

**Molekulare Mechanismen der Mad1-abhängigen
Signalwege
in Proliferation und Apoptose**

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

von

Dipl.-Biol. Sabine Rottmann
geboren am 23. November 1974 in Wolfenbüttel

Referenten: Prof. Dr. Bernhard Lüscher

Koreferent: Prof. Dr. Achim Gossler

Tag der Promotion: 21.7.2003

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>I</u>
<u>Abkürzungsverzeichnis, Schlagwörter</u>	<u>VI</u>
<u>Zusammenfassung</u>	<u>VIII</u>
<u>Abstract</u>	<u>IX</u>

1. Material und Methoden 1

1.1. Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 1

1.1.1. Vektoren	1
1.1.1.1. Eukaryontische Expressionsvektoren	1
1.1.1.2. Bakterielle Expressionsvektoren	3
1.1.2. Antikörper	3

1.2. Zellkultur 4

1.2.1. Allgemeine Materialien für die Zellkultur	4
1.2.2. Eukaryontische Zellen	5
1.2.3. Kulturbedingungen	5
1.2.4. Kryokonservierung	5
1.2.5. Synchronisation von NIH3T3-L1-Zellen	5
1.2.6. Transiente Transfektion	6
1.2.7. Koloniebildungs-Assay	6
1.2.8. Induktion der Mad-Klone	7

1.3. Arbeiten mit prokaryontischen Zellen 7

1.3.1. Kulturmedien	7
1.3.2. Bakterienstämme	8
1.3.3. Transformation	8
1.3.4. Isolation von Plasmid-DNA	8
1.3.5. Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen	9

1.4. Arbeiten mit DNA **10**

1.4.1. Enzymatische Modifizierung von DNA	10
1.4.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten	10
1.4.3. Elektrophorese von DNA und Extraktion aus Agarosegelen	10
1.4.4. <i>In vitro</i> Mutagenese	11
1.4.5. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	12

1.5. Proteinchemische Methoden **15**

1.5.1. Präparation von Zellysaten	15
1.5.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	15
1.5.3. Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau	16
1.5.4. Western-Blot	16
1.5.5. Nachweis von Proteinen in der Immunofluoreszenz	17
1.5.6. Immunpräzipitation	18
1.5.7. Koimmunpräzipitation	18
1.5.8. Gekoppelte <i>in vitro</i> -Transkription /-Translation	19
1.5.9. Pulldown-Experimente mit GST-Fusionsproteinen	19
1.5.10. Histone-Deacetylase Assay	19
1.5.11. Kinase-Assays	20
1.5.12. Bestimmung der Halbwertszeit	21
1.5.13. Peptid-Kartierung und Phosphoaminosäuren-Bestimmung	21
1.5.14. Apoptose-Assays (Spaltung und Aktivität von Caspase-8)	23

1.6. Arbeiten mit RNA **23**

1.6.1. Aufreinigung von RNA	23
1.6.2. <i>RNase Protection Assay</i>	24
1.6.3. Northern Hybridisierung	26

1.7. PCR-Select und Identifizierung der differenziell exprimierten RNAs **28**

1.7.1.1. PCR-Select-Protokoll	30
1.7.1.2. Interne Kontrollen zum PCR-Select-Durchlauf	30
1.7.2. pZERO-Klonierung	30
1.7.3. Kolonie-Hybridisierung (<i>colony dot blot</i>)	31
1.7.4. Unigene Filter Hybridisierung	33

2. Einleitung **34**

2.1. Die Regulation der Genexpression **34**

2.1.1.	Der bHLHZip-Transkriptionsfaktor Mad1	34
2.1.1.1.	Das Myc/Max/Mad-Netzwerk	34
2.1.1.2.	Die Funktion von Mad1 in der Regulation der Proliferation	40
2.1.1.3.	Die Funktion von Mad1 in der Regulation der Apoptose	41
2.1.1.4.	Zielgene von Mad1	43
2.1.1.5.	Mad1 als Teil des HDAC-Mediator-Komplexes	46
2.1.1.5.1.	Übersicht zum Chromatinremodeling	46
2.1.1.5.2.	Histon Deacetylasen und ihre Regulation	47
2.1.1.5.3.	Interaktionspartner der HDAC-Komplexe	48
2.1.1.5.4.	Spezifische Inhibitoren von HDACs	50
2.1.1.5.5.	Die Zusammensetzung des HDAC-Komplexes	50
2.1.1.5.6.	Die Rekrutierung des HDAC-Komplexes	53
2.1.1.5.7.	Der Mad1-HDAC-Komplex	53
2.1.1.5.8.	HDACs in der transkriptionellen Aktivierung	54
2.1.2.	Die Zellzyklusregulation durch Cyclin E/Cdk2	55
2.1.2.1.	Die Phasen des Zellzyklus	55
2.1.2.2.	Restriktionspunkte und Cyclin/Cdk-Komplexe	57
2.1.2.3.	Die Funktion von Cyclin E/Cdk2	58

2.2. Die Analyse der differentiellen Genexpression **59**

2.3. Zielsetzung **65**

3. Ergebnisse **66**

3.1. Die Rolle von Mad1 in der Apoptose **66**

3.1.1.	Mad1 inhibiert die Spaltung der Pro-Caspase-8	66
3.1.2.	<i>RNase Protection Assays</i>	68
3.1.3.	Mad1 steigert die c-Flip-Expression	68

3.2. Identifizierung von potentiellen Mad1-Zielgenen mittels PCR-Select **71**

3.2.1.	Gewinnung der subtrahierten Populationen mittels PCR-Select	71
3.2.1.1.	RsaI-Verdau der cDNA-Population	72

3.2.1.2. Ligationseffizienz der Adapter	72
3.2.1.3. Subtraktion der driver-Population von der <i>tester</i> -Population	73
3.2.1.4. Identifizierung und Verifizierung mittels der Klonierungs-Dot-Blot-Strategie	75
3.2.1.5. Identifizierung und Verifizierung mittels des Unigene Screens	80

3.3. Regulation des Mad1-HDAC-Komplexes durch Cyclin E/Cdk2 **83**

3.3.1. Cyclin E/Cdk2 hebt die Mad1-vermittelte Inhibierung der Proliferation auf	83
3.3.2. Generelle Modelle zur Inhibierung von Mad1 durch Cyclin E/Cdk2	84
3.3.2.1. Cyclin E bindet an HDAC1	85
3.3.2.2. Cyclin E/Cdk2 hemmt die HDAC-Aktivität	87
3.3.2.3. Untersuchung der biochemischen Ursache der HDAC-Inhibierung	90
3.3.2.4. Die Cyclin E/Cdk2-Aktivität korreliert <i>in vivo</i> mit der Inhibierung des Mad1-induzierten G1-Arrests	93
3.3.2.5. Kartierung der Cyclin E/Cdk2-Phosphorylierungsstelle in HDAC1	94
3.3.2.6. <i>In vivo</i> Relevanz der Phosphorylierung von Ser346 in HDAC1	97
3.3.2.7. Untersuchung der funktionellen Ursache der HDAC-Inhibierung	98
3.3.3. Die Funktion von Skp2 im Mad1-HDAC-Komplex	103
3.3.3.1. Interaktion von Skp2 und HDAC1	104
3.3.3.2. Biologische Bedeutung der Interaktion von Skp2 und HDAC1	105

4. Diskussion **109**

4.1. Identifizierung von Mad1-Zielgenen **109**

4.1.1. Kritische Erörterungen einer Verknüpfung zwischen der Tet-Off-Zelllinie und dem PCR-Select-System zur Identifizierung von Mad1-Zielgenen	110
4.1.2. Allgemeine Validierung der Effizienz der Bestimmung von Mad1-Zielgenen	112
4.1.3.1. Potentielle Mad1-aktivierte Gene	117
4.1.3.2. Potentielle Mad1-reprimierte Gene	118
4.1.4. Identifizierung von PCR-Select-Zielgenen mittels RZPD-Unigene Filter	120
4.1.5. Anschließende Möglichkeiten der Verifizierung	122
4.1.6. Abschließende Bewertung der finalen Mad1-Zielgenkandidaten vor dem Hintergrund der Funktion von Mad1 in Proliferation und Apoptose	123

4.1.6.1. Modell zum Mechanismus der Mad1-vermittelten Inhibierung der Apoptose	123
4.1.6.2. Die funktionelle Einordnung der besten Zielgenkanidaten	126
4.2. Regulation des Mad1-HDAC-Komplexes	139
4.2.1. HDAC1 und Cyclin E/Cdk2	140
4.2.2. HDAC1 und Skp2	143
5. Literaturverzeichnis	147
6. Anhang	164
Eidesstattliche Erklärung	164
Lebenslauf	165
Veröffentlichungen	166
Danksagung	167

Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>Antibody</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium Persulfat
aa	<i>Aminoacid</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
b	basische Region
bp	Basenpaar
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
cpm	<i>counts per minute</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DISC	<i>death-induced signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
d.n.	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GI	<i>Genbank Number</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hebs	<i>Hepes Buffered Saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N`-2-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	β-D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LZ	Leucin-Zipper
MB	Myc-Box

MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
MOPS	3-N-Morpholin-Propansulfonsäure
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
PKA	Proteinkinase-A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RZPD	Resource Center/ Primary Database Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SID	Sin3-Interaktionsdomäne
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
Taq-Pol	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TBP	TATA-Box bindendes Protein
Tet	Tetrazyklin
TK	Thymidinkinase
TPA	o-Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A
U	Einheit
upm	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht pro Volumen-Verhältnis
wt	Wildtyp
XC	Xylencyanol
ZK	Zellkultur

Schlagwörter zum Inhalt

Mad1, Apoptose, Proliferation
Mad1, apoptosis, proliferation

Zusammenfassung

Mad1 ist Teil des Myc/Max/Mad-Netzwerkes von bHLHZip-Transkriptionsfaktoren, die eine wesentliche Rolle in der Regulation verschiedener zellulärer Aspekte wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose spielen. Es wurde gezeigt, daß Mad1 die Proliferation hemmt, indem es Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, und daß es mit Differenzierung korreliert. Vorherige Arbeiten bestätigten auch die Annahme, daß Mad1 Apoptose inhibiert. Aber im Gegensatz zu seinem onkogenen Antagonisten c-Myc sind die molekularen Mechanismen und Signalwege, über die Mad1 seine biologische Funktion ausübt, noch unbekannt. Um aber das Myc/Max/Mad-Netzwerk und seine Bedeutung bei der Tumorentstehung vollständig begreifen zu können, müssen auch die Signalwege des potentiellen Tumorsuppressors Mad1 aufgeklärt werden. Daher war das Ziel dieser Arbeit, Zielgene und Regulatoren von Mad1 zu untersuchen.

In einem ersten Teil der Arbeit konnte der Mechanismus der Mad1-abhängigen Inhibierung von Apoptose auf die Inhibierung der Pro-Caspase-8 Spaltung und Aktivität fokussiert werden. Dadurch scheint Mad1 die vollständige Bildung der DISC zu reprimieren, wobei die Induktion von c-Flip involviert zu sein scheint.

Um einen Überblick über die Mad1-abhängigen Signalwege in der Regulation der Proliferation und Apoptose zu bekommen, wurde ein SSH-basiertes Verfahren zur Identifikation von Mad1-Zielgenen etabliert. In einem ersten Schritt der Verifizierung durch Dot-Blot-Hybridisierungen und Unigene Filter konnten Zielgene wie PTEN, ATM, α Nac und eEF-1 α -1 favorisiert werden.

In einem dritten Projekt wurde der negative Einfluß von Cyclin E/Cdk2 auf den Mad1-Mediator-Komplex bestätigt. Dabei wurde die Störung der Integrität des Mad1-HDAC-Komplexes durch Cyclin E/Cdk2 als der zugrunde liegende Mechanismus aufgezeigt. Die Regulation der Halbwertszeit oder Lokalisation von HDAC1 konnte ausgeschlossen werden. Unter der Annahme einer Kinaseabhängigkeit der Cyclin E/Cdk2-vermittelten Regulation wurde ein Cdk2-Substrat im Komplex postuliert. Tatsächlich konnte *in vitro* eine Phosphorylierung von HDAC1 an Ser346 gezeigt werden, deren Mutation allerdings die negative Regulation durch Cyclin E/Cdk2 nicht beeinträchtigte. Während dieser Arbeiten wurde Skp2 als neuer Interaktionspartner von HDAC1 identifiziert, der die HDAC1-Aktivität zu stimulieren scheint.

Zusammengefaßt konnten die Funktion von Mad1 in der Apoptose und seine Regulation durch Cyclin E/Cdk2 auf ihre molekularen Mechanismen zurückgeführt und über die potentiellen Zielgene mit Modellen zu möglichen Signalwegen in Zusammenhang gebracht werden.

Abstract

The Mad1 protein is part of the Myc/Max/Mad-network of bHLHZip-transcription factors, which play an essential role in the regulation of different aspects of cellular behavior like proliferation, differentiation and apoptosis. It has been demonstrated that Mad1 inhibits proliferation by arresting cells in the G1-phase of cell cycle and correlates with differentiation. The previous work could support the theory that Mad1 also inhibits apoptosis. But in contrast to its oncogenic counterpart c-Myc, the molecular mechanisms and signaling pathways by which Mad1 mediates its functions are still unknown. To fully understand the Myc/Max/Mad-network and its impact on tumor genesis, one has to elucidate the signaling pathways of the potential tumor suppressor Mad1. Therefore, the aim of this work was to study target genes downstream and regulators upstream of Mad1.

In the first part of this work, the mechanism of the Mad1-dependent inhibition of apoptosis could be focused on the inhibition of pro-Caspase-8 cleavage and activity. Furthermore, Mad1 seems to repress the complete DISC formation by use of a pathway involving the induction of c-Flip.

To get insight into the general pattern of Mad1-dependent signaling pathways referring to the regulation of proliferation and apoptosis, an SSH-based screen for Mad1-target genes was established. A first step of verification by dot blot hybridizations and Unigene filters revealed some potential target genes like PTEN, ATM, α Nac and eEF-1 α -1.

In a third project the negative influence of Cyclin E/Cdk2 on the Mad1-mediator complex was analyzed. It could be confirmed that Cyclin E/Cdk2 rescues the Mad1-mediated inhibition of proliferation. In addition, the underlying mechanism of this Cyclin E/Cdk2-mediated inhibition of Mad1 was attributed to the inhibition of the integrity of the Mad1-HDAC-complex. Other mechanisms like regulation of half-time or cellular localization of HDAC1 could be eliminated. As one would expect the regulation by Cyclin E/Cdk2 to be based on the kinase activity of Cdk2, a potential phosphorylation substrate within the Mad1-HDAC-complex was postulated. In fact, an in vitro phosphorylation of HDAC1 could be ascribed to Ser346, but the Ser346 mutant was still sensitive to Cyclin E/Cdk2-mediated regulation. Along the way, Skp2 was postulated to be a new interaction partner of HDAC1, stimulating its activity.

In summary, the function of Mad1 in apoptosis and its regulation during G1-S-phase transition by Cyclin E/Cdk2 have been narrowed to their molecular mechanisms and combined with some models of signaling pathways arising from the screen for potential Mad1-target genes.

1. Material und Methoden

1.1. Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

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

1.1.1. Vektoren

1.1.1.1. Eukaryontische Expressionsvektoren

pCB6+:

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

pCB6+-Skp2 (N. Malek):

Es liegen keine Vektorkarten vor.

pcDNA3MT-Skp2 Δ F (Lars G. Larsson):

Die Aminosäuren 113-152 (F-Box) im Wildtyp-Klon pcDNA3MT-Skp2 sind deletiert.

pcDNA3:

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

pEV-HA-RF0, 1, 2 (Matthias *et al.*, 1989):

Mit den pEV-HA Vektoren können HA-Epitop getagte cDNAs in eukaryontischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert werden. Das HA-Epitop ist in den drei möglichen Leserastern zu den Restriktionsschnittstellen Kpn I, Sma I und Xba I angeordnet. Ansonsten besitzen die drei Vektoren einen SV40 *origin of replication* und beruhen auf dem bakteriellen Plasmidsequenz von pSP65.

HA-HDAC1myc (S. Rottmann):

Aus pcDNA3-HDAC1myc wurde das KpnI/XbaI-Fragment herausgeschnitten und mit dem KpnI/XbaI-geschnittenen pEVHA-RFO ligiert.

pcDNA3-HDAC1myc (A. Sommer):

Das 1,25 kb BamHI/EcoRI-Fragment aus pBabe-HDAC1myc wurde in den BamHI/EcoRI-geöffneten Vektor pcDNA3 ligiert.

pCB6+-HDACmyc (A. Sommer):

Rpd3-myc wurde als BamHI/EcoRI-Fragment aus pBabe-Rpd3-myc (Bartl et al., 1997) geschnitten, der die murine cDNA von hdac1 als IL-2 induzierbares Gen enthält, und in die BglII/EcoRI-Schnittstelle von pCB6+ eingefügt. Das murine hdac1 ist 99% homolog zum humanen hdac1, 84% zum murinen hdac2 und 58% zu rpd3 aus Hefe. Am 3'-Ende von hdac1 wurde die Sequenz des Myc-Epitops angehängt.

pEQ176P2 (Firzlaff et al., 1991):

Durch Restriktionsverdau von pEQ176 mit Pvu II und Religation des verbliebenen Vektors wurde ein Großteil der β -Galactosidase-cDNA entfernt. Dieser Vektor wurde zum Auffüllen der Transfektionsansätze auf gleiche DNA-Mengen eingesetzt.

pCMV-Cyclin D, pCMV-Cyclin E, pCMV-CDK2, pCMV-CDK4 (R. Bernards):

Es liegen kein Vektorkarten vor.

pCMV-Mad1 (Cerni et al., 1995):

Die mad1 cDNA wurde in PEQ176P2 kloniert.

pCMV-Sin3B (S. Hilfenhaus):

Sin3B wurde als HindII-Fragment aus pVZ1 geschnitten und in die HindII-Schnittstelle von pEQ176P2 kloniert.

pFlag-Cyclin E, Cyclin E-128, Cyclin E-160 (Möröy):

Der Vektor enthält die cDNA von cyclin E unter der Kontrolle eines CMV-Promoters mit einem Flag-tag am 3'-Ende. Cyclin E-128 codiert für eine Deletionsmutante, die die Aminosäuren 1-128 und 216-395 enthält und damit keine Cyclin Box mehr aufweist. Diese Deletionsmutante bindet weder Cdk2, noch p27, noch p130. Das gleiche gilt für die Mutante Cyclin E-160, die aus den Aminosäuren 1-160 und 221-395 besteht, also noch einen Teil der Cyclin Box besitzt, dennoch aber keine Bindung zu Cdk2 zeigt.

pCMVneo-BamHI (Baker et al., 1990):

Der Vektor enthält die für die Neomycin-Resistenz kodierende Region unter transkriptioneller Kontrolle des TK-Promoters. Der CMV-Promoter kontrolliert die Expression einer in die singuläre BamHI-Schnittstelle eingefügte cDNA; das anschließende Polyadenylierungssignal stammt aus dem β -Globin. Außerdem trägt der Vektor Replikationsursprungs-Sequenzen (ori) für bakterielle (von pBR322) Zellen und kodiert für Ampizillin-Resistenz.

pcDNA3-Flag-Myc (S. Schreek):

Das BamHI/BglII-Fragment von BJ3Myc-wt/EG (B. Amati) wurde in den BamHI-geöffneten pcDNA3Flag-Vektor kloniert.

1.1.1.2. Bakterielle Expressionsvektoren

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

pGST-HDAC1 Deletionsmutanten (T. Kouzarides):

Folgende Fragmente wurden in die BamHI/EcoRI-Stelle von pGex-2TK-P kloniert: HDAC aa1-120-, aa101-242, aa150-242, aa150-382, aa332-482.

pGST-HDAC1 Deletionsmutanten (C. A. Jonson):

Die Mutante 219-482 enthält die Aminosäuren 219-482 vom HDAC1, die in die EcoRI/PstI-Stelle von pGex-4T-2 kloniert wurden. Die Mutante 342-482 enthält die Aminosäuren 342-482 vom HDAC1, die in die HindIII/PstI-Stelle von pGex-4T-3 kloniert wurden.

pGST-Skp2 (H. Malek):

Das PCR-amplifizierte Skp2 wurde zwischenkloniert, dann mit EcoRI/XhoI herausgeschnitten und in die EcoRI/XhoI Stelle von pGEX-4T-3 kloniert.

1.1.2. Antikörper

α -Caspase-8 (C-15; I. Schmitz, DKFZ): C-15 ist ein monoklonaler Maus-Antikörper, der Caspase-8 *full-length* erkennt, sowie die Spaltprodukte p43, p41 und p18.

α -Cdk4 (C-22): Polyklonaler IgG-Antikörper aus Kaninchen (Santa Cruz) gegen den C-Terminus von murinem Cdk4. Erkennt auch Cdk4 aus Ratte und Mensch.

α -Cyclin A (C-19): Polyklonaler IgG-Antikörper aus Kaninchen (Santa Cruz) gegen den C-Terminus von murinem Cyclin A. Erkennt auch Cyclin A aus Ratte und Mensch.

α -Cyclin E (C-19): Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum (Santa Cruz) nur gegen humanes Cyclin E.

α -Cyclin E (M-20): Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum (Santa Cruz) gegen den C-Terminus von Cyclin E aus Ratte. Erkennt auch Cyclin E aus Maus und Mensch.

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

α -Flip (T. Aprahamian; Boston): Der Antikörper stammt aus Kaninchen und hat eine Konzentration von 0,48mg/ml.

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

α -HDAC (6.2. Eurogen. #19): Das polyklonale Kaninchenserum wurde gegen murines HDAC1 generiert und ist reaktiv gegen murines und humanes HDAC1. Der Antikörper wurde von C. Seiser zur Verfügung gestellt (Bartl et al., 1997).

α -Mad1 (C19), sc-222: Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen Aminosäure 203-221 von humanem Mad1, reaktiv gegen Mad1 aus allen Säugern. (Santa Cruz Biotechnology)

α -Mad1 (5C9/ 5E12/ 5F4): Monoklonale Rattenantikörper (E. Kremmer, B. Lüscher); reaktiv gegen humanes Mad1. Sie wurden erzeugt durch Immunisierung von Wistar-Ratten mit bakteriell expremiertem His-Mad1-Fusionsprotein. Während der Antikörper 5C9 gegen den N-Terminus gerichtet ist, liegt das Epitop für den 5F4-Antikörper am C-Terminus.

α -myc-tag (9E10): Monoklonaler Maus Antikörper aus der Hybridomazelllinie GE10 gegen das Epitop aa 408-438. Der Antikörper erkennt allerdings das Epitop nur als *tag*, da das endogene Epitop durch die Interaktion von Myc mit Max verdeckt ist (Roche).

α -Sin3B (AK-12):

Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen die Aminosäuren 172-228 (PAH-Domäne 2) von murinem Sin3B. Der Antikörper ist reaktiv gegen Sin3B aus Maus, Ratte und Mensch und in geringem Maße auch gegen Sin3A und Sin3A9 aus Maus (Santa Cruz Biotechnology).

α Skp2 (H-435):

Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen die Aminosäuren 1-435 von humanem Skp2. Der Antikörper ist reaktiv gegen Skp2 p45 aus Maus, Ratte und Mensch (Santa Cruz Biotechnology).

1.2. Zellkultur

1.2.1. Allgemeine Materialien für die Zellkultur

DMEM, MEM, RPMI 1640 (Gibco)	mit 4,5 g/l Glucose
PBS	140 mM NaCl
	2,6 mM KCl
	2 mM Na ₂ HPO ₄
	1,45 mM KH ₂ PO ₄
Penicillin/Streptomycin (Seromed)	10.000 Einheiten/10.000 µg/ml
Trypsin/EDTA (Seromed)	0,5/0,02% (w/v) in PBS
FCS (Gibco)	fötales Kälberserum
G418	50 mg/ml in HEPES
Puromycin	1 mg/ml in PBS
Tetrazyklin	1 mg/ml in PBS
Gewebekulturschalen (Falcon)	Durchmesser 6, 10 cm
Gewebekulturflaschen (Falcon)	Volumen 100, 250, 1000 ml
1 ml Einfriergefäße (Nalgene)	

1.2.2. Eukaryontische Zellen

<u>293:</u>	Mit Adenovirus Type 5 (Ad 5) DNA transformierte embryonale Nieren Zelllinie (ATCC CRL-1573).
<u>Cos-7:</u>	Nierenfibroblasten, die aus der Niere der Grünen Meerkatze isoliert und mit SV40 transformiert wurde (ATCC CRL-1651)
<u>HL60:</u>	Zelllinie, aus einer kaukasischen Patientin mit promyelotischer Leukämie (Suspensions-Zelllinie) (ATCC CCL-240).
<u>Jurkat:</u>	Humane lymphoblastoide T-Zelllinie (Suspensions-Zelllinie) (ATCC ACC-282)
<u>U2OS:</u>	Osteosarkoma Zelllinie (ATCC HTB-96)
<u>Saos-2:</u>	Osteosarkom Zelllinie (ATCC HTB-85)
<u>UTAwT:</u>	Klon von U2OS mit stabil integrierten Plasmiden pUHD15-1 und pCMVneo
<u>M19, M47:</u>	Klone von UTAwt mit stabil integrierten Plasmiden <i>tetmad1</i> und pBabepuro

1.2.3. Kulturbedingungen

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

COS-7, MCF, U2OS, Saos-2:	DMEM mit 10% (v/v) FCS
293:	DMEM mit 10% (v/v) FCS
HL-60, Jurkat:	RPMI 1640 mit 10% (v/v) FCS
UTAMad-Klone:	DMEM, 10% (v/v) FCS, G418 (500 µg/ml), Puromycin (1 µg/ml), Tetrazyklin (1 µg/ml)
NIH3T3-L1:	DMEM mit 10% (v/v) FCS, 4 mM L-Glutamin, 4.5 g/L Glucose

1.2.4. Kryokonservierung

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

1.2.5. Synchronisation von NIH3T3-L1-Zellen

NIH3T3-Li-Zellen wurden am 1.Tag ausgesät. Am 2.Tag wurden die Zellen gehungert, indem das Medium durch FCS-freies Medium ersetzt wurde. Am 3. Tag (24h nach

Beginn des Hungerns) wurden die Zellen erneut mit FCS stimuliert, so daß sie synchronisiert in den Zellzyklus eintraten. Zu definierten Zeitpunkten wurden Zellen je 1h mit BrdU gefärbt, um die Anzahl der in S-Phase befindlichen Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu bestimmen.

1.2.6. Transiente Transfektion

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

2 x Hebs-Puffer	274 mM NaCl 42 mM HEPES 9,6 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,1
HEPES-Puffer	142 mM NaCl 10 mM HEPES 6,7 mM KCl pH 7,3
250 mM CaCl ₂	

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

1.2.7 Koloniebildungs-Assay

Giemsa-Lösung (Riedel de Häen) unverdünnt, mehrfach verwendbar
G418 (50mg/ml Stock in Hepes-Puffer; 1:100 final)

Für den Koloniebildungs-Assay wurde zunächst eine transiente Transfektion von Rk13- oder U2OS-Zellen wie beschrieben durchgeführt. 24 Stunden nach Wegwaschen des Präzipitates wurden die Zellen 1:5 auf je 5 Schalen pro Ansatz gesplittet. Am folgenden Tag wurde mit der Selektion durch G418 begonnen. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt, bis die Kolien groß genug zum Anfärben waren (ca. 21 Tage). Zum

Fixieren und Anfärben der Kolonien wurden die Schalen einmal in PBS gewaschen und die Flüssigkeit gründlich abgesaugt. Auf die Schalen wurde ca. 1ml (für 6cm-Schalen) Giemsalösung gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt. Die Schalen wurden dann zum vollständigen Entfernen von unspezifischer Hintergrundfärbung vorsichtig in Leitungswasser geschwenkt. Alle Kolonien über einer festgesetzten kritischen Größe wurden gezählt.

1.2.8. Induktion der Mad-Klone

α -Fas (Kamya CH-11): 100 ng/ml

Flag-TRAIL, Enhancer (M. Thome): 100 ng/ml

Am Tag 1 wurden M19- oder M47-Zellen auf 4×10^5 Zellen pro 6 cm-Schale bzw. 8×10^5 Zellen pro 10 cm-Schale eingestellt und am Tag 3 mit oder ohne Tetrazyklin (1 μ g/ml) inkubiert.

Die Zellen wurden für die Isolation der mRNA nach 15h Induktion geerntet und für die weiteren RNA- bzw. cDNA-Arbeiten verwendet (s. 1.6.; 1.7.).

Für die Apoptose-Assays (s. 1.5.14.) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit DMEM +P/S + Puromycin + G418 ohne FCS versehen. Dann wurde auf verschiedene Weisen Apoptose induziert:

a) 100 ng/ml TRAIL (= 1:1000) + 2 μ g/ml Enhancer (= 1:500)

b) 100 ng/ml α Fas (= 1:1000)

Die Zellen wurden 15h weiter kultiviert und dann für die Apoptose-Assays geerntet.

1.3. Arbeiten mit prokaryontischen Zellen

1.3.1. Kulturmedien

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 7,0

TB-Medium

1,2% (w/v) Trypton (AppliChem)
2,4% (w/v) Hefeextrakt (AppliChem)
0,4% (w/v) Glycerin
17 mM KH₂PO₄

1.3.2. Bakterienstämme

HB101:

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

XL10 gold:

Tet^rΔ (mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44 thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]^a

BL21(DE)pLysS:

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

1.3.3. Transformation

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

1.3.4. Isolation von Plasmid-DNA

Lösung 1	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA
Lösung 2	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung 3	3 M Kaliumacetat, pH 4,8
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 1mM EDTA
<i>Quick seal</i> -Röhrchen	13 x 51 mm (Beckman)

In kleinem Maßstab:

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

Im mittleren Maßstab:

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

In großem Maßstab (für Transfektionen):

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

Am nächsten Tag wurde die untere Plasmidbande unter UV-Licht aus dem *Quick-seal* Röhrchen isoliert. Dazu wurde eine Kanüle (0,9 x 40 mm) vorsichtig in das obere Ende des Röhrchens eingestochen, so dass die Plasmidbande nicht gestört wurde. Mit einer zweiten Kanüle auf einer 2 ml Spritze wurde nun einen halben Zentimeter unter der Plasmidbande eingestochen und diese dann vorsichtig abgezogen. Die so gewonnene DNA wurde in ein neues *Quick-seal* Röhrchen überführt. Dieses wurde mit einer CsCl-Lösung (0,85 g/ml) aufgefüllt, zugeschweißt und bei 56.000 rpm für mindestens 5 h wie beim ersten Gradienten zentrifugiert. Nach Isolation der Plasmid-DNA wurde das Ethidiumbromid durch Extraktion mit Isopropanol (gesättigt mit NaCl) bis zur Farblosigkeit der Plasmidlösung entfernt. Anschließend wurde noch zweimal extrahiert. Die DNA wurde dann für mindestens 1 h mit 100% Ethanol bei -20°C gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt. Dabei entspricht 1 OD bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml. Der Quotient aus der OD bei 260 nm sollte bei 1,8 liegen.

1.3.5. Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

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

Glutathion-Agarose (Sigma)

BL21-Bakterien wurden zunächst mit dem gewünschten pGEX-Konstrukt transformiert. Am nächsten Tag wurde eine 50 ml LB/Ampicillin-Kultur mit 3-5 Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:10 in ein gewünschtes Volumen LB/Ampicillin verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 inkubiert. Schließlich wurde die Kultur für 3- 16 h mit 0,4 mM IPTG induziert, sedimentiert und in Puffer A durch Ultraschallbehandlung lysiert. Die Zelltrümmer werden sedimentiert (20 min bei 4°C/15000 upm/JA21-Rotor) und der Überstand für 30 min bei 4°C mit Glutathion-Agarose (Sigma), die zuvor durch mehrmaliges Waschen mit Puffer A äquilibriert worden war, inkubiert. Vor der Benutzung wurde das Säulenmaterial zunächst in PBS gequollen und dann dreimal mit demselben Puffer gewaschen, um den

vom Hersteller zur trockenen Lagerung verwendeten Stabilisator zu entfernen. Die Glutathion-Agarose mit dem gebundenen Protein wurde zunächst dreimal mit Puffer A gewaschen und dann in eine Chromatographiesäule (Biorad) gefüllt. Die gebundenen Proteine wurden mit 10 mM Glutathion in Puffer A in 500 µl Fraktionen eluiert. Zur Konzentrationsabschätzung wurden Aliquots der Fraktionen zusammen mit einer BSA Verdünnungsreihe auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

1.4. Arbeiten mit DNA

1.4.1. Enzymatische Modifizierung von DNA

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

1.4.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit passenden Oligonukleotidprimern amplifiziert. Die Denaturierungs-, *Annealing*- und Elongationszeiten waren abhängig von der DNA-Vorlage (genomische DNA oder Plasmid-DNA, GC-Gehalt des Fragments), den Primern (wobei die optimale *Annealing*-Temperatur meist experimentell ermittelt wurde) und der Länge des zu erwartenden Fragments.

1.4.3. Elektrophorese von DNA und Extraktion aus Agarosegelen

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

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

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

Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt und für analytische Zwecke elektrophoretisch in 0,5 - 1,5%igen Agarosegelen mit TBE als Lauf-

aufgetrennt. Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des JETsorb-Kits nach Angaben des Herstellers.

1.4.4. *In vitro* Mutagenese

Zur Erstellung von Punktmutationen in Plasmiden wurde das Protokoll von "Quick Change" (Stratagene) verwendet. Die *sense* und *antisense* Primer zur Einführung der Mutation wurden so entworfen, daß etwa jeweils 13-15 Nukleotide zu beiden Seiten der/des zu mutierenden Nukleotide(s) liegen. Die Mutation sollte neben der Punktmutation auch zur Einführung einer neuen Restriktionsstelle oder dem Wegfall einer alten führen, um hinterher direkt durch einen Restriktionsverdau auf eine erfolgreiche Mutagenese testen zu können. Die Primer sollten weiterhin so konstruiert sein, daß keien endogenen Schleifen oder Doppelstränge gebildet werden und die Anwendung folgender Formel zu einer T_m von über 78°C führt:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \%GC \text{ Gehalt} - 675/N \text{ (Länge des Oligos)} - \% \text{ Fehlpaarung}$$

Mutagenese-PCR

20 ng Wildtyp-Plasmid (kleinstmöglichstes Konstrukt wählen!)

125 ng jedes Primers

1 µl dNTP Mix (25 mM von jedem der vier dNTPs)

5 µl 10x Polymerase Puffer

PCR-Wasser ad 49 µl

1 µl PfuI Polymerase (5 U/ ml)

98°C 2 min

18 Zyklen:

96 °C 30 sec

55°C 1 min

68°C 2 min pro kb (bezogen auf das Plasmid)

Lagerung:

4°C

Verdau und Transformation

Nach der PCR wurde 1/10 des Ansatzes auf ein Gel aufgetragen, um zu prüfen, ob ein entsprechend großes Produkt amplifiziert wurde. Parallel wurde der restliche Ansatz mit 1 ml DpnI 1 h bei 37°C verdaut. Dieses Enzym erkennt nur die methylierte Restriktionsstelle, so daß spezifisch das Wildtyp-Plasmid verdaut, das mutierte Plasmid aber erhalten bleibt. Hiermit wurden dann XL-10 Bakterien transformiert (s. 1.3.3.). Aus den erhaltenen Klonen wurde mittels Minipräps die Plasmid-DNA gewonnen und im Restriktionsverdau geprüft, ob tatsächlich das mutierte Plasmid vorlag. Zudem wurde das Plasmid sequenziert.

1.4.5. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

benötigte Zellzahl: 50×10^6 / IP

Spinner: Winkel 720°, 30 upm

maximale Zelldichte: HL60 5×10^5 / ml

Fixierungslösung

0,1 M NaCl

	1 mM EDTA 0,5 mM EGTA 50 mM Tris-HCl, pH8 ddH ₂ O = Stocklösung + 11 % Formaldehyd (frisch zugeben)
Waschlösung	0,25% TritonX100 10 mM Tris-HCL, pH8 10 mM EDTA 0,5 mM EGTA ddH ₂ O frisch zugeben: 0,5% Aprotinin, Pefa-Block (stock=500x)
Waschlösung	200 mM NaCl 10 mM Tris-HCL, pH8 1 mM EDTA 0,5 mM EGTA ddH ₂ O frisch zugeben: 0,5% Aprotinin, Pefa-Block (stock=500x)
TE-Puffer	10 mM NaCl, pH7,5 1 mM EDTA ddH ₂ O (bzw. analytisch rein)
Eluierungspuffer	TE-Puffer 1% SDS
High Salt-Puffer	2 M NaCl 10 mM NaCl, pH7,5 1% NP40 0,5% DOC 1 mM EDTA ddH ₂ O
ChIP-RIPA-Puffer	150 mM NaCl 10 mM Tris, pH7,5 1% NP40 1% DOC 0,1% SDS 1 mM EDTA 0,5% Aprotinin ddH ₂ O
Phenol/ IAA/ Chloroform	5 ml Phenol 200 ml IAA 4,8 ml Chloroform bei frischem Ansatz zentrifugieren,

- 50 µl Eluat bzw. 20 µl Total-Chromatin + 30 µl Elutions-Puffer
2. zu Eluaten 1 µg DNA dazugeben
 3. 30 min, 37°C
 4. Zugabe von 5 µl Proteinase K (final 500 µg/ ml, stock 20 mg/ ml)
zu Total-Chromatin: 2,25 µl 20% SDS
 5. Inkubation bei 37°C, 6 h oder üN
 6. Inkubation bei 65°C, 6 h oder üN (reverses Crosslinken)
 7. Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (= PIC: 25/24/1) Extraktion (1:1= 200 µl)
 8. Zentrifugation 8 min, 14.000 upm, RT, Überstand vorsichtig abnehmen
 9. Chloroform/ Isoamylalkohol (24/1) Extraktion (1:1= 200 µl), vortexen
 10. s. 8.
 11. Präzipitation mit 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 5,2 + 20 µg Glykogen + 3 Vol. EtOH, -20°C
üN
 12. Zentrifugation 20 min, 14.000 upm, 4°C
 13. waschen mit 500 µl 70% EtOH
 14. Zentrifugation 10 min, 14.000 upm, 4°C
 15. trocknen lassen im Heizblock bei 30°C
 16. Pellet von Eluaten in 50 µl TE, von Total (=Input) in 20 µl TE aufnehmen, bei 4°C
lösen lassen, dann in PCR einsetzen oder bei -20°C lagern
 17. DNA-Messung vo Input: 1:25 --> 4 µl + 96 µl in TE; 0,8 mg auf 1,5% Agarose-Gel

PCR

30 µl Ansatz:

- 3 µl 10x Hotstar PCR-Puffer (Qiagen)
- 3 µl dNTP Mix (4x 2 mM, final 4x 0,2 mM)
- 3 µl Primer-Mix (Forward + Reverse je 10 µM, final je 1 µM)
- 18 µl PCR-Wasser
- 0,5 µl Hotstar-Taq-Polymerase (Qiagen, 5U/ ml)
- 2,5 µl DNA-Template, vortex

für Input-Eichreihe: 0,25; 1; 4; 16; 64 ng

Vordenaturierung	95°C 15 min
34 Zyklen:	
Denaturierung	94°C 20 sec
Annealing	60°C 20 sec
Elongation	72°C 20 sec
Finale Elongation	72°C 7 min
Lagerung	4°C

Nach der PCR werden die einzelnen Proben mit 3,3 µl 10x Sample Puffer versetzt und auf ein 2 % Agarose/TAE-Gel geladen (nur kurz laufen lassen!).

PCR-Primer für den EIF2a-Promoter:

eIF2alpha-h1 5'-TTC TCG GAG GAC CCA GAC TCT ATG-3'
eIF2alpha-h2 5'-TCA CAG AGA CCA GAC TTG CTT CCC-3'

PCR-Primer für Cyclin D2-Promoter:

hCycD2prom-1 5'-CCC CTT CCT CCT GGA GTG AAA TAC-3'
hCycD2prom-2 5'-CGT GCT CTA ACG CAT CCT TGA GTC-3'

PCR-Primer für 3'UTR E-Box auf Chromosom 22 als Negativkontrolle:

NEKON-1a 5'-TTA CAG GTA AGC ACC TCC ATG ACC-3'
 NEKON-1b 5'-GCA AAA GCT ACC ATT TAG GAA CCC-3'

1.5. Proteinchemische Methoden

1.5.1. Präparation von Zellysaten

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

Frackelton-Puffer (F-Puffer)	50 mMHEPES, pH 7,4 50 mM NaCl 30 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 100 µM Na ₃ VO ₄ 10 % Glycerin 0,2 % (wv) Triton X-100 1mM NaF 1 mM PEFA-Block 5 U/ml α-Makroglobulin 2,5 U/ml Pepstatin A 2,5 U/ml Leupeptin 0,15 mM Benzamidin
------------------------------	---

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

1.5.2. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

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

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

Molekulargewichtsstandards	14.300 - 200.000 Da, vorgefärbt 2.850 - 43.000 Da, vorgefärbt
----------------------------	--

1.5.3. Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau

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

Entfärbelösung 1	42,5% (v/v) Ethanol 5% (v/v) Methanol
------------------	--

Entfärbelösung 2	8% (v/v) Essigsäure 5% (v/v) Methanol
------------------	--

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

1.5.4. Western-Blot

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

Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminohexansäure 4 % (v/v) Methanol
----------------	--

Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base
----------------	-----------------

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

Aus dem Polyacrylamidgel wurde ein Streifen mit dem zu detektierenden Protein ausgeschnitten und in Kathodenpuffer getränkt. Gleichzeitig wurden je ein Whatman Papier der Größe des Gelstreifens in Kathodenpuffer, Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2 getränkt. Nacheinander wurden das in Kathodenpuffer getränkte, sowie der Gelstreifen, die in Anodenpuffer 1 getränkte Nitrozellulosemembran und das Anodenpuffer 1 und Anodenpuffer 2 getränkte Papier auf die Kathode der Blotapparatur blasenfrei aufgelegt. Die Blotapparatur wurde mit der Anodenplatte verschlossen und die Proteine wurden bei 0,8 mA/cm² für 1 h auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur in ECL-Blockpuffer abgesättigt, bevor sie mit einem entsprechenden Antikörper in ECL-Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit ECL-Waschpuffer gewaschen und für 1 h mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Für die Detektion mit dem ECL-Kit wurde die Membran erneut 3 x mit ECL-Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Inkubation der Membran für 1 min in ECL-Lösung und anschließender Belichtung mit einem Fuji RX Film für eine 1/2, 2 und 5 min.

1.5.5. Nachweis von Proteinen in der Immunfluoreszenz

3,7% Paraformaldehyd in PBS
0,2% Triton X-100 in PBS
20% Perdeserum in PBS
Moviol 4-88 (Hoechst) mit Isopropylgallat
Hoechst 33258 (1 mg/ml Stammlösung in PBS)
Cy³-markierter zweiter Antikörper (*donkey-anti mouse*; Jackson; 800-307-5296)

Um überexprimierte Proteine über Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden am Boden von Zellkulturschalen runde Deckgläschen mit 1 cm Durchmesser plaziert. Diese waren vorher durch Einlegen in Ethanol entfettet und anschließend hitzesterilisiert worden. Dann wurden Zellen wie für eine Standardtransfektion ausgesät und wie üblich transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Platten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur mit 3,7% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit

PBS gewaschen und dann 8 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Blocklösung (20% Pferdeserum in PBS) blockiert. Die Blocklösung wurde vor Verwendung 30 min bei 5.000x g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Zur Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde dieser zunächst in Blocklösung verdünnt und dann in 30 µl Tropfen auf Parafilm plaziert. Die Deckgläschen wurden dann mit der Zell-Seite auf diese Tropfen gelegt und in einer feuchten Kammer 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wie zuvor mit in Blocklösung verdünntem zweiten Antikörper inkubiert. Zuletzt wurde die DNA mit Hoechst 33258 in PBS gefärbt (1 µg/ml, 3 min, Raumtemperatur) und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden PBS Kristalle mit destilliertem Wasser von der Rückseite der Deckgläschen gewaschen und die Deckgläschen mit einem Tropfen Moviol (mit Isopropylgallat als Bleichschutz) auf Objektträger montiert. Das Betrachten und Fotografieren erfolgte mit einem Zeiss Axiophot Fotomikroskop (Integralmessung) und Kodak 200 ASA Diafilmen.

1.5.6. Immunpräzipitation

Frackelton-Puffer

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

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

1.5.7. Koimmunpräzipitation

Für die Analyse von direkten Protein-Protein Wechselwirkungen in der Zelle wurden HEK293 Zellen (4-5 x 10⁶ Zellen pro 10 cm Kulturschale) mit [³⁵S]-Methionin markiert und es wurden Lysate in F-Puffer hergestellt. Anschließend wurden die Lysate mit dem ersten Antikörper und 20 µl Protein A/G-Sepharose für mindestens 1 h bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Der an der Protein A/G-Sepharose gebundene Protein-Antikörper-Komplex wurde zunächst dreimal mit F-Puffer gewaschen. Dann wurden 200 µl des stringenten AB-Puffers zugegeben und wie zuvor für 30 min inkubiert. Bei diesem Schritt blieb das direkt von den Antikörpern erkannte Protein zusammen mit den Antikörpern an der Protein A/G-Sepharose gebunden, während indirekt gebundene Proteine abgegeben wurden. Nach 3-4facher Verdünnung in F-Puffer konnten diese Proteine mit einer zweiten Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Die in beiden

Reaktionen an die Antikörper gebundenen Proteine wurden anschließend auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, im Gel fixiert (30 min in 40% Ethanol/10% Essigsäure), in Amplify-Lösung für 30 min inkubiert und autoradiographisch nachgewiesen.

1.5.8. 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 die eingebaute Radioaktivität mit einem Phosphorimager (Fuji BAS 2000) und zugehöriger Software (Fuji MacBAS 2.2) quantifiziert.

1.5.9. *Pulldown*-Experimente mit GST-Fusionsproteinen

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

Gluthation-Agarose

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

1.5.10. Histone-Deacetylase Assay

HD-Reaktionspuffer	20mM Tris-HCl, pH 8.0 80mM NaCl 10% Glycerin
--------------------	--

Stoplösung Ethylacetat	0,4M Acetat/ 1 M HCl
---------------------------	----------------------

Der Histone-Deacetylase Assay wurde direkt im Anschluß an eine niedrig stringente Immunpräzipitation mit dem α -myc-tag Antikörper durchgeführt (von einer 10cm-Schale transient transfizierter COS7- oder 293-Zellen). Das Immunpräzipitat wurde dreimal mit F-Puffer und einmal mit HD-Puffer gewaschen. Die Enzymaktivität wurde durch Freisetzung von Acetat von ³H-acetylierten Hühnchen-Retikulozyten-core-Histonen (P. Loidl) wie folgt bestimmt. Der immunpräzipitierte HDAC-Komplex wurde mit 25µl HD-Puffer (Taunton et al., 1996) und 5µl markierten Histonen (ca. 12000 cpm eingesetzter Radioaktivität) versetzt und 1,5 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktion

wurde dann mit 40µl 0,4M Acetat/1M HCl gestoppt und der Ansatz gevortext. Das freigesetzte markierte Acetat wurde durch Zusatz von 1 ml Ethylacetat in die lipophile Phase überführt und zur Phasentrennung 5 min bei 14.000 upm zentrifugiert. Von der oberen Phase wurde ein Aliquot von 800 µl abgenommen und in 3 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen.

1.5.11. Kinase-Assays

Kinase-Puffer	50mM Hepes pH7,5 10mM MgCl ₂ 1mM DTT (frisch zugesetzt) 2,5mM EGTA 10mM b-Glycerophosphat
g-ATP (P ³²)	NEN (NEG002H), 10mCi/ml
<i>Destain</i> -Lösung	40% Ethanol 10% Essigsäure
Sf E/2	Baculovirus-aufgereinigtes Cyclin E/ Cdk2 (R. Lilischkis)
Cyclin D-Puffer	50mM Hepes pH7,5 150mM NaCl 2,5mM EGTA 1mM EDTA 1mM DTT 0,1% Tween 20 10% Glycerol
Roscovitin	25mM Stock-Lösung in DMSO (1:1000) (Calbiochem; Kat.Nr.=557360)

Der Kinase-Assay wurde entweder direkt mit GST-Proteinen als Substrat durchgeführt oder im Anschluß an eine Immunpräzipitation des Substrates. Eine Standardisierung der eingesetzten Proteinmengen erfolgte über eine Coomassi-Färbung des Geles. Als Negativkontrolle wurde das GST-Protein (1µg) allein verwendet.

Im Falle einer vorhergegangenen Immunpräzipitation wurden die beads zweimal mit F-Puffer, einmal mit Kinase-Puffer gewaschen. Die Kinase-Reaktion erfolgte in Kinase-Puffer (final 25µl) unter Zugabe von 1mM kaltem ATP, 10µCi g-ATP (P³²) und 1µl Sf Cyclin E/Cdk2 bei 30°C für 30 min.

In einer 3. Variante wurde direkt das Enzym aus synchronisierten NIH3T3-L1-Zellen (s. 1.2.5.) in Frackelton- bzw- Cyclin D-Puffer immunpräzipitiert (mit Santa-Cruz-Antikörpern spezifisch gegen Cyclin A (C-19), Cyclin E (M-20) und Cdk4 (C-22)), mit Kinase-Puffer gewaschen und mit 10µCi g-ATP (P³²) und 1µg Histon H1 bzw. 200ng Rb in eine Kinase-Reaktion eingesetzt.

Zur Überprüfung der Spezifität der Cyclin E/Cdk2-Aktivität wurden 25µM Roscovitin eingesetzt.

Die Reaktion wurde direkt durch Zugabe von 4fach SDS-PAGE-Auftragspuffer gestoppt und 5min bei 95°C inkubiert. Zur Auftrennung der phosphorylierten Proteine wurde der Überstand auf ein 12,5 %iges SDS-Gel geladen. Die Lauffront mit freiem ATP wurde abgetrennt und entsorgt, das restliche Gel zunächst 30min in *Destain*-Lösung fixiert, dann getrocknet und für die Autoradiographie exponiert (Phosphoimager oder Film).

1.5.12. Bestimmung der Halbwertszeit

Emetine (Sigma; 100mM Stock in DMSO; 1:1000 final)

Zur Bestimmung der Halbwertszeit von HDAC1myc bei Koexpression anderer Proteine wurden 293 Zellen transient transfektiert. Am 3. Tag wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 100µM Emetine für 0, 0,5, 1, 2, 4 Stunden gehemmt und das weiterhin der Degradation unterliegende Protein quantifiziert. Dies erfolgte durch direkte Lyse der Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten in 4fach SDS-PAGE-Puffer und Auftrennung über ein 12.5% iges denaturierendes Gel. Danach wurde ein Western Blot angeschlossen und mit dem α -Myc Antikörper spezifisch das überexprimierte HDAC1myc detektiert.

1.5.13. Peptid-Kartierung und Phosphoaminosäuren-Bestimmung

50mM NH_4HCO_3 (Ammoniumbicarbonat)

20% SDS

β -Mercaptoethanol

1 mg/ml RNase

100% TCA

H_2O_2

Ethanol: Ether 1:1

Performsäure (Ameisensäure + H_2O_2 , 10:1, 1h bei RT)

1 mg/ml Trypsin (Roche, *sequencing grade*)

5,7 N HCl

pH1,9 Puffer 45 ml 98% Ameisensäure

155 ml Eisessig

1800 ml H_2O

pH3,5 Puffer 0,25 M EDTA

10 ml Pyridin

100 ml Eisessig

1825 ml H_2O

Ninhydrin (0,25% in Aceton)

Chromatographie-Laufpuffer Isobuttersäure: Pyridin: Eisessig: N-Butanol: H_2O
(65: 5: 3: 2: 29)

Chromatographie-Platten DC-Platten 20x20cm
Cellulose (Merck-1.05716)

Phospho-Serin, Phospho-Threonin, Phospho-Tyrosin (Sigma) je 1 mg/ml in pH1,9

Peptid-Kartierung:

Zur Bestimmung der Anzahl Cyclin E/Cdk2-phosphorylierter Peptide in HDAC1 wurden ein Kinase-Assay wie unter 1.5.11. beschrieben mit GST-HDAC1 und Sf E/2 durchgeführt.

1. Nach Abgleich mit der Autoradiographie wurden die radioaktiven Banden auf Höhe des HDAC1-Proteins ausgeschnitten, Filterpapierreste mit einem Skalpell entfernt.
2. Das Gelstück wurde in 50 mM NH_4HCO_3 + 5 μl 20% SDS + 10 μl β -Mercaptoethanol gelöst und mit einem Pistill im Tübchen gequetscht.
3. Der Ansatz wurde gevortext und 5 min bei 5°C inkubiert, dann 6h bzw. ∞ bei 37°C zur Dialyse. Nach einer Zentrifugation bei 15000 upm für 10 min wurde der Überstand in ein neues Tübchen transferriert und erneut mit NH_4HCO_3 für einige Stunden extrahiert.
4. Beide Überstände (final 1,2 ml) wurden vereint und wie oben zentrifugiert.
5. Zugabe von 10 μl 1 mg/ml RNase A + 250 μl 100% TCA. Inkubation 40 min auf Eis. Zentrifugation für 15 min bei 15000 upm bei 4°C (kein Pellet sichtbar!).
6. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml EtOH:Ether (1:1) zweimal gewaschen (vortexen), 5 min getrocknet.
7. Oxidation in 30 ml Performersäure auf Eis für 90 min. Zugabe von 1 ml H_2O und Lyophilisieren in der Vakuumzentrifuge. Verbleibende Radioaktivität im Szintillationsmesser bestimmen.
8. Zugabe von 20 ml 50 mM NH_4HCO_3 + Trypsin (1 mg/ml) 1x 1 ml (∞) und 4x 0,5 ml (während des Tages).
9. Zugabe von 1 ml H_2O , Inkubation bei 56°C für 15 min, Zentrifugation für 15 min bei 15000 upm, Transfer des Überstandes und Lyophilisieren der Probe, nochmal 1 ml H_2O zugeben, lyophilisieren und im Szintillationsgerät messen.
10. Lösen der Probe in 5-10 μl pH1,9 Puffer, 2 min vortexen, Auftragen auf die Cellulose-Platte. Elektrophorese in pH1.9 Puffer für 20min bei 1,8 kV. Trocknen der Platten für 1 h.
11. Chromatographie in entsprechendem Tank im Chromatographie-Puffer für 8-10h.

Phosphoaminosäuren-Bestimmung:

Zur Bestimmung der phosphorylierten Aminosäure(n) in HDAC1 wurde wie oben bei der Peptid-Kartierung unter 1.-7. beschrieben verfahren. Die Probe wurde dann allerdings nicht tryptisch verdaut, sondern einer Totalhydrolyse unterzogen (2h bei 110°C in 5,7 N HCl). Die Probe wurde zum Entfernen des HCl wieder in 1 ml H_2O aufgenommen und lyophilisiert. Wie oben unter 10. beschrieben wurde die Probe in 5-10 ml pH1,9 Puffer aufgenommen, gevortext und auf die Chromatographie-Platte aufgetragen. Um die phosphorylierte Aminosäure als Serin, Trypsin oder Threonin zu identifizieren, wurden auf dieselbe Stelle der Platte auch je 1 μl von Phospho-Serin/ -Threonin und -Tyrosin (1 mg/ml) gespottet. Die Elektrophorese wurde 20 min bei 1,8 kV und 10 psi Druck in pH1,9 Puffer durchgeführt. Die Platte wurde danach getrocknet, dann mit einer Filterpappe mit pH3,5 Puffer gleichmäßig befeuchtet und dann um 90° gedreht erneut für 16 min bei 1,6 kV in der 2. Dimension aufgetrennt. Die abermals getrocknete Platte wurde dann mit Ninhydrin gleichmäßig besprüht und 5 min bei 65°C im Ofen entwickelt. Die lilafarbenen Farbspots zeigen die Lokalisation der 3 Referenz-Phosphoaminosäuren. Von der Platte wurde dann ein Autoradiographiefilm entwickelt, der durch Auflegen auf die gefärbte Platte und Abgleich mit den 3 Referenz-Phosphoaminosäuren Aufschluß über die Identität des Signals gibt.

1.5.14. Apoptose-Assays (Spaltung und Aktivität von Caspase-8)

30h nach Induktion der Mad1-Expression und 15h nach Induktion des Apoptose-Signalweges (s. 1.2.8.) wurden die Zellen geerntet.

Für die Analyse der Pro-Caspase-8-Spaltung wurden die Zellen direkt in 1fach Auftragpuffer für SDS-PAGE lysiert, ultrabeschallt, 5 min bei 95°C inkubiert und die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Caspase-8-Spaltung konnte dann im Western Blot mit dem Anti-Caspase-8 Antikörper C-15 detektiert werden, der Caspase-8 *full-length* erkennt, sowie die Spaltprodukte p43, p41 und p18.

Für die Analyse der Caspase-8-Aktivität wurde von Pharmingen ein fluorogenes Caspase-8-Substrat verwendet (Ac-IETD-AFC; Kat.Nr.: 66961U). Für Caspase-3 wurde ein vergleichbares Substrat von Alexis verwendet (Z-DEVD-AMC; Kat.Nr.: 260-048-M001). Für die Messung wurde eine 10 cm Schale induzierte bzw. nicht-induzierte, apoptotische bzw. Kontroll-Zellen von M19 in 800 µl Frackelton-Puffer (mit 100 mM NaCl and 10 mM DTT) geerntet und mit 17 mM Ac-IETD-AFC oder 19 mM Z-DEVD-AMC versetzt. Die Reaktion wurde direkt im Spektralfluorometer bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm über 30min bei 37°C verfolgt. Innerhalb dieses Zeitfensters war die Reaktion linear. Die Steigung (= Enzymaktivität) wurde kalkuliert. Der subtrahierte Hintergrund ergab sich aus der Steigung der Kontroll-Lysate, die ohne Substrat gemessen wurden.

1.6. Arbeiten mit RNA

1.6.1. Aufreinigung von RNA

DEPC-Wasser

(Diethylpyrocarbonat)

Aqua bidest. mit 0,1% DEPC über Nacht stark rühren; anschließend DEPC durch zweimaliges Autoklavieren zerstören.

Denaturierungslösung

47,26 g Guanidiniumisothiocyanat
2,5 ml (final 25 mM) 1 M Na-Citrat, pH 7,0
0,7 ml (final 100 mM) β-Mercaptoethanol
0,5 g (0,5%) Na-Laurylsarcosinat
0,1 g (0,1%) Antifoam A
ad 100 ml mit H₂O

Phenol-Chloroform-Mix

0,8 ml NaAc (NaCH₃COO²⁻) pH 4,0
8,0 ml Phenol (Wasser-gesättigt)
1,6 ml Chloroform

Alle Arbeiten im Rahmen von RNA unterliegen besonderer Sorgfalt. Es wurde nur mit Filter-Spitzen, DEPC-Wasser, gebackenen Gefäßen bzw. anderen RNase freien Gerätschaften gearbeitet.

Zur Isolierung von etwa 500 mg total RNA aus M19 Zellen wurden mind. 10x 15cm-Schalen mit konfluenten Zellen benötigt. Alle Schritte der Aufarbeitung der RNA erfolgten wenn möglich auf Eis. Die Zellen wurden trypsinisiert, mit PBS einmal gewaschen und in 8 ml Denaturierungslösung aufgenommen, homogenisiert und nach

Zugabe von 10 ml Phenol-Chloroform-Mix 10 sec gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Transfer in ein 30 ml Corex Glasröhrchen wurde das Lysat 15 min bei 10.000 upm zentrifugiert. Der Überstand (wässrige Phase) wurde abgenommen und nach Zugabe von 1 Vol. Isopropanol in einem 50 ml Falcon Röhrchen für mind. 1 h oder üN bei -20°C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 6.000 upm wurde das Pellet in 2 ml H₂O aufgenommen. Es wurde erneut extrahiert, indem 2 ml Phenol/Chloroform (Wasser-gesättigt) zugegeben wurde, 10-20 sec gevortext, der Überstand in ein Falcon Röhrchen überführt und für 5 min bei 3.000 upm zentrifugiert wurde. Zum Überstand wurde dann 1/2 Vol. NH₄Acetat, pH 7,5 und 2,5 Vol. EtOH zugegeben und nach 10 min Fällern bei RT für weitere 10 min bei 6.000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 100 µl H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch die photometrische Bestimmung der OD₂₆₀, wobei für einzelsträngige RNA zusätzlich zum Verdünnungsfaktor mit der Gleichung 1OD= 40 µg/ml RNA kalkuliert wurde. Die total RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder entsprechend dem Protokoll des Quiagen *Oligotex Direct mRNA kits* zu mRNA weiter aufgereinigt.

1.6.2. RNase Protection Assay

hApo-1c, -2c, -3b, 3d, -6 *Multi-Probe Template Set* von Pharmingen
(Kat. Nr.:45607P, 45609P, 45611P, 45616P, 45612P)

DEPC-Wasser (s.o.)

Filter-Spitzen

10x Hybridisierungspuffer 400mM Pipes pH 6,4
 4M NaCl
 10mM EDTA
 lagern bei -80°C

finaler Hybridisierungspuffer 0,1 Vol 10x Hyb.-Puffer,
 0,1 Vol ddH₂O
 0,8 Vol Formamid (frisch zugeben)

Digestion Mix 40 µl RNase A (10 mg/ml)
 + 71,5 µl RNase T1 (280 mg/ml = 500.000 U/ml)
 + 600 µl 5M NaCl
 + 100 µl Tris pH 7,4 (final 10mM)
 + 100 µl 0,5M EDTA
 ad 10 ml H₂O

Formamid-Ladepuffer 200 µl 0,5m EDTA
 10 mg Xylencyanol
 10 mg Bromphenolblau
 8 µl Formamid
 ad 10 ml H₂O

1. Herstellen der RNA-Sonde durch *in vitro* Transkription:

7 µl H₂O (ad 20 ml)
+ 2 µl linearisiertes (Restriktionsstelle = Ende der

- Sonde), gereinigtes Plasmid (0,5 mg)
 + 2 µl 10x Polymerase Puffer
 + 2 µl rNTPs (5mM ATP, CTP, GTP)
 + 1 µl RNase Inhibitor
 + 5 µl α-³²P-rUTP (100 µCi)
 + 1 µl RNA-Polymerase (T3/ T7/ SP6)
 → > 1 h, 37°C
2. Aufreinigung der RNA-Sonde: + 1,5 µl DNase I (10 U/ ml)
 → 15 min, 37°C
- + 100 µl 0,2% SDS
 + 200 µl Phenol/ Chloroform (H₂O gesättigt)
 vortex 30 sec,
 5 min zentrifugieren bei 15.000 upm
 ca. 130 µl in neues Tübchen
 + 0,1 Vol 3M NaAc, pH 5,2
 + 2,5 Vol 100% EtOH
 10 min auf Eis
 10 min zentrifugieren bei 15.000 upm bei 4°C
 waschen mit 500 µl 70% EtOH
 zentrifugieren s.o.
 trocknen
 lösen in 50 µl ddH₂O
 1 µl im Szintillationsgerät messen
 (soll: 0,5-1x10⁶/ ml)
3. Vorbereiten des RNA-Pools: 40 µg total RNA (gewonnen aus Zellkultur-Zellen,
 s. Abschnitt 1.6.1)
 + 10 µl (=0,1 Vol) 3 M NaAc, pH 5,2
 + 250 µl (= 2,5 Vol) 100% EtOH
 → 30 min -20°C
 zentrifugieren 15 min 15.000 upm bei 4°C
 waschen mit 500 µl 70% EtOH, trocknen
 lösen in 30 µl Hybridisierungspuffer
4. Hybridisierung: Zugabe von 500.000 cpm RNA-Sonde
 (von Schritt 2.) zum RNA-Pool (aus Schritt 3.)
 → 10 min 85°C (Aufheben der RNA
 -Sekundärstruktur)
 → Hybridisierung bei 45°C ün
5. Verdau der Einzelstrang-RNA: +300 µl *digestion* Mix
 → 60 min, 30°C
6. Aufreinigung der Doppelstrang-RNA-Fragmente:
- + 10 µl 20% SDS
 + 10 µl Proteinase K (10 mg/ml)
 → 30 min, 37°C
 + 400 µl Phenol/Chloroform

(H₂O gesättigt, schütteln!)
 → vortex 30 sec, 5 min zentrifugieren
 Überstand (max. 300ml)
 + 20 µg tRNA
 + 750 µl 100% EtOH
 → 30 min, -20°C
 15 min bei 4°C zentrifugieren
 waschen mit 500 µl 70% EtOH
 15 min bei 4°C zentrifugieren
 trocknen
 lösen in 15 µl Formamid-Ladepuffer
 10 min bei 95°C

7. Polyacrylamid-Gel:

Stammlösung: 210 g Harnstoff (8%)
 + 300 ml 1x TBE
 + 100 ml Acryl 19:1
 ad 500 ml

Gel: 60 ml Stammlösung
 + 600 µl APS 10%
 + 20 µl TEMED

Gel ohne Luftblasen gießen,
 Kamm mit spitzen Taschen,
 mit long-needle tip beladen,
 30 min bei 60 Watt vorlaufen lassen (gleichmäßig
 warm),
 bei 60 Watt: bis die untere Markerfront 5 cm vor
 Gelende ist,
 Gel trocknen,
 Autoradiographie

1.6.3. Northern Hybridisierung

50x MOPS-Puffer (pH 7,0) für 1 L; nicht autoklavieren; dunkel lagern
 200 mM MOPS
 50 mM Na-Acetat (6,8 g)
 10 mM EDTA (pH 8,0) (3,4 g)

Formaldehyd-Gel 2,25 g Agarose
 5 ml 50x MOPS
 203 ml H₂O
 42 ml Formaldehyd (37%ig) (nach Aufkochen und
 Abkühlen der Agarose zugeben!)

Formaldehyd-Laufpuffer für 2l (mehrfach verwendbar):
 40 ml 50x MOPS
 1,625 l H₂O
 330 ml Formalehyd (37%ig)

Mastermix	20 µl 100% Formamid 7 µl 37%iges Formaldehyd 1 µl 50x MOPS 1 µl Bromphenolblau 0,1-0,5 µl Ethidiumbromid
20x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Na-Citrat, pH 7,0 ad 1l Aqua bidest
Church-Puffer	1mM EDTA 0,5M NaHPO ₄ , pH 7,2 7% SDS

Formaldehyd-Agarosegel:

Pro Geltasche wurden mit 20 µg total RNA bzw. 2 µg mRNA geladen, die sich jeweils in einem Volumen von 13 µl H₂O befanden. Dazu wurden 30 µl Mastermix gegeben. Die Ansätze wurden dann 5 min bei 65°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz anzentrifugiert und in die Taschen geladen. Das Gel wurde bei 50 V laufen gelassen, bis die Proben aus den Taschen ins Gel eingetreten waren, dann wurde auf 100 V (3-4 V/cm²) erhöht und eine Pumpe zum Umwälzen des Laufpuffers angeschaltet. Nach Ende des Gellaufs sollten unter UV-Licht die 28S und 18S Banden ribosomaler RNA auf dem Gel zu sehen sein. Die Integrität der RNA konnte daran fest gemacht werden, daß kein RNA-Schmier auftrat und das Verhältnis der 28S zur 18S RNA etwa 2:1 betrug.

Transfer der RNA auf Nylonmembran:

Nach Ende des Gellaufs wurde das Gel kurz in Bidest. gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Danach wird das Gel 15-20 min in 10x SSC (Transferpuffer) äquilibriert. Zum Blotten der RNA wurde in einer mit 10x SSC gefüllten Schale aus einer kleineren Glasschale ein Tisch errichtet. Auf diesen wurde ein Streifen Whatman 3MM Filter gelegt, so daß dieser in den Puffer eintauchte. Darauf wurde das Gel mit der Öffnung der Taschen nach unten gelegt. Überschüssige Bereiche wie unbenutzte Spuren oder die Ränder (Meniskus!) des Gels wurden vorher mit einem Skalpell abgeschnitten. Es folgte ein Stück Nylonmembran, das exakt auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten wurde und weitere 3 Lagen Whatman 3MM Filter. Den Abschluß bildete ein 5-8 cm hoher Stapel aus Papierhandtüchern, auf den eine Glasplatte gelegt wurde. Der gesamte Aufbau wurde mit einem 0,5 kg Gewicht beschwert. Der kapillar nach oben wandernde Puffer transferierte die RNA auf die Membran. Der Blot erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur, wurde dann 10 min in 2x SSC gewaschen. Die RNA wurde auf dem noch feuchten Filter mit UV-Strahlung kovalent gebunden und zusätzlich 2 h bei 80°C gebacken. Das Gel konnte dann wegen des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht auf vollständigen Transfer überprüft werden.

Markierung der Sonde

Als Sonde wurde ein Fragment eines Plasmidinserts benutzt, das einem konservierten, spezifischen Abschnitt der zu detektierenden RNA im Northern entspricht, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Zur Markierung dieses Fragmentes wurde das *PRIME-IT II Random Labeling Kit* (Stratagene) verwendet und nach Hersteller-Protokoll verfahren. 50 µCi dCTP-³²P wurden hierbei pro zu markierendes Fragment eingesetzt. Die Aufreinigung der Sonde erfolgte über tRNA-unterstützte Et-OH-Fällung. Denaturiert

wurde entweder durch Zugabe von 30 µl 2 M NaOH zu 100 µl Sonde oder direkt durch 3 min Inkubation bei 95°C.

Hybridisierung

Die Membran wurde zuerst 2 h bei 65°C in Church-Puffer vorhybridisiert. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurden zusätzlich 50 µl Cot-1 DNA (nach 3 minütiger Denaturierung bei 95°C) und 50 µl PolydA (Boehringer) auf ein Volumen von 50 ml Church-Puffer gegeben.

Zur anschließenden Hybridisierung wurde die denaturierte, radioaktiv markierte, denaturierte (30 µl 2 M NaOH/ 100 µl Sonde) Sonde (1×10^7 cpm) direkt in die Prähybridisierlösung pipettiert und über Nacht inkubiert. Der Filter wurde dann zweimal 30-45 min in 2x SSC/ 1% SDS und einmal 30 min mit 0,5% SSC/ 1% SDS bei Hybridisierungstemperatur gewaschen bis der Handzähler ca. 100-300 IPS pro Membran anzeigte. Alle Hybridisier- und Waschschrte wurden in einem Hybridisierofen ausgeführt.

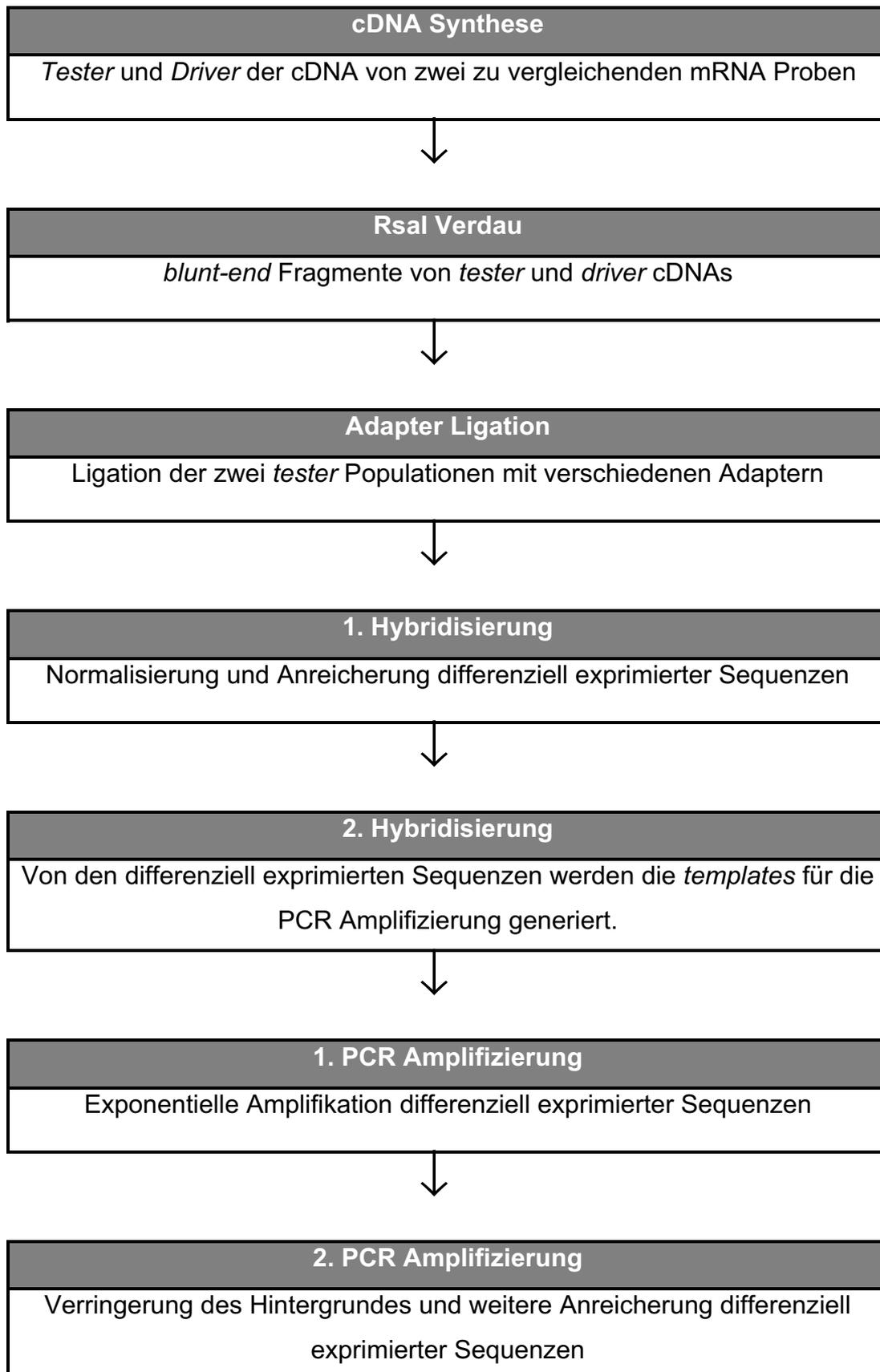
Zur Detektion der Banden wurde die Membran in einen Vernichtungsbeutel eingeschweißt und auf einem Phosphoimager-Screen exponiert bzw. mit Verstärkerscreen bei -20°C für 1-2 Tage ein Film belichtet.

1.7. PCR-Select und Identifizierung der differentiell exprimierten RNAs

Bei PCR-Select handelt es sich um eine substraktive Hybridisierung mittels der zwei verschiedene mRNA-Populationen miteinander verglichen werden können, indem solche mRNAs über PCR angereichert werden, die nur in einer der beiden Populationen vorhanden ist. Dazu wurde das Protokoll von Clontech PCR-Select (PR99466) als Vorlage verwendet. Primer sowie alle benötigten Reagenzien wurden nach Angaben dieses Protokolls selber zusammengestellt (s. 1.7.1.).

Diese Methode wurde hier angewendet, um potentielle Zielgene von Mad1 zu finden. Dazu wurde die stabile Tet-Mad1 Zelllinie verwendet. Sowohl von induzierten als auch von nicht-induzierten Zellen wurde die mRNA gewonnen (s. 1.6.1). Die substraktive Hybridisierung wurde dann jeweils mit der induzierten (*forward subtraction*) bzw. der nicht-induzierten (*reverse subtraction*) mRNA als *tester* durchgeführt (s. Abb. 11.).

Die angereicherten Sequenzen des jeweiligen Durchlaufes wurden auf zwei verschiedene Weisen identifiziert. Zum einen wurden sie in den Vektor pZERO subkloniert, sequenziert und dann über die Datenbank des NCBI im *Blast-Search* einer entsprechenden Gensequenz zugeordnet (s. 1.7.2.). Zum anderen wurde ein *Unigene* Filter vom RZPD mit 36.000 EST-Klonen (*Library No. 950 Human Unigene 1 cDNA*) verwendet (s. 1.7.4.). Dieser wurde jeweils mit einem der beiden mRNA-Pools hybridisiert, der aus der 2. (*nested*) PCR mit radioaktiv-markiertem dCTP stammt. Die detektierten spots, die aus den beiden Hybridisierungen mit den beiden angereicherten mRNA-pools differentiell exprimierter Gene stammten, wurden gegeneinander abgeglichen. Nur solche spots, die aus einem der beiden Hybridisierungen resultierten, wurden als potentielle Zielgene ausgewertet.



(nach Figur 1. im Clontech Handbuch zum PCR-Select™ cDNA Substraction Kit)

1.7.1.1. PCR-Select-Protokoll

Folgende Abweichungen zum Clontech-Protokoll wurden vorgenommen.

1. Zur Erst-Strang-Synthese der cDNA wurde die Reverse Transkriptase Stratascript (Stratagene) verwendet. Die Synthese erfolgte für 2h bei 42°C nach Angaben des Herstellers.

2. Zur direkt anschließenden Zweitstrangsynthese wurde folgender 3,5x Mastermix zusammenpipettiert:

- 185,15 µl H₂O
- + 28 µl 10x Ligase Puffer
- + 5,6 µl dNTPs
- + 3,5 µl RNase H
- + 7,35 µl Ligase E.coli
- + 4,2 µl KCl (3,3 M)
- + 2,8 µl (NH₄)SO₄ (1M)
- + 8,4 µl DNA Polymerase I (10 U/ µl)
- 2 h, 16°C

3. Die anschließenden Phenol/ Chloroform-Aufreinigungsschritte wurden unter Verwendung von *Phase Lock Gel* (Eppendorf) durchgeführt, um Verluste zu minimieren.

4. Für alle PCR-Reaktionen wurde die *Advanced* Polymerase (Clontech) eingesetzt.

5. Hybridisierungen und anschließende PCR-Zyklen wurden wie im Clontech-Protokoll angeraten durchgeführt. Allerdings wurde die Zyklenzahl der 1. PCR von 27 auf 30, die der 2. PCR von 12 auf 15 erhöht.

1.7.1.2. Interne Kontrollen zum PCR-Select-Durchlauf

Drei Kontrollen zur Absicherung eines quantitativ und qualitativ optimalen Ablaufes der Methode wurden wie im PCR-Select-Protokoll vorgeschlagen übernommen und im Ergebnis-Teil näher beschrieben.

Prinzipiell wurde zum einen auf Vollständigkeit des Rsa I-Verdaus geprüft (s. 3.2.2.1.).

Zum zweiten wurde als Kontroll-Subtraktion eine HaeIII-verdaute FX174-DNA als *tester* eingesetzt (s. 3.2.1.3.).

Als dritte Kontrolle der Subtraktions-Effizienz innerhalb eines Durchlaufes wurde die Anreicherung von max (Primer von K. Bouchard) (*Annealing*-Temperatur 57°C) mittels einer semiquantitativen PCR analysiert (s.3.2.1.3.). Auch hier wurde wieder nach dem Clontech-Protokoll Abschnitt V.-E. verfahren, wobei alle 5 Zyklen zwischen dem 18. und dem 38. 5 ml des PCR-Produktes entnommen wurden. Max sollte im nicht-subtrahierten cDNA-Pool weiterhin präsent sein, aber nicht mehr nach erfolgter Subtraktion, da davon ausgegangen wird, daß max unabhängig von einer Mad1-Induktion in beiden Zell-Populationen exprimiert wird.

1.7.2. pZERO-Klonierung

Zur Subklonierung der angereicherten, differenziell exprimierten Fragmente wurde sich der Tatsache bedient, daß in der Sequenz von Adapter 1 eine NotI-Restriktionsstelle (GC/GGCCGC), im Adapter 2R eine EagI/ EaeI-Stelle (C/GGCCG, Y/GGCCR) vorliegen. Beide Restriktionsstellen enthalten aber auch die Erkennungssequenz für das Enzym EciXI (C/GGCCG).

Für die Klonierung wurde wie zuvor beschrieben die 1. und 2. PCR durchgeführt, die dann gefällt wurde:

20 µl PCR-Ansatz
 + 10 µl 7,5 M NH₄Acetat
 + 7,5 µl EtOH
 + 1 µl Glykogen/ EDTA
 → 1 h, -20°C; 20 min 13.000 upm zentrifugieren;
 80% EtOH Waschschrift, erneut zentrifugieren
 Pellet in 18 µl H₂O aufnehmen,
 + 2 U EclXI
 + 2 µl 10x Puffer
 → 1,5 h, 37°C
 Phenol-Chloroform-Aufreinigung
 EtOH-Fällung
 Aufnahme in 7 µl

Die Klonierung in pZERO erfolgte nach dem Protokoll zum *Zero BackgroundTM Cloning Kit* von Invitrogen (K2500-01).

pZERO (1mg/ml), 30 min NotI-Verdau bei 37°C,
 Inaktivierung 20 min bei 65°C

Ligation:
 10 ng pZERO (NotI-geschnitten)
 + 7 µl Fragment-Pool (EclXI-geschnitten)
 + 1 µl Ligase (Biolabs)
 + 1 µl 10x Puffer
 → 4 h RT

Transformation:
 XL10 Bakterien werden mit dem halben Ligationsansatz transformiert (s. 1.3.3);

Ausplattieren:
 Niedrig-Salz Agarplatten (höhere Salzkonzentrationen hemmen Zeocin!) mit Zeocin (50 µg/ml)/ IPTG (1mM)
 → Selektion gegen leeren pZERO-Vektor

Sequenzierung:
 Qiagen Plasmid-Minipräparationen von den Klonen 1.-72.;
 Verdau mit EclXI zur Bestimmung der Insertlänge;
 Sequenzierung;
 Abgleich mit der NCBI-Datenbank über *Blast-Search*

1.7.3. Kolonie-Hybridisierung (*colony dot blot*)

Aus den in der Diskussion zum Kolonie Dot Blot angeführten Gründen ist bei dem PCR-Select-Verfahren mit der hier verwendeten induzierbaren Mad1-Zelllinie mit einem hohen Hintergrund an falsch positiv subtrahierten Klonen zu rechnen. Diese mußten nun hier extern noch einmal auf ihre tatsächliche differenzielle Expression geprüft

1.7.4. Unigene Filter Hybridisierung

Da die Identifizierung der subtrahierten cDNAs mittels Klonierung, Kolonie-Filter-Validierung und Sequenzierung recht zeitaufwendig ist, wurde im folgenden ein neues System entwickelt. Hier wurde ein *Unigene* Filter vom RZPD (*Library No. 950 Human Unigene 1 cDNA*) eingesetzt.

Als Sonde wurde der Pool angereicherter, subtrahierter cDNAs nach der 1. PCR verwendet. Angeschlossen wurde die 2. *nested* PCR, die hier gleichzeitig zum Einbau radioaktiv markierten dCTPs diente.

Markierung:

12,5 µl H₂O
 2,5 µl 10x Advantage Taq-Puffer
 2 µl *template* der 1. PCR (1:10 verdünnt)
 2x 2,5 µl *nested* Primer
 0,5 µl Advantage Taq
 2 µl = 20 µCi dCTP ³²P

PCR-Protokoll:

94°C Advantage Taq-Aktivierung, dann
 94°C 10 sec
 65°C 30 sec
 68°C 2,5 min
 → 20 Zyklen

+ 75 µl H₂O
 + 100 µl Phenol/ Chloroform
 zentrifugieren, wässrige Phase übernehmen
 + 2 µl tRNA
 + 25 µl NH₄Cl 7,5 M
 + 250 µl EtOH
 1h -20°C, 20 min zentrifugieren bei 13.000 upm
 Pellet in 100 µl aufnehmen

Prähybridisierung, Hybridisierung (bei 64°C) und Waschen (bei 60°C) s. Northern Protokoll (1.6.3.). Die Auswertung erfolgte nach Autoradiographie, indem die Filme nach Hybridisierung mit dem Pool *forward* und *reverse* subtrahierter cDNAs gegeneinander abgeglichen wurden. Nur solche spots, die auf einem der beiden Filme zu detektieren waren, wurden später über die Datenbank des RZPDs als potentiell differenziell exprimierte Gene identifiziert. Eine letzte Verifizierung der differenziellen Expression erfolgte im Northern.

2. Einleitung

2.1. Die Regulation der Genexpression

Betrachtet man die Vielzahl der Einflüsse, die auf eine einzelne Zelle einwirken und auf die sie optimal reagieren muß, um einem negativen Selektionsdruck zu entgehen, wird deutlich, warum die Genexpression nicht statisch sein kann.

Bei mehrzelligen Organismen kommt hinzu, daß die Zellen ihre Pluripotenz verloren haben und durch Differenzierung eine Aufgabenteilung aufweisen. Um nun die Homöostase des gesamten Organismus zu gewährleisten, müssen diese Zellen auch auf der intrazellulären Ebene reguliert werden, d.h. das Programm ihrer Genaktivitäten muß in Hinsicht auf das Überleben des Organismus koordiniert sein. Damit wird bei mehrzelligen Lebewesen ein neues "Genprogramm" notwendig, die Apoptose. Durch den selbst-induzierten Zelltod kann zum Wohle des Gesamtorganismus die Weitergabe von Fehlern z.B. auf der DNA-Ebene vermieden werden, die sonst zur Krebsentstehung beitragen würden. Somit können im Wesentlichen drei Aspekte des zellulären Schicksals unterschieden werden, die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose. Sie unterliegen einer strikten Kontrolle, die vornehmlich über die Regulation der Genexpression erfolgt.

Damit sind hier die Begriffe der Genregulation und der Apoptose eingeführt, die in den folgenden Kapiteln der Einleitung näher erläutert und dann mit dem Thema der vorliegenden Dissertation in Zusammenhang gebracht werden sollen.

2.1.1. Der bHLHZip-Transkriptionsfaktor Mad1

2.1.1.1. Das Myc/Max/Mad-Netzwerk

Die Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes gehören zu den bHLHZip-Transkriptionsfaktoren. Sie haben eine DNA-bindende basische Region (b) und eine unmittelbar anschließende Proteindimerisierungsdomäne „Helix-Loop-Helix" (HLH) mit einem „Leuzin-Zipper" (ZIP) (s. Abb. 4.). Die Bindungsspezifität von Myc/Max- und Mad/Max-Komplexen zur E-Box unterscheiden sich nicht wesentlich [Sommer et al., 1997].

Die Myc-Familie weist zusätzlich eine N terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) auf [Ingvarsson et al., 1990; Kato et al., 1990]. Sie enthält die für alle Myc-Funktionen essentielle und evolutionär konservierte Myc-box I (MBI) und Myc-box II (MBII).

Jeweils Myc- und Max-, bzw. Mad- und Max-Proteine formen Heterodimere, die in den Promoterbereichen ihrer Zielgene an eine spezifische DNA-Sequenz, die E-Box (5'-CACGTG), binden. Diese Heterodimere üben auf biologischer und molekularer Ebene zum Teil gegenläufige Funktionen aus (s. Abb. 1.).

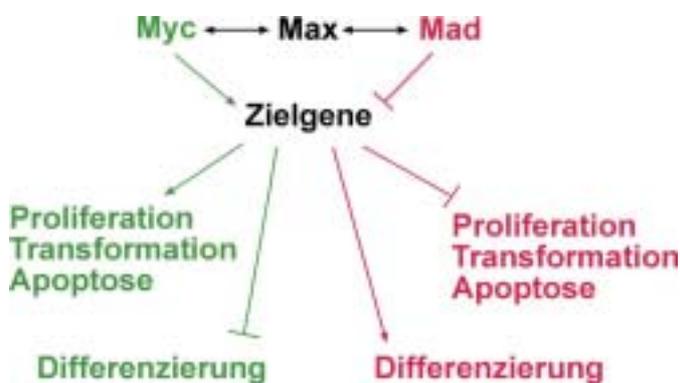


Abb. 1: Schematische Übersicht über die biologischen Funktionen der Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes.

Es soll hier zunächst näher auf c-Myc eingegangen werden, da aus seiner Funktion Rückschlüsse auf die antagonistisch wirkenden Mad-Proteine gezogen werden können.

c-Myc wurde als das zelluläre Homolog des transformierenden v-Myc des Vogel-Leukämie-Virus MC29 identifiziert. In Säugerzellen gibt es neben c-Myc auch noch N-Myc [Kohl et al., 1983] und L-Myc [Nau et al., 1985]. Die Charakterisierung von c-myc zeigte, daß es ein Proto-Onkogen ist. So ist die Expression von Myc in einer Vielzahl verschiedener Tumoren aufgrund von chromosomalen Translokationen (z.B. beim Burkitt-Lymphom), Genamplifikationen (z.B. beim Neuroblastom, kleinzelligen Lungenkarzinom) und retroviralen Insertionen fehlreguliert, was zu einer ständig erhöhten, nicht mehr regulierbaren Expression von Myc führt.

Diese tumorigenen und proliferierenden Eigenschaften von Myc-Genen ließen sich in Tier- und Zellkulturmodellen bestätigen. So führt die zielgerichtete Deletion von c-Myc oder N-myc in Mäusen zwischen Tag 9,5 und 10,5 der Embryonalentwicklung zur Letalität [Davis et al., 1993].

Dagegen entwickeln c-Myc transgene Mäuse mit hoher Frequenz Tumore [Henriksson et al., 1996]. Mausmodelle, in denen c-Myc konditional in epithelialen oder hämatopoetischen Systemen überexprimiert wird, zeigen, daß c-Myc allein ausreichend ist, um einen prä malignanten Status zu initiieren oder aufrecht zu halten [Pelengaris et al., 1999; 2000].

In zellulären Systemen korreliert die Expression von c-Myc mit einer erhöhten Proliferationsrate. Das zeigt sich z.B. auch daran, daß c-Myc als *immediate early gene* sehr früh durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mitogenen induziert wird [Grandori et al., 2000]. In ruhenden Zellen ist eine Expression von c-Myc nicht zu detektieren; nach Serumstimulation allerdings wird c-Myc bis zum Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus (s. 2.1.2.1.) stark induziert und fällt dann in proliferierenden Zellen auf ein basales Niveau ab (s. Abb. 2.). Im Verlaufe der Differenzierung von Zellen geht die Expression von c-Myc stark zurück [Henriksson et al., 1996; Facchini et al., 1998; Grandori et al., 1996]. Der Eintritt von ruhenden Zellen in den Zellzyklus wird durch Inhibierung der c-Myc Expression blockiert und eine Überexpression von c-Myc in ruhenden Zellen induziert die S-Phase [Eilers et al., 1989; 1991; Roussel, 1991; Barone, 1995]. c-Myc wird daher als positiver Regulator des G1-S-Überganges im Zellzyklus angesehen. Außerdem führt seine Koexpression mit aktiviertem Ras zur Immortalisierung von primären Zellen. Wird c-Myc dagegen in Abwesenheit von Überlebensfaktoren überexprimiert, so induziert es Apoptose über den ARF-Mdm2-p53 Signaltransduktionsweg [Zindy et al., 1998; Prendergast, 1999].

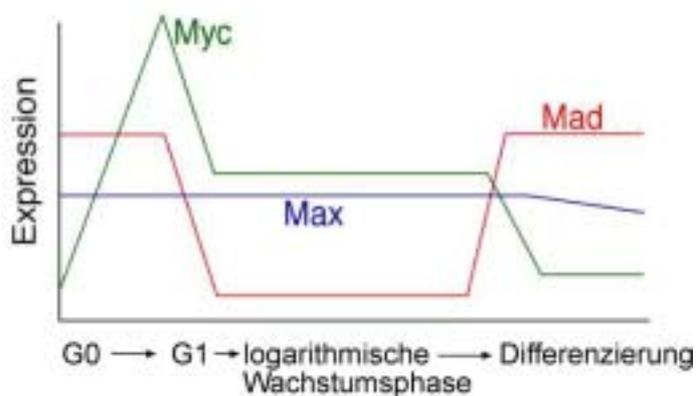


Abb. 2: Die differentielle Expression der Myc/Max/Mad-Proteine.

Die Expression der einzelnen Mitglieder der Myc/Max/Mad-Familie in ruhenden Zellen (G0), der G1-Phase des Zellzyklus, der Proliferation und der terminalen Differenzierung ist schematisch dargestellt.

Für den Mechanismus, über den c-Myc diese biologischen Funktionen ausübt, ist sein Charakter als Transkriptionsfaktor entscheidend. Da c-Myc allein keine DNA binden kann, wurde Max als Interaktionspartner isoliert. Beide weisen HLHZip-Domänen auf (s. Abb. 4.), über die sie ein Heterodimer bilden und binden dann über ihre basischen Domänen an die DNA [Blackwood et al., 1991; Prendergast et al., 1991; Luscher et al., 1999].

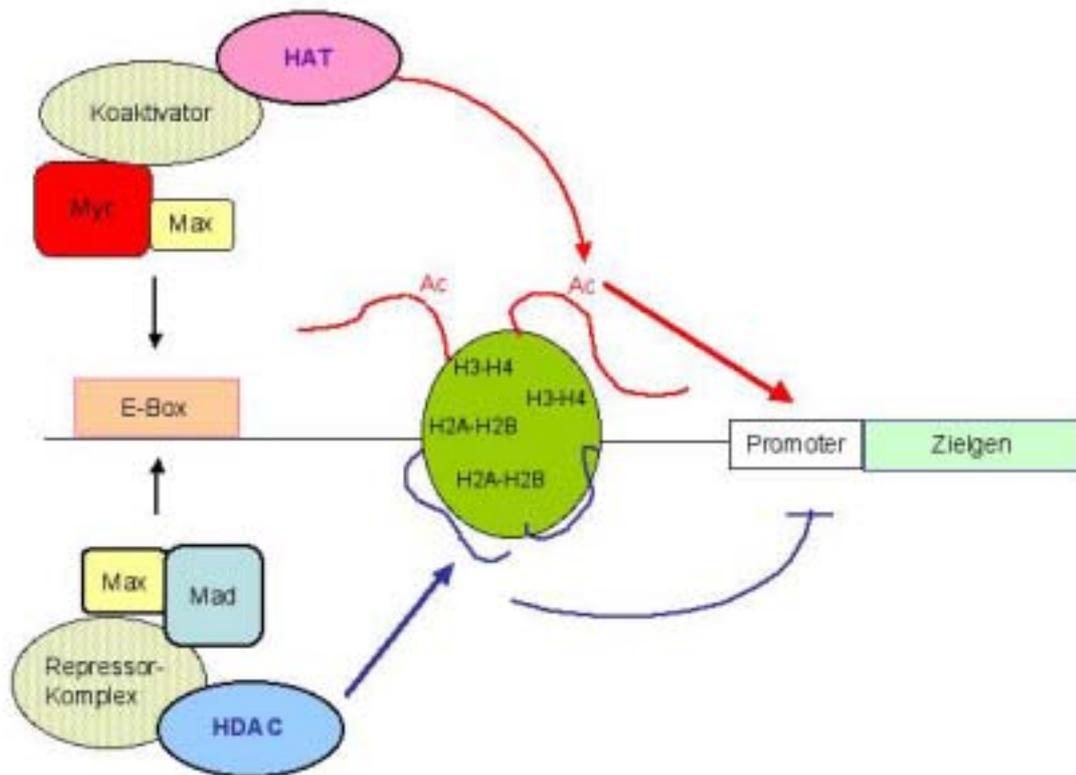


Abb. 3: Modell zur transkriptionellen Regulation durch Myc- und Mad-Proteine.

Das Mad/Max-Heterodimer kann über die Bindung an den Sin3-Komplex (Repressor-Komplex) Histon-Deacetylasen an die DNA rekrutieren. Die Deacetylierung der Lysinreste an den N-Termini der Histone korreliert mit einer kompakteren Anordnung der DNA um die Histone, so daß der Promoter weniger leicht zugänglich für den basalen Transkriptionsapparat ist. Dies führt zu einer Repression der Transkription. HAT= Histon Acetyltransferase; HDAC= Histone Deacetylase.

Am N-Terminus von Myc-Proteinen befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die zusammen mit der bHLHZip-Domäne essentiell für alle oben beschriebenen biologischen Funktionen von Myc ist [Grandori et al., 2000]. Dies erklärt sich dadurch, daß c-Myc hier Chromatin-modifizierende Komplexe rekrutiert, zu denen TRRAP und der SWI/SNF-Komplex

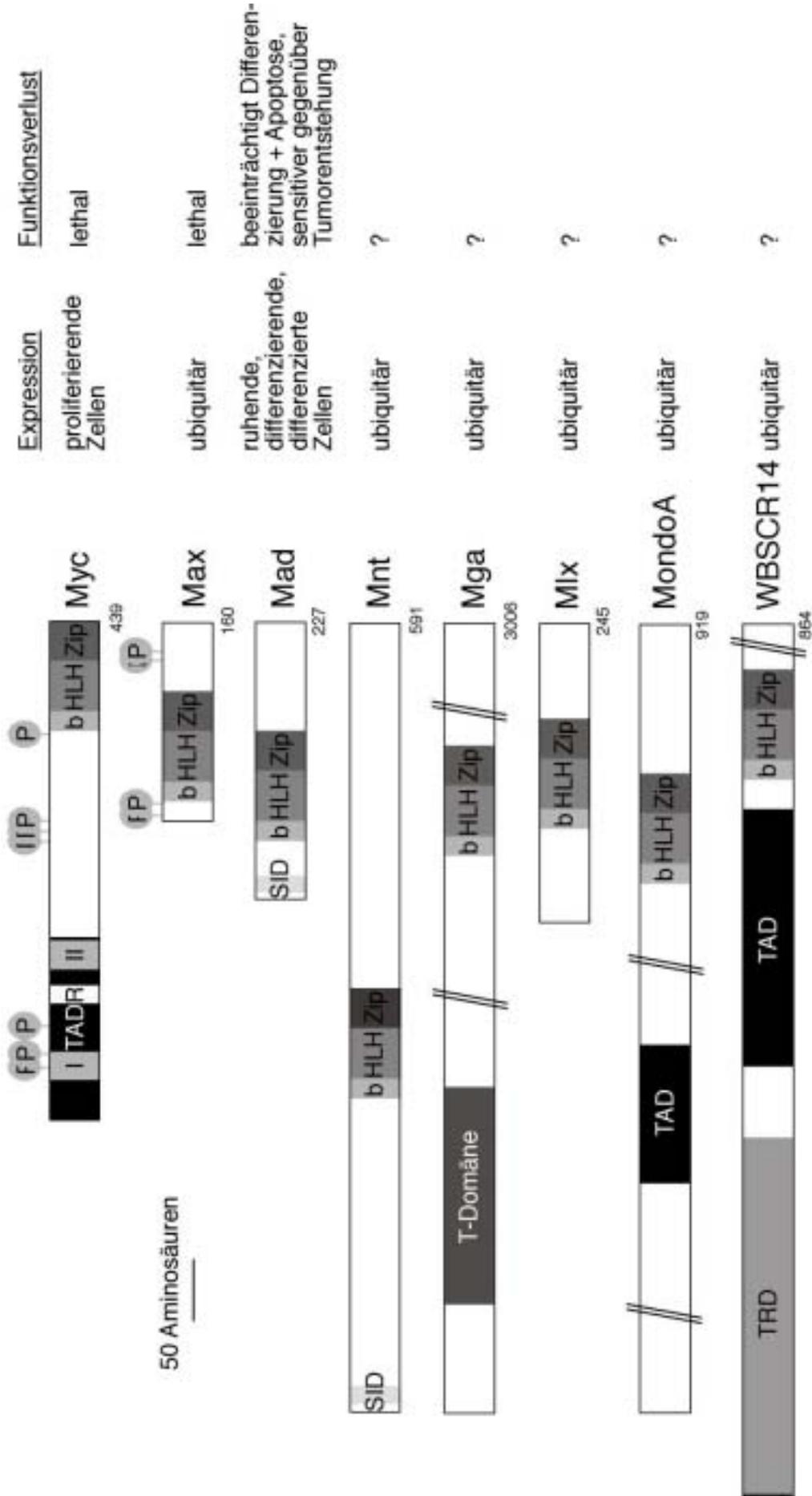
gehören. TRRAP ist Teil des SAGA- und des NuA4-Histon-Acetyltransferase-Komplexes, die die Histonacetylrasen GCN5 und Tip60 enthalten. Darauf begründet sich das aktuelle Modell zur c-Myc-vermittelten Transaktivierung. Demnach rekrutiert c-Myc Acetyltransferasen an die DNA, was zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur führt (s. 2.1.1.5.1.), die Zugänglichkeit für Faktoren des basalen Transkriptionsapparates erleichtert und schließlich die Transkription aktivieren kann (s. Abb. 3.).

Da Max im Gegensatz zu c-Myc auch während der Differenzierung und in ruhenden Zellen exprimiert wird, stellte sich die Frage, ob es weitere Interaktionspartner von Max gibt. Es wurden daraufhin die Mad-Proteine identifiziert, zu denen Mad1, Mxi1 (Mad2), Mad3 und Mad4 zählen [Ayer et al., 1993; Zervos et al., 1993; Hurlin et al., 1995]. Die Mad-Proteine bilden ebenfalls Heterodimere mit Max und binden an das gleiche E-Box-Motif. Neben der Sequenzhomologie in der bHLHZip-Domäne, die sie mit den Myc-Proteinen und Max gemeinsam haben, besitzen sie am N-Terminus eine SID-Domäne (*Sin3-interacting domain*). Über diese SID interagieren Mad-Proteine mit dem Sin3-Protein, das Teil eines Deacetylase-Komplexes ist [Hassig et al., 1997; Laherty et al., 1997; Sommer et al., 1997]. Über die Rekrutierung dieser Histon-Deacetylasen können Mad-Proteine im Gegensatz zu Myc-Proteinen Transkription inhibieren (s. 2.1.1.5.7.).

Neben den Mitgliedern der Myc- und Mad-Familie interagiert Max auch noch mit zwei weiteren bHLHZip-Proteinen, Mnt und Mga [Hurlin et al., 1997; 1999]. Mnt besitzt wie die Mad-Proteine eine SID, während Mga neben der bHLHZip-Domäne noch eine zweite DNA-bindende Region aufweist, die T-Domäne (s. Abb. 4.).

Das Netzwerk (s. Abb. 5.) konnte auf Seiten der Mad-Proteine durch die Identifizierung von Mlx noch erweitert werden. Mlx ist ein Max-ähnliches Protein, das aber nur mit Mad1, Mad4 und Mnt heterodimerisieren kann. Hier wurden dann zwei weitere Mlx-Interaktionspartner gefunden, MondoA und WBSCR14, die wahrscheinlich eine transkriptionsaktivierende Wirkung ausüben [Billin et al., 2000; Cairo et al., 2001].

Abb. 4: Schematische Übersicht zu Struktur, Expression und Funktion der Proteine des Myc/Myc/Mad-Netzwerkes.



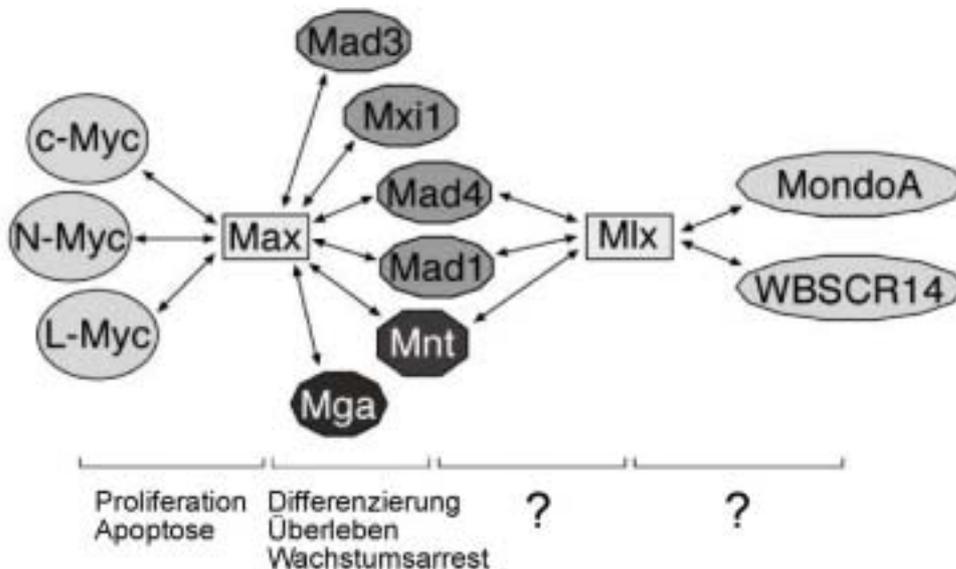


Abb. 5: Schematische Darstellung der Interaktionen der klassischen und neu identifizierten Proteine des Myc/Max/Mad-Netzwerkes. ?= Funktion unbekannt.

2.1.1.2. Die Funktion von Mad1 in der Regulation der Proliferation

Nachdem im Abschnitt 2.1.1.1 Mad1 in das Netzwerk der bHLHZip-Transkriptionsfaktoren eingeordnet und sein Gegenspieler c-Myc in seinen biologischen Funktionen und Wirkmechanismen erläutert worden ist, soll hier nun die Rolle von Mad1 in der Regulation von Differenzierung und Apoptose aufgezeigt werden.

Während bei einer Kotransformation von Myc und Ras eine Transformation der REFs erfolgt (Bildung von Foci) [Land et al., 1983], bewirkt eine Kotransformation von Mad1, Myc und Ras eine Reduktion der Foci um 50% [Lahoz et al., 1994; Cerni et al., 1995; Koskinen et al., 1995; Vastrik et al., 1995]. Mad1 inhibiert also Transformation wie auch Zellwachstum (s. Abb. 1).

Außerdem wurde gezeigt, daß die Mad1-Expression in G₀-Zellen den seruminduzierten oder wachstumsfaktorinduzierten G₁/S-Übertritt inhibiert [Roussel et al., 1996]. Mad1 wird

dementsprechend in differenzierten und terminal differenzierten Zelllinien exprimiert, nicht aber in proliferierenden Zellen [Ayer et al., 1993; Zervos et al., 1993; Larsson et al., 1994]. Somit spricht auch das Expressionsverhalten von Mad1 für eine inhibitorische Funktion im Zellwachstum und eine Assoziation mit Differenzierung.

Während c-Myc als Proto-Onkogen bekannt ist, ist der Einfluß von Mad1 in Tumorzellen nicht so eindeutig. In zwei Zelllinien führte zwar die Überexpression von exogenem Mad1 zu einer Verlangsamung des Wachstums und Verminderung der Malignität dieser Tumorzellen in Nacktmäusen [Chen et al., 1995], in anderen Tumorzelllinien konnte aber kein Effekt beobachtet werden [Roy et al., 1995]. Da *mx11* (*mad2*) in einer chromosomalen Region liegt, die häufig in Prostata Tumoren verändert ist, lag zumindest bei diesem Mad-Protein die Hypothese eines Tumorsuppressors nahe. Sie konnte aber bisher nicht bestätigt werden. Über Mutationen in anderen Mad-Genen in Tumoren ist nichts bekannt.

2.1.1.3. Die Funktion von Mad1 in der Regulation der Apoptose

Zunächst soll ein kurzer Überblick über die Bedeutung und den generellen Signaltransduktionsweg der Apoptose gegeben werden, soweit es für das Verständnis der Rolle von Mad1 nötig ist.

In Metazoen bedeutet die Anhäufung von Fehlern z.B. in der DNA-Sequenz möglicherweise eine Störung der Regulation zentraler Vorgänge, so daß ein programmierter Tod auf Einzelzell-Ebene im Interesse des gesamten Organismus ist.

Der programmierte Zelltod oder Apoptose ist der entscheidende Prozeß in der Entwicklung des Nervensystems und des Immunsystems. Bei apoptotischen Fehlfunktionen kommt es entweder zur Entstehung von Tumoren und Autoimmunerkrankungen, wenn der Zellzyklus trotz DNA-Schäden o.ä. fortgesetzt wird oder wenn autoreaktive T-Zellen nicht eliminiert werden, oder andererseits zu neuronalen Schäden nach einem Schlaganfall oder der Neurodegeneration bei der Alzheimerschen Erkrankung.

Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen kommt es in apoptotischen Zellen nicht zum Anschwellen der Zelle und Ausstoß entzündungsfördernder Mediatoren, sondern zunächst zu einem Abrunden, dann zum *membrane blebbing*. In der Zelle führt eine Kaskade von Caspasen und ein Ausstrom verschiedener Mediatoren (AIF, Apaf-1, Cytochrom c, Pro-Caspasen) aus den Mitochondrien zur Chromatinkondensation und Degradation, die durch ein *DNA-laddering*

sichtbar gemacht werden kann. Die Zelle löst sich schließlich in einzelne apoptotische „Körperchen“ (*apoptotic bodies*) auf, die von umliegenden Zellen phagozytiert werden.

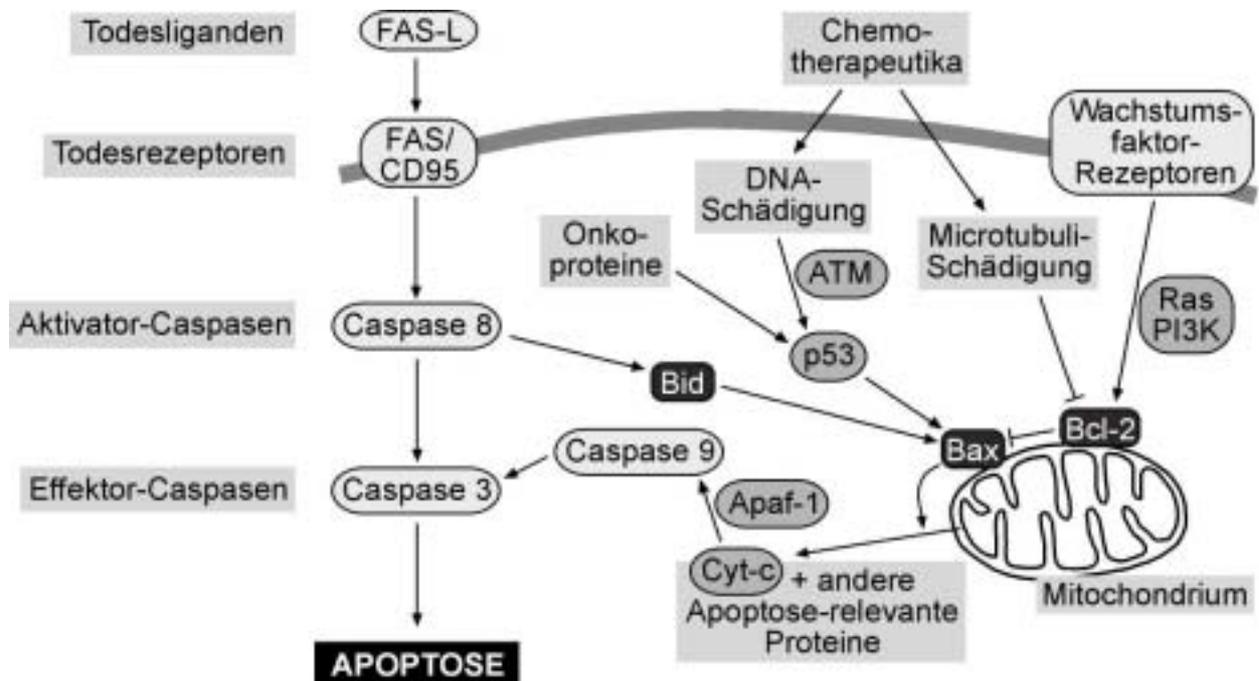


Abb. 6: Schematische Übersicht zum Apoptose-Signaltransduktionsweg. Dargestellt ist die Caspase-Kaskade und ihre Verknüpfung zum mitochondrialen Apoptose-Signalweg, der als Sensor verschiedener externer und interner Signale dient.

Unter den Induktoren von Apoptose befinden sich auch rezeptorvermittelte, die zur Familie der TNF-Liganden gehören. Die zugehörigen Rezeptoren sind CD95 (= Fas/Apo1), TNFR1, DR3 und 5 (= TRAIL-R). Die Bindung des Liganden führt zur Trimerisierung des Rezeptors, wobei sich dessen intrazelluläre *death domains* gruppieren. Ein Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain*) bindet mit seiner eigenen *death domain* (DD) an die des Rezeptors. FADD kann dann über seine *death effector domain* (DED) eine analoge von der Pro-Caspase-8, -2, -9 oder -10 binden. Diese Rekrutierung aktiviert die autokatalytische Spaltung in die aktive Caspaseform