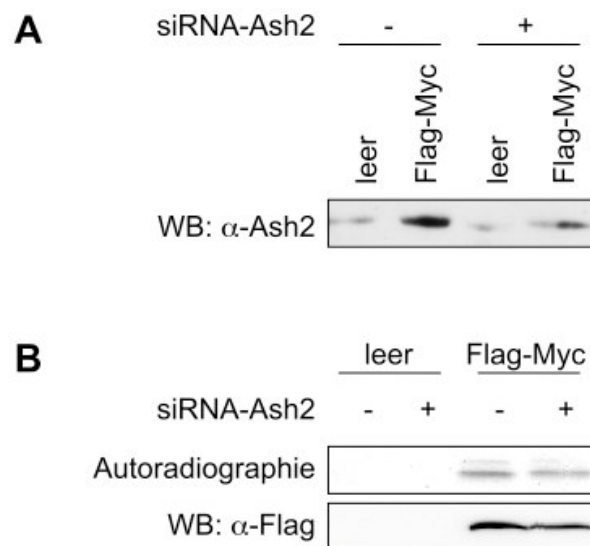


Abb. 3.11: Effekt von siRNA-Oligos gegen Ash2 auf die Myc-HMT-Assoziation. 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3Flag-Myc und pSuper-Ash2/370 transfiziert und im F-Puffer lysiert. Anschliessend wurden IPs mit Flag M2-Antikörpern durchgeführt. Die gefällten Proteine wurden entweder direkt (**A**) oder nach einem HMT-Assay mit GST-H3-N-Termini (**B**) in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie oder nach einem Western-Blot mit Ash2-Antikörpern 4C5 nachgewiesen. Die Ausgangsmenge an Flag-Myc wurde im Western-Blot mit Flag M2-Antikörpern detektiert.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob diese siRNA-abhängige reduzierte Bindung von Ash2 an Myc einen Einfluss auf die Myc-assozierte HMT hat. Dafür wurden Ash2-siRNA-Oligos zusammen mit Flag-Myc in 293-Zellen transient exprimiert und die Zelllysate nach einer Flag-IP in HMT-Assays eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass die Anwesenheit von siRNA-Oligos gegen Ash2 keinen Einfluss auf die Myc-assozierte HMT hatte (Abb. 3.11.B).

Die HMT-Bindung an Myc korreliert nicht mit der Ash2-Interaktion

Um weiterhin zu überprüfen, ob Myc über Ash2 an eine HMT bindet, sollen verschiedene Antikörper gegen Myc eingesetzt werden. Wenn diese Antikörper in gleicher Relation Ash2 und HMT-Aktivität ko-immunpräzipitieren, würde dies auf eine Ash2-Abhängigkeit der Myc-HMT-Assoziation hinweisen.

Bisher wurde nur die Myc-assozierte HMT-Aktivität untersucht, indem Myc von transient transfizierten Plasmiden überexprimiert wurde. Daher sollte weiterhin untersucht werden, ob eine HMT auch an Myc bindet, wenn dieses von einem stabil integrierten Gen exprimiert

wird. In diesem Fall ist die Expression von Myc weitaus niedriger als in der transienten Transfektion und entspricht eher einer physiologischen Situation. Dazu wurde die B-Zelllinie P-493-6 eingesetzt, in deren Genom stabil das *myc*-Gen integriert ist, das durch einen Tetrazyklin-regulierbaren Promotor kontrolliert wird (Schuhmacher *et al.*, 1999). Die Regulation erfolgt durch das sogenannte Tet-off-System, wobei die Wegnahme von Tetrazyklin das Gen anschaltet. Dementsprechend ist Myc in Abwesenheit von Tetrazyklin ständig in diesen Zellen exprimiert. Von diesen Myc-exprimierenden B-Zellen wurden Zelllysate hergestellt, die mit verschiedenen Myc-Antikörpern immunpräzipitiert und in HMT-Assays mit GST-H3-N-Termini als Substrate eingesetzt wurden.

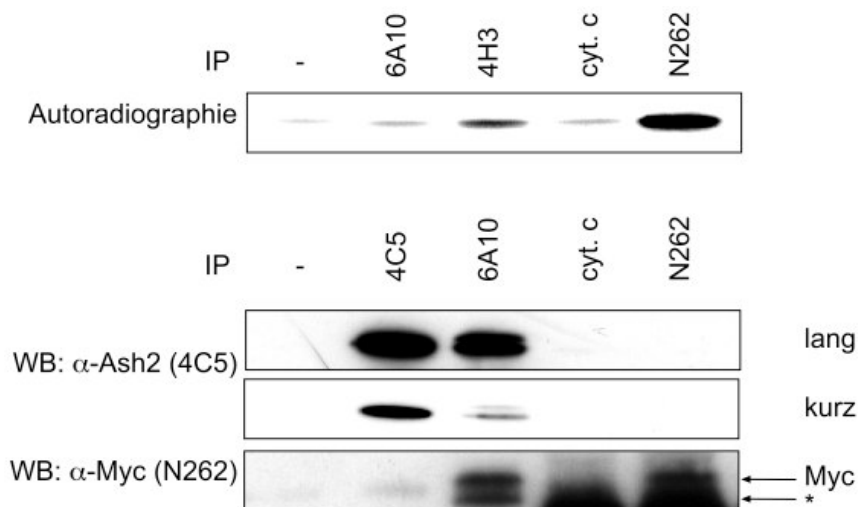


Abb. 3.12: Vergleich von Myc-Antikörpern, die eine HMT oder Ash2 ko-immunpräzipitieren. P493-6-Zellen wurden lysiert und in eine IP mit Antikörpern gegen Myc (6A10, 4H3, N262) oder Ash2 (4C5) oder Cytochrom c als Negativkontrolle eingesetzt. Die immunpräzipitierten Proteine wurden entweder direkt oder nach einem HMT-Assay mit GST-H3-N-Termini in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie oder nach einem Western-Blot mit Ash2-Antikörpern 4C5 nachgewiesen. Lang: längere Exponierung; kurz: kürzere Exponierung; *: schwere Ketten der Antikörper aus der IP.

Parallel dazu wurde untersucht, wieviel Ash2 mit diesen Myc-Antikörpern ko-immunpräzipitiert werden kann, indem nach den Myc-IPs ein Western-Blot mit Ash2-Antikörpern angeschlossen wurde. Während die Myc-Antikörper N262 und 4H3, aber nicht 6A10 eine HMT immunpräzipitierten, konnten N262 und 4H3 kein, aber 6A10 viel Ash2 ko-immunpräzipitieren (Abb. 3.12.A und 3.12.B und Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Myc über die Aminosäuren 367 bis 439 mit einer H3-K9-spezifischen HMT assoziiert ist. Die Myc-assoziierte HMT kann nicht durch siRNA-Oligos gegen Ash2 beeinflusst werden und verschiedene Myc-Antikörper ko-immunpräzipitieren nicht gleich viel HMT und Ash2.

3.3 Ash2 wird methyliert

Neben Histonen können auch andere Proteine methyliert werden, z. B. STAT1 (Mowen *et al.*, 2001; McBride *et al.*, 2001). Da Ash2 in mehreren HMT-Komplexen vorkommt, sollte überprüft werden, ob es selber methyliert werden kann. Im Vergleich dazu sollten noch andere Proteine auf Methylierung untersucht werden, insbesondere solche, die in Myc-Komplexen vorkommen.

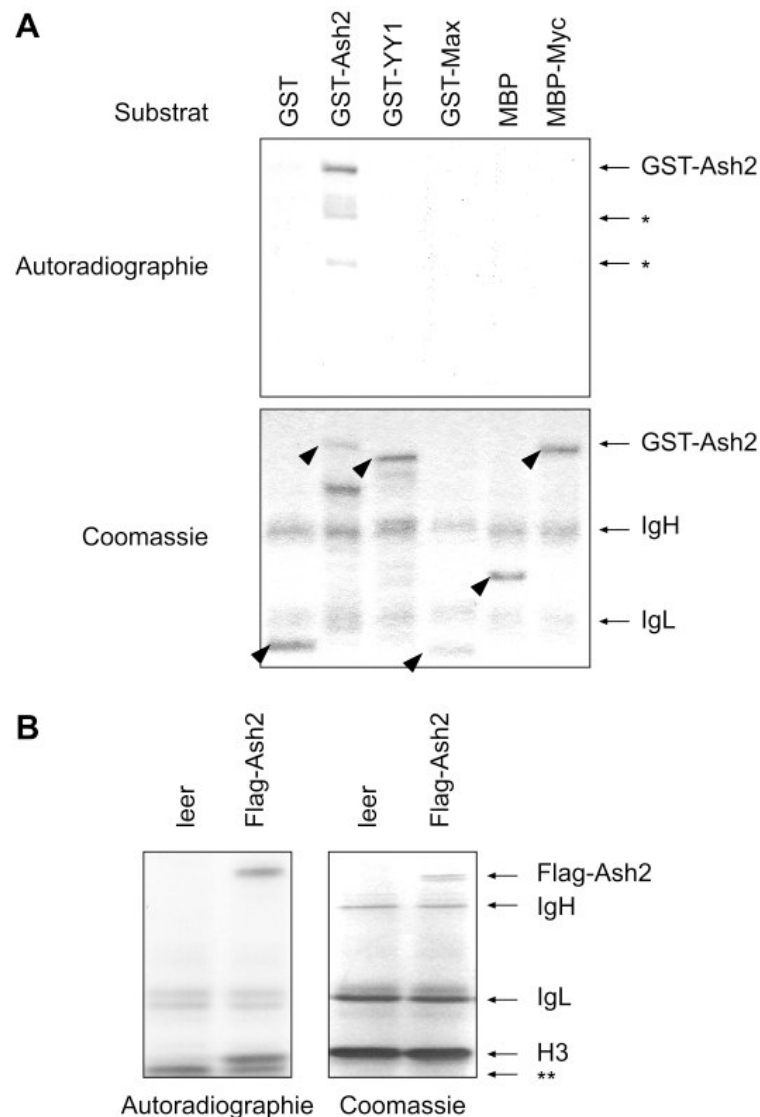


Abb. 3.13: Ash2 wird methyliert. (A) 3×10^7 Jurkat-Zellen wurden lysiert und mit den Ash2-Antikörpern 548-8 immunpräzipitiert. Dann wurden HMT-Assays mit in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten GST, GST-Ash2, GST-YY1, MBP und MBP-Myc durchgeführt. Die Proteine wurde nach einer SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung und Autoradiographie dargestellt. Die GST- bzw. MBP-Proteine sind durch Dreiecke markiert. (B) 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3Flag-Ash2 transfiziert und im F-Puffer lysiert. Nach IPs mit den Flag-Antikörpern M2 und HMT-Assays mit Histon H3 wurden die aufgetrennten Proteine durch Coomassie-Färbung und Autoradiographie nachgewiesen. IgH: schwere Ketten der Antikörper, IgL: leichte Ketten der Antikörper, *: GST-Ash2-Fragmente. **: unspezifische Banden; Schwarze Dreiecke: GST- bzw. MBP-Fusionsproteine.

Dazu wurde Ash2 aus Zelllysaten immunpräzipitiert und in HMT-Assays mit GST-Ash2, GST-YY1, GST-Max und MBP-Myc als Substrate eingesetzt. Während weder GST-YY1, noch

GST-Max, noch MBP-Myc und auch nicht GST oder MBP methyliert wurden, war eine methylierte Bande von GST-Ash2 zu erkennen, die mit dem Coomassie-gefärbten GST-Ash2 deckungsgleich war (Abb. 3.13.A).

Weiterhin sollte untersucht werden ob auch in Zellen exprimiertes und immunpräzipitiertes Flag-Ash2 methyliert werden kann. Dazu wurde Flag-Ash2 in 293-Zellen transient exprimiert, aus Zelllysaten mit Flag-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und in einen HMT-Assay mit Histon H3 als Substrat eingesetzt. Neben Histon H3 war auch Flag-Ash2 methyliert (Abb. 3.13.B).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl rekombinantes GST-Ash2 als auch in Zellen exprimiertes und immunpräzipitiertes Flag-Ash2 methyliert werden können.

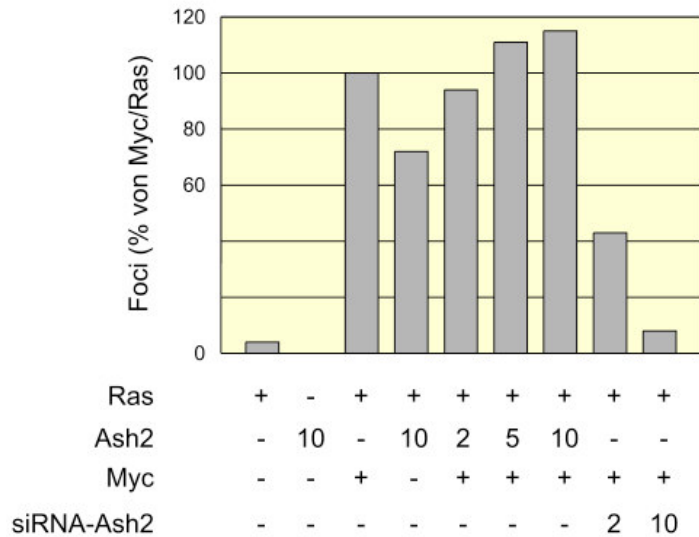
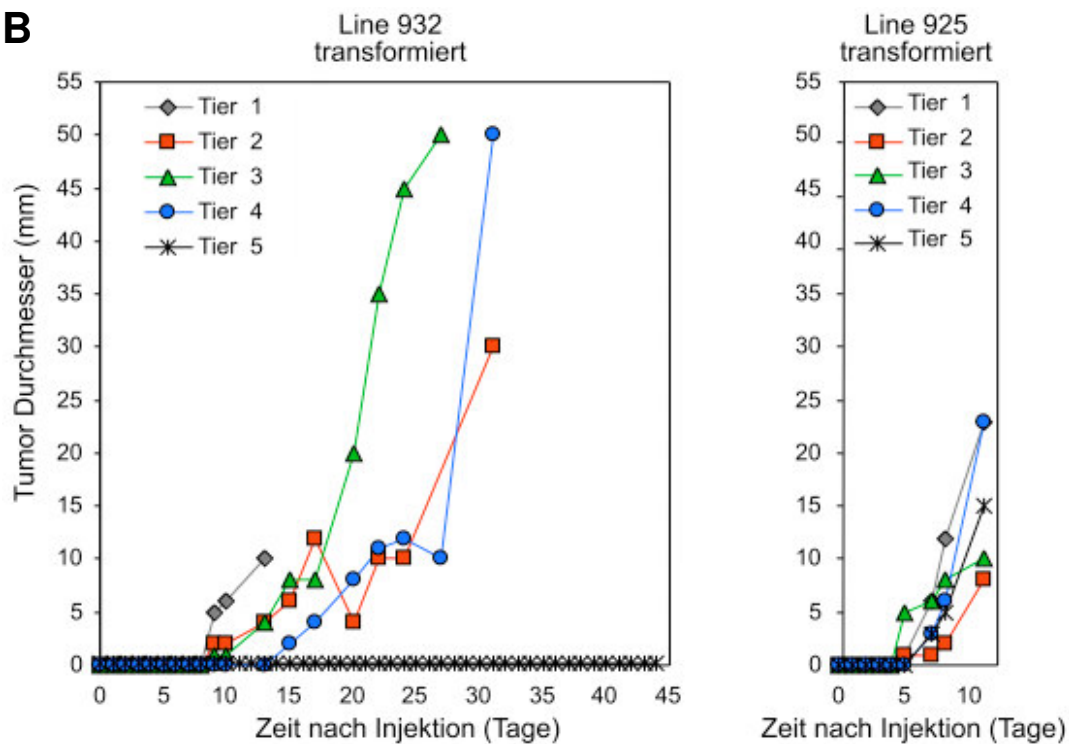
3.4 Transformation von Rattenembryo-Fibroblasten (REFs) durch Ras und Ash2

3.4.1 Ash2 und Ras transformieren REFs

Neben der biochemischen Charakterisierung von Ash2 sollte seine biologische Funktion untersucht werden. Da Myc zusammen mit Ras transformieren kann und Ash2 an Myc bindet, stellte sich die Frage, ob auch Ash2 mit Ras in der Transformation kooperiert. Die stabile Überexpression vieler Onkogene zusammen mit konstitutiv aktivem *Ha-ras* (Harvey-Ras) in Rattenembryo-Fibroblasten (REFs) führt zur Transformation dieser Zellen (siehe Einleitung). Dieses Ha-Ras ist konstitutiv aktiv durch eine Mutation der Aminosäure 12 von Glycin zu Valin, die bewirkt, dass Ha-Ras GTP nicht mehr hydrolysieren und somit nicht inaktiviert werden kann. Da in dieser Arbeit nur das konstitutiv aktive Ha-Ras (G12V) behandelt wird, wird dieses weiterhin Ras genannt.

Wenn Ash2 tatsächlich einen Einfluss auf die Transformation hätte, wäre interessant, ob Ash2 eine Rolle bei der Myc/Ras-induzierten Transformation spielt und umgekehrt. Einerseits kann untersucht werden, ob die Myc/Ras-Transformation von Ash2 abhängig ist, andererseits kann die Charakterisierung der Ash2/Ras- und Myc/Ras-Zellen auf ähnliche Transformations-Mechanismen hinweisen.

Ob Ash2 und Ras transformieren können, sollte mithilfe eines Focus-Bildungs-Assays überprüft werden: Primäre und immortalisierte Zellen wachsen in der Zellkulturschale in einer Schicht (Monolayer) und beenden ihre Proliferation, wenn sie aufeinandergetroffen und zusammengewachsen, d.h. konfluent, sind.

A**B****C****Zusammenfassung:**

Myc/Ras	transformiert	5/5 Tumore
Ash2/Ras-925	transformiert	5/5 Tumore
Ash2/Ras-932	transformiert	4/5 Tumore
Ash2/Ras-921	nicht transformiert	0/5 Tumore

Abb. 3.14: Ash2 und Ras transformieren REFs. (A) REFs wurden stabil mit Plasmiden transfiziert, die Ras, Myc, Ash2 oder siRNA-Oligos gegen Ash2 kodieren, und entstandene Foci wurden gefärbt und gezählt. (B) REFs wurden mit Plasmiden transfiziert, die Ash2, Ras und eine Resistenz gegen G418 (Neomycin) kodieren. Nach Selektion mit G418 wurden die stabilen Ash2/Ras-Zelllinien 925 und 932 kloniert und in Ratten injiziert. Die Größe der Tumore wurde nach bestimmten Zeitabschnitten gemessen. (C) Zusammenfassung der Anzahl der Tumore. (A und B) Die Experimente wurden von Dr. Cerni, Universität Wien, durchgeführt.

Transformierte Zellen dagegen lassen sich nicht durch Konfluenz im Zellzyklus arretieren; stattdessen wachsen sie über den Monolayer hinaus in mehreren Schichten und bilden in einer Population aus normalen Zellen Zellhäufchen: sogenannte Foci. Dazu wurden primäre REFs mit Ash2 und Ras stabil transfiziert, gefärbt, und entstandene Foci wurden gezählt. Dies wurde in Kooperation mit Dr. Cerni, Universität Wien, durchgeführt. Es zeigte sich, dass die stabile Überexpression von Ash2 und Ras (Ash2/Ras) zur Bildung von Foci führten und zwar im Vergleich zu Myc/Ras zu 72%, während die Überexpression von Ash2 alleine keine Foci hervorbrachte (Abb. 3.14.A). Die zusätzliche Überexpression von Ash2 hatte keinen Einfluss auf die Myc/Ras-abhängige Foci-Bildung, doch siRNA-Oligos gegen Ash2 konnten diese reduzieren. Dies war spezifisch für Myc/Ras, denn die Transformation durch dominant-negatives p53/Ras wurde durch die siRNA-Ash2-Oligos nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Ausserdem wurden REFs mit Ash2, Ras und einem Resistenzplasmid gegen das Antibiotikum G418 (Neomycin) transfiziert, mit G418 selektiert und stabil transfizierte, transformierte Zelllinien kloniert: Ash2/Ras-925 und Ash2/Ras-932. Da sich nach der Injektion von Myc/Ras-transformierten Zellen in syngene (mit identischem Genom ausgestattete) Ratten Tumore bilden, sollte untersucht werden, ob dies auch für Ash2/Ras-transformierte Zellen zutrifft (Yancopoulos *et al.*, 1985). Dazu wurden die Ash2/Ras-Zelllinien 925 und 932 in syngene Ratten injiziert, was ebenfalls in Kooperation mit Dr. Cerni, Universität Wien, durchgeführt wurde. Nach der Injektion der Ash2/Ras-925-Zellen bildeten sich nach fünf Tagen in allen fünf Tieren Tumore, durch die 932-Zellen entwickelten sich nach zehn Tagen in vier von fünf Tieren Tumore (Abb. 3.14.B). Folglich ist Ash2 ein Onkoprotein, das mit Ras REFs transformieren und Tumore in Ratten erzeugen kann. Ausserdem ist die Myc/Ras-induzierte Transformation abhängig von Ash2, denn sie ist durch siRNA-Ash2 reduzierbar, was darauf hinweist, dass Myc und Ash2 gemeinsam bei der Transformation wirken könnten.

3.4.2 Charakterisierung der Ash2/Ras-transformierten Zellen

Da die Transformation im Allg. Auswirkungen auf die Morphologie der Zelle hat (Yancopoulos *et al.*, 1985), sollte mikroskopisch untersucht werden, ob sich auch die Morphologie der REFs durch die Ash2/Ras-abhängige Transformation verändert. Wie erwartet zeigten die Ash2/Ras-Zellen eine andere Morphologie als die nichttransformierten REFs: Sie waren abgerundeter und hafteten nicht mehr so stark am Untergrund, sondern waren nur noch mit langen, dünnen Zell-Ausläufern mit der Kulturschalen-Oberfläche verbunden (Abb. 3.15).

Da Ash2 als nukleäres Protein charakterisiert wurde (Dissertation von Dr. Vervoorts), sollte mit der Immunfluoreszenz überprüft werden, ob Ash2 auch in den transformierten Zellen im

Nukleus lokalisiert ist. Dafür wurden Zellen auf Deckgläser ausgesät und mit Paraformaldehyd fixiert.

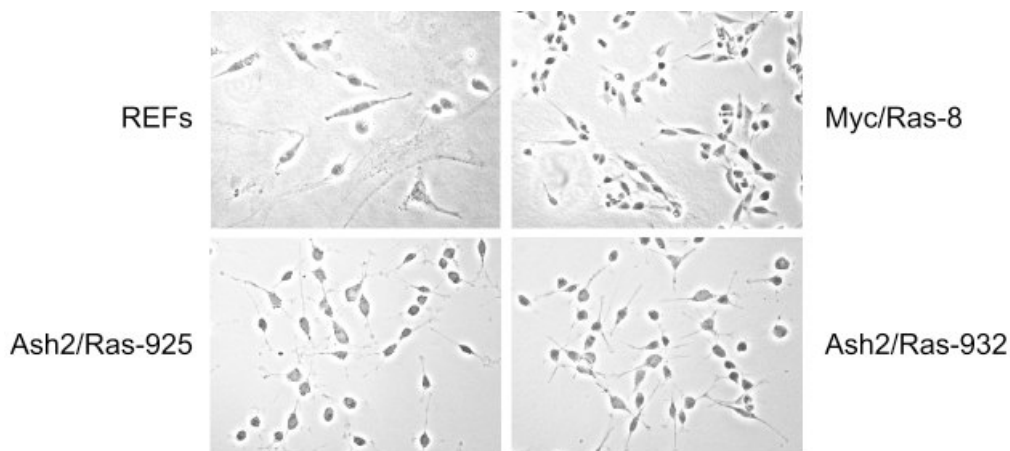


Abb. 3.15: Morphologischer Vergleich der REFs, Myc/Ras- und Ash2/Ras-transformierten Zellen. Mikroskopische Aufnahmen der REFs und den transformierten Linien: Myc/Ras-8, Ash2/Ras-925 und Ash2/Ras-932.

Dann wurden sie erst mit Ash2-spezifischen Antikörpern inkubiert, anschliessend mit Antikörpern, die die Ash2-Antikörper artspezifisch binden und mit einem fluoreszierenden Farbstoff (hier Cy3) gekoppelt sind. Um die Zellkerne anzufärben, wurden die Zellen mit einem fluoreszierenden, DNA-interkalierenden Farbstoff (Hoechst) behandelt. Die Färbung wurde im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Wie erwartet befand sich Ash2 in den transformierten Zellen im Nukleus (Abb. 3.16).

Folglich zeigen die Ash2/Ras-Zellen eine veränderte Morphologie, und Ash2 ist immer noch im Nukleus lokalisiert.

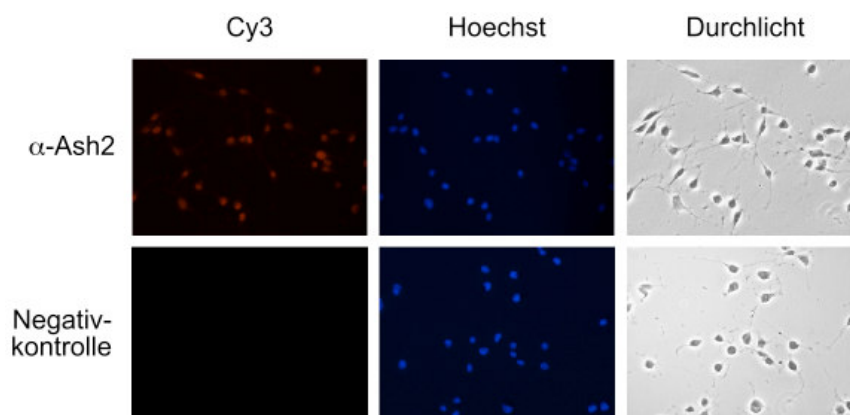


Abb. 3.16: Ash2 ist in den Ash2/Ras-925-Zellen im Nukleus lokalisiert. Die Ash2/Ras-925-Zellen wurden fixiert und bei einer indirekten Immunfluoreszenz mit Ash2-spezifischen Antikörpern 4C5 und sekundären Cy3-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Bei der Negativkontrolle wurde die Prozedur ohne Ash2-Antikörper durchgeführt.

3.4.3 Ash2/Ras-Zellen entwickeln einen tetraploiden Karyotyp

Interessanterweise waren die Ash2/Ras-Zellen innerhalb einer Population unterschiedlich gross, was möglicherweise auf eine abweichende Anzahl an Chromosomen bzw. Chromosomensätze hinweisen könnte.

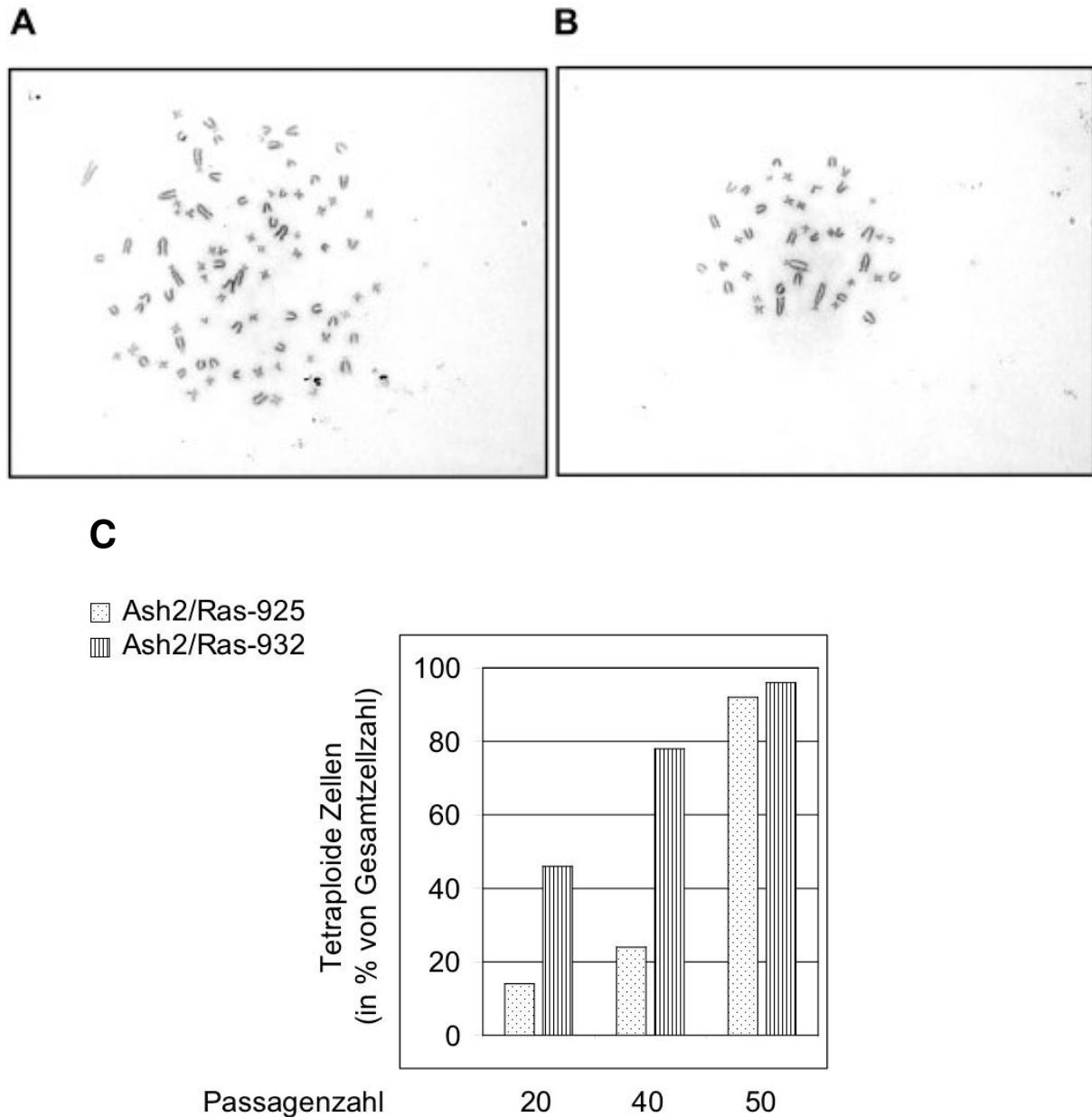


Abb. 3.17: Tetraploidie der Ash2/Ras-transformierten Zellen. Die Ash2/Ras-925- und -932-Linien wurden in Karyotyp-Analysen eingesetzt. **(A)** und **(B)** Mikroskopische Aufnahmen von Ash2/Ras-932-Zellen nach 20 Passagen mit 84 (A) bzw. 42 (B) Chromosomen. **(C)** Der Karyotyp der Ash2/Ras-925- und -932-Zellen wurde nach unterschiedlichen Passagenzahlen (20, 40, 50) analysiert. Der prozentuale Anteil der tetraploiden Zellen an der Gesamtzellzahl wurde im Säulendiagramm dargestellt. (In Kooperation mit Fr. Kalka, Humangenetik, Uniklinikum Aachen.)

Dies sollte mithilfe einer Karyotyp-Analyse ermittelt werden, die an mitotischen Metaphase-Chromosomen durchgeführt wird, da diese kondensiert und daher leicht identifizierbar sind.

Die Zellen der Ash2/Ras-Linien 925 und 932 sowie einer Myc/Ras-Linie 8 wurden mit Colcemid in der mitotischen Metaphase des Zellzyklus' arretiert, fixiert, gefärbt, auf Objektträger gebracht und die Chromosomen unter dem Mikroskop betrachtet. Da eine diploide Rattenzelle 21 Chromosomen besitzt, würde eine Zelle in der Metaphase 42 Chromosomen enthalten.

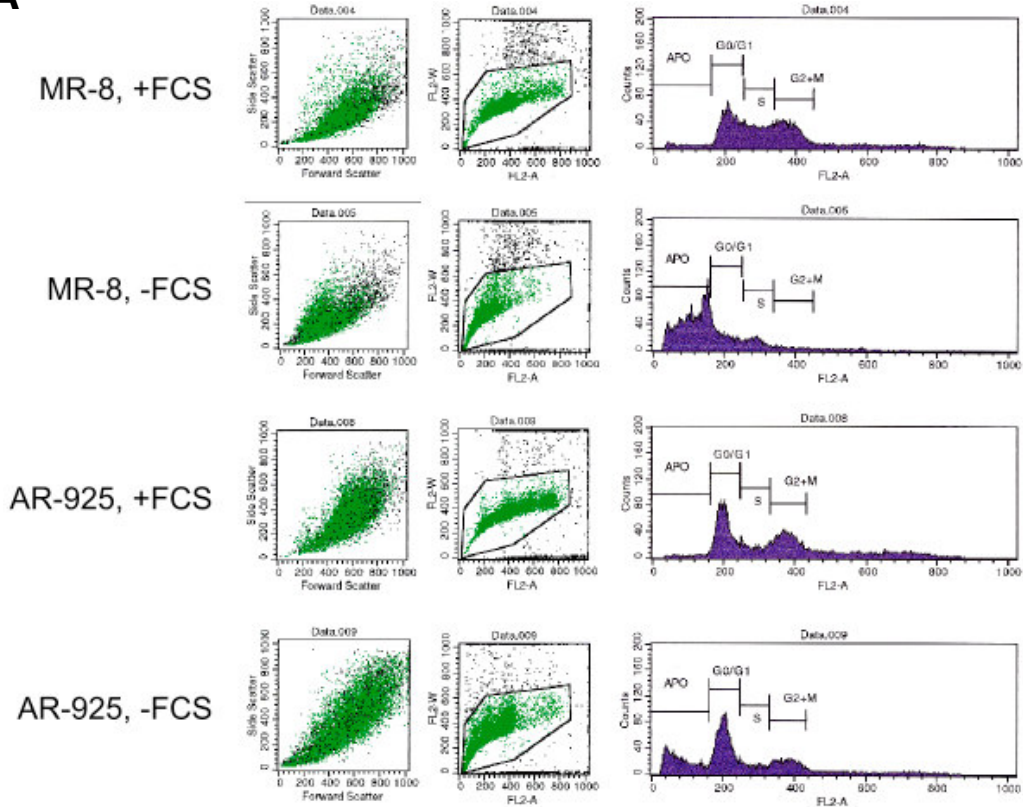
Tatsächlich traten bei beiden Ash2/Ras-Linien nicht nur Zellen mit 42 Chromosomen, sondern auch mit 84 Chromosomen auf, aber es wurde keine Zelle entdeckt, die mehr als 84 Chromosomen enthielt (Abb. 3.17.A). Im Gegensatz dazu gab es in den Myc/Ras-8-Zellen nur 42 Chromosomen. Dabei entsprechen 42 Chromosomen einem diploiden, 84 einem tetraploiden Chromosomensatz. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Transformation durch Ash2 und Ras zur Entstehung von Tetraploidie führt, die Ash2-spezifisch ist, denn Myc/Ras-Zellen sind nicht tetraploid.

Da die Ash2/Ras-transformierten Zellen eine Mischpopulation aus tetraploiden und diploiden Zellen waren, wäre interessant, ob das Verhältnis dieser beiden Zell-Arten sich im Zeitverlauf ändert. Daher wurden die Karyotypen der Zellen beider Ash2/Ras-Linien nach unterschiedlichen Passagenzahlen analysiert, und der prozentuale Anteil der tetraploiden Zellen errechnet. Auffällig war, dass bei gleicher Passagenzahl mehr Zellen der Ash2/Ras-932-Linie tetraploid waren als die der Ash2/Ras-925-Linie: Bereits nach 20 Passagen waren die Ash2/Ras-932-Zellen zu 46 % tetraploid, die Linie 925 erst zu 14 % (Abb. 3.17.B). Weiterhin nahm bei beiden Ash2/Ras-Linien die Anzahl der polyploiden Zellen mit der Passagenzahl zu: Nach etwa 50 Passagen bestanden beide Linien aus etwa 92 bzw. 96 % tetraploiden Zellen. Folglich fördert die Überexpression von Ash2 zusammen mit Ras die Bildung von Tetraploidie, die mit dem Alter der Zellen zunimmt. Unter diesem Aspekt unterscheiden sich die Ash2/Ras- von den Myc/Ras-Zellen.

3.4.4 Ash2/Ras-Zellen gehen unter Serummangel in die Apoptose

Ein weiteres Kriterium, um Ash2/Ras- und Myc/Ras-Zellen auf Ähnlichkeiten zu untersuchen, ist die Induktion von Apoptose unter Serummangel. Für Myc/Ras-Zellen wurde bereits beschrieben, dass sie unter Entzug von Serum in die Apoptose gehen, wohingegen das für andere Onkoproteine, z.B. Zyklin E, nicht zutrifft (Haas *et al.*, 1997). Dazu wurden die Ash2/Ras-925- und die Myc/Ras-8- und -15-Linien zwei Tage mit 0,5 % statt 10 % fötalem Kälber-Serum (FCS) im Kulturmedium kultiviert. Dann wurden sie mit Ethanol fixiert und mit Propidium-Jodid gefärbt. Mithilfe einer FACS-Messung wurde die Anzahl der Zellen in der SubG1-Population gezählt. Propidium-Jodid ist ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert und direkt in Relation zur DNA-Menge gesetzt werden kann.

A



B

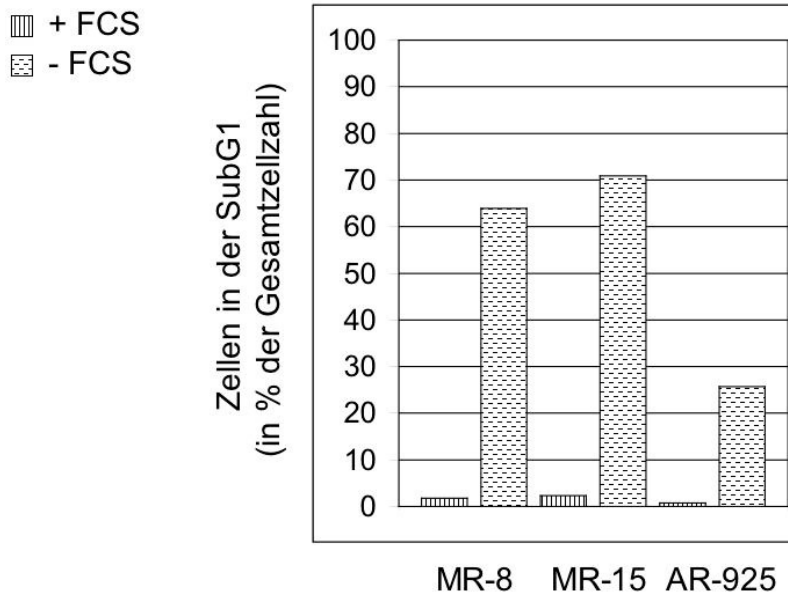


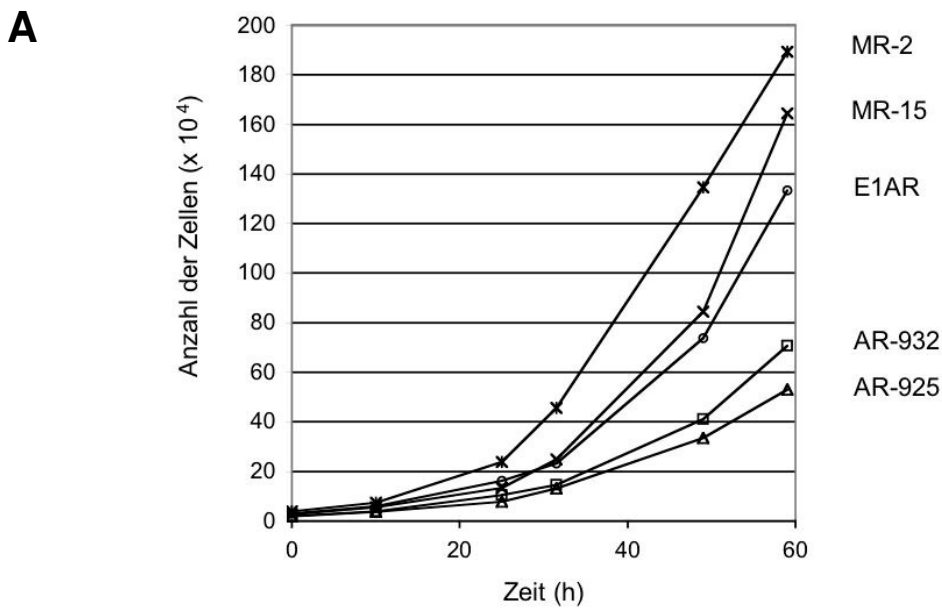
Abb. 3.18: Ash2/Ras-Zellen gehen unter Serumangel in die Apoptose. Myc/Ras- und Ash2/Ras-transformierte Zellen wurden zwei Tage in 0,5% statt 10% FCS kultiviert. Danach wurden sie fixiert, mit Propidium-Jodid gefärbt und mit der FACS-Methode analysiert. **(A)** FACS-Diagramme. **(B)** Der prozentuale Anteil der Zellen in der SubG1-Phase wurde im Säulendiagramm dargestellt. MR: Myc/Ras; AR: Ash2/Ras; FCS: fötales Kälberserum. (In Kooperation mit Dr. Galm, Onkologie und Hämatologie, Uniklinikum Aachen.)

Da in der Apoptose die nukleäre DNA fragmentiert und dementsprechend weniger Propidium-Jodid eingebaut wird, ist die SubG1-Population ein ungefähres Mass für apoptotische Zellen (Haas *et al.*, 1997). Mit der FACS (*fluorescent activated cell sorting*)-Analyse wird die Fluoreszenz einer Zelle gemessen, aber auch ihre Grösse und Granularität. Abb. 3.18.A zeigt als Beispiel die FACS-Diagramme der Myc/Ras-8- und Ash2/Ras-925-Zellen. Jeder Punkt der beiden linken *dot plots* entspricht einem gezählten Ereignis, was normalerweise eine Zelle ist. Das linke FACS-Diagramm zeigt auf der X-Achse den *forward scatter*, der mit der Grösse der Zellen zunimmt, während der *side scatter* auf der Y-Achse die Granularität der Zellen widerspiegelt. Im mittleren Diagramm ist die Fläche unter der Fluoreszenzkurve (*area*, FL2-A) gegen ihre Breite (*width*, FL2-B) aufgetragen, wodurch analysierbare Einzelzellen von nicht-auswertbaren Zellen, die aneinander heften, getrennt werden können. Dies erfolgt durch das sogenannte „gating“, dem Ausgrenzen von ungewollten Signalen, die somit bei der weiteren Auswertung nicht mehr einbezogen werden. Das rechte Diagramm reflektiert die Zellzahl auf der Y-Achse pro Fluoreszenz-Signal auf der X-Achse. Die meisten Zellen befinden sich in der G0/G1- und in der G2/M-Phase des Zellzyklus und ergeben im Diagramm zwei Spitzen. In der G2/M-Phase enthalten die Zellen doppelt so viele Chromosomen, interkalieren also dementsprechend mehr Propidium-Jodid und fluoreszieren dadurch zweimal stärker. Wie erwartet zeigten in Anwesenheit von FCS sowohl die Myc/Ras-8- als auch die Ash2/Ras-925-Zellen eine G1/G0- und G2/M-Spitze. Nachdem allerdings die Zellen unter niedriger FCS-Konzentration gehalten wurden, befanden sich viele Zellen in der SubG1-Population mit einer niedrigen Fluoreszenz („APO“ in Abb. 3.18.A). Dieses war sowohl für die beiden Myc/Ras-Linien als auch für die Ash2/Ras-Zellen der Fall. (Die andere Ash2/Ras-Linie 932 konnte nicht eingesetzt werden, da sie bereits sehr früh Tetraploidie entwickelte. Dadurch verschiebt sich bei einigen Zellen die Färbung auf das doppelte und eine klare SubG1-Population ist nicht analysierbar.) Der prozentuale Anteil der Zellen in der SubG1-Population war bei den Zellen ohne FCS höher als mit FCS (Abb. 3.18.B). Da der SubG1-Wert mit dem Anteil apoptotischer Zellen korreliert, kann geschlossen werden, dass ebenso wie die Myc/Ras- auch die Ash2/Ras-Zellen unter Serumangel in die Apoptose gehen, allerdings schwächer. Folglich gleichen sich die Ash2/Ras- und Myc/Ras-Zellen unter dem Aspekt der Serumangel-induzierten Apoptose.

3.4.5 Ash2/Ras-Zellen wachsen langsamer als Myc/Ras-Zellen

Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich die Ash2/Ras- und die Myc/Ras-Zellen in Bezug auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit gleichen. Dazu wurden gleich viele Zellen von verschiedenen Myc/Ras- und Ash2/Ras-Zelllinien und einer E1A/Ras-Linie ausgesät und nach gleichen Zeitabschnitten gezählt. Nach 80 Stunden wurden mehr Myc/Ras-Zellen

gezählt als E1A/Ras-Zellen und Ash2/Ras-Zellen (Abb. 3.19). Die Verdopplungszeit, d. h. die Zeit, in der sich eine Population verdoppelt, wurde am Diagramm abgelesen und ist in Abb. 3.19.B dargestellt. Folglich wachsen die Ash2/Ras- bedeutend langsamer als die Myc/Ras-Linien. In dem Punkt der Wachstumsgeschwindigkeit unterscheiden sich also die Myc/Ras- von den Ash2/Ras-Zellen.



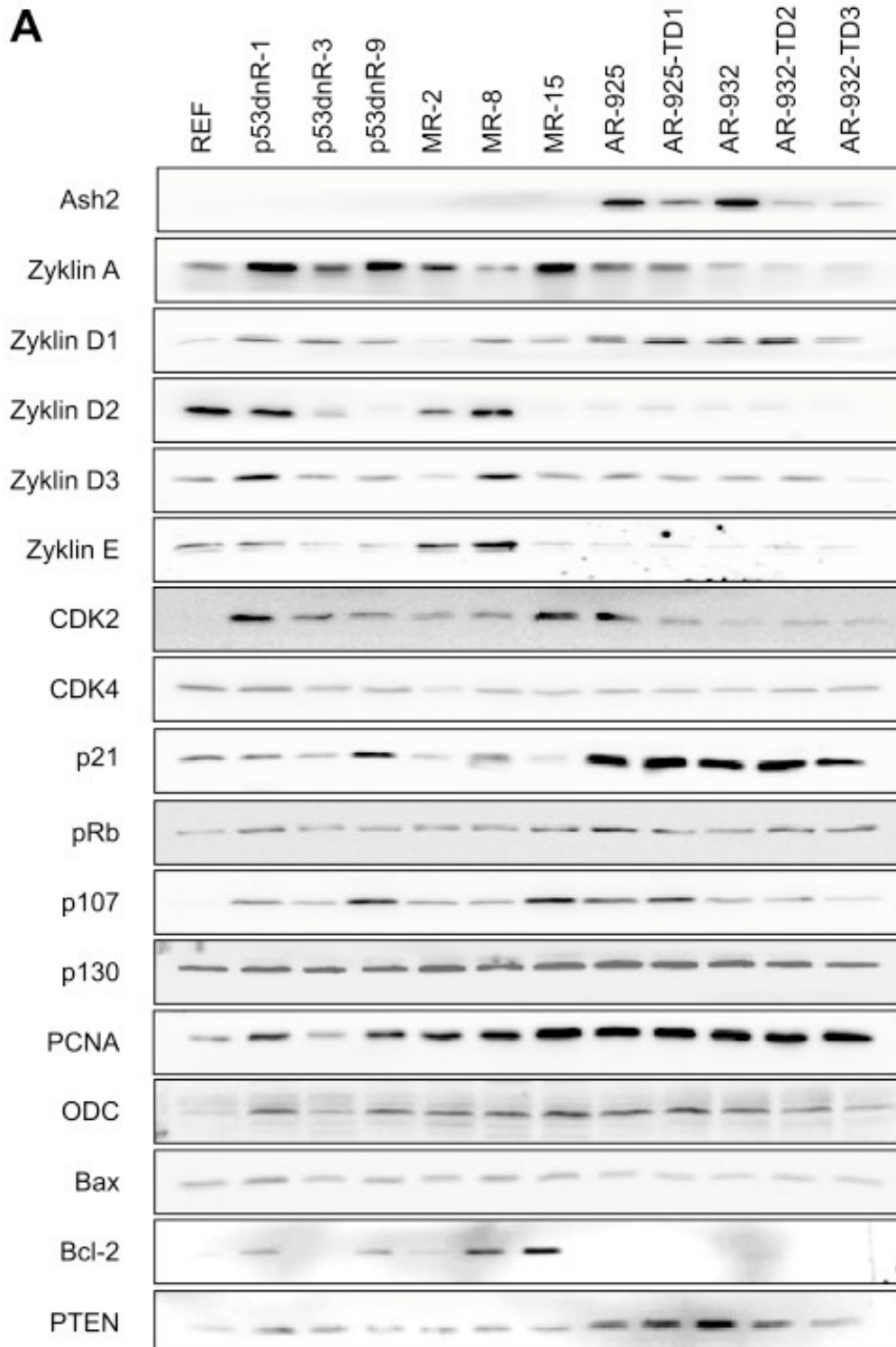
B

	Verdopplungszeit (in Stunden)
Myc/Ras-2	8
Myc/Ras-15	9
E1A/Ras	12
Ash2/Ras-925	14
Ash2/Ras-932	16

Abb. 3.19: Wachstum der Ash2/Ras-transformierten Zellen. (A) 2×10^4 Zellen der transformierten Linien Myc/Ras-2 (MR-2), Myc/Ras-15 (MR-15), E1A/Ras (E1AR), Ash2/Ras-925 (AR-925) und Ash2/Ras-932 (AR-932) wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät, nach 10; 25; 31,5; 49 und 59 Stunden trypsinisiert und gezählt. (B) Vergleich der Populations-Verdopplungszeiten der unterschiedlichen transformierten Zelllinien. Die Verdopplungszeit wurde vom Diagramm in Abb 3.19.A abgelesen und ist in Stunden angegeben.

3.4.6 Expression verschiedener Zellzyklus-relevanter und anderer Proteine in Ash2/Ras-Zellen

Interessant wäre, wie die Überexpression von Ash2 und Ras die Expression von bestimmten Zellzyklus- und Transformations-relevanten Proteinen beeinflusst und inwieweit sich das von Myc/Ras unterscheidet, denn oft geschieht die Transformation durch Deregulation des Zellzyklus' (siehe Einleitung).



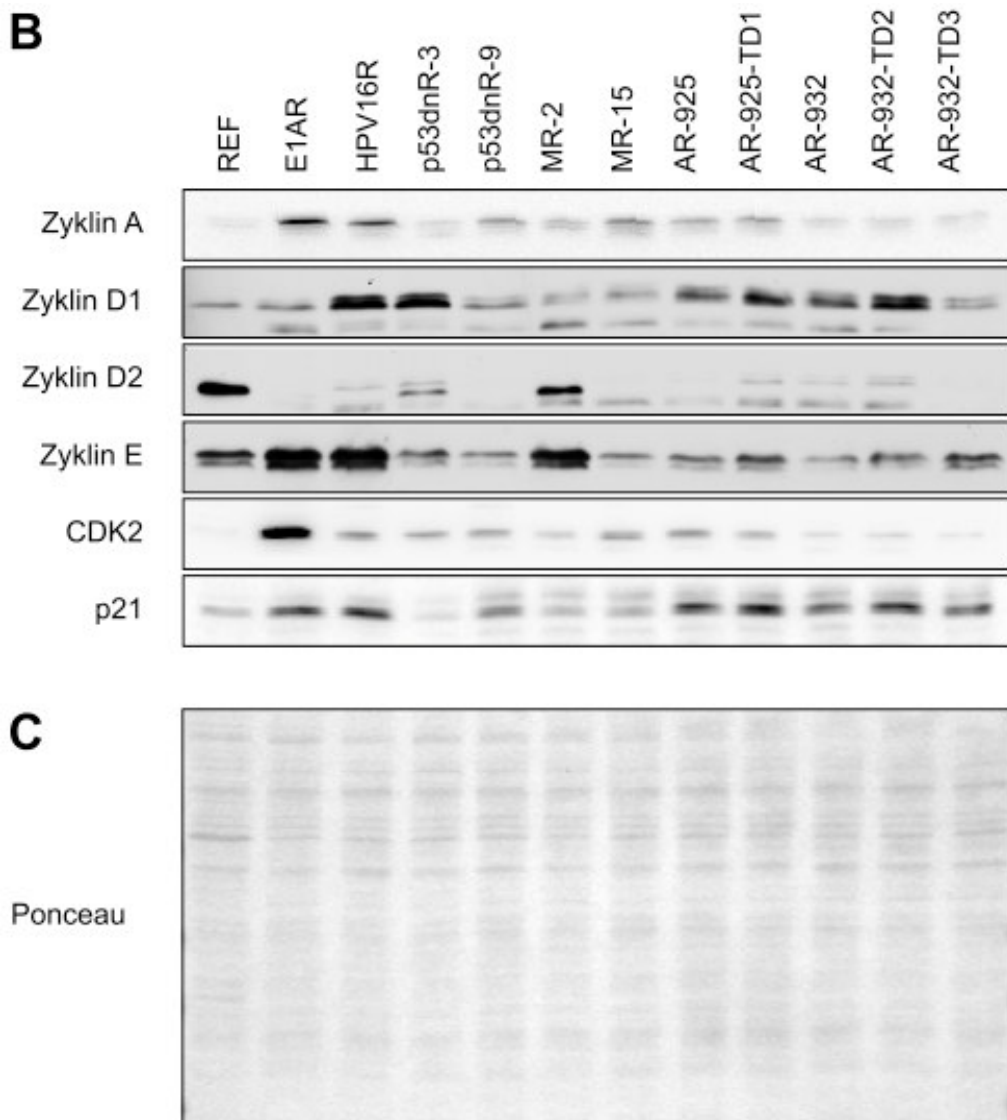


Abb. 3.20: Expressionsmuster verschiedener Proteine in den transformierten Zelllinien. REFs und die transformierten Zelllinien wurden im F-Puffer lysiert und nach einer SDS-PAGE im Western-Blot analysiert (**A**) und (**B**) Immunodetektion mit verschiedenen Antikörpern: Ash2 wurde mit den Antikörpern 4C5 detektiert. Die anderen Antikörper sind unter Material und Methoden beschrieben. (**C**) Ponceau S-Färbung der Western-Blot-Membran.

Daher sollte untersucht werden, welche Proteine in den Ash2/Ras-Linien, sowohl in den primären transformierten als auch in den Tumor-abstammenden, im Vergleich zu den REFs und den Myc/Ras- und einigen anderen transformierten Zelllinien dereguliert sind. Von den Zelllinien wurden Extrakte hergestellt und mithilfe des Bradford-Assays wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden auf eine SDS-PAGE geladen, und die Expression verschiedener Proteine wurde durch einen Western-Blot ermittelt. Um zu bestätigen, dass jede Spur auf dem Western-Blot tatsächlich die gleiche Menge an Gesamtprotein enthält, wurde die Proteinmenge auf der Membran mit Ponceau S gefärbt (Abb 3.20.C). Zunächst wurde die Expression von Ash2 untersucht: Ash2 konnte in den Ash2/Ras-transformierten, jedoch nicht in den anderen transformierten Linien detektiert

werden (Abb. 3.20.A). Dass Ash2 in den anderen Linien nicht detektierbar war, lässt sich dadurch erklären, dass entweder sehr wenig Ash2 in den REFs exprimiert war oder aber dass die Ash2-Antikörper nur humanes Ash2 erkannten, nicht aber Ratten-Ash2. Weiterhin war Ash2 in den Tumor-abstammenden Linien weniger exprimiert als in den primären transformierten.

Im Bezug auf die Expression anderer Proteine ist im Allgemeinen bemerkenswert, dass sich die Myc/Ras-Linien stark voneinander unterschieden; innerhalb der Ash2/Ras-Linien traten nicht so starke Differenzen auf (Abb. 3.20.A und 3.20.B). Die Unterschiede bei den Myc/Ras-Linien erschwerten den Vergleich mit den Ash2/Ras-Linien. In den Ash2/Ras-Linien war Zyklin D1 höher exprimiert als in den REFs und auch durchschnittlich höher als in den Myc/Ras-Linien. Dafür war Zyklin D2 sehr schwach exprimiert, welches sowohl in den REFs als auch in den Myc/Ras-Linien weitaus stärker vorhanden war. Auch die Zyklin E-Proteinmenge war geringer als in den REFs und in zwei der drei Myc/Ras-Linien. Unerwarteterweise war der CDK-Inhibitor p21 in den Ash2/Ras-Zellen im Vergleich zu den REFs und den Myc/Ras-Zellen hoch exprimiert. Dieses war auch der Fall bei den E1A/Ras- und HPV16/Ras-Linien (Abb. 3.20.B und 3.20.C).

Zusammenfassend ist offensichtlich, dass sich die Ash2/Ras- und Myc/Ras-transformierten Zellen in Bezug auf die untersuchten Zellzyklus-Proteine deutlich voneinander unterscheiden.

3.4.7 Der Zellzyklus-Inhibitor p21 ist in den Ash2/Ras-Zellen überexprimiert

p21, ein CDK-Inhibitor, ist hoch in den Ash2/Ras-transformierten Zellen exprimiert (Abb. 3.20.A und 3.20.B). Da bekannt ist, dass Ras p21 hochreguliert und dadurch Seneszenz (Altern) bewirkt, muss p21 zur Transformation inaktiviert werden, was auf verschiedene Wege geschehen kann. Eine Möglichkeit wäre, dass p21 aus dem Zellkern transportiert wird und somit nicht mehr den Zellzyklus inhibieren könnte, z. B. durch das HPV (Humanes Papilloma-Virus)-Onkogen E7 (Westbrook *et al.*, 2002). Daher sollte mithilfe der Immunfluoreszenz untersucht werden, in welchem Zell-Kompartiment p21 in den Ash2/Ras-Zellen lokalisiert ist, ob also p21 noch aktiv Zyklin/CDK-Komplexe und dadurch den Zellzyklus im Zellkern inhibieren könnte. Zunächst wurden einige p21-Antikörper auf ihre Tauglichkeit in der Immunfluoreszenz überprüft, indem Flag-getaggetes p21 in Hela-Zellen überexprimiert und p21 mit unterschiedlichen Antikörpern angefärbt wurde. Nur einige Zellen zeigten eine nukleäre Färbung mit den p21-Antikörpern, was darauf hinwies, dass diese transfiziert waren und dass die Antikörper p21 spezifisch anfärbten (Daten nicht gezeigt). Dann wurden die p21-Antikörper in ein Immunfluoreszenz-Experiment mit den Ash2/Ras-transformierten Zellen eingesetzt. In allen betrachteten Zellen war der Zellkern gefärbt, und es wurde nicht beobachtet, dass der Zellkern ungefärbt blieb (Abb. 3.21). Daraus ist

abzuleiten, dass p21 in den Ash2/Ras-transformierten Zellen zwar hoch exprimiert, aber nicht aus dem Zellkern ausgeschlossen ist; eine mögliche Inaktivierung von p21 kann also nicht durch seinen Export erklärt werden.

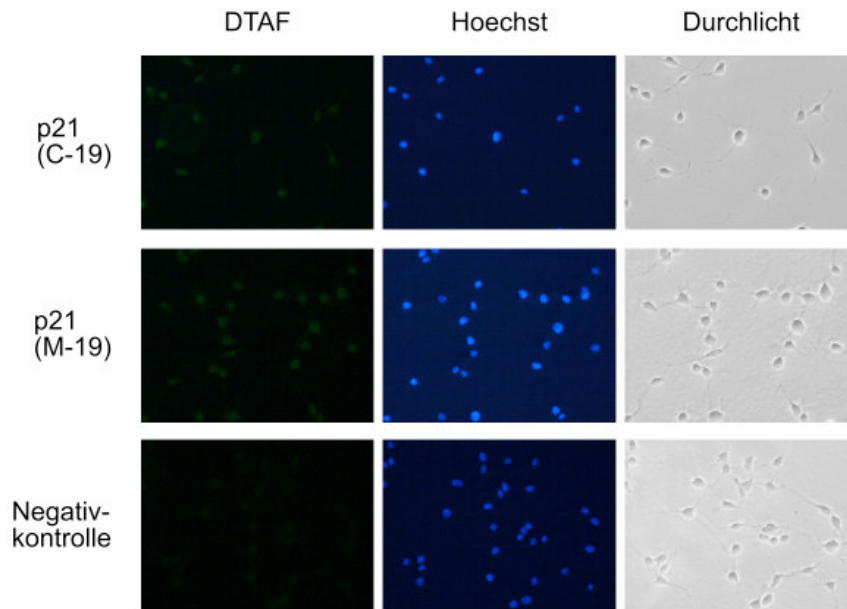


Abb. 3.21: p21 ist in den Ash2/Ras-Zellen nicht aus dem Nukleus ausgeschlossen. Die Ash2/Ras-925-Zellen wurden fixiert und bei einer indirekten Immunfluoreszenz mit den p21-spezifischen Antikörpern C-19 und M-19 und sekundären DTAF-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Die DNA wurde mit Hoechst 33258 gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Bei der Negativkontrolle wurde die Prozedur ohne p21-Antikörper durchgeführt.

Es stellt sich also weiterhin die Frage, ob das nukleäre p21 noch seine Funktionen ausüben kann oder ob es durch einen anderen Mechanismus inaktiviert wird. Da eine Funktion von p21 die Inhibierung von Zyklin E-assoziierten und CDK2-Kinase-Aktivitäten ist, sollten diese in den Ash2/Ras-transformierten Zellen untersucht werden. Dafür wurden Zell-Extrakte von REFs, Myc/Ras- oder Ash2/Ras-Zellen einer IP mit Zyklin E- bzw. CDK2-spezifischen Antikörpern unterzogen, anschliessend folgten Kinase-Assays mit Histon H1 als Substrat. Ausserdem wurden die Zyklin E- und CDK2-Proteinmengen im Western-Blot überprüft. Es wurde beobachtet, dass die CDK2-Kinase-Aktivität in den Myc/Ras- und den Ash2/Ras-Zellen ähnlich war und weitaus höher als in den REFs, aber auch die CDK2-Proteinmenge war in den REFs niedriger (Abb. 3.22). Die Zyklin E-assoziierte Kinase-Aktivität war in den Ash2/Ras-Zellen niedriger als in den Myc/Ras-Linien-2 und -8, was in etwa mit der Proteinmenge korrelierte, so dass die relative Zyklin E-assoziierte Kinase-Aktivität in den Ash2/Ras- und den Myc/Ras-Zellen in etwa gleich war. Folglich sind die relativen Kinase-Aktivitäten in den Ash2/Ras- im Vergleich zu den Myc/Ras-Zellen nicht reduziert, obwohl in jenen mehr p21 exprimiert wird. Es könnte also postuliert werden, dass dieses p21 inaktiviert worden ist, weil es nicht Zyklin E und CDK2 inhibieren kann.

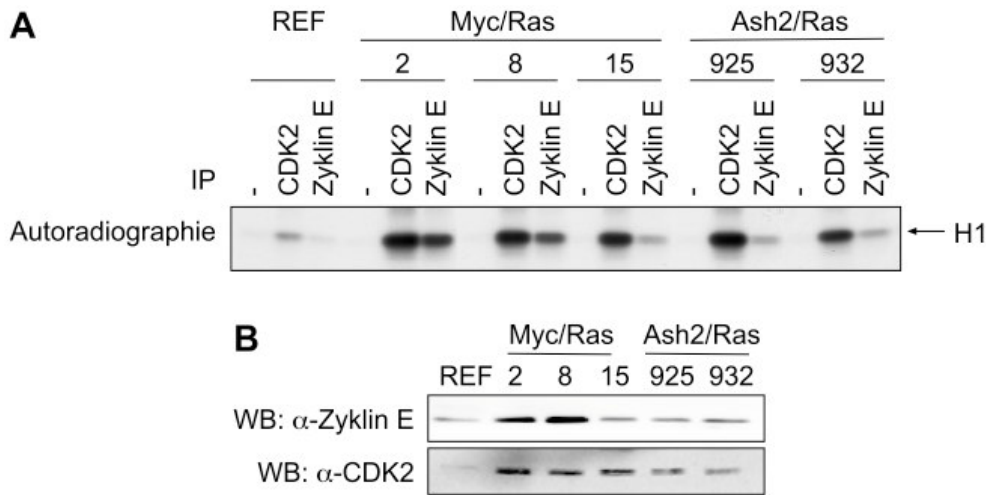


Abb. 3.22: Zyclin E-assoziierte und CDK2-Kinase-Aktivitäten in den Ash2/Ras-Zelllinien. Die Zellen wurden in F-Puffer lysiert, mit Antikörpern gegen CDK2 (D-12) und Zyclin E (M-20) immunpräzipitiert und in einen Kinase-Assay mit Histon H1 und ^{32}P - γ -ATP als Substrate eingesetzt. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch die Autoradiographie dargestellt. Die Ausgangsmengen an CDK2 und Zyclin E wurden im Western-Blot nachgewiesen.

p21 bindet an Zyclin D1-CDK4/6-Komplexe und stimuliert die Kinase-Aktivitäten als auch die Komplex-Bildung (siehe Einleitung). Da p21 und auch Zyclin D1 in den Ash2/Ras-Zellen höher exprimiert waren, wäre interessant, ob das überexprimierte Zyclin D1 auch mehr p21 bindet. Zell-Extrakte wurden mit dem Bradford-Assay auf die gleiche Proteinmengen standardisiert und mit p21-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Nach einer SDS-PAGE wurde das ko-immunpräzipitierte Zyclin D1 im Western-Blot detektiert, während die Ausgangsmengen von p21 und Zyclin D1 in den Zell-Extrakten mittels eines direkten Western-Blots ermittelt wurde.

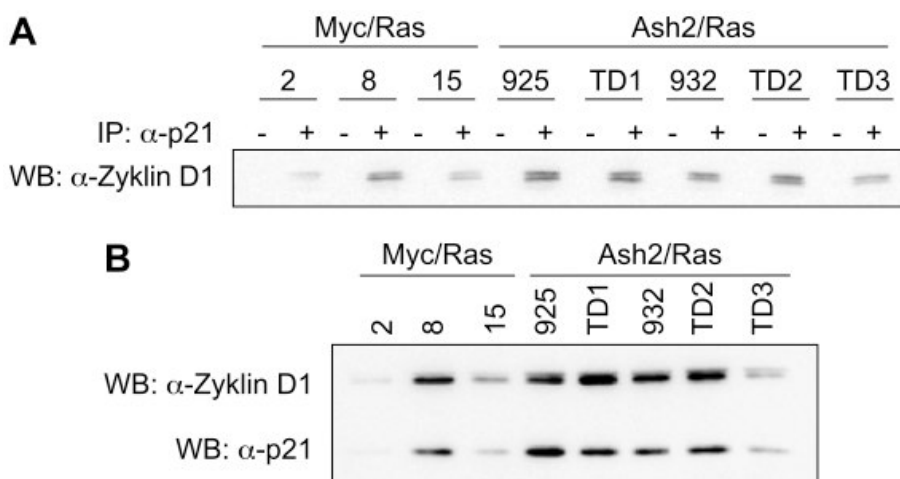


Abb. 3.23: Ko-Immünpräzipitationen von Zyclin D1 und p21 in den Ash2/Ras-Zelllinien. Die Zellen wurden im F-Puffer lysiert und mit Antikörpern gegen p21 (C-19) immunpräzipitiert. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Zyclin D1-Antikörpern (7213G) detektiert. Die Ausgangsmengen an p21 und Zyclin D1 wurden im Western-Blot nachgewiesen.

Es war zu erkennen, dass die Proteinmengen sowohl von p21 als auch von Zyklin D1 in den Ash2/Ras-Zellen aber auch in der Myc/Ras-8-Linie erhöht waren und dementsprechend wurde auch mehr Zyklin D1 in diesen Linien ko-immunpräzipitiert (Abb. 3.23). Folglich wird das erhöhte p21 in den Ash2/Ras-Zellen von mehr Zyklin D1 gebunden, wodurch möglicherweise p21 davon abgehalten wird, die Zyklin E-assozierten bzw. die CDK2-Kinasen zu inaktivieren.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Ash2 und Ras REFs transformieren können und dass die Reduktion von endogenem Ash2 durch siRNA-Oligos die Myc/Ras-Transformation inhibiert. Ash2/Ras- und Myc/Ras-transformierte Zellen unterscheiden sich bezüglich mehrerer Kriterien: Ash2/Ras-Zellen wachsen langsamer, entwickeln einen tetraploiden Karyotyp und zeigen ein anderes Expressionsmuster von Zellzyklus-relevanten und anderen Proteinen. Obwohl p21, ein CDK-Inhibitor, in Ash2/Ras-Zellen überexprimiert ist, sind Zyklin E-assozierte und CDK2-Kinase-Aktivitäten ähnlich hoch wie in Myc/Ras-Zellen.

4 DISKUSSION

4.1 Kartierung der Interaktionsdomänen in Ash2 und Myc

4.1.1 Die Ash2-Interaktionsdomänen in Myc unterscheiden sich *in vivo* und *in vitro*

Da Ash2 ein neuer Interaktionspartner von Myc ist (Dissertation von Dr. Vervoorts), stellte sich die wichtige Frage, welche Rolle Ash2 bei den biologischen Funktionen von Myc, wie Transformation und Regulation von Zielgenen, spielt. Für ihre Beantwortung könnten bestimmte Myc-Mutanten, die nicht mehr Ash2 binden, in biologischen Assays (Transformations-Assays, Reporter-gen-Experimenten usw.) überprüft werden. Dafür sollte in dieser Arbeit die Ash2-Interaktionsdomäne in Myc kartiert werden. Ausserdem sind viele Bereiche von Myc bezüglich der biologischen Funktionen und Interaktionspartner charakterisiert, so dass die Definition der minimalen Ash2-bindenden Myc-Region auf mögliche Funktionen dieser Interaktion und potenzielle andere Bindungspartner von Ash2 hinweisen könnte.

Bereits in der Dissertation von Dr. Vervoorts wurde mit Myc-Deletionsmutaten gezeigt, dass Myc *in vitro* mit den Aminosäuren 262 bis 350 mit Ash2 interagiert, wohingegen die Deletion der Aminosäuren 265 bis 367 nicht mehr Ash2 bindet. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass sich die Bindungsregionen *in vivo* und *in vitro* teilweise unterscheiden: Im Gegensatz zur *in vitro*-Kartierung wurde beobachtet, dass *in vivo* die Myc-Deletionsmutante 265 bis 367 (d265-367) immer noch mit Ash2 ko-immunpräzipitiert (Abb. 3.1.A). Übereinstimmend ist mit der *in vitro*-Kartierung, dass die Region 293 bis 366 ausreichend für die Ash2-Bindung ist, denn 1-366 bindet, 1-293 jedoch nicht mehr (Abb. 3.1.B). Zusätzlich interagiert Ash2 *in vivo* mit den Aminosäuren 367 bis 439 in Myc, so dass postuliert werden kann, dass *in vitro* die Myc-Region 265 bis 367 für die Ash2-Interaktion wichtig ist, *in vivo* es jedoch zwei Bindungsdomänen gibt: eine zwischen 293 und 366, die mit der *in vitro*-Domäne 265 bis 367 überlappt, und eine weitere zwischen 367 und 439.

Es wäre möglich, dass die zweite Bindung indirekt ist und durch ein Brückenprotein vermittelt wird, das sowohl Myc als auch Ash2 bindet. Daher sollte geklärt werden, welche Proteine in dieser Region in Myc binden und als Brückenproteine in Frage kommen könnten: Die Aminosäuren 367 bis 439 in Myc, die die HLHZip (Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper)-Domäne bilden, interagieren mit Max, YY1, Miz-1, AP2, TFII-I, BRCA1, Nmi und hSnf5/INI1, die als überbrückende Faktoren eine indirekte Interaktion von Myc und Ash2 vermitteln könnten (Sakamuro und Prendergast, 1999; Shrivastava *et al.*, 1993; Gaubatz *et al.*, 1995; Bao *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1999). Eine Bindung des Transkriptionsfaktors YY1 an Ash2 wurde zwar mit überexprimierten Ko-Immünpräzipitationen (Ko-IPs) detektiert, doch dies könnte auch

indirekt sein; ausserdem konnte diese Interaktion *in vivo* durch eine Ko-IP der endogenen Proteine nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Folglich ist nicht geklärt, warum Ash2 *in vivo* zusätzlich zu der *in vitro*-definierten Region noch die HLHZip-Domäne in Myc bindet. Zwar wurde für einige Proteine die Bindung an die HLHZip-Domäne beschrieben, doch es noch offen, ob diese als potenzielle Brückenproteine die zusätzliche Bindung an Ash2 *in vivo* vermitteln.

Die andere Ash2-bindende Region der Aminosäuren 293 bis 366 in Myc ist zwischen den verschiedenen Spezies konserviert und die der Aminosäuren 293 bis 318 auch zwischen c-Myc, N-Myc und L-Myc (Marcu *et al.*, 1992), so dass sie eine Arten-übergreifende Rolle bei der Funktion von Myc spielen könnte. Diese Region liegt in einem zentralen Bereich, ausserhalb der Transaktivierungs-Domäne (TAD) am N-Terminus und der bHLHZip-Domäne am C-Terminus, an die die meisten Myc-Interaktionspartner binden. Zu den wenigen bekannten Proteinen, die ebenfalls mit der zentralen Region von Myc interagieren, gehören z. B. die TGF-beta-abhängigen Signalmoleküle Smad2/3 und der Transkriptionsfaktor Sp1.

Myc kann über die Bindung der Aminosäuren 251 bis 360 an Smad2/3 die TGF-beta-vermittelte Aktivierung des *p15*-Promotors antagonisieren und durch die Aminosäuren 250 bis 352 die Sp1-abhängige Aktivierung des *p21*-Promotors hemmen (Feng *et al.*, 2002; Gartel *et al.*, 2001). Sp1 interagiert auch mit Smad2/3 und es wird postuliert, dass es einen ternären Myc-Sp1-Smad-Komplex gibt, der die *p15*- und *p21*-Promotoren regulieren könnte (Feng *et al.*, 2002). Da Ash2, Sp1 und Smad2/3 an dieselbe Region in Myc binden, könnte Ash2 auch mit Sp1 und/oder Smad2/3 interagieren und somit an der Regulation der *p21*- und *p15*-Promotoren beteiligt sein.

An den C-Terminus von Myc – Aminosäuren 262 bis 439 – binden auch der Ko-Aktivator CBP, Nucleolin und p150(MAARP), die ebenso wie Ash2 als Myc-interagierende Proteine chromatographisch aufgereinigt und charakterisiert wurden (Dissertation von Dr. Vervoorts; Vervoorts *et al.*, 2003). Ash2 bindet an CBP, Nucleolin und p150(MAARP) und könnte zusammen mit ihnen bei Myc-abhängigen Funktionen eine Rolle spielen. Ausserdem könnten diese Proteine ebenfalls als potenzielle Brückenproteine die *in vivo*-Bindung von Ash2 an die Myc-HLHZip vermitteln.

Um zu überprüfen, ob die Ash2-Bindung in Myc-abhängigen biologischen Assays wichtig ist, müssen möglichst kleine Regionen in Myc deletiert sein. Bei einer Deletion grösserer Bereiche kann ein entstehender Effekt auch auf die Bindung anderer Faktoren zurückzuführen sein. Eine kleine Deletion in Myc, die die Ash2-Assoziation verhindert, ist unmöglich, da Ash2 mit zwei Regionen in Myc interagiert; bei der Mutation einer Domäne würde Ash2 über die andere binden. Erst Punktmutationen in beiden Regionen könnten die Ash2-Myc-Interaktion verhindern und genauen Aufschluss über die biologische Funktion dieser Bindung geben. Ausserdem kann die Ash2-bindende Region in Myc nicht deletiert und

in biologischen Assays untersucht werden, da Max mit der bHLHZip-Domäne von Myc interagiert und somit mögliche Effekte auf Max zurückzuführen sind.

Folglich interagiert Myc in vivo über zwei Domänen mit Ash2: eine zentrale Region zwischen den Aminosäuren 293 und 366 und die C-terminale HLHZip-Domäne (367-439). Der zentrale Bereich bindet auch in vitro an Ash2, während die Assoziation über die HLHZip-Domäne nur in vivo erfolgt. Somit ist eine Myc-Mutante, die nicht mehr Ash2 binden kann, schwierig herzustellen, da Ash2 über zwei Regionen bindet und die fehlende Max-Bindung an Myc einen reinen Ash2-abhängigen Effekt verhindern würde.

4.1.2 Ash2 bindet über eine zentrale Region zwischen Zink-Finger und SPRY-Domäne *in vitro* und *in vivo* an Myc

Um die Ash2-Myc-Interaktion genauer zu charakterisieren, sollte in dieser Arbeit die Myc-Interaktionsdomäne in Ash2 kartiert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass *in vitro* die Aminosäuren 1 bis 121 in Ash2 nicht an Myc binden, 1 bis 279 schwach und 1 bis 394 stark (Dissertation von Dr. Vervoorts). Diese Beobachtungen weisen auf eine Binderegion zwischen den Aminosäuren 121 bis 279 und 279 bis 394 hin. In dieser Arbeit wurde mit anderen Ash2-Deletionsmutanten beobachtet, dass *in vitro* die Aminosäuren 156 bis 626 (156-626) noch mit Myc interagieren, 393 bis 626 (393-626) jedoch nicht mehr (Abb 3.2.A). Daraus ist abzuleiten, dass die Aminosäuren 156 bis 393 in Ash2 für die Bindung an Myc *in vitro* wichtig sind, was mit der Kartierung der Myc-Interaktions-Region in der Dissertation von Dr. Vervoorts übereinstimmt.

Auch *in vivo* ko-immunpräzipitiert Myc wie erwartet mit den N-terminalen 395 Aminosäuren (N395) von Ash2, auch wenn von diesem Fragment die Aminosäuren 18 bis 159 (1-17/160-395) deletiert sind (Abb. 3.2.B). Eine Deletion der Aminosäuren 161 bis 279 und der letzten beiden Aminosäuren (1-160/280-626) führt jedoch zu einer stärkeren Bindung als mit den beiden erstgenannten Konstrukten. Daraus kann zunächst geschlossen werden, dass *in vivo* die Aminosäuren 280 bis 395 für die Myc-Bindung relevant sind, was mit der *in vitro*-Kartierung übereinstimmt, die auf 156 bis 393 eingegrenzt wurde. Weiterhin ist unerwartet, dass die Deletion der Aminosäuren 161 bis 279 und der letzten beiden Aminosäuren (1-160/280-626) stärker an Myc bindet als die N-terminalen 395 Aminosäuren, was zwei Gründe haben kann: Erstens könnten manche Deletionen Konformationsveränderungen hervorrufen und so die Bindung an Myc beeinflussen, zweitens könnten auch die Aminosäuren 396 bis 626 zur Bindung beitragen, da die Deletion 161 bis 279 stärker bindet als die N-terminalen 395 Aminosäuren. Da sich die Myc-bindende Ash2-Domänen *in vitro* und *in vivo* unterscheiden, wäre möglich, dass es analog zu Myc auch in Ash2 eine Region gibt, die *in vitro* nicht bindet, sondern nur *in vivo*, nämlich 396 bis 626, was ebenfalls durch

die Interaktion mit Brückenproteinen vermittelt sein könnte. Die Aminosäuren 280 bis 395 enthalten das NLS (Kern-Lokalisierungs-Signal, Aminosäuren 299 bis 315); ob dieses an der Myc-Bindung beteiligt ist, in bisher unklar.

Die Funktion der Myc-Ash2-Interaktion ist bisher noch unbekannt. Da Ash2 als Trithorax-(TrxG)-Protein in mehreren Komplexen mit Histon-Methyltransferasen (HMTs) und anderen TrxG-Proteinen vorkommt, die möglicherweise an der Genregulation beteiligt sind, könnte Myc durch die Ash2-Bindung in diesen Komplexen eine Rolle spielen, indem es diese zu Zielgenen rekrutiert und dadurch die Genexpression reguliert (Goo *et al.*, 2003; Wysocka *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2004). Es ist noch nicht bekannt, ob Myc mit anderen Komplexpartnern von Ash2 interagiert und inwieweit es für die Ash2-Funktion wichtig ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in vivo die Aminosäuren 280 bis 395 von Ash2 für die Interaktion mit Myc ausreichen, welche zwischen dem Zink-Finger und der SPRY-Domäne liegen und das Kern-Lokalisierungs-Signal enthalten.

4.2 Ash2 und Myc binden Histon-Methyltransferasen (HMTs)

4.2.1 Ash2 bindet eine Histon H3-Lysin-9-spezifische HMT

Ash2 wurde in mehreren Komplexen mit Histon-Methyltransferasen (HMTs) identifiziert, die Histon H3 an Lysin-4 (H3-K4) methylieren (HALR/ALR-1, hSet1, MLL1, MLL2) (Goo *et al.*, 2003; Wysocka *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass unter den gegebenen Umständen Ash2 nur äusserst schwach mit H3-K4-spezifischen HMT-Aktivitäten assoziiert, eine viel stärkere Bindung erfolgte an eine bisher unbekannte H3-K9-spezifische HMT (Abb. 3.5.B). Daher wird postuliert, dass Ash2 sowohl in H3-K4- als auch H3-K9-HMT-Komplexen vorkommen kann.

Für die Assoziation mit der H3-K9-HMT ist die Region von den Aminosäuren 1 bis 160 in Ash2 notwendig, die den Zink-Finger enthält, so dass dieser möglicherweise die Interaktion vermittelt (Abb. 3.6.B). Statt des Zink-Fingers im humanen Ash2 besitzt das *Drosophila*-Protein einen PHD-Finger, der als eine Art von Zink-Finger in nukleären Proteinen gefunden wurde und vermutlich als Protein-Protein-Interaktionsdomäne eine Rolle bei der Chromatin-abhängigen Transkriptionsregulation spielt (Aasland *et al.*, 1995). Er wurde u. a. in dem TrxG-Protein Trithorax (MLL) und dem PcG-Protein Polycomb-like gefunden, wo er wichtig für die Interaktion mit anderen Proteinen ist (Fair *et al.*, 2001; O'Connell *et al.*, 2001). Zwar ist der Zink-Finger in humanem Ash2 kein vollständiger PHD-Finger, doch auch er könnte als

Protein-Protein-Interaktionsdomäne eine Rolle bei der Chromatin-abhängigen Transkriptionsregulation durch H3-K9-Methylierung spielen.

Aus der Beobachtung, dass Ash2 eine H3-K9-HMT bindet, resultieren mehrere Fragen:

- 1) Kann Ash2 selbst HMT-Aktivität besitzen?
- 2) Welche Effekte sind aufgrund der Ash2-H3-K9-HMT möglich?
- 3) Wie ist erklärbar, dass Ash2 laut Literatur in H3-K4-Komplexen vorkommt, gemäss dieser Arbeit jedoch vorwiegend mit einer H3-K9-HMT-Aktivität assoziiert ist?
- 4) Kann Ash2 in seiner Eigenschaft als TrxG-Protein eine H3-K9-HMT binden?
- 5) Welche H3-K9-Komplexe könnte Ash2 binden?
- 6) Ist die H3-K9-HMT-Ash2-Assoziation mit der Eigenschaft von Ash2 zu transformieren vereinbar?

1) Kann Ash2 selbst HMT-Aktivität besitzen?

Dass Ash2 selbst HMT-Aktivität besitzt, ist unwahrscheinlich, denn es enthält keine SET-Domäne. Die SET-Domäne wurde in Suv39H1, E(Z) und Trithorax identifiziert und ist essentiell für die Histon-Lysin-Methylierung, denn bisher wurde noch keine Lysin-spezifische HMT identifiziert, die keine SET-Domäne enthält (Zhang und Reinberg, 2001). Ausserdem wurde mit rekombinantem, bakteriell aufgereinigtem GST-Ash2 keine HMT-Aktivität auf Histonen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass Ash2 eine intrinsische HMT-Aktivität besitzt, die durch eine unbekannte Domäne oder in Abhängigkeit von anderen Faktoren Histone methylieren kann. In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass Ash2 selbst keine H3-K9-HMT ist, sondern mit einem Enzym assoziiert ist, das diese Aktivität besitzt.

2) Welche Effekte sind aufgrund der Ash2-H3-K9-HMT möglich?

Eine interessante Frage ist, welche Rolle diese H3-K9-Methylierung bei der Funktion von Ash2 spielt. Die Histon-Methylierung könnte zum Histon-Code beitragen, eine hypothetische Kombination verschiedener Modifikationen, die durch die Rekrutierung bestimmter Komplexe die Aktivierung bzw. Repression der Genexpression regulieren kann, wobei die Methylierung von H3-K9 meist mit repressivem Chromatin korreliert wird, die im Heterochromatin und Euchromatin auftritt (Zhang und Reinberg, 2001). Im Euchromatin ändert sich die H3-K9-Methylierung abhängig vom Expressionstatus u.a. auf dem *Zyklin E*- und *DHFR*-Gen, einigen E2F- und Myc-responsiven Genen und induzierbaren inflammatorischen Genen (Nielsen *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2002; Sacconi *et al.*, 2002). Daher wäre eine mögliche Funktion der Ash2-assoziierten H3-K9-Methylierung die Histon-Modifikation an Ash2-Zielgenen, die letztendlich die Genexpression reprimiert. An die H3-K9-Methylgruppe kann im Allg. HP1 (Heterochromatin-Protein 1) binden, das im Hetero- und Euchromatin

gefunden wurde und dort Genrepression vermittelt, so dass auch Ash2 HP1 durch die assoziierte H3-K9-HMT zu seinen Zielgenen dirigieren und diese dadurch reprimieren könnte (Zhang und Reinberg, 2001).

Unerwartet wäre, wenn die Ash2-assoziierte H3-K9-HMT zur Aktivierung der Gen-Transkription beitragen könnte, denn nur in seltenen Fällen wurde beobachtet, dass eine H3-H9- in Verbindung mit einer H3-K4-Methylierung zur Aktivierung führen kann. Beispielsweise kann Ash1 neben H3-K4 und H4-K20 auch H3-K9 methylieren und abhängig von seiner enzymatischen Aktivität die Transkription aktivieren, und der Ko-Aktivator CBP kann sowohl Ash1 als auch eine H3-K4 und H3-K9-HMT-Aktivität binden (Beisel *et al.*, 2002; Vandel *et al.*, 2001). Da auch Ash2 anscheinend an H3-K4- und H3-K9-HMTs bindet, könnten diese HMT-Komplexe miteinander in der Genaktivierung kooperieren.

Weiterhin könnte Ash2 aufgrund der Bindung an H3-K4- und H3-K9-HMTs an einem oszillierenden An- und Abschalten von Genen beteiligt sein, was auch für den HCF-1/Ash2/HMT-Komplex postuliert wurde, der einen aktivierenden hSet1/H3-K4-HMT-Komplex und einen reprimierenden Sin3/HDAC-Komplex bindet (Wysocka *et al.*, 2003).

H3-K9 kann mono-, di- oder tri-methyliert werden, was vermutlich unterschiedliche Auswirkungen auf die Genexpression haben kann. Nur für wenige HMTs ist bisher bekannt, wie sie H3-K9 methylieren. Für die H3-K9-HMT ESET/SETDB1 wurde beschrieben, dass sie durch den Komplexpartner mAM dazu stimuliert wird, nicht mehr zu di-methylieren, sondern statt dessen zu tri-methylieren, wodurch die ESET-abhängige Repression verstärkt wird (Wang *et al.*, 2003). Bei der Ash2-assozierten HMT ist nicht klar, ob sie mono-, di- oder trimethyliert und wie sich dies auf die Genexpression auswirkt.

Zusammenfassend sind mehrere Effekte der Ash2-assozierten H3-K9-Methylierung möglich, wovon die Repression der Genexpression am wahrscheinlichsten ist. Allerdings ist noch unklar, welches die Ash2-assoziierte H3-K9-HMT ist, ob sie mono-, di- oder tri-methyliert, welche Zielgene dadurch reguliert werden, in welchem Zusammenhang dies passiert, welche Signale dies beeinflussen oder ob es Zellzyklus-abhängig ist.

3) Wie ist erklärbar, dass Ash2 laut Literatur in H3-K4-Komplexen vorkommt, gemäss dieser Arbeit jedoch vorwiegend mit einer H3-K9-HMT-Aktivität assoziiert ist?

Da einerseits Ash2 als Bestandteil mehrerer Komplexe mit H3-K4-HMTs beschrieben wurde, andererseits diese Arbeit vorwiegend eine H3-K9-Spezifität der Ash2-assozierten HMT zeigt, sollte folgendes geklärt werden:

- a) Ist die in dieser Arbeit beschriebene Ash2-assoziierte HMT-Aktivität wirklich vorwiegend H3-K9-spezifisch?
- b) Schliesst das Vorkommen von Ash2 in H3-K4-HMT-Komplexen die Möglichkeit einer H3-K9-HMT-Assoziation aus?

c) Wieso kann mit Ash2 in dieser Arbeit nur wenig H3-K4- und viel H3-K9-HMT-Aktivität ko-immunpräzipitiert werden?

a) Ist die in dieser Arbeit beschriebene Ash2-assoziierte HMT-Aktivität wirklich vorwiegend H3-K9-spezifisch?

Die H3-K9-Spezifität der Ash2-bindenden HMT wurde mit rekombinanten GST-H3-N-terminalen Armen gezeigt, die entweder an Lysin-4, -9 oder -27 in verschiedenen Kombinationen mutiert waren (Abb. 3.5.B). Die GST-H3N-Plasmide stammen von der Arbeitsgruppe von Prof. Shinkai, die mit den entsprechenden GST-Proteinen zeigten, dass die HMT G9A H3-K9- und H3-K27-spezifisch ist, was auch von anderen Gruppen reproduziert wurde (Tachibana *et al.*, 2001). Dass die GST-H3N-Plasmide und -Proteine tatsächlich diese Mutationen enthielten, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch DNA-Sequenzierung bestätigt und wird dadurch unterstützt, dass die bereits bekannte H3-K9-spezifische HMT EMT auch hier H3-K9-abhängig methyliert (Abb. 3.8). Diese Arbeit zeigt, dass die Mutation von Lysin-9 (K9) die Ash2-assoziierte Methylierung aufheben konnte, während die Lysin-4 (K4)-Mutation kaum einen Einfluss hatte, was darauf hinweist, dass die Ash2-assoziierte HMT vorwiegend H3-K9 und viel weniger H3-K4 methyliert.

b) Schliesst das Vorkommen von Ash2 in H3-K4-HMT-Komplexen die Möglichkeit einer H3-K9-HMT-Assoziation aus?

Die H3-K4-Spezifität des humanen ASC-2-Komplexes (ASCOMs) wurde mit bakteriell aufgereinigten rekombinanten GST-HALR-Proteinen gezeigt, die des humanen HCF-1/hSet1-Komplexes nur mit chromatographisch aufgereinigtem Material und die des Menin/MLL2/HMT-Komplexes nur mit Menin-spezifischen Antikörpern (Goo *et al.*, 2003; Wysocka *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2004). Daher schliessen die publizierten Ergebnisse ein Vorkommen von Ash2 in anderen Komplexen, mit z. B. H3-K9-HMTs, nicht aus.

c) Wieso kann mit Ash2 in dieser Arbeit nur wenig H3-K4- und viel H3-K9-HMT-Aktivität ko-immunpräzipitiert werden?

Dass Ash2 in dieser Arbeit eine äusserst schwache H3-K4-, aber sehr viel stärker eine H3-K9-HMT-Aktivität immunpräzipitiert werden kann, kann entweder technische oder natürliche Ursachen haben. Ein natürlicher Grund wäre, dass Ash2 in der Zelle an mehr H3-K9-Komplexe bindet und somit auch mehr immunpräzipitiert oder dass das Enzym effizienter methylieren kann. Technische Ursachen wären z. B., dass die Ash2-Antikörper hauptsächlich Ash2 aus H3-K9-Komplexen erkennen, aber nicht solches aus H3-K4-Komplexen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, denn für die Untersuchung der Spezifität der Ash2-bindenden HMT wurden polyklonale Antikörper eingesetzt, die wahrscheinlich mehrere

Epitope in Ash2 erkennen und somit auch Ash2 in H3-K4-HMT-Komplexen immunpräzipitieren sollten. Zweitens könnte es sein, dass durch die gewählten Extraktionsbedingungen die H3-K4-Aktivität verloren geht, die H3-K9-Aktivität jedoch erhalten bleibt. Auch dies ist unwahrscheinlich, denn die Lysierung der Zellen in dieser Arbeit erfolgte unter sehr niedrig-stringenten Bedingungen (50 mM NaCl, 0,2 % Triton X-100), die die Bindung einer H3-K4-HMT erlauben sollten. Es wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht, welche Spezifität die Ash2-assoziierte HMT unter den publizierten Extraktionsbedingungen hat.

Folglich ist bisher ist unklar, warum Ash2 mehr H3-K9-HMT-Komplexe ko-immunpräzipitiert als H3-K4-spezifische, was entweder durch experimentelle Bedingungen oder dadurch begründet werden könnte, dass mehr Ash2 in der Zelle an möglicherweise effizientere H3-K9-Komplexe bindet.

4) Kann Ash2 in seiner Eigenschaft als TrxG-Protein eine H3-K9-HMT binden?

Ein allgemeines Modell postuliert, dass TrxG-Proteine die Genexpression aktivieren und in H3-K4-HMT-Komplexen vorkommen, während PcG-Proteine reprimieren und in H3-K9- und H3-K27-HMT-Komplexen enthalten sind (siehe Einleitung). Daher ist zunächst widersprüchlich, dass Ash2 ein TrxG-Protein ist und eine H3-K9-HMT bindet, doch dies könnte folgendermassen erklärt werden: Erstens gibt es Hinweise, die die scharfe Grenze zwischen den TrxG- und PcG-Proteinen auflösen: Beispielsweise wird postuliert, dass zusätzlich zu den eindeutigen TrxG- und PcG-Proteinen eine dritte Gruppe von TrxG/PcG-Proteinen existiert, die durch ihre dualen Eigenschaften reprimierte und aktivierte Zustände aufrechterhalten (Muylers-Chen und Paro, 2001; Abb. 4.1.A). Beispielsweise ist bei dem PcG-Protein E(Z) nicht klar, ob es tatsächlich ein echtes PcG-Protein oder eher ein TrxG-Protein ist, denn es kann auch die aktive Genexpression aufrechterhalten, und auch das PcG-Protein Batman aktiviert und reprimiert homöotische Gene und bindet an das TrxG-Protein GAGA (LaJeunesse und Shearn, 1996; Muylers-Chen und Paro, 2001; Faucheux *et al.*, 2003). Dementsprechend könnte Ash2 durch seine verschiedenen assoziierten HMT-Komplexe Zielgene aktivieren und reprimieren.

Zweitens wurde aufgrund von Ko-Lokalisations-Studien und Ko-Immünpräzipitationen vorgeschlagen, dass TrxG- und PcG-Proteine miteinander interagieren können (Caldas und Aparicio, 1999). Beispiele dafür sind das TrxG-Protein Zeste, das in einem *Drosophila*-PcG-Komplex vorkommt; das PcG-Protein Pho, dessen Bindung an Chromatin-DNA abhängig von TrxG-Faktor GAGA ist; und das TrxG-Protein MLL, das an den Ko-Repressor CtBP und an die PcG-Proteine HPC2 und Bmi-1 bindet (Saurin *et al.*, 2001; Mahmoudi *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2003). Analog dazu könnte auch Ash2 über die Interaktion mit PcG-Proteinen an eine H3-K9-HMT binden (Abb. 4.1.B und 4.1.C).

Drittens wurde für *Drosophila*-Ash2 postuliert, dass es kein typisches TrxG-Protein ist, denn Ash2-Mutationen führen zu einem für TrxG-Proteine ungewöhnlichen Phänotyp, so dass es noch weitere Funktionen als die eines TrxG-Proteins ausüben und dieses durch eine assoziierte H3-K9-HMT bewirken könnte (Adamson *et al.*, 1996).

Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass Ash2 auch als TrxG-Protein die Genexpression durch eine H3-K9-Methylierung reprimieren könnte, z. B. durch die Interaktion mit H3-K9-HMT-enhaltenen PcG-Komplexen oder als duales TrxG-Protein. Andererseits könnte die Ash2-assozierte H3-K9-Methylierung unabhängig von seiner Funktion als TrxG-Protein erfolgen (Abb. 4.1).

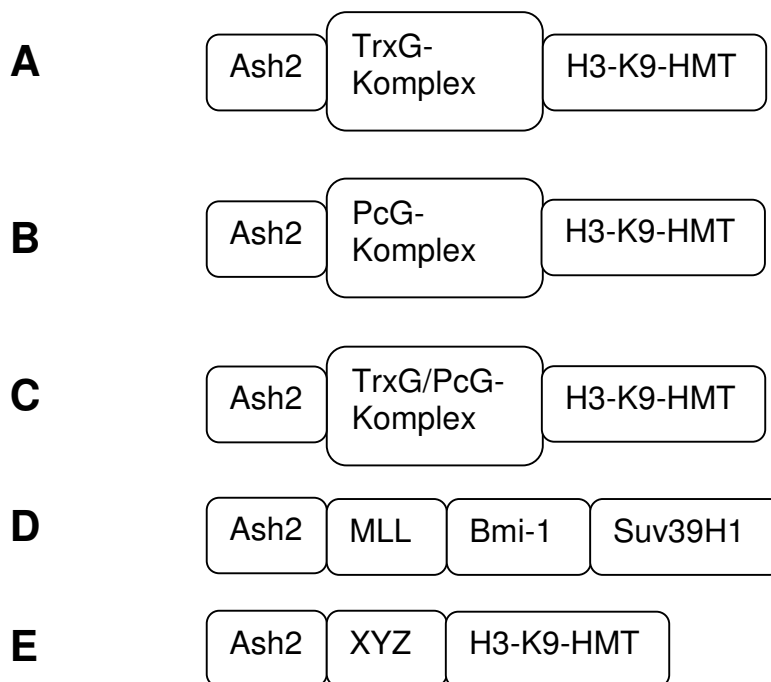


Abb. 4.1: Mögliche Ash2-interagierende Komplexe, die H3-K9-HMTs enthalten könnten. Erklärungen befinden sich im Text.

5) Welche H3-K9-Komplexe könnte Ash2 binden?

Die nächste Frage ist, welche H3-K9-HMT Ash2 in welchem Zusammenhang binden könnte. Eine mögliche Ash2-assozierte HMT könnte Suv39H1 sein: Erstens wurde bei der Untersuchung der Ash2-H3-K4-HMT-Komplexes ASCOM beobachtet, dass Ash2 und RBQ-3, ein pRb (Retinomablastom-Protein)-bindendes Protein, in einem separaten Komplex in der Gelfiltration eluieren. Dieser könnte entweder ein Subkomplex des ASCOM sein, der diesen weniger stark bindet oder auch ein selbständiger Komplex (Goo *et al.*, 2003). In letzterem Fall könnte er neben RBQ3 und Ash2 noch pRb und Suv39H1 enthalten, denn RBQ3 bindet pRb, das wiederum mit der H3-K9-HMT Suv39H1 interagiert, was die Assoziation von Ash2 mit einer H3-K9-HMT erklären könnte.

Zweitens interagiert Ash2 mit dem TrxG-Protein MLL, das über eine Repressor-Domäne an die PcG-Proteine HPC1 und Bmi-1 binden und reprimieren kann (Xia *et al.*, 2003). HPC1 und Bmi-1 sind mit Suv39H1 assoziiert und könnten so die Verbindung von Ash2 mit der H3-K9-HMT vermitteln (Sewalt *et al.*, 2002 und Abb. 4.1.D).

Tatsächlich wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, dass sowohl Bmi-1 als auch Suv39H1 an Ash2 binden, wenn diese Proteine transient überexprimiert sind, doch die Interaktion der endogenen Proteine konnte nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Ausserdem kann die Ash2-assoziierte HMT-Aktivität nicht durch siRNA-Suv39H1 reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese negativen Ergebnisse sind schwierig zu interpretieren, da sie auch technische Ursachen haben können.

Demzufolge wäre Suv39H1 ein Kandidat für die Ash2-assoziierte H3-K9-HMT, doch ein klarer Hinweis liegt dafür nicht vor.

6) Ist die Assoziation von Ash2 mit einer H3-K9-HMT mit der Eigenschaft von Ash2 zu transformieren vereinbar?

Da Ash2 eine H3-K9-spezifische HMT bindet und zusammen mit Ras transformieren kann, wäre eine Frage, ob die Bindung an die HMT bei der Ash2-abhängigen Transformation eine Rolle spielt. Auch Bmi-1, das die H3-K9-HMT Suv39H1 bindet, kooperiert mit Myc in der Maus-Lymphomagenese (Sewalt *et al.*, 2002; Haupt *et al.*, 1991, van Lohuizen *et al.*, 1991). Dementsprechend ist möglich, dass Ash2 über die Bindung an die H3-K9-HMT transformieren könnte, möglicherweise über die Interaktion mit PcG-Proteinen wie Bmi-1. Dies müsste noch weiterhin untersucht werden, indem Ash2-Deletionsmutanten, die keine HMT mehr binden können, in Transformations-Assays eingesetzt werden.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass Ash2 neben H3-K4-Komplexen auch eine H3-K9-HMT-Aktivität bindet, möglicherweise über PcG- oder TrxG-Komplexe, z. B. über Bmi-1 bzw. MLL, und eine Repression der Genexpression bewirken könnte. Diese Assoziation mit einer H3-K9-HMT könnte auch eine Rolle bei der Ash2-abhängigen Transformation spielen. Allerdings ist bisher unklar, welches tatsächlich die Ash2-assoziierte H3-K9-HMT ist, ob diese H3-K9 mono-, di- oder tri-methyliert, welche Zielgene dadurch reguliert werden, in welchem Zusammenhang dies passiert, welche Signale dies beeinflussen oder ob es Zellzyklus-abhängig ist.

4.2.2 Myc bindet eine Histon H3-Lysin-9-spezifische HMT

Da Ash2 eine H3-K9-spezifische HMT und Myc bindet, sollte untersucht werden, ob Myc ebenfalls mit einer H3-K9-HMT interagiert. Diese Arbeit zeigt nun, dass mit Myc tatsächlich

eine H3-K9-HMT ko-immunpräzipitiert werden kann (Abb. 3.8). Daraus resultieren v. a. folgende Fragen:

- 1) Kann Myc selbst HMT-Aktivität besitzen?
- 2) Welche Rolle könnte die H3-K9-HMT auf Myc-Zielgenen zusammen mit Myc spielen?
- 3) Inwiefern könnte die H3-K9-HMT im Zusammenhang mit Myc wichtig sein?
- 4) Können Voraussagen über mögliche Genregulations-Mechanismen durch die Definition der HMT-bindenden Region in Myc getroffen werden?
- 5) Welche Rolle könnte die HMT bei den biologischen Funktionen von Myc spielen?
- 6) Sind die Myc- und Ash2-HMTs identisch?

1) Kann Myc selbst HMT-Aktivität besitzen?

Ebenso wie für Ash2 ist es für Myc unwahrscheinlich, dass es selbst die H3-K9-HMT-Aktivität besitzt, da es keine SET-Domäne enthält, so dass in dieser Arbeit davon ausgegangen wird, dass die Myc-ko-immunpräzipitierbare H3-K9-HMT-Aktivität ein Enzym ist, das an Myc bindet.

2) Welche Rolle könnte die H3-K9-HMT auf Myc-Zielgenen zusammen mit Myc spielen?

Abgesehen von dieser neuen Myc-bindenden HMT wurden weitere Enzymkomplexe beschrieben, die mit Myc assoziiert sind, nämlich Histon-Acetyltransferasen (HATs) und SWI/SNF-Komplexe (Amati *et al.*, 2001; Vervoorts *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass diese Komplexe durch Myc an seine Zielgene rekrutiert werden und durch Histon-Acetylierung bzw. Nukleosomen-remodelling zur Aktivierung der Genexpression beitragen können. Analog dazu könnte die neue Myc-assoziierte HMT die Genexpression auf Myc-Zielgenen durch Histon-Methylierung verändern. Der Effekt der Myc-assoziierten H3-K9-HMT-Aktivität wird vermutlich eine Repression der Genexpression sein, was i. Allg. als Folge der H3-K9-Methylierung angesehen wird.

Dementsprechend könnte postuliert werden, dass die H3-K9-HMT-Myc-Bindung zur Methylierung von Histonen an Myc-Zielgenen und zur Repression der Genexpression führen könnte.

3) Inwiefern könnte die H3-K9-HMT im Zusammenhang mit Myc wichtig sein?

Es sind mehrere Szenarien vorstellbar, bei denen eine HMT-Bindung an Myc dessen Funktion beeinflussen kann: Die Myc-assoziierte HMT könnte die Myc-Funktion fördern oder aber ihr entgegenwirken, denn einerseits könnte die HMT die Myc-Repression vermitteln, indem sie von Myc zu den Zielgenen rekrutiert wird; andererseits könnte die HMT die Myc-Transaktivierung behindern, indem sie über die Myc-Bindung zu Myc-aktivierten Genen

rekrutiert wird und die transaktivierende Funktion von Myc reprimiert (Abb. 4.2.A und 4.2.B). Tatsächlich können einige Proteine durch die Bindung an Myc dessen Transaktivierung hemmen z. B. YY1, MM-1, p107, p202A, BRCA1, wobei der Mechanismus der Repression z. T. noch nicht bekannt ist, so dass nicht ausgeschlossen ist, dass Myc-reprimierende Proteine die Transaktivierung auch durch eine Rekrutierung einer H3-K9-HMT hemmen könnten.

Ausserdem kann Myc selbst einige Zielgene reprimieren, die wichtig für Zell-Adhäsion, Differenzierung und Zellzyklus-/Wachstumsarrest sind, z. B. die CDK-Inhibitoren *p15*, *p21*, *p27* (Claassen und Hann, 1999; Wanzel *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass Myc abhängig vom Zielgen über die direkte Bindung an die DNA oder über indirekte DNA-Interaktion über Protein-Protein-Interaktionen reprimieren kann. Ein Beispiel für die direkte Myc-DNA-Interaktion ist der Promotor von *TMEFF2*, das für ein Transmembran-Protein und potenziellen Tumor-Suppressor kodiert, und abhängig von den E-Boxen durch Myc reprimiert wird (Gery *et al.*, 2003). Weiterhin wird *p27* von Myc reprimiert, indem Myc/Max-Heterodimere direkt mit der Transkriptionsstartstelle interagieren (Yang *et al.*, 2001; Wanzel *et al.*, 2003).

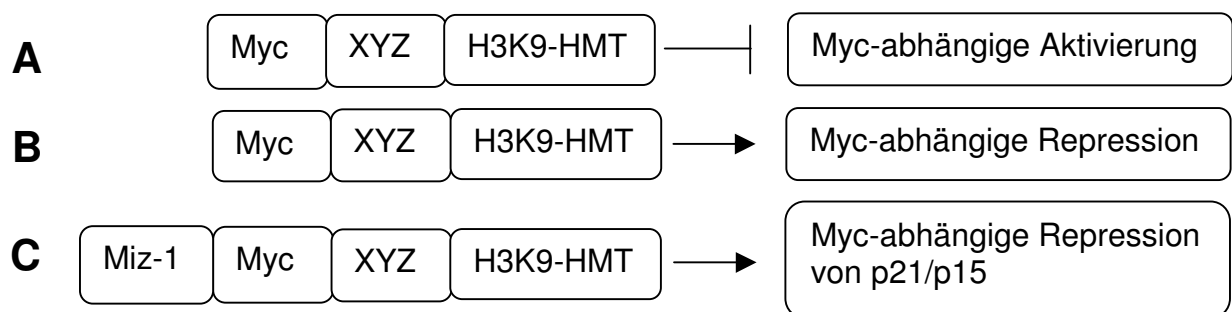


Abb. 4.2: Mögliche Zusammenhänge, in denen Myc an eine H3-K9-spezifische HMT binden könnte. Erklärungen befinden sich im Text.

Die Myc-Repression durch indirekte DNA-Interaktion über Protein-Wechselwirkungen wurde hauptsächlich im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor Miz-1 beschrieben, der durch die Bindung an Initiator (INR)-Elemente die CDK-Inhibitor-Gene *p21* und *p15* aktivieren kann, was durch die Interaktion mit Myc reprimiert werden kann. Auch viele andere Myc-reprimierte Zielgene haben INR-Elemente, die im Allg. in TATA-Box-freien Genen vorkommen und von TFIID, TFII-I, YY1 und Miz-1 gebunden werden können. TFII-I, YY1 und Miz-1 können mit der bHLHZip-Region von Myc interagieren (Grandori *et al.*, 2000). Es wurde zwar beschrieben, dass Myc durch die Interaktionen mit YY1 oder TFII-I den *Adenovirus major late promoter* (AdMLP) reprimieren kann, aber dies wurde nicht mit endogenen Zielgenen gezeigt und ist z. T. noch umstritten (Roy *et al.*, 1993; Shrivastava,

1993, Zhao *et al.*, 1998; Austen *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu gibt es für die Myc-Repression von Miz-1 viele fundierte Hinweise (Wanzel *et al.*, 2003).

Der Mechanismus der Myc-abhängigen Gen-Repression ist bislang nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass Myc die Gen-Aktivierung supprimiert, indem es die Funktion der Aktivatoren, wie z. B. des Transkriptionsfaktors Miz-1, hemmt (Philipp *et al.*, 1994). Miz-1 aktiviert den *p15*-Promotor durch die Rekrutierung des Ko-Aktivators p300. Es wurde postuliert, dass Myc die Bindung von Miz-1 an p300 verhindern und somit die Transaktivierung des *p15*-Promotors reprimieren könnte (Staller *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus kann angezweifelt werden, denn erstens wurde nicht gezeigt, dass tatsächlich die Bindung von p300 an den Promotor in Anwesenheit von Myc reduziert ist, z. B. durch ChIP. Zweitens kann Myc selbst p300 binden, und p300 kann die Myc-Transaktivierung stimulieren, so dass Myc zwar die Bindung von p300 und Miz-1 inhibieren, aber trotzdem selbst noch p300 binden könnte, was dann weiterhin den Promotor aktivieren könnte (Vervoorts *et al.*, 2003). Somit könnte die Repression des *p15*-Promotors auch durch eine Myc-assoziierte H3-K9-HMT erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings nicht bestätigt werden, dass Miz-1 eine HMT binden kann und die *p21*- und *p15*-*INR*-Elemente H3-K9-methyliert sind, was auch technische Ursachen haben könnte (Daten nicht gezeigt). Zwar wird zur Zeit im Allg. angenommen, dass Myc nicht durch einen aktiven Mechanismus reprimiert, doch auch die Myc-antagonisierenden Mad-Proteine unterdrücken ihre Zielgene durch die Rekrutierung von Ko-Repressor-Komplexen (Amati *et al.*, 2001). Ausserdem geht eine Regulation von Genen oft mit einer Veränderung des Chromatins einher, so dass auch Myc durch die Rekrutierung einer H3-K9-HMT seine Zielgene reprimieren könnte (Abb. 4.2.B). Weiterhin ist bereits bekannt, dass Myc durch die Rekrutierung von HAT-Komplexen und die damit verbundene Histon-Acetylierung seine Zielgene aktiviert, so dass auch die Myc-vermittelte Repression ein aktiver Prozess durch Histon-Methylierung sein könnte. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die H3-K9-HMT in vielen Situationen für die Myc-Funktion wichtig sein könnte, z.B. könnte Myc die HMT an die Miz-1-Zielgene *p15* und *p21* rekrutieren, die dann durch die H3-K9-Methylierung reprimiert werden.

4) Können Voraussagen über mögliche Genregulations-Mechanismen durch die Definition der minimalen HMT-bindenden Region in Myc getroffen werden?

Um die molekularen und biologischen Funktionen der Myc-HMT-Bindung zu entschlüsseln, sollte die minimale HMT-bindende Region in Myc definiert werden. Dies hat mehrere Gründe: Erstens könnte die eingegrenzte HMT-bindende Region Aufschluss über die Rolle der HMT in der Myc-Funktion geben, denn viele Regionen in Myc sind bezüglich ihrer Bindung mit anderen Proteinen und ihren biologischen Funktionen wie Transformation und Regulation von Zielgenen charakterisiert. Zweitens sollten Myc-Deletionsmutanten gefunden

werden, die nicht mehr die HMT binden und die in Myc-abhängigen biologischen Assays die Funktion der HMT erklären könnten (siehe unten).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Myc mit den Aminosäuren 177 bis 439 (d177) und trotz der Deletion von 103 bis 263 (d103-263) und von 265 bis 367 (d265-367) mit der HMT interagieren kann. Die Region 1 bis 180 (1-180) bindet nicht mehr (Abb. 3.9 und 3.10). Daraus ist abzuleiten, dass die HMT-assoziierende Region in Myc wahrscheinlich die Aminosäuren 367 bis 439 umfasst. Zwar wurden die Aminosäuren 367 bis 439 in Myc nicht auf HMT-Bindung untersucht, um diese Hypothese fundieren zu können, doch in dieser Arbeit wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die Aminosäuren 367 bis 439 in Myc für die HMT-Bindung ausreichen. Die HA-getaggten Myc-Mutanten konnten für eine genauere Kartierung nicht eingesetzt werden, da damit keine detektierbare HMT-Aktivität ko-immunpräzipitiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Nun wäre interessant, ob die HMT-bindende Region in Myc mit bereits beschriebenen Myc-Repressionsbereichen überlappt: Es gibt mindestens zwei Domänen in Myc, die bisher als relevant für die Repression beschrieben wurden: Die TAD (Aminosäure 1 bis 143) und die HLHZip-Domäne (Aminosäure 367 bis 439). Da Myc mit den Aminosäuren 367 bis 439 an die HMT bindet, könnte diese an der HLHZip-abhängigen Repression beteiligt sein. Die HLHZip-vermittelte Repression wurde hauptsächlich im Zusammenhang mit Miz-1 beschrieben, und es wurde postuliert, dass vor allem die Myc-Miz-1-Interaktion dafür verantwortlich ist. Dies wurde auf der Beobachtung begründet, dass die Bindung von Miz-1 an Myc und die Repression der *p15*- und *p21*-Promotoren abhängig von der Aminosäure 394 in der HLHZip-Region sind, was jedoch nicht ausschliesst, dass noch andere Funktionen in Myc wichtig sind, z. B. die Bindung an eine HMT (Herold *et al.*, 2002 und Abb 4.3.C). Ausserdem wurde gezeigt, dass für die Myc-vermittelte Repression des *p15*-Promotors die Aminosäuren 355 bis 439 ausreichen, die ebenfalls die HMT binden, so dass die Repression durch eine H3-K9-Methylierung vermittelt werden könnte (Staller *et al.*, 2001).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die HMT-Bindung über die Aminosäuren 367 bis 439 in Myc erfolgt, die die HLHZip-Domäne bilden und an der bereits beschriebenen Myc-Repression der Miz-1-Aktiveringung auf *p21*- oder *p15*-Promotoren beteiligt sein könnte oder auch in einem anderen Zusammenhang auf weiteren Myc-Zielgenen.

5) welche Rolle könnte die HMT in der biologischen Funktion von Myc spielen?

Die nächste Frage ist, ob die Myc-assozierte H3-K9-HMT durch die mögliche Repression von Myc-reprimierten Genen eine Rolle bei den Myc-abhängigen biologischen Funktionen, z.B. der Transformation spielt, denn tatsächlich kann Myc aufgrund der Repression vieler Zielgene zur Transformation beitragen. Um zu überprüfen, ob die HMT-Assoziation für die Myc-Transformation wichtig ist, könnten Myc-Mutanten in Transformations-Assays eingesetzt

werden, die keine HMT mehr binden. Diesen Mutanten müssten die Aminosäuren 367 bis 439 fehlen, da Myc mit den Aminosäuren 367 bis 439 an die HMT bindet. Da durch diese Deletion auch die Max-Bindung verloren geht, können solche Mutanten nicht in Myc-abhängigen biologischen Assays überprüft werden, weil der Effekt nicht nur HMT-abhängig wäre. Um einen reinen HMT-Effekt bei den Myc-vermittelten biologischen Funktionen zu überprüfen, müssten Punktmutanten in der HLH-Zip-Domäne hergestellt werden, die die HMT-Bindung verhindern, aber die Interaktion mit den anderen bekannten Proteinen erhalten.

Folglich ist es schwierig zu zeigen, dass die HMT in den biologischen Funktionen von Myc eine Rolle spielt, denn bisher gibt es keine Myc-Mutante, die die HMT zwar nicht mehr bindet, aber alle anderen biologischen Eigenschaften von Myc beibehält.

6) Sind die Ash2- und Myc-HMTs identisch?

Ash2 wurde als Interaktionspartner von Myc charakterisiert und beide binden H3-K9-spezifische HMTs. Es könnte also möglich sein, dass einerseits die Ash2- und die Myc-assoziierten HMTs identisch sind und dass Ash2, Myc und eine HMT im gleichen Komplex vorkommen, andererseits könnten Ash2 und Myc auch verschiedene HMTs in unterschiedlichen Komplexen binden.

Wenn sie in demselben Komplex mit einer HMT assoziiert sind, könnten die Ash2- und die Myc-HMTs kooperativ oder antagonistisch auf die Funktion des Komplexpartners wirken. Es wäre möglich, dass die Ash2-HMT die transaktivierende Funktion von Myc hemmt, denn eine Inhibition der Myc-Transaktivierung wurde schon für andere Faktoren beschrieben, z. B. p107 (Beijersbergen *et al.*, 1994; Abb. 4.2.A).

Eine Kooperation von Ash2 und Myc ist wahrscheinlicher, denn ähnliches wurde bereits für die HATs beschrieben, z. B. rekrutiert Myc TRRAP, das durch die Bindung an HAT-Komplexe für die Histon-Acetylierung und Gen-Aktivierung sorgt (McMahon *et al.*, 1998). Analog dazu könnte Myc auch Ash2 binden, das durch die assoziierte HMT Histone methylieren und Gene reprimieren könnte (Abb. 4.2.B).

Zum einen wäre möglich, dass Myc und Ash2 direkt an dieselbe HMT binden, zum anderen könnte Myc indirekt mit der HMT über Ash2 interagieren oder Ash2 indirekt mit der HMT über Myc. Die Hypothese, dass die Bindung indirekt über den Bindungspartner erfolgt, könnte durch kongruente HMT- und Bindungspartner-interagierende Regionen unterstützt werden. Daher ist unwahrscheinlich, dass Ash2 über Myc mit der HMT assoziiert ist, denn die Region in Ash2, die mit Myc interagiert (1-17/160-395), bindet keine HMT mehr (Abb. 3.2, 3.6 und 3.7). Andererseits könnte Myc über Ash2 mit dem HMT-Komplex interagieren, denn die Aminosäuren 367 bis 439 (HLHZip) binden sowohl Ash2 als auch die HMT, die Aminosäuren 293 bis 366 interagieren nur mit Ash2; ob sie auch mit der HMT interagieren, ist bisher

unklar, jedoch nicht auszuschliessen (Abb. 3.1, 3.9 und 3.10). Demnach sind die Ash2- und HMT-bindenden Regionen in Myc kongruent, was die Hypothese bekräftigt, dass Myc über Ash2 an die HMT binden könnte. Allerdings sind diese Regionen sehr gross, und somit ist nicht auszuschliessen, dass Myc die HMT über andere Interaktionspartner als Ash2 oder direkt bindet. Wenn eine Punktmutation in Myc die Bindung sowohl von Ash2 als auch der HMT verhindern würde, würde dies ein stärkeres Indiz dafür sein, dass Myc über Ash2 an die HMT bindet. Eine Punktmutante in Myc lässt sich jedoch schwierig herstellen, da Myc über zwei Domänen (293 bis 367 und 367 bis 439) an Ash2 bindet. Ein Ergebnis, das möglicherweise gegen die Hypothese von Ash2 als Brückenprotein zwischen Myc und HMT sprechen könnte, ist der Vergleich der HMT- und Ash2-ko-immunpräzipitierenden Myc-Antikörper. Denn die Myc-Antikörper N262 ko-immunpräzipitieren die HMT, aber kein Ash2; die Antikörper 6A10 ko-immunpräzipitieren Ash2, jedoch keine HMT-Aktivität (Abb. 3.12). Dies könnte zunächst darauf hinweisen, dass Myc nicht über Ash2 an die HMT bindet, denn sonst würden die Antikörper 6A10 eine HMT präzipitieren. Es wäre jedoch auch möglich, dass die N262-Antikörper Ash2 präzipitieren, was unterhalb der Detektionsgrenze liegt, aber für eine Rekrutierung der HMT zu Myc ausreicht. Andererseits ko-immunpräzipitieren die 6A10-Antikörper viel Ash2, was jedoch möglicherweise nicht mit einer HMT-Aktivität assoziiert ist. Dass die Ash2- und HMT-Ko-Immünpräzipitationen nicht korrelieren, spricht zunächst gegen das Myc-Ash2-HMT-Modell, doch dies kann die Funktion von Ash2 als Brückenprotein nicht definitiv ausschliessen. Als nächstes sollte der Effekt der Reduzierung der Ash2-Proteinmenge durch siRNA-Oligos auf die Myc-HMT-Bindung Aufschluss über die Wichtigkeit von Ash2 geben. Es wurde beobachtet, dass die Myc-assoziierte HMT-Aktivität in Anwesenheit von siRNA-Ash2 nicht verändert wird, obwohl die Bindung von Ash2 reduziert ist (Abb. 3.11). Dies könnte einerseits darauf hinweisen, dass Ash2 für die Rekrutierung der HMT nicht benötigt wird, andererseits könnte auch eine geringe Menge an Ash2 schon für die maximale HMT-Bindung ausreichen. Diese Beobachtungen sprechen zwar zunächst ebenfalls gegen die Hypothese der Myc-Ash2-HMT-Bindung, doch sie sind kein unumstösslicher Beweis gegen die Funktion von Ash2 in der Myc-HMT-Interaktion.

Da Myc mit einer H3-K9-HMT assoziiert ist, was demnach möglicherweise auf Myc-reprimierten Genen zusammen mit Miz-1 stattfinden könnte, könnte auch Ash2 bei dieser Myc-vermittelten Repression beteiligt sein (Abb. 4.2.C und Abb. 4.3). Dagegen spricht, dass Ash2 in überexprimierten Ko-Immünpräzipitationen nicht an Miz-1 bindet und auf den Miz-1-Myc-Zielgenen *p21* und *p15* keine H3-K9-Methylierung durch die ChIP-Analyse detektiert wurde, was allerdings auch technische Ursachen haben könnte (Daten nicht gezeigt). Ausserdem ist das *p21*-Protein in den Myc/Ras-transformierten Zellen grösstenteils herunterreguliert, während es in den Ash2/Ras-Zellen höher exprimiert ist, so dass Ash2 hier

wahrscheinlich nicht mit Myc bei der p21-Repression kooperiert (Abb. 3.20.Ab und 3.20.B). Demzufolge ist unklar, ob Ash2 eine Rolle bei der Myc-Miz-1-Regulation spielt.

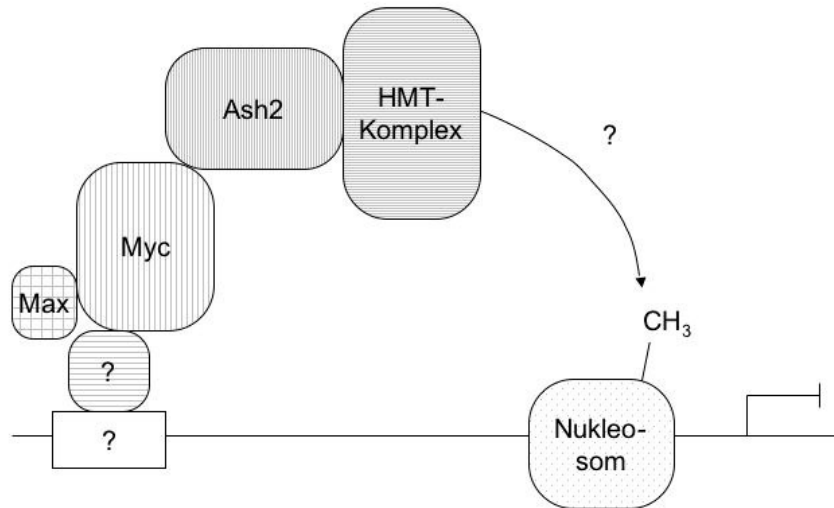


Abb. 4.3: Möglicher Mechanismus der HMT- und Myc-abhängigen Gen-Repression. Eine Hypothese ist, dass Myc über die Bindung an Ash2 einen HMT-Komplex rekrutiert, der auf Myc-reprimierten Zielgenen Histon H3 an Lysin-9 methylieren und dadurch zur Myc-abhängigen Repression beitragen kann.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit gezeigt, dass Myc eine H3-K9-spezifische HMT mit den Aminosäuren 367 bis 439 bindet. Da diese Region auch für die Max-Bindung wichtig ist, gibt es bisher noch keine Myc-Mutante, die die HMT nicht mehr bindet und gleichzeitig in Myc-abhängigen biologischen Assays einen reinen HMT-Effekt ergeben könnte. Ein hypothetisches Modell ist, dass Myc die HMT an seine Zielgene rekrutiert, die dann durch die H3-K9-Methylierung reprimiert werden, was im Zusammenhang mit Miz-1 geschehen könnte. Da auch Ash2 eine H3-K9-HMT bindet, könnte postuliert werden, dass Myc über Ash2 die HMT an seine Zielgene rekrutiert und somit die HMT-Myc-Bindung abhängig von Ash2 ist. Dies wird dadurch bestätigt, dass die Ash2- und HMT-bindenden Regionen in Myc dieselben sind. Obwohl die Ko-Immünpräzipitationen von Ash2 und HMT mit unterschiedlichen Myc-Antikörpern nicht korrelieren und siRNA-Ash2 keinen Effekt auf die Myc-HMT-Aktivität hat, können diese Experimente nicht ausschließen, dass Ash2 eine Funktion bei der Myc-HMT-Bindung haben könnte.

Folglich ist noch offen, welches die Myc- und Ash2-assoziierten HMTs sind, ob diese H3-K9 mono-, di- oder tri-methylieren, ob Ash2, Myc und die HMT in einem Komplex vorkommen und welche Myc-Zielgene durch eine HMT reguliert werden können.

4.3 Ash2 wird methyliert

Neben Histonen können auch andere Proteine von Protein-Methyltransferasen (PMTs) methyliert werden, z.B. STAT1 (McBride und Silver, 2001). Da Ash2 in mehreren H3-K4- und H3-K9-HMT-Komplexen vorkommt, wurde überprüft, ob es selber methyliert werden kann. Tatsächlich können rekombinantes GST-Ash2 und in Zellen exprimiertes und immunpräzipitiertes Flag-Ash2 spezifisch methyliert werden, was folgende Fragen hervorbringt (Abb. 3.13):

- 1) Erfolgt die Ash2-Methylierung durch einen Ash2-assoziierten PMT-Komplex oder durch Ash2 selbst?
- 2) Welche Aminosäure(n) könnte(n) in Ash2 methyliert werden?
- 3) Welchen Einfluss kann die Methylierung auf die Ash2-Funktion haben?

1) Erfolgt die Ash2-Methylierung durch einen Ash2-assoziierten PMT-Komplex oder durch Ash2 selbst?

Weiterhin ist noch nicht geklärt, ob die Ash2-Methylierung durch einen Ash2-assoziierten PMT-Komplex oder durch Ash2 selbst erfolgt. Dafür muss untersucht werden, ob Ash2 die Voraussetzung für eine PMT erfüllt: Vielen Arginin-PMTs ist eine AdoMet-bindende Domäne gemeinsam, die für die Bindung des Substrats S-Adenosyl-Methionin wichtig ist (McBride *et al.*, 2001). In humanem PRMT1, PRMT3 und CARM1 sind die Aminosäuren VLDVG konserviert, und wenn in CARM1 die Aminosäuren VLD zu AAA mutiert werden, kann es nicht mehr Histon H3 methylieren (Chen *et al.*, 1999). Diese oder eine ähnliche Sequenz wurde in Ash2 nicht gefunden, so dass zwar nicht auszuschliessen ist, dass die Methylierung durch Ash2 selbst erfolgt, aber unwahrscheinlich. Daher wird im Folgenden davon ausgegangen, dass die Ash2-Methylierung durch Ash2-assoziierte Komplexe vermittelt wird.

2) Welche Aminosäure(n) könnte(n) in Ash2 methyliert werden?

Als nächstes sollte geklärt werden, an welchen Aminosäuren Ash2 methyliert werden könnte: Die Ash2-Methylierung findet wahrscheinlich eher an Argininen statt als an Lysinen, denn bisher ist die SAM (S-Adenosyl-Methionin)-abhängige Protein-Methylierung hauptsächlich an Argininen bekannt, während eine Lysin-Methylierung bei Histonen, aber nicht bei anderen Proteinen gefunden wurde. Allerdings kann eine Lysin-Methylierung nicht ausgeschlossen werden, denn mit Ash2 sind mehrere H3-K4- oder H3-K9-spezifische Lysin-Methyltransferasen assoziiert. Es ist somit noch unklar, ob Ash2 an Argininen oder Lysinen methyliert wird und welche Enzyme dies vermitteln. Wenn davon ausgegangen wird, dass Ash2 an Argininen methyliert wird, könnte dies an RGG-, RXR-, RG- und GRG-Motiven erfolgen (McBride und Silver, 2001). Die Ash2-Sequenz wurde auf das Vorkommen dieser Sequenzen untersucht und als einziges dieser Motive wurde GRG gefunden, wobei das

Arginin die Aminosäure 296 ist. Aber auch eine andere Sequenz könnte das Ziel der Arginin-Methylierung sein, denn STAT1 besitzt die abweichende Sequenz EIRQ (Mowen *et al.*, 2001). Demzufolge ist bisher offen, ob und an welchen Argininen Ash2 methyliert werden kann.

3) Welchen Einfluss kann die Methylierung auf die Ash2-Funktion haben?

Es wird angenommen, dass die Protein-Methylierung im Allg. eine sterische Hinderung erzeugt, die Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen könnte, z. B. reduziert die Methylierung von Sam68 (eines mitotischen Substrates der Src-Kinase) die Bindung an SH3-Proteine, die Methylierung von STAT1 erniedrigt dessen Affinität zu seinem Inhibitor PIAS1, aber andererseits verstärkt die Methylierung von SmD1 und SmD3 die Bindung zu SMN (dem Produkt des spinalen Muskel-Atrophie-Gens) (Bedford *et al.*, 2000; Mowen *et al.*, 2001; Friesen *et al.*, 2001). Somit könnte die Methylierung von Ash2 auch die Bindung an seine Interaktionspartner verändern. Ash2 bindet an Myc mit den Aminosäuren 280 bis 395 (Abb. 3.2). Das potenziell methylierte Arginin-296 liegt in dieser Region, so dass es möglich wäre, dass die Bindung von Myc an Ash2 durch die Methylierung von Ash2 an Arginin-296 beeinflusst werden kann. Die Methylierung von Ash2 könnte auch die Bindung zu anderen Proteinen verändern, z. B. zu den bekannten Komplex-Partnern (siehe Einleitung) oder zu anderen bisher unbekanntem Proteinen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Ash2 selbst methyliert werden kann. Da Ash2 offensichtlich keine AdoMet-bindende Domäne besitzt, kann es sich wahrscheinlich nicht selbst methylieren. Ob die Ash2-Methylierung an Lysin oder Argininen stattfindet, ist unklar, denn bisher wurde zwar noch keine Lysin-Methylierung an Proteinen ausser Histonen beschrieben, aber Ash2 kommt in mehreren Lysin-HMT-Komplexen vor, so dass eine Lysin-Methylierung nicht ausgeschlossen werden kann. Die Ash2-Methylierung könnte die Interaktion mit anderen Proteinen, z. B. Myc, beeinflussen. Zusammenfassend ist offen, welche Aminosäure in Ash2 methyliert wird, durch welches Enzym dies erfolgt, welchen Einfluss das auf die Ash2-Funktion hat und wie die Methylierung von Ash2 reguliert ist, z. B. durch verschiedene Signale oder im Laufe des Zellzyklus'.

4.4 Ash2 ist ein Onkoprotein, das mit Ras in der Transformation kooperiert

Da bereits bekannt ist, dass Myc und Ras Rattenembryo-Fibroblasten (REFs) transformieren können und Ash2 ein neuer Interaktionspartner von Myc ist, sollte untersucht werden, ob auch Ash2 mit Ras in der Transformation kooperieren kann und ob Ash2 bei der Myc/Ras-

Transformation eine Rolle spielt (Dissertation von Dr. Vervoorts). Tatsächlich kann Ash2 zusammen mit Ras REFs transformieren, jedoch nicht alleine, woraus folgende Fragen resultieren (Abb. 3.14):

- 1) Spielt Ash2 eine Rolle bei der Myc/Ras-abhängigen Transformation?
- 2) Bezüglich welcher Kriterien unterscheiden und gleichen sich die Ash2/Ras- und die Myc/Ras-Zellen?
- 3) Welche Eigenschaften ermöglichen Ash2 zu transformieren?

1) Spielt Ash2 eine Rolle bei der Myc/Ras-abhängigen Transformation?

Da Ash2 und Myc interagieren, könnte Ash2 an der Myc/Ras-Transformation beteiligt sein. Zwar hat die Überexpression von Ash2 keinen offensichtlichen Einfluss auf die Myc/Ras-Transformation, doch die Ko-Expression von siRNA-Oligos gegen Ash2 reduziert die Myc/Ras-Transformation (Abb. 3.14). Daraus kann geschlossen werden, dass Ash2 für die Myc/Ras-Transformation wichtig ist. Warum überexprimiertes Ash2 die Myc/Ras-Transformation nicht beeinflusst, ist unklar.

2) Bezüglich welcher Kriterien unterscheiden und gleichen sich die Ash2/Ras- und die Myc/Ras-Zellen?

Da Ash2 und Myc miteinander interagieren, beide mit Ras in der Transformation kooperieren und die Myc/Ras-Transformation durch siRNA-Ash2 inhibiert wird, könnte postuliert werden, dass Ash2 und Myc in der Transformation zusammenwirken. Um herauszufinden, wie Ash2 und Myc in der Transformation kooperieren könnten, sollte untersucht werden, ob sich Ash2 und Myc in der Art der Transformation gleichen und die transformierten Zellen sich mehr ähneln als die anderer Ras-kooperierender Onkogene. Dazu wurden die Ash2/Ras- und die Myc/Ras-Zellen bezüglich mehrerer Kriterien miteinander verglichen:

- a) Karyotyp
- b) Apoptose aufgrund von Serumentzug
- c) Expression einiger Zellzyklus-relevanter und anderer Proteine
- d) Wachstumsgeschwindigkeit

a) Karyotyp: Ash2/Ras-transformierte Zellen entwickeln einen tetraploiden Karyotyp

Da beobachtet wurde, dass die Ash2/Ras-Populationen aus unterschiedlich grossen Zellen bestehen, sollten Karyotyp-Analysen zeigen, ob Ash2/Ras-Zellen eine veränderte Chromosomenzahl haben. Tatsächlich besitzen viele Zellen der Ash2/Ras-Linien 925 und 932 doppelt so viele Chromosomen, also einen tetraploiden Karyotyp, im Gegensatz zu Myc/Ras-Zellen, die nicht tetraploid sind (Abb. 3.17). Auch die Überexpression anderer Onkogene zusammen mit Ras führt zu tetraploiden Zellen, z. B. von Zyklin E und Zyklin D1,

und viele Krebszellen sind ebenfalls tetraploid, z. B. Epithel-Tumore (Haas *et al.*, 1997; Storchova und Pellman, 2004).

Wie die Tetraploidie in den Ash2/Ras-Zellen entsteht, ist unklar. Polyploidie kann durch Zellfusion oder Endoreplikation einem normalen Entwicklungsprogramm folgen oder aufgrund von Defekten im Zellzyklus entstehen, was häufig pathologisch ist und in transformierten Zellen und Krebszellen auftritt. Daher könnte die Tetraploidie in den Ash2/Ras-Zellen ebenfalls durch einen Defekt im Zellzyklus entstanden sein, welcher in unterschiedlichen Phasen der Zellteilung auftreten könnte, z. B. bei der Zellteilung (Zytokinese), bei der DNA-Replikation, beim Lösen der Schwester-Chromatid-Kohäsion, bei der Funktion der mitotischen Spindel oder bei der Kernteilung (Karyokinese) sein. Wahrscheinlich für die Ash2/Ras-Zellen wäre eher ein Defekt während der Kernteilung als während der Zellteilung, denn sonst würden in jeder Zelle zwei Kerne vorliegen, was hier nicht beobachtet wurde (Storchova und Pellman, 2004; Abb. 3.16). Normalerweise gehen tetraploide Zellen in den Zellzyklus-Arrest oder in die Apoptose, was durch einen defekten postulierten Tetraploidie-Kontrollpunkt umgangen werden kann. Dann können sich die tetraploiden Zellen weiter teilen, was jedoch aufgrund der doppelten Anzahl der Zentromere oft durch eine multipolare Mitose erfolgt, die zur Aneuploidie und Apoptose führen kann. Dies scheint für die Ash2/Ras-Zellen nicht zuzutreffen, denn aneuploide Zellen wurden nicht beobachtet und ältere Ash2/Ras-Populationen bestehen aus etwa 90% tetraploiden Zellen, die sich immer noch teilen können und nicht apoptotisch sind (Abb. 3.17). Folglich kann in den Ash2/Ras-Zellen wahrscheinlich der Tetraploidie-Kontrollpunkt umgangen werden, und die Zellteilung muss geregelt ablaufen. Da viele andere Krebszellen sich an die doppelte Anzahl an Zentrosomen anpassen, indem sie diese bipolar an den Spindelpolen konzentrieren und sich somit geregelt teilen können, könnten auch in tetraploiden, sich teilenden Ash2/Ras-Zellen bipolare Mitosen stattfinden. (Storchova und Pellman, 2004).

Es ist noch nicht klar, über welche Mechanismen Ash2 die Tetraploidie auslöst. Bei den Zyklin E/Ras oder Zyklin D1/Ras-Zellen wird postuliert, dass diese Onkogene in normalerweise entstehenden tetraploiden Zellen den Tetraploidie-Kontrollpunkt umgehen und diese Zellen schnell in die nächste S-Phase führen, wodurch natürlich vorkommende tetraploide Zellen nicht eliminiert werden können (Haas *et al.*, 1997). Dies könnte auch für Ash2/Ras-Zellen zutreffen, denn unwahrscheinlicher ist, dass die Ash2/Ras-Überexpression direkt Tetraploidie bewirkt, indem sie die Teilung einer normalen Zelle beeinflusst, was theoretisch bereits nach einer Passage zur Tetraploidie aller Zellen führen müsste. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Überexpression von Ash2/Ras - ähnlich wie die von Zyklin E/Ras und Zyklin D1/Ras - nicht verhindern kann, dass natürlich entstehende tetraploide Zellen eliminiert werden, und somit den Fortbestand tetraploider Zellen fördert.

Folglich bewirkt die Überexpression von Ash2 und Ras in REFs die Entwicklung eines tetraploiden Karyotyps, was sich von Myc/Ras-transformierten Zellen unterscheidet, die nicht tetraploid sind. Bisher ist unklar, wie Ash2 die Tetraploidie auslösen kann, aber möglicherweise haben Ash2/Ras-Zellen einen defekten Zellzyklus und können den Tetraploidie-Kontrollpunkt umgehen. Da die Tetraploidie in den Ash2/Ras-Linien erst nach etwa 50 Passagen in 90 % der Zellen vorkommt, ist ein Mechanismus vorstellbar, der weniger normale Zellen tetraploid macht als vielmehr natürlicherweise entstehende tetraploide Zellen nicht zerstört.

b) Apoptose aufgrund von Serumentzug: Ash2/Ras- und Myc/Ras-Zellen gehen unter Serumentzug in die Apoptose

Serummangel führt in normalen REFs zu einem Wachstumsarrest, während dies in manchen transformierten REFs in Apoptose resultiert, z. B. wenn sie Ras zusammen mit dem grossen T-Antigen des SV40-Virus, Myc oder Zyklin D1 überexprimieren. Andere Ras-kooperierende Onkoproteine bewirken durch ihre Überexpression zusammen mit Ras keine Apoptose unter Serumentzug, z. B. Zyklin E und Zyklin D2 (Haas *et al.*, 1997). Da es also Unterschiede zwischen den verschiedenen Onkogenen gibt, sollte untersucht werden, ob Ash2/Ras- genauso wie Myc/Ras-Zellen unter Serummangel apoptotisch werden. Tatsächlich gehen sowohl Ash2/Ras- als auch Myc/Ras-Zellen unter Serumentzug in die Apoptose, allerdings ist der Anteil apoptotischer Zellen in den Ash2/Ras-Zellen niedriger (Abb. 3.18). Hier wurde jedoch nur die eine Ash2/Ras-Linie 925 eingesetzt, da die zweite, 932, bereits früh viele tetraploide Zellen enthielt, die durch die Verschiebung der Fluoreszenz kein eindeutiges Ergebnis zulassen würden. Mit nur einer Zelllinie lassen sich keine eindeutigen quantitativen Schlüsse ziehen, sondern nur Tendenzen erkennen. Folglich könnte postuliert werden, dass Ash2/Ras- und Myc/Ras-Zellen auf Serumentzug mit Apoptose reagieren, wenn auch möglicherweise unterschiedlich stark.

c) Expression einiger Zellzyklus-relevanter und anderer Proteine: Ash2/Ras-Zellen und Myc/Ras-Zellen unterscheiden sich

Eine Voraussetzung zur Transformation ist die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, die häufig durch eine veränderte Expression Zellzyklus-regulierender Proteine entsteht, was letztendlich zur Inhibierung des pRb-Weges führt. Viele dieser Proteine sind Onkoproteine (z. B. Zyklin D1, D2, E, CDK4) oder Tumor-Suppressoren (z. B. der CDK-Inhibitor p16), denn Zykline und CDKs (*cyclin-dependent kinases*) phosphorylieren und inhibieren pRb, während CDK-Inhibitoren die CDKs hemmen und pRb aktivieren. Da die Expression dieser Proteine also in Myc/Ras- und Ash2/Ras-Zellen verändert sein und somit den Transformationsprozess beeinflussen könnte, sollten diese beiden Zellarten aufgrund

von Gemeinsamkeiten und Unterschieden verglichen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Vergleich zunächst schwierig erscheint, da die drei Myc/Ras-Linien untereinander schon Differenzen aufweisen, doch es lassen sich Tendenzen erkennen: im Vergleich mit den REFs und den Myc/Ras-Linien-2 und -8 gibt es in den Ash2/Ras-Zellen eine höhere Expression von Zyklin D1 und p21 und eine niedrigere Expression von Zyklin D2 und Zyklin E (Abb. 3.20). Demnach ist bei den Ash2/Ras-Zellen im Vergleich mit den anderen transformierten Linien die Begünstigung des Zellzyklus aufgrund der hier untersuchten Proteine am wenigsten ausgeprägt.

Demzufolge unterscheiden sich die Myc/Ras- und den Ash2/Ras-Zellen in der Expression vieler Zellzyklus-relevanter und anderer Proteine. Wahrscheinlich erfolgt die Kooperation nicht auf den bekannten Myc-Zielgenen *p21* oder *zyklin D2*, da die Genprodukte in Ash2/Ras- und Myc/Ras-Zellen gegensätzlich exprimiert sind.

d) Wachstumsgeschwindigkeit:

Ash2/Ras Zellen wachsen langsamer als Myc/Ras- und E1A/Ras-Zellen

Das langsamere Wachstum der Ash2/Ras-Zellen könnte mit der Expression der Zellzyklus-regulierenden Proteine korrelieren, denn die Ash2/Ras-Zellen besitzen mehr p21-Protein als die Myc/Ras-Zellen (Abb. 3.19 und 3.20). Allerdings enthalten auch die E1A/Ras-Zellen viel p21 und wachsen trotzdem schneller als die Ash2/Ras-Zellen. Hier ist jedoch bekannt, dass E1A durch die Bindung an p21 dieses inaktiviert (Funk *et al.*, 1997). Ausserdem ist das p21 in den Ash2/Ras-Zellen möglicherweise inaktiv, denn die relativen Zyklin E-assoziierten und CDK2-Kinase-Aktivitäten sind in den Myc/Ras- und den Ash2-Ras-Zellen etwa gleich (Abb. 3.22). Die reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit in den Ash2/Ras-Zellen könnte zwar eine Folge der geringen Zyklin D2- und Zyklin E-Expression sein, doch auch die Myc/Ras-15-Linie enthält vergleichbar wenig Zyklin D2 und Zyklin E und wächst trotzdem schneller. Es ist bisher also unklar, ob das langsamere Wachstum der Ash2/Ras-Zellen auf eine veränderte Aktivität von Zellzyklus-regulierenden Proteinen zurückzuführen ist.

Es wäre weiterhin möglich, dass Ash2/Ras-Zellen eher in die Apoptose gehen als Myc/Ras-Zellen, doch FACS-Analysen zeigen, dass die Ash2/Ras-Linien weniger apoptotische Zellen enthalten als die Myc/Ras-Linien (Abb. 3.18).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ash2/Ras-Zellen in Kultur langsamer als die Myc/Ras-Zellen wachsen, aus bisher unbekanntem Grund.

Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der primären transformierten Ash2/Ras-Zellen und der induzierten Tumore

Ash2/Ras-925-Zellen bilden bereits nach fünf Tagen Tumore, 932-Zellen erst nach zehn Tagen, und die Tumor-abstammenden Linien von 925-Zellen enthalten mehr Ash2 als die von 932-Zellen (Abb. 3.14.B und 3.20). Somit könnte das schnellere Tumorstadium durch

die Ash/Ras-925-Zellen auf eine erhöhte Proteinmenge an Ash2 zurückzuführen sein. Allerdings ist die Ash2-Menge in der aus Foci isolierten transformierten 925-Linie niedriger als in der 932-Linie. Wie sich während der Tumorentwicklung das Verhältnis geändert hat, ist unklar.

Ebenso wie das Wachstum der Tumore, korreliert auch das Wachstum der primären transformierten Zellen in Kultur mit der Menge an Ash2, denn die Ash2/Ras-932-Linie enthält mehr Ash2 als die –925-Linie und wächst auch etwas schneller (Abb. 3.20 und 3.19).

Folglich kann postuliert werden, dass die Ash2-Menge mit der Wachstumsgeschwindigkeit korrelieren und das Wachstum positiv beeinflussen könnte.

Die Ash2-Proteinmenge ist in den Tumor-entstammenden Linien niedriger als in den primären transformierten Zellen (Abb. 3.20). Es wäre möglich, dass in den Tumorzellen einerseits nicht mehr so viel Ash2 benötigt wird, um die malignen Eigenschaften aufrechtzuerhalten, andererseits könnte sehr stark überexprimiertes Ash2 ebenso wie bei Myc Apoptose induzieren und somit einen Selektionsdruck zugunsten geringerer Ash2-Expression aufbauen. FACS-Analysen zeigten, dass die Ash2/Ras-Linien in Kultur viel weniger apoptotische Zellen enthielten als die Myc/Ras-Linien (Abb. 3.18). Somit ist bisher unklar, warum die Tumor-abstammenden Linien weniger Ash2 enthalten als die primär transformierten. Da postuliert wurde, dass die Ash2-Menge mit der Wachstumsgeschwindigkeit korreliert, wäre interessant, ob die Tumor-entstammenden Linien langsamer wachsen, was bisher unklar ist.

Zusammenfassend gibt es zwischen den Myc/Ras- und Ash2/Ras-vermittelten Transformationen zwar Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede: Im Gegensatz zu den Myc/Ras-Linien wachsen die Ash2/Ras-Zellen langsamer, tendieren zur Tetraploidie, und exprimieren unterschiedlich viel Zellzyklus-regulierende Proteine. Beiden Onkoproteinen gemeinsam ist, dass die transformierten Zellen unter Serummangel in die Apoptose gehen, wenn auch möglicherweise unterschiedlich stark.

Obwohl sich die Myc/Ras- und Ash2/Ras-Zellen unterscheiden, scheint die Myc/Ras-Transformation abhängig von der Ash2-Expression zu sein, was durch siRNA-Ash2 gezeigt wurde.

Es könnte also postuliert werden, dass Myc und Ash2 in bestimmten Punkten der Transformation zusammenarbeiten, aber auch voneinander unabhängige Funktionen ausüben, die sich auf die Eigenschaften der Zellen unterschiedlich auswirken können. Welche molekularen Mechanismen und Zielgene von Myc und Ash2 gemeinsam reguliert werden und so zur Transformation führen, ist unklar.

3) Welche Eigenschaften ermöglichen Ash2 zu transformieren?

Ash2 könnte auf verschiedene Weise transformieren: Zum einen könnte dies durch die Interaktion mit Myc geschehen, zum anderen über die Assoziation mit anderen bereits beschriebenen oder bisher unbekanntem Komplexen und Bindungspartnern. Ash2 könnte durch epigenetische Veränderungen transformieren, denn es ist mit einer unbekanntem H3-K9-spezifischen HMT und mehreren H3-K4-spezifischen HMTs assoziiert: HALR, ALR-1, hSet1, MLL1, MLL2 (Goo *et al.*, 2003; Wysocka *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2004; Yokoyama *et al.*, 2004; Abb. 3.5.B).

Um zu erkennen, wie Ash2 transformieren könnte, muss zunächst geklärt werden, welchen Effekt Ras in Zellen hat: Ras ist ein Proto-Onkoprotein, das äussere Signale, z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Mitogene, in zelluläre Antworten verwandelt, was durch die drei Effektoren Raf-Kinase, Rel und PI3K vermittelt wird. Ras kann als G-Protein GTP binden und hydrolysieren, was durch die Verankerung mithilfe von Adapter-Proteinen an die Membran geschieht. Durch die GTP-Hydrolyse wird Ras inaktiviert, so dass Mutationen in Ras, die diese GTP-Hydrolyse hemmen, z. B. Val-12, Ras konstitutiv (ständig) aktiv machen. In vielen Tumoren ist Ras auf diese Weise mutiert und aktiv (Macaluso *et al.*, 2002).

Ras alleine kann primäre Nagerzellen nicht transformieren, sondern kooperiert mit vielen anderen Proto-Onkoproteinen in der Transformation: z. B. mit Myc, dominant-negativem p53, Zyklin D1, D2 und E, CDK4, CDC25A und B, ODC, SV40 T-Antigen, E1A, E7 und dem Fehlen von p16 und p53 u.a. Die Überexpression von Ras führt zur Seneszenz (Altern) von primären Nagerzellen, was anscheinend nicht direkt abhängig vom Ras-Signalweg, sondern eine zelluläre Antwort auf die Ras-Überexpression ist (Serrano *et al.*, 1997).

Für die Transformation sind folgende Veränderungen in der Zellphysiologie essentiell: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Resistenz gegenüber Wachstums-hemmenden Signalen, Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose) und nicht-limitiertes replikatives Potenzial. Bei der Kooperation von Ash2 und Ras muss jeder Partner zu den Veränderungen in der Zellphysiologie auf komplementäre Weise beitragen. Einerseits macht Ras die Zellen durch die Aktivierung der Raf-Kinase-, Rel- und PI3K-Signalwege unabhängig von Wachstumssignalen. Ausserdem kann Ras die Apoptose inhibieren, denn überexprimiertes Myc induziert in primären Nagerzellen Apoptose, was durch die Ko-Expression von Ras aufgehoben wird. Zudem induziert Ras über seinen Effektor PI3K Survivin, einen Inhibitor apoptotischer Proteine, und Survivin-*antisense*-Konstrukte hemmen die Myc/Ras-abhängige Transformation, so dass postuliert wird, dass die Myc-induzierte Apoptose durch diesen Mechanismus durch Ras gehemmt werden kann (Sommer *et al.*, 2003).

Andererseits muss Ash2 zur Transformation mit komplementären Eigenschaften beitragen: Beispielsweise induziert die Ras-Überexpression Seneszenz, die durch einen Ras-

Kooperationspartner verhindert werden muss. Ash2 müsste demnach in der Lage sein, die Seneszenz zu hemmen und eine Resistenz gegenüber Wachstums-hemmenden Signalen zu entwickeln, die hauptsächlich durch einen defekten pRb-Weg verursacht wird.

Da der pRb-Weg u. a. durch Zykline, CDKs und CDK-Inhibitoren reguliert ist, wurde hier die Expression mancher dieser Proteine in den Ash2/Ras-Zellen untersucht (Abb. 3.20). Tatsächlich sind in den Ash2/Ras-Zellen im Vergleich zu den REFs Zyklin D1 hochreguliert, aber Zyklin D2 und E herunter und der CDK-Inhibitor p21 ist hochreguliert, so dass unklar ist, wie in den Ash2/Ras-Zellen der pRb-Weg inhibiert werden kann. In die Betrachtung der Expression der Zellzyklus-Proteine in den transformierten Zellen muss der Effekt von Ras eingeschlossen werden: Da Zyklin D1 und p21 durch Ras aktiviert werden, könnte die Zyklin D1- und p21-Überexpression in den Ash2/Ras-Zellen also ein Ras-Effekt sein (Macaluso *et al.*, 2002). Demzufolge ist noch nicht eindeutig, wie Ash2 die Seneszenz aufheben kann. Es ist möglich, dass Ash2/Ras einen positiven Einfluss auf den Zellzyklus mithilfe von Zellzyklus-Regulatoren ausübt, die hier nicht untersucht wurden.

Weiterhin müssen die primären Zellen zur Transformation immortalisiert werden. Beispielsweise ermöglicht die Überexpression der Telomerase oder der katalytischen Untereinheit TERT ein nicht-limitiertes replikatives Potenzial. Da viele Ras-kooperierende Onkoproteine im überexprimierten Zustand Immortalisierung induzieren und Ras zwar immortale Nagerzellen aber nicht primäre transformieren kann, wird vermutet, dass Ras-kooperierende Onkoproteine die Fähigkeit zu immortalisieren mitbringen müssen. Die Immortalisierung ist durch einen Erhalt der Telomere möglich, welche sich in normalen Zellen mit jeder Zellteilung verkürzen, was schliesslich zur Seneszenz führt. Myc kann z. B. immortalisieren, indem es das *TERT*-Gen aktiviert, das für die enzymatische Untereinheit der Telomerase kodiert, welches die Telomer-DNA wieder vervollständigt. Dementsprechend müsste auch Ash2 die Eigenschaft besitzen zu immortalisieren.

Zusammenfassend wird postuliert, dass Ash2 und Ras in der Transformation kooperieren, weil sie sich möglicherweise bei den verschiedenen Voraussetzungen für ein malignes Wachstum ergänzen: Ras fördert die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und wahrscheinlich auch das Umgehen der Apoptose, kann aber alleine die Zellen nicht immortalisieren und führt sie in die Seneszenz. Ash2 muss also die Zellen immortalisieren und der Ras-abhängige Seneszenz entgegenwirken, indem es für eine Resistenz gegenüber Wachstums-hemmenden Signalen sorgt.

p21 ist in Ash/Ras-Zellen überexprimiert

p21 ist eines der Proteine, durch die Ras Seneszenz auslösen kann. Noch ist umstritten, über welchen Weg Ras die Seneszenz induziert: über p53/p16 oder über p21. Einerseits wird postuliert, dass die Ras-überexprimierenden Zellen durch die Überexpression von p53

und p16 in die Seneszenz gehen (Serrano *et al.*, 1997). p53 induziert entweder Zellzyklus-Arrest oder Apoptose, abhängig von verschiedenen Faktoren, wobei auch p21 beteiligt sein könnte, da es durch p53 transkriptionell aktiviert ist. Andererseits führt die Überexpression des Ras-Effektors Raf zum Zellzyklus-Arrest, der abhängig von p21 ist (Woods *et al.*, 1997; Sewing *et al.*, 1997). Auch die Expression von onkogenem *ras* und *raf* führt zu einem p21-vermittelten Zellzyklus-Arrest in Fibroblasten, epithelialen Keratinozyten und primären Schwann-Zellen (Lloyd *et al.*, 1997; Ridley *et al.*, 1988). Ausserdem wird p21 durch Ras sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch durch Erhöhung der Proteinstabilität in Abhängigkeit von Zyklin D1 hochreguliert (Coleman *et al.*, 2003). Viele Ras-kooperierende Onkoproteine hemmen den p53/p16/pRb-Weg, z. B. T-Antigen, Zyklin D1, Tax, cdc25A und -B phosphatasen (die CDK2 aktivieren) und Myc (das die Expression von CDC25A und -B aktiviert) (Serrano *et al.*, 1997). Der p21-Weg wird u.a. inhibiert durch E1A, E7 und Her-2/neu (Westbrook *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001).

In den Ash2/Ras-Zellen ist die p21-Proteinmenge stark erhöht im Vergleich zu den REFs und den Myc/Ras-Zellen (Abb. 3.20). Da p21 in den E1A- und HPV16/Ras-Zellen genauso hoch wie in den Ash2/Ras-Zellen ist und es bisher unbekannt ist, dass E1A und HPV16 die Proteinmenge von p21 beeinflussen können, könnte davon ausgegangen werden, dass dieses erhöhte p21 eine Folge der Ras-Expression ist.

Da p21 ein CDK-Inhibitor ist, der Zellzyklus-Arrest und Seneszenz bewirkt, ist es zunächst unerwartet, dass es in E1A-, HPV16- und Ash2/Ras-transformierten Zellen überexprimiert ist. So ist z. B. in den Myc/Ras-Zellen p21 reduziert, da Myc die Transkription von p21 herunterreguliert. Daher muss p21 in den E1A-, HPV16- und Ash2/Ras-Zellen auf andere Weise inaktiviert sein, um die Seneszenz umgehen zu können.

p21 ist auch in Tumoren überexprimiert, z. B. manchmal in HCC (*hepatocellular carcinoma*) *Head-and-neck*-Karzinomen, Pankreas-Adenokarzinomen und Brust-Karzinomen (Qin *et al.* 1998; Erber *et al.*, 1997; Kern *et al.*, 1995). Alle diese Zellen müssen Mechanismen besitzen, die p21 inaktivieren. Daher ist die Frage, ob und wie Ash2 p21 inaktivieren kann, um so die Seneszenz zu verhindern.

Das überexprimierte p21 in den Ash2/Ras-Zellen hat keinen negativen Einfluss auf die Zyklin E-assoziierte und die CDK2-Kinase-Aktivitäten

Eine Möglichkeit herauszufinden, ob p21 in den Ash2/Ras-Zellen inaktiv ist, ist die Analyse der Zyklin E-assoziierten und CDK2-Kinase-Aktivitäten, denn p21 kann als CDK-Inhibitor Zyklin E/CDK2-Komplexe binden und inhibieren. Wenn p21 in den Ash2/Ras-Zellen überexprimiert ist, kann zunächst davon ausgegangen werden, dass es die Zyklin E/CDK2-Komplexe hemmt. Allerdings ist trotz hoher p21-Expression die Zyklin E-assoziierte und CDK2-Kinase-Aktivität in den Ash2/Ras-925- ähnlich hoch wie in den Myc/Ras-15-Zellen

(Abb. 3.22). Folglich kann postuliert werden, dass das überexprimierte p21 in den Ash2/Ras-Linien nicht in der Lage ist, Zyklin E und CDK2 zu inhibieren und auf irgendeine Weise inaktiviert sein muss. Über diesen bisher unbekanntem Mechanismus der p21-Inaktivierung könnte Ash2 der Ras-abhängigen Seneszenz entgegenwirken und zur Transformation beitragen.

Die Inaktivierung des überexprimierten p21 in den Ash2/Ras-Zellen erfolgt nicht durch die subzelluläre Lokalisierung

Die Inaktivierung von p21 erfolgt bei manchen Onkoproteinen durch eine zytoplasmatische Lokalisierung, denn die Induktion des Ras-Effektors Raf resultiert in einer nukleären Akkumulation von p21, was durch manche Onkoproteine wieder aufgehoben wird, z. B. durch E7 und Her-2/neu (Westbrook *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001). Dadurch wird verhindert, dass p21 Zyklin E/CDK2-Komplexe hemmen kann. In dieser Arbeit wurde die Lokalisation von p21 in Ash2/Ras-Zellen durch Immunfluoreszenz untersucht und als nukleär befunden (Abb. 3.21). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Ash2 nicht in der Lage ist, p21 aus dem Zellkern auszuschliessen und dadurch zu inaktivieren.

Andere Onkoproteine inaktivieren p21, indem sie es binden, z. B. E1A und Zyklin E (Funk *et al.*, 1997; Haas *et al.*, 1997). Eine Bindung von Ash2 an p21 in Ash2/Ras-Zellen wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Eine andere Möglichkeit ist, dass p21 nicht von den Onkoproteinen selbst, sondern von anderen durch das Onkoprotein aktivierte Proteine gebunden und somit gehemmt wird. Dies ist z. B. der Fall für Myc, das Zyklin D1 und D2 überexprimiert, die p21 und p27 sequestrieren (Perez-Roger *et al.*, 1999; Vlach *et al.*, 1996). Hier enthält die Myc/Ras-15-Linie allerdings sehr wenig Zyklin D2 im Vergleich zu den REFs und den anderen Myc/Ras-Linien und kann trotzdem transformieren. Bisher ist unklar, ob und welche Ash2-regulierte Proteine bei der p21-Inaktivierung eine Rolle spielen könnten.

In den Ash2/Ras-Zellen bindet mehr p21 an Zyklin D1 als in den Myc/Ras-Zellen

Eine Möglichkeit, wie p21 in den Ash2/Ras-Zellen inaktiviert werden könnte, wäre über die erhöhte Expression von Zyklin D1, denn tatsächlich bindet mehr Zyklin D1 an p21 im Vergleich zu den Myc/Ras-Zellen (Abb. 3.23). Es gibt zwei Möglichkeiten, die letzteres erklären können: Einerseits sind Zyklin D1 und p21 allein durch Ras überexprimiert und könnten dadurch mehr aneinander binden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, denn Ras kann durch die p21-Aktivierung Seneszenz induzieren, so dass p21 durch die Bindung an Zyklin D1 nicht inaktiviert werden sollte. In diesem Szenario wäre es wahrscheinlich, dass immer noch genügend p21 ungebunden vorliegt, das die Zyklin E/CDK2-Komplexe hemmen und die Seneszenz fördern kann. Zweitens könnte Ash2 die Zyklin D1-Expression erhöhen, so

dass dieses p21 sequestriert und verhindert, dass es Zyklin E/CDK2-Komplexe hemmt. Gegen die Rolle von Zyklin D an der Bindung und Inaktivierung von p21 spricht, dass die Zyklin D2-Expression in den Ash2/Ras-Zellen sehr niedrig ist, welches ebenfalls p21 binden und inaktivieren könnte, so dass nicht klar ist, ob die erhöhte Expression von Zyklin D1 das Fehlen von Zyklin D2 kompensieren kann.

Demzufolge ist unklar, wie das überexprimierte p21 in den Ash2/Ras-Zellen inaktiviert wird, aber wahrscheinlich geschieht dies nicht über den Export aus dem Nukleus. Eine Möglichkeit wäre über die Sequestrierung von p21 durch Proteine, die Ash2-abhängig überexprimiert sind, doch welche diese Proteine sind, ist offen.

Zusammenfassend kann Ash2 ebenso wie Myc mit Ras in der Transformation von REFs kooperieren. Ausserdem ist Ash2 wahrscheinlich für die Myc/Ras-abhängige Transformation notwendig, denn diese wird durch die Reduzierung von Ash2 durch siRNA-Oligos inhibiert. Beim Vergleich der Myc/Ras- und Ash2/Ras-transformierten Zellen fällt auf, dass sie sich in vielen Aspekten unterscheiden, z. B. wachsen die Ash2/Ras-Zellen langsamer, sind tetraploid und andere Zellzyklus-relevante Proteine, wie p21 und Zyklin D2 und E, sind dereguliert. Dies führt zu dem Postulat, dass Myc und Ash2 in bestimmten Punkten der Transformation zusammenarbeiten, aber auch durch voneinander unabhängige Eigenschaften die Zellphysiologie beeinflussen können. Die molekularen Mechanismen und Zielgene, die von Myc und Ash2 gemeinsam reguliert werden und so zur Transformation führen, sind unbekannt. Wahrscheinlich erfolgt die Kooperation nicht auf den Myc-Zielgenen p21 oder Zyklin D2, da die Genprodukte in Ash2/Ras- und Myc/Ras-Zellen gegensätzlich exprimiert sind.

Welche Eigenschaften von Ash2 zur Transformation mit Ras beitragen, ist bisher offen. Da überexprimiertes Ras nicht immortalisieren kann, sondern Seneszenz auslöst, muss die Überexpression von Ash2 vermutlich die Zellen immortalisieren und sie resistent gegen Wachstums-hemmende Signale machen. Diese Wachstums-hemmenden Signale werden u. a. durch p21 vermittelt, denn die Hochregulierung von p21 kann für die Ras-abhängige Seneszenz notwendig sein, so dass es für die Transformation inaktiviert werden muss, was in Myc/Ras-Zellen durch die Genrepression erfolgt.

Im Gegensatz zu Myc/Ras-Zellen ist p21 in den Ash2/Ras-Zellen überexprimiert und muss dort auf anderem Wege inaktiviert sein. Dass p21 in den Ash2/Ras-Zellen inaktiv ist, schlägt die Beobachtung vor, dass die Zyklin E-assoziierten und CDK2-Kinase-Aktivitäten anscheinend unbeeinflusst von der p21-Überexpression sind. p21 wird in den Ash2/Ras-Zellen anscheinend nicht inaktiviert, indem es aus dem Nukleus transportiert wird, sondern durch bisher unbekannte Mechanismen, die letztendlich zur Transformation beitragen können.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Allgemeine 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.

5.1.2 Vektoren

Klonierungsvektoren:

pT7T3-Ash2:	Der Vektor wurde beim RZPD in Berlin bestellt und enthält den EST-Klon N32725, der die Basenpaare 257 bis 2361 der humanen Ash2 cDNA umfaßt. Um einen vollständiges cDNA-Konstrukt von Ash2 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 (Dissertation von Dr. Vervoorts).
pT7T3-Ash2-HA:	In pT7T3-Ash2 wurde am C-Terminus der Ash2-cDNA in die Nco I- und Not I-Schnittstellen ein Oligonukleotid, das für ein Hämagglutinin-Epitop kodiert, eingeführt.

Eukaryotische Expressionsvektoren:

pcDNA3:	eukaryotisches Expressionsplasmid unter der Kontrolle des CMV-Promotors; 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 einen T7-Promotor (Invitrogen).
pcDNA3Flag:	Das Oligo 5'-GGTACCGCCACCATGGACTACAAGG-ATGATGATGATAAGGGATCC wurde mit Kpn I und BamH I geschnitten und in den Kpn I und BamH I geschnittenen Vektor pcDNA3 ligiert.
pEQ176:	Der frühe (immediate early) Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor exprimiert konstitutiv die b-Galactosidase in eukaryontischen Zellen. Außerdem trägt der Vektor Replikationsursprungs-Sequenzen (origin of replication) für bakterielle (von pBR322) und eukaryontische Zellen (von SV40) und kodiert für Ampizillinresistenz. (Firzlaff et al., 1991)
pEQ176P2:	Durch Restriktionsverdau von pEQ176 mit Pvu II und Religation des verbliebenen Vektors wurde ein Großteil der b-Galactosidase-cDNA entfernt. (Firzlaff et al., 1991)
pcDNA3Flag-Ash2:	Ein EcoR I/Not I-Fragment aus pT7T3-Ash2 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. Schreek).
pEQ176P2-Ash2:	Ein EcoRI/BamHI Fragment aus pCB6+-Ash2 wurde in die HindIII/BglIII Schnittstellen von pEQ176P2 kloniert (J. Vervoorts).
pEQ176P2-Ash2-HA	Ash2 wurde aus pCB6+-Ash2 mit EcoR I und BamH I geschnitten und in das mit Hind III und Bgl II geschnittene Plasmid pEQ176P2 ligiert (J. Lüscher-Firzlaff).

pEQ176P2-Ash2-N395-HA	Die Oligos 5'-GATCTCATAACCCCTTATGACGTCCCCGATTACGCCAGCC-TGTGACTC und 5'- AGTATGGGAATACTGCAGGGGCTAATGC-GGTCCGACACTGAGCT mit dem HA-Tag wurden hybridisiert, mit Bgl II und Xho I geschnitten und in das mit Bgl II und Xho I geschnittene Plasmid pEQ176P2-ASH2 ligiert (J. Vervoorts).
pEQ172P2-Ash2(1-160/280-626)-HA:	Ein Ash2-Fragment wurde mit Xag I und Bgl II aus dem Plasmid PT7T3-Ash2(1-160/280-626) geschnitten und in Xag I und Bgl II geschnittenes pEQ176P2-Ash2-HA ligiert (J. Lüscher-Firzlaff).
pEQ176P2-Ash2(1-17/160-626)-HA:	Das Plasmid pEQ176P2-Ash2-HA wurde mit EcoN I und Bspe I geschnitten und nach einer Polymerase I- bzw. Klenow-Behandlung religiert (J. Lüscher-Firzlaff).
pEQ176P2-Ash2(1-17/160-395)-HA	Das Plasmid pEQ176P2-Ash2-N395-HA wurde mit EcoN I und Bspe I geschnitten und nach einer Polymerase I- bzw. Klenow-Behandlung religiert (J. Lüscher-Firzlaff).
pCMV2N3T-Suv39H1, pCMV2N3T-Suv39H1(1-332):	Suv39H1 wurde in den Vektor pCMV-2N3T kloniert. 1-332 wurde durch PCR hergestellt und durch Sequenzierung überprüft. Der Vektor hat 3 HA-Tags und 3 Myc-Tags. Die Vektoren wurden von D. Trouche, Frankreich zur Verfügung gestellt (Vandel <i>et al.</i> , 2001)
pcDNA3Flag-Myc:	Ein BamH I/Bgl II-Fragment aus BJ-Myc3-wt (B. Amati) wurde in die BamH I-Schnittstelle von pcDNA3-Flag kloniert (J. Vervoorts).
pcDNA3Flag-Myc-dLZ:	Myc-dLZ wurde aus pRC/CMV-Myc-dL Z(von L. Kretzner) geschnitten und in pcDNA3Flag-Myc kloniert (M. Austen und S. Schreek)
pcDNA3Flag-Myc-N, pcDNA3Flag-Myc-d147, pcDNA3Flag-Myc-d177, pcDNA3Flag-Myc-d6:	Myc-Fragmente wurde mit Kpn I und Xho I aus pSVFlag-Myc-N,-d147,-d177 oder -d6 geschnitten und in pcDNA3Flag ligiert. d6=d103-263 (J. Vervoorts)
pcDNA3Flag-EMT:	EMT wurde in pcDNA3Flag kloniert, Das Plasmid wurde von A. Lund, M. van Lohuizen, Amsterdam zur Verfügung gestellt von.
pCGN-Myc, pCGN-Myc-dN3, -dN4, -dN5, -dC1, -dC2, -dC3:	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. Von Myc wurden N-terminale und C-terminale Deletionen hergestellt. Das Plasmid wurde von W. P. Tansey zur Verfügung gestellt. (Salghetti <i>et al.</i> , 1999)
pcDNA3Flag-Myc(d265-329), -(d265-367), -(d319-341):	Myc-Fragmente in pSP56SV40-Myc(d265-329), -(d265-367), -(d319-341) von Stone <i>et al.</i> , 1987 wurden mit Cla I und EcoR I geschnitten und in den Cla I und EcoR I geschnittenen Vektor pcDNA3Flag ligiert. (J. Vervoorts)
pSuper-Ash2/370:	Die Oligos 5'- GATCCCCTGGTTCACGGCTGACACATTTCAAGAGAATG-TGTCAGCCGTGAACCA und 5'- AGCTTTTCCAAAATGGTTCACGGCTGACACATTCT-CTTGAAATGTGTCAGCCGTGAACCAGG wurden hybridisiert, mit Hind III und Bgl II geschnitten und in den mit Hind III und Bgl II geschnittenen Vektor pSUPER-DUPER ligiert (J. Lüscher-Firzlaff).

Bakterielle Expressionsvektoren:

pGEX-2T, pGEX-3T, pGEX-2TK, pGEX-4T:	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
pGEX-Ash2:	Ein EcoR I/Not I-Fragment wurde aus pT7T3-hASH2 in pGEX-4T3

	kloniert (S. Schreek).
pGEX-Myc-N262, -C176:	stammen aus dem Labor von R. Eisenmann.
pMal-Pre:	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. (Kitaura <i>et al.</i> , 2000)
pMal-Pre-c-Myc:	Die c-Myc cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Sal I in pMal-Pre kloniert. (Kitaura <i>et al.</i> , 2000)
pGEX-H3-N, -4R, -9R, -27R, -NT, -N4, -N4, -N9, -N27	Histon H3 wurde mit EcoR I und Sal I geschnitten und in pGEX4T3 ligiert. Diese Plasmide wurde von Shinkai zur Verfügung gestellt (Tachibana <i>et al.</i> , 2001). NT=4R, 9R, 27R; N4= 9R, 27R; N9= 4R, 27R; N27= 4R, 9R
pGEX-YY1	YY1 wurde aus pYblue geschnitten und in pGEX2T ligiert (J. Lüscher-Firzlaff).

5.1.3 Antikörper

α -Ash2 (4B5, 4C5):	Monoklonale Antikörper aus der Ratte gegen GST-hASH (E. Kremmer).
α -Ash2 (547, 548):	Polyklonale Seren aus dem Kaninchen gegen GST-hASH2. Vom Serum 548 wurden die Blutabnahmen 2, 3 und 4 vereinigt und nach Ammoniumsulfatfällung affinitätsgereinigt.
α -Flag (M2):	monoklonale IgG1-Antikörper aus der Maus gegen das synthetische Flag-Peptid (Sigma).
α -HA (3F10):	Monoklonale Antikörper aus der Ratte, erkennt die Aminosäuren 98-108 in Hämagglutinin des Influenza-Virus (E. Kremmer).
α -Mad1 (5F4):	Monoklonale Antikörper aus der Ratte gegen humanes Mad1 (E. Kremmer).
α -c-Myc (4H3, 6A10):	Monoklonale Antikörper aus der Ratte (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.
α -c-Myc (N-262):	Affinitäts-gereinigtes Serum aus dem Kaninchen gegen die Aminosäuren 1 bis 262 von humanem c-Myc (Santa Cruz).
α -Caspase 5:	Polyklonales Serum aus dem Kaninchen gegen Caspase 5
α -Zyklin A (C-19):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen Zyklin A (Santa Cruz)
α -Zyklin D1 (7213G):	Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen Zyklin D1 (Santa Cruz)
α -Zyklin D2 (M-20):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen Zyklin D2 (Santa Cruz)
α -Zyklin D3 (C-16):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen Zyklin D3 (Santa Cruz)
α -Zyklin E (M-20):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen Zyklin E (Santa Cruz)
α -CDK2 (D-12):	Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen CDK2 (Santa Cruz)
α -CDK4 (C-22):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen CDK4 (Santa Cruz)
α -p21 (C-19):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen p21 (Santa Cruz)
α -p21 (M-19):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen p21 (Santa Cruz)
α -pRb (C-15):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen pRb (Santa Cruz)

α -p107 (C-18):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen p107 (Santa Cruz)
α -p130 (C-20):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen p130 (Santa Cruz)
α -PCNA (PC10):	Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen PCNA (Santa Cruz)
α -ODC:	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen ODC (Jsomaa <i>et al.</i> , 1983)
α -Bax (N-20):	Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen Bax (Santa Cruz)
α -Bcl-2 (C-2):	Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen Bcl-2 (Santa Cruz)
α -PTEN (A2B1):	Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen PTEN (Santa Cruz)

5.1.4 Material für die Arbeit mit Bakterien

Agar-Platten:	LB-Medium 1,5 % (w/v) Bacto-Agar (Difco) 100 mg/ml Ampicillin
LB-Medium:	1 % (w/v) Trypton (AppliChem) 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (AppliChem) 1 % (w/v) NaCl pH 7

5.1.5 Bakterienstämme

XL10 gold:	TetrD (mcrA)183, D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44 thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]a
BL21(DE)pLysS:	BL21(DE)pLysS:
BL21(DE)pLysS:	F-, ompT, hsdSB, (rB-, mB-), dcm, gal λ (DE3), pLysS(Cmr)

5.1.6 Materialien für die 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 μ g/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 EinfriergefäÙe (Nalgene)	

5.1.7 Eukaryotische Zellen

293:	Mit Adenovirus Type 5 (Ad 5)-DNA transformierte embryonale Nieren-Zelllinie (ATCC CRL-1573)
HeLa:	Epheloide Zelllinie, isoliert aus einem menschliche Cervix-

	Karzinom (ATCC CCL-2)
HL-60:	Humane promyelozytäre Leukämie-Zelllinie (ATCC CCL-240)
U-937:	humane monozytäre Lymphom-Zelllinie (ATCC CRL-1593.2)
Jurkat:	humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie (ATCC ACC-282)
REF:	primäre Rattenfibroblasten, präpariert aus 14,5 Tage alten Embryonen von Fischer-Ratten
RECP53val135/ras-3:	mit Ha-ras(val12) und p53(val135) transformierte REFs; REC-Nummer: 189; alte Klonnummer: 111, neue Klonnummer: 3; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECP53val135/ras-1:	mit Ha-ras(val12) und p53(val135) transformierte REFs; neue Klonnummer: 1; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECP53val135/ras-9:	mit Ha-ras(val12) und p53(val135) transformierte REFs; neue Klonnummer: 9; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECmyc/ras-2:	mit Ha-ras(val12) und myc transformierte REFs; REC-Nummer: 411; alte Klonnummer: 141; neue Klonnummer: 2; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECmyc/ras-8:	mit Ha-ras(val12) und myc transformierte REFs; REC-Nummer: o239; alte Klonnummer: 1112; neue Klonnummer: 8; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECmyc/ras-15:	mit Ha-ras(val12) und myc transformierte REFs; REC-Nummer: o89; alte Klonnummer: 222; neue Klonnummer: 15; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECAsh2/ras-925:	mit Ha-ras(val12) und ash2 transformierte REFs; REC-Nummer: 310B; Klonnummer: 925; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECAsh2/ras-932:	mit Ha-ras(val12) und ash2 transformierte REFs; REC-Nummer: ??; Klonnummer: 932; ist Neomycin (G418)-resistent (200 ug G418/ml Kulturmedium)
RECAsh2/ras-TD1-925:	mit Ha-ras(val12) und ash2 transformierte REFs; Ash2/Ras-transformierte Zellen mit der Klonnummer 925 bildeten in Ratten Tumore, aus denen, diese Zellen isoliert wurden.
RECAsh2/ras-TD2-932:	mit Ha-ras(val12) und ash2 transformierte REFs; Ash2/Ras-transformierte Zellen mit der Klonnummer 932 bildeten in Ratten Tumore, aus denen, diese Zellen isoliert wurden.
RECAsh2/ras-TD3-932:	mit Ha-ras(val12) und ash2 transformierte REFs; Ash2/Ras-transformierte Zellen mit der Klonnummer 932 bildeten in Ratten Tumore, aus denen, diese Zellen isoliert wurden.
Tig3 LO3273:	Primäre humane diploide Fibroblasten
Tig3: LO923:	Primäre humane diploide Fibroblasten-Linie, die mit TERT immortalisiert sind und den ecotropen Rezeptor für die Infektion mit MLV-basierten Vektoren exprimiert.

Kulturbedingungen

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

Alle transformierten Linien, Tig3, 293, DMEM mit 10 % (v/v) FCS

REFs:

HL-60, Jurkat:

RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS

Hela:

DMEM mit 10 % (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin

5.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

5.2.1 Transformation

In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 80 µl frisch aufgetaute transformations-kompetente Bakterien mit 1 µl DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert, diese anschließend für 47 Sekunden bei 42 °C hitzebehandelt und für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl LB-Medium und Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C auf einem Rotationsgerät, wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf Amp-LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Lösung 1:	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris-HCl, pH 8 Bei 4 °C gelagert
Lösung 2:	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS Frisch angesetzt
Lösung 3:	3 M Kaliumacetat, pH 4,8 5 M Eisessig Bei 4 °C gelagert
TE:	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 mM EDTA

1 mg/ml RNase

In kleinem Maßstab:

1 ml einer Bakterienkultur in LB-Ampicillin-Medium wurde für 30 Sekunden bei 13.000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, in 200 µl Lösung 1 resuspendiert, durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert und nach Zugabe von 200 µl Lösung 3 für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 15000 UpM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand mit 600 µl Isopropanol für 15 Minuten gefällt und für 20 Minuten abzentrifugiert. Das DANN-Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl TE aufgenommen. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNase eines 1 mg/ml-Stocks für 10 Minuten bei 37 °C verdaut.

In grossem Maßstab:

Plasmide aus 200 ml Bakterienkultur in LB-Medium wurden über Maxi-Säulen von Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt. Dabei entspricht 1 OD bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml. Der Quotient aus der OD bei 260 nm und 280 nm sollte bei 1,8 liegen.

5.2.3 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-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
-----------	--

5.3 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen (Zellkultur)

5.3.1 Kryokonservierung

Zum Einfrieren wurden Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert, 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 bei -150°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen für 5 Minuten in einem 37°C-Wasserbad inkubiert, mit 10 ml Medium gewaschen und in die entsprechenden Gefäße mit frischem Medium überführt.

5.3.2 Transiente Transfektion

2 x Hebs-Puffer

274 mM NaCl
42 mM HEPES
9,6 mM KCl
1,5 mM Na₂HPO₄
pH 7,1

HEPES-Puffer

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

250 mM CaCl₂

Die transiente Transfektion adhärenter Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode (Chen und Okayama, 1988; Bousset et al., 1994). Dabei ko-präzipitiert die DNA in einem Komplex mit Calcium-Phosphat und wird von den Zellen vermutlich über Endozytose aufgenommen und im Zellkern extrachromosomal transkribiert.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 1,5 x 10⁵ pro 6 cm bzw. 8 x 10⁵ 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. Es wurden im Allg. 20 µg DNA auf eine 10 cm-, 8 µg auf eine 6 cm-Schale transfiziert. Die DNA für 6 cm Schalen wurde in 200 µl (500 µl für 10 cm Schalen) 2x CaCl₂ aufgenommen. Unmittelbar vor der Transfektion wurde 200 µl (500 µl) Hebs-Puffer tropfenweise unter Schütteln innerhalb 10-15 Sekunden 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.

5.3.3 FACS-Analyse

80 % Ethanol

Bei -20°C gelagert

20 µg/ml RNase (DNase-frei)

1 mg/ml Propidium-Jodid

Bereits in Lösung von Sigma-Aldrich

Die Zellen wurden auf 10 cm-Schalen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag etwa 80% konfluent waren. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium in einem 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, das ebenfalls in das Röhrchen überführt wurde. Die Zellen wurden für 8 Minuten trypsinisiert und dies auch in das Röhrchen pipettiert. Die Zell-Lösung wurde 8 Sekunden gevortext und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Etwa 2-6 Millionen Zellen wurden bei 1500 Upm einer Tischzentrifuge für 5 Minuten

abzentrifugiert, mit 10 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert, in 500 µl PBS resuspendiert und in 14 ml-Polypropylen-Röhrchen (Snap-caps) überführt. Dann wurden die Zellen tropfenweise unter Vortexen mit 7,5 ml 80%-igem Ethanol fixiert. Sie wurden mindestens über Nacht, maximal 14 Tage bei -20°C gelagert.

Dann wurden die Zellen bei 2400 UpM (etwa 3900 g) für 5 Minuten zentrifugiert und ein bis zwei Mal mit 5 ml-eiskaltem PBS gewaschen, das durch Dekantieren entfernt wurde. Zu dem Zell-Pellet wurden 200 µl Rnase gegeben, dies wurde gevortext und 5 Minuten inkubiert. Propidium-Jodid wurde 1:20 mit PBS verdünnt und davon 400 µl zu den Zellen gegeben (finale Konzentration: 50 µg/ml). Dies wurde mindestens 30 Minuten, maximal über Nacht im Dunkeln inkubiert. Die FACS-Messung erfolgt auf einem FACS-Gerät von Beckton Dickinson und wurde mit der Software Cell Quest analysiert.

5.3.4 Karyotyp-Analyse

Fixativ:

60 ml Methanol
20 ml Eisessig
Frisch hergestellt und bei -20°C vorgekühlt

0,05 M KCl

Kurz vorher auf 37°C vorgewärmt

10 µg/ml Colcemid

Sörensen Phosphat-Puffer, pH 6,8:

Stammlösung A: 0,9 % (w/v) KH_2PO_4 :
Stammlösung B: 0,12 % (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
49,2 ml Stammlösung B mit Stammlösung A auf 100 ml aufgefüllt

Giemsa

Stammlösung von Merck

Giemsa-Färbelösung

3% (v/v) Giemsa in Sörensen Phosphat-Puffer, pH 6,8

Die Zellen wurden auf eine 6 cm-Platte mit 4 ml Kulturmedium ausgesät. Am nächsten Tag wurde 2 ml Kulturmedium dazugegeben. Am darauffolgenden Tag wurde zu den Zellen 150 µl Colcemid gegeben und 3 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen trypsinisiert und für 10 Minuten bei 1000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 13 ml angewärmtem KCl resuspendiert und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde 13 ml kaltes Fixativ unter Schwenken tropfenweise untergemischt, alles für 30 Minuten auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 10 ml Fixativ resuspendiert und dieses erneut zentrifugiert. Insgesamt wurde sieben Mal mit dem Fixativ gewaschen. Die Zellen werden auf Objektträger getropft und getrocknet, für 5 Minuten mit der Giemsa-Färbelösung gefärbt und unter dem Mikroskop analysiert.

5.4 Arbeiten mit DNA

5.4.1 Enzymatische Modifizierung von DNA

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

5.4.2 Elektrophorese von DNA und Extraktion aus Agarose-Gelen

10 x DNA-Ladepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM EDTA
50 % (v/v) Glycerin
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol

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 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch in 0,5-1,5 %-igen Agarose-Gelen mit TBE als Laufpuffer aufgetrennt. Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des JETsorb-Kits nach Angaben des Herstellers.

5.5 Proteinchemische Methoden

5.5.1 Präparation von Zelllysaten

Frackelton-Puffer (F-Puffer): 20 mM HEPES, pH 7,05
50 mM NaCl
30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
0,2 % (v/v) Triton X-100
50 mM NaF
5 μM ZnCl_2
10 % Glycerol
5 U/ml α -Makroglobulin
2,5 U/ml Pepstatin A
2,5 U/ml Leupeptin
0,15 mM Benzamidin

Die Zellen wurden im Allg. mit einer Konzentration von 2,5 bis 5×10^7 Zellen pro ml F-Puffer lysiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert, von der Platte geschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten bei 4°C und 13.000 UpM (16.200 g) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder sofort weiter eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

5.5.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

2 x SDS-Probenpuffer: 160 mM 1 M Tris, pH 6,8
20 % (v/v) Glycerol
10% (w/v) SDS
0,25% (w/v) BPB
100 mM b-Mercaptoethanol

4 x SDS-Probenpuffer: 320 mM 1 M Tris, pH 6,8
40 % (v/v) Glycerol
8 % (w/v) SDS
0,5 % (w/v) BPB
200 mM b-Mercaptoethanol

Laufpuffer: 50 mM Tris-Base
380 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

Längenmarker: „prestrained protein ladder“, ca. 10-180 kDa,
von MBI-Fermentas (#SM0671)

Für die denaturierende Auftrennung von Proteingemischen wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine ein 12,5 bis 20%-iges Polyacrylamidgele mit einem 5%-igen Sammelgel gegossen. Die Proteine wurden 1:2 oder 1:4 in 2 x bzw. 4 x SDS-Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95 °C erhitzt und auf das Gel geladen.

5.5.3 Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau

Fixierungs-Lösung: 25 % Isopropanol
10 % Eisessig

Rapid-Coomassie-Färbe-Lösung: 10 % Eisessig
0,006 % Coomassie brilliant blue G-250
(Biorad)

Amplify Von Amersham Biosciences (Code Nummer:
NAMP100)

Zur Detektion von Proteinen nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele eine Stunde in Fixierungs-Lösung geschwenkt, danach eine Stunde bis über Nacht mit der Rapid-Coomassie-Färbe-Lösung gefärbt und mit Wasser entfärbt. Dann wurden die Gele auf ein Whatman-Papier überführt, mit Haushalts-Folie bedeckt und für 1,5 Stunden bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Wenn die Gele Schwefel- oder Tritium-markierte Proteine enthielten, wurden sie zwischen Färben und Trocknen für 30 Minuten in Amplify geschwenkt. Radioaktive Gele wurden auf einen Film gelegt und bei -80 °C für unterschiedliche Zeit inkubiert.

5.5.4 Western-Blot

10 x Semi-Dry-Puffer: 250 mM Tris-Base,
1,92 M Glycine
pH 8,3 bis 8,8

1 x Semi-Dry-Puffer: 10 x Semi-Dry-Puffer
20 % Methanol
Frisch angesetzt

Waschpuffer: PBS
0,05 % (v/v) Tween-20

Blockpuffer: PBS
0,05 % (v/v) Tween-20
5 % (w/v) Magermilchpulver

0,2 % Ponceau S in 3 % TCA

Im Prinzip wurden Zelllysate über ein SDS-Polyacrylamid-Gel 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 ein fluoreszierendes Signal aussendet, welches mittels eines Filmes oder mit einem automatischen Kamera-assoziierten Chemi-Dokumentations-System autoradiographisch detektiert werden kann.

Aus dem Polyacrylamidgel wurde ein Streifen mit dem zu detektierenden Protein ausgeschnitten und in 1 x Semi-Dry-Puffer getränkt. Gleichzeitig wurden zwei Whatman-Papiere und eine Nitrozellulose-Membran der Größe des Gelstreifens in 1 x Semi-Dry-Puffer getränkt. Alles wurde auf die Blot-Apparatur blasenfrei in Schichten folgendermassen gelegt: auf die negative Kathode folgt ein Whatman-Papier, das Gel, die Membran und das zweite Whatman-Papier. Die Blotapparatur wurde mit der positiven Anoden-Platte verschlossen und die Proteine aus dem Gel wurden bei 2 mA pro cm² für 1 Stunde auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose-Membran für 1 Stunde in Blockpuffer abgesättigt, bevor sie mit einem entsprechenden Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen und für 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Für die Detektion mit dem ECL-Kit (Pierce, Pico) wurde die Membran erneut 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Inkubation der Membran für 1 Minute in ECL-Lösung und anschließender Belichtung mit einem Fuji RX-Film oder mit einem automatischen Kamera-assoziierten Chemi-Dokumentations-System für 10 Sekunden bis 30 Minuten.

Die Proteine auf der Membran wurden reversibel mit Ponceau S vor dem Blockieren für 5 min gefärbt und durch Wasser wieder entfärbt.

5.5.5 Nachweis von Proteinen in der Immunfluoreszenz

4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS

0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS

20 % Pferde-Serum in PBS

Moviol 4-88 (Hoechst) mit Isopropylgallat

1 mg/ml Hoechst 33258 in PBS,

Um Proteine über Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden am Boden von Zellkulturschalen runde Deckgläser mit 12 oder 18 mm Durchmesser platziert, die zuvor durch Einlegen in Ethanol entfettet und anschließend hitzesterilisiert worden waren. Dann wurden Zellen ausgesät, die entweder wie üblich transfiziert oder am nächsten Tag direkt behandelt wurden. Die Deckgläser wurden je in ein Loch einer 12-Loch-Platte überführt, einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit Paraformaldehyd zur Fixierung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen und dann 5 Minuten mit Triton X-100 permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen. Die Antikörper wurden mit Pferde-Serum verdünnt zu einem finalen Volumen von 30 ul (für 12 mm-Deckgläser) bzw. 60 ul (für 18 mm-Deckgläser). Auf den Deckel der 12-Loch-Platte wurde Parafilm festgedrückt, darauf die Antikörper-Lösung pipettiert und darauf die Deckgläser mit den Zellen nach unten gelegt. Dies wurde in eine verschliessbare Plastikdose, die mit feuchten Papier-Tüchern ausgelegt war, überführt, und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Deckgläser mit den Zellen nach oben wieder in die 12-Loch-Platte überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Die zweiten Antikörper wurden ebenfalls in Pferde-Serum verdünnt, auf Parafilm pipettiert und mit den Deckgläsern nach unten bedeckt. Dies wurde in der feuchten Dose für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, die Deckgläser wurden dreimal gewaschen und mit Hoechst 33258, das mit PBS 1:1000 verdünnt wurde, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Auf Objektträger wurden 3 ul (12 mm) bzw. 6 ul (18 mm) Moviol pipettiert und darauf die Deckgläser mit den Zellen nach unten gelegt. Das Betrachten und Fotografieren erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX50 und der Software AnalySIS.

5.5.6 Immunpräzipitation (IP)

Protein A- oder G- Sepharose „4 fast flow“ (Amersham Pharmacia) (auch beads genannt) wurden in PBS gequollen, mehrfach mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,1% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert. Die Protein A-Sepharose wurde für die IP mit polyklonalen Antikörpern, die Protein G-Sepharose für monoklonale Antikörper eingesetzt.

Die spezifischen Antikörper, 10-20 µl Sepharose und das Zelllysate wurden 1 Stunde bei 4°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf einem Über-Kopf-Rotierer inkubiert. Die Sepharose wurde zweimal mit Frackelton-Puffer gewaschen. Die beads wurden für HMT- oder Kinase-Assays oder Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IPs) weiterverwendet. Für die Ko-IPs wurden die Proteine an den beads in 2 x oder 4 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot detektiert.

5.5.7 Gekoppelte *in vitro*-Transkription/-Translation

In vitro translatierte und [³⁵S]-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 durch das Auflegen eines Films detektiert.

5.5.8 *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 Minuten bei 4°C inkubiert. Die an die Gluthation-Agarose gebundenen Protein-Komplexe wurden dreimal mit Bindungspuffer gewaschen und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, im Gel fixiert (30 Minuten in 40% Ethanol/10% Essigsäure), in Amplify-Lösung für 30 min inkubiert, getrocknet und durch Auflegen eines Films autoradiographisch nachgewiesen.

5.5.9 Kinase-Assays

Kinase-Puffer: 50 mM HEPES, pH 7,5
10 mM MgCl₂
1 mM DTT (frisch zugesetzt)
2,5 mM EGTA
10 mM β-Glycerophosphat

γ-ATP-[³²P] NEN (NEG002H), 10 mCi/ml

Der Kinase-Assay wurde im Anschluß an eine Immunpräzipitation von Zyklin E (M-20) oder CDK2 (D-12) aus Zelllysaten durchgeführt. Die beads zweimal mit F-Puffer und einmal mit Kinase-Puffer gewaschen. Die Kinase-Reaktion erfolgte in Kinase-Puffer (finales Volumen: 25µl) unter Zugabe von 1 mM kaltem ATP, 10 µCi γ-ATP [³²P] und 5 µg Histon H1 bei 30°C für 30 min. Die Reaktion wurde direkt durch Zugabe von 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt und 5min bei 95°C inkubiert. Die phosphorylierten Proteine im Überstand wurden im 20 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Lauffront mit freiem ATP wurde abgetrennt und

entsorgt, das restliche Gel zunächst 30 Minuten in Fixierungs-Lösung geschwenkt, dann getrocknet und für die Autoradiographie auf einen Film gelegt, der nach einer Inkubation bei -80°C entwickelt wurde.

5.5.10 HMT-Assays

S-Adenosyl-Methionin (SAM)- $[\text{}^3\text{H}]$

0,55 mCi/ml; 20,35 mBq/ml Perkin Elmer,
NET-155H, 79,8 Ci/mmol

Etwa 3×10^7 Zellen wurden in Frackelton-Puffer mit einer Konzentration von 5×10^7 Zellen pro ml lysiert. Nach einer Immunpräzipitation (5.5.6) wurde zu den beads 1,5 μl SAM- $[\text{}^3\text{H}]$, 5 μg Histone oder GST-Histon H3-N-terminale Arme gegeben und dies zu einem End-Volumen von 30 μl mit Frackelton-Puffer (5.5.1) aufgefüllt. Dies wurde für 30 Minuten bei 30°C unter horizontalem Schütteln inkubiert, mit 4 x SDS-Probenpuffer (5.5.2) abgestoppt und bei -20°C gelagert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aasland, R., Gibson, T.J. and Stewart, A.F. (1995) The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, **20**, 56-59.
- Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J. and Revel, M. (1997) A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *Embo J*, **16**, 260-266.
- Adamson, A.L. and Shearn, A. (1996) Molecular genetic analysis of Drosophila ash2, a member of the trithorax group required for imaginal disc pattern formation. *Genetics*, **144**, 621-633.
- Amati, B., Frank, S.R., Donjerkovic, D. and Taubert, S. (2001) Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta*, **1471**, M135-145.
- Angulo, M., Corominas, M. and Serras, F. (2004) Activation and repression activities of ash2 in Drosophila wing imaginal discs. *Development*, **131**, 4943-4953.
- Austen, M., Cerni, C., Luscher-Firzlaff, J.M. and Luscher, B. (1998) YY1 can inhibit c-Myc function through a mechanism requiring DNA binding of YY1 but neither its transactivation domain nor direct interaction with c-Myc. *Oncogene*, **17**, 511-520.
- Bannister, A.J., Schneider, R. and Kouzarides, T. (2002) Histone methylation: dynamic or static? *Cell*, **109**, 801-806.
- Bao, J. and Zervos, A.S. (1996) Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene*, **12**, 2171-2176.
- Bedford, M.T., Frankel, A., Yaffe, M.B., Clarke, S., Leder, P. and Richard, S. (2000) Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J Biol Chem*, **275**, 16030-16036.
- Beijersbergen, R.L., Hijmans, E.M., Zhu, L. and 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.
- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. and Sauer, F. (2002) Histone methylation by the Drosophila epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*, **419**, 857-862.
- Blackwood, E.M. and Eisenman, R.N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*, **251**, 1211-1217.
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M. and 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**, 2042-2047.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R.H. and Eilers, M. (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *Embo J*, **23**, 2830-2840.
- Bouck, N., Stellmach, V. and Hsu, S.C. (1996) How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*, **69**, 135-174.
- Byvoet, P., Shepherd, G.R., Hardin, J.M. and Noland, B.J. (1972) The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, **148**, 558-567.
- Caldas, C. and Aparicio, S. (1999) Cell memory and cancer--the story of the trithorax and Polycomb group genes. *Cancer Metastasis Rev*, **18**, 313-329.
- Cao, R. and Zhang, Y. (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 155-164.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. and Stallcup, M.R. (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*, **284**, 2174-2177.
- Cheng, M.K. and Shearn, A. (2004) The direct interaction between ASH2, a Drosophila trithorax group protein, and SKTL, a nuclear phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, implies a role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in maintaining transcriptionally active chromatin. *Genetics*, **167**, 1213-1223.
- Cheng, S.W., 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 transactivation function. *Nat Genet*, **22**, 102-105.

- 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**, 905-915.
- Claassen, G.F. and Hann, S.R. (1999) Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene*, **18**, 2925-2933.
- Claassen, G.F. and Hann, S.R. (2000) A role for transcriptional repression of p21^{CIP1} by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9498-9503.
- Coleman, M.L., Marshall, C.J. and Olson, M.F. (2003) Ras promotes p21(Waf1/Cip1) protein stability via a cyclin D1-imposed block in proteasome-mediated degradation. *Embo J*, **22**, 2036-2046.
- Coqueret, O. (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*, **13**, 65-70.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B. and Bacchetti, S. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J*, **11**, 1921-1929.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- DiGiuseppe, J.A., Redston, M.S., Yeo, C.J., Kern, S.E. and Hruban, R.H. (1995) p53-independent expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol*, **147**, 884-888.
- Dinter, A. and Berger, E.G. (1998) Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol*, **109**, 571-590.
- Dotto, G.P. (2000) p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*, **1471**, M43-56.
- Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M.A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M. and Shilatifard, A. (2002) Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem*, **277**, 28368-28371.
- Drayton, S. and Peters, G. (2002) Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 98-104.
- Duerre, J.A. and Lee, C.T. (1974) In vivo methylation and turnover of rat brain histones. *J Neurochem*, **23**, 541-547.
- Dutnall, R.N. (2003) Cracking the histone code: one, two, three methyls, you're out! *Mol Cell*, **12**, 3-4.
- Eilers, M., Schirm, S. and Bishop, J.M. (1991) The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *Embo J*, **10**, 133-141.
- Erber, R., Klein, W., Andl, T., Enders, C., Born, A.I., Conradt, C., Bartek, J. and Bosch, F.X. (1997) Aberrant p21(CIP1/WAF1) protein accumulation in head-and-neck cancer. *Int J Cancer*, **74**, 383-389.
- Fair, K., Anderson, M., Bulanova, E., Mi, H., Tropschug, M. and Diaz, M.O. (2001) Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 3589-3597.
- Faucheux, M., Roignant, J.Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C. and Theodore, L. (2003) batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. *Mol Cell Biol*, **23**, 1181-1195.
- Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W. and Lin, X. (2002) Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell*, **9**, 133-143.
- Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. and Dreyfuss, G. (2001) SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol Cell*, **7**, 1111-1117.
- Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B. and Galloway, D.A. (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, **11**, 2090-2100.
- Gartel, A.L. and Shchors, K. (2003) Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res*, **283**, 17-21.
- Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. and Tyner, A.L. (2001) Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4510-4515.

- 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.
- Gehring, S., Rottmann, S., Menkel, A.R., Mertsching, J., Krippner-Heidenreich, A. and Luscher, B. (2000) Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1. Repression of Fas-induced caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **275**, 10413-10420.
- Gery, S. and Koeffler, H.P. (2003) Repression of the TMEFF2 promoter by c-Myc. *J Mol Biol*, **328**, 977-983.
- Goo, Y.H., Sohn, Y.C., Kim, D.H., Kim, S.W., Kang, M.J., Jung, D.J., Kwak, E., Barlev, N.A., Berger, S.L., Chow, V.T., Roeder, R.G., Azorsa, D.O., Meltzer, P.S., Suh, P.G., Song, E.J., Lee, K.J., Lee, Y.C. and Lee, J.W. (2003) Activating signal cointegrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins. *Mol Cell Biol*, **23**, 140-149.
- 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**, 653-699.
- Haas, K., Staller, P., Geisen, C., Bartek, J., Eilers, M. and Moroy, T. (1997) Mutual requirement of CDK4 and Myc in malignant transformation: evidence for cyclin D1/CDK4 and p16INK4A as upstream regulators of Myc. *Oncogene*, **15**, 179-192.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hateboer, G., Timmers, H.T., Rustgi, A.K., Billaud, M., van 't Veer, L.J. and Bernards, R. (1993) TATA-binding protein and the retinoblastoma gene product bind to overlapping epitopes on c-Myc and adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8489-8493.
- Haupt, Y., Alexander, W.S., Barri, G., Klinken, S.P. and Adams, J.M. (1991) Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*, **65**, 753-763.
- Hayflick, L. (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*, **62**, 1180-1190.
- Henriksson, M. and Luscher, B. (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, **68**, 109-182.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaioja, J., Saluz, H.P., Haenel, F. and Eilers, M. (2002) Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell*, **10**, 509-521.
- Hsu, D.R., Chuang, P.T. and Meyer, B.J. (1995) DPY-30, a nuclear protein essential early in embryogenesis for *Caenorhabditis elegans* dosage compensation. *Development*, **121**, 3323-3334.
- Hughes, C.M., Rozenblatt-Rosen, O., Milne, T.A., Copeland, T.D., Levine, S.S., Lee, J.C., Hayes, D.N., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Biondi, C.A., Kay, G.F., Hayward, N.K., Hess, J.L. and Meyerson, M. (2004) Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus. *Mol Cell*, **13**, 587-597.
- 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**, 167-172.
- 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**, 13180-13185.
- Jacobs, J.J. and van Lohuizen, M. (2002) Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 151-161.
- Johnson, J.P. (1991) Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev*, **10**, 11-22.
- Judware, R. and Culp, L.A. (1997) N-myc over-expression downregulates alpha3beta1 integrin expression in human Saos-2 osteosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis*, **15**, 228-238.
- 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.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 148-151.
- Kuras, L. and Struhl, K. (1999) Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature*, **399**, 609-613.

- Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P. and Gaynor, R.B. (2003) Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell*, **11**, 1055-1066.
- Lahoz, E.G., Xu, L., Schreiber-Agus, N. and DePinho, R.A. (1994) Suppression of Myc, but not E1a, transformation activity by Max-associated proteins, Mad and Mxi1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5503-5507.
- LaJeunesse, D. and Shearn, A. (1996) E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development*, **122**, 2189-2197.
- Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, **304**, 596-602.
- Lee, T.C., Li, L., Philipson, L. and Ziff, E.B. (1997) Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12886-12891.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-649.
- Li, J., Moazed, D. and Gygi, S.P. (2002) Association of the histone methyltransferase Set2 with RNA polymerase II plays a role in transcription elongation. *J Biol Chem*, **277**, 49383-49388.
- Li, L.H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D. and Ziff, E.B. (1994) c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *Embo J*, **13**, 4070-4079.
- Lieb, J.D., de Solorzano, C.O., Rodriguez, E.G., Jones, A., Angelo, M., Lockett, S. and Meyer, B.J. (2000) The *Caenorhabditis elegans* dosage compensation machinery is recruited to X chromosome DNA attached to an autosome. *Genetics*, **156**, 1603-1621.
- Lloyd, A.C., Obermuller, F., Staddon, S., Barth, C.F., McMahon, M. and Land, H. (1997) Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev*, **11**, 663-677.
- Lo, W.S., Trievel, R.C., Rojas, J.R., Duggan, L., Hsu, J.Y., Allis, C.D., Marmorstein, R. and 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**, 917-926.
- Lund, A.H. and van Lohuizen, M. (2004) Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 239-246.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N. and Russo, A. (2002) Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol*, **192**, 125-130.
- Mahmoudi, T., Zuijderduijn, L.M., Mohd-Sarip, A. and Verrijzer, C.P. (2003) GAGA facilitates binding of Pleiohomeotic to a chromatinized Polycomb response element. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4147-4156.
- Marcu, K.B., Bossone, S.A. and Patel, A.J. (1992) myc function and regulation. *Annu Rev Biochem*, **61**, 809-860.
- McBride, A.E. and Silver, P.A. (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*, **106**, 5-8.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. and Cole, M.D. (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*, **94**, 363-374.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. (1993) The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, **4**, 615-661.
- Mowen, K.A. and David, M. (2001) Analysis of protein arginine methylation and protein arginine-methyltransferase activity. *Sci STKE*, **2001**, PL1.
- Mowen, K.A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B.T., Shuai, K., Herschman, H.R. and David, M. (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell*, **104**, 731-741.
- Muyrers-Chen, I. and Paro, R. (2001) Epigenetics: unforeseen regulators in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1552**, 15-26.
- Nagy, P.L., Griesenbeck, J., Kornberg, R.D. and 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**, 90-94.
- Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*, **11**, 709-719.

- Nicolas, E., Roumillac, C. and Trouche, D. (2003) Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol*, **23**, 1614-1622.
- 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**, 561-565.
- 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**, 479-489.
- 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**, 2421-2436.
- Nowell, P.C. (2002) Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol*, **12**, 261-266.
- O'Connell, S., Wang, L., Robert, S., Jones, C.A., Saint, R. and Jones, R.S. (2001) Polycomblike PHD fingers mediate conserved interaction with enhancer of zeste protein. *J Biol Chem*, **276**, 43065-43073.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M. and Nakatani, Y. (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, **296**, 1132-1136.
- Oster, S.K., Ho, C.S., Soucie, E.L. and Penn, L.Z. (2002) The myc oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res*, **84**, 81-154.
- Otte, A.P. and Kwaks, T.H. (2003) Gene repression by Polycomb group protein complexes: a distinct complex for every occasion? *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 448-454.
- Park, J., Kunjibettu, S., McMahon, S.B. and Cole, M.D. (2001) The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev*, **15**, 1619-1624.
- Pelengaris, S. and Khan, M. (2003) The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys*, **416**, 129-136.
- Pelengaris, S., Khan, M. and Evan, G.I. (2002) Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*, **109**, 321-334.
- Penn, L.J., Brooks, M.W., Laufer, E.M. and Land, H. (1990) Negative autoregulation of c-myc transcription. *Embo J*, **9**, 1113-1121.
- Perez-Roger, I., Kim, S.H., Griffiths, B., Sewing, A. and Land, H. (1999) Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J*, **18**, 5310-5320.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F. and Eilers, M. (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J*, **16**, 5672-5686.
- Pollack, B.P., Kotenko, S.V., He, W., Izotova, L.S., Barnoski, B.L. and Pestka, S. (1999) The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem*, **274**, 31531-31542.
- Ponting, C., Schultz, J. and Bork, P. (1997) SPRY domains in ryanodine receptors (Ca(2+)-release channels). *Trends Biochem Sci*, **22**, 193-194.
- Qin, L.F., Ng, I.O., Fan, S.T. and Ng, M. (1998) p21/WAF1, p53 and PCNA expression and p53 mutation status in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, **79**, 424-428.
- 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. and Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, **406**, 593-599.
- Rice, J.C. and Allis, C.D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 263-273.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Noble, M. and Land, H. (1988) Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *Embo J*, **7**, 1635-1645.
- Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R. and Stewart, A.F. (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *Embo J*, **20**, 7137-7148.
- Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T. and Roeder, R.G. (1993) Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature*, **365**, 359-361.

- Saccani, S. and Natoli, G. (2002) Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev*, **16**, 2219-2224.
- Sakamuro, D. and Prendergast, G.C. (1999) New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene*, **18**, 2942-2954.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J. and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**, 407-411.
- Satijn, D.P. and Otte, A.P. (1999) Polycomb group protein complexes: do different complexes regulate distinct target genes? *Biochim Biophys Acta*, **1447**, 1-16.
- Saurin, A.J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Kingston, R.E. (2001) A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature*, **412**, 655-660.
- Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U.H., Bornkamm, G.W., Eick, D. and Kohlhuber, F. (1999) Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol*, **9**, 1255-1258.
- Seoane, J., Poupponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M. and Massague, J. (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol*, **3**, 400-408.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.
- Sewalt, R.G., Lachner, M., Vargas, M., Hamer, K.M., den Blaauwen, J.L., Hendrix, T., Melcher, M., Schweizer, D., Jenuwein, T. and Otte, A.P. (2002) Selective interactions between vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 histone lysine methyltransferase suggest that histone H3-K9 methylation contributes to chromosomal targeting of Polycomb group proteins. *Mol Cell Biol*, **22**, 5539-5553.
- Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A.C. and Land, H. (1997) High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**, 5588-5597.
- 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**, 2594-2598.
- Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silver, P.A. and Lee, M.S. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev*, **12**, 679-691.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Shrivastava, A., Saleque, S., Kalpana, G.V., Artandi, S., Goff, S.P. and Calame, K. (1993) Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science*, **262**, 1889-1892.
- Sims, R.J., 3rd, Nishioka, K. and Reinberg, D. (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*, **19**, 629-639.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, **235**, 177-182.
- 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**, 357-365.
- Sommer, K.W., Schamberger, C.J., Schmidt, G.E., Sasgary, S. and Cerni, C. (2003) Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene*, **22**, 4266-4280.
- 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**, 392-399.
- 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.
- Storchova, Z. and Pellman, D. (2004) From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 45-54.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.

- Sun, Z.W. and Allis, C.D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, **418**, 104-108.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. and Shinkai, Y. (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem*, **276**, 25309-25317.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G. (1994) The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J*, **13**, 3822-3831.
- van der Vlag, J. and Otte, A.P. (1999) Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet*, **23**, 474-478.
- van Lohuizen, M., Verbeek, S., Scheijen, B., Wientjens, E., van der Gulden, H. and Berns, A. (1991) Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell*, **65**, 737-752.
- Vandel, L. and Trouche, D. (2001) Physical association between the histone acetyl transferase CBP and a histone methyl transferase. *EMBO Rep*, **2**, 21-26.
- Varga-Weisz, P. (2001) ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene*, **20**, 3076-3085.
- Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**, 440-442.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J.M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M. and Luscher, B. (2003) Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep*, **4**, 484-490.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*, **20**, 1899-1910.
- Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D. and Amati, B. (1996) Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J*, **15**, 6595-6604.
- Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R.G. and Zhang, Y. (2003) mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell*, **12**, 475-487.
- Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P. and Zhang, Y. (2001a) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science*, **293**, 853-857.
- Wang, J., Zhou, Y., Yin, B., Du, G., Huang, X., Li, G., Shen, Y., Yuan, J. and Qiang, B. (2001b) ASH2L: alternative splicing and downregulation during induced megakaryocytic differentiation of multipotential leukemia cell lines. *J Mol Med*, **79**, 399-405.
- Wanzel, M., Herold, S. and Eilers, M. (2003) Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol*, **13**, 146-150.
- Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E. and McMahon, M. (1997) Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*, **17**, 5598-5611.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, **67**, 545-579.
- Wu, K.J., Polack, A. and Dalla-Favera, R. (1999) Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science*, **283**, 676-679.
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J. and Larsson, L.G. (2003) Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene*, **22**, 351-360.
- Wysocka, J., Myers, M.P., Laherty, C.D., Eisenman, R.N. and Herr, W. (2003) Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev*, **17**, 896-911.
- Xia, Z.B., Anderson, M., Diaz, M.O. and Zeleznik-Le, N.J. (2003) MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8342-8347.

- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L.P. and Sonenshein, G.E. (2001) Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene*, **20**, 1688-1702.
- Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J., Sanyal, M., Aufiero, D.J., Kitabayashi, I., Herr, W. and Cleary, M.L. (2004) Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol*, **24**, 5639-5649.
- Yun, C.Y. and Fu, X.D. (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **150**, 707-718.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, **15**, 2343-2360.
- Zhao, J.H., Inoue, T., Shoji, W., Nemoto, Y. and Obinata, M. (1998) Direct association of YY-1 with c-Myc and the E-box binding protein in regulation of glycophorin gene expression. *Oncogene*, **17**, 1009-1017.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungen

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
H	Histon
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
HMT	Histon-Methyltransferase
HS	Hochsalz
HS	<i>Horse Serum</i>
IE	<i>immediate early</i>
Ig	Immunglobulin
Im Allg.	Im Allgemeinen
INR	Initiator-Element
IPTG	b-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

TD	<i>Tumor derived</i> , Tumor-abstammend
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
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
XC	Xylencyanol
ZK	Zellkultur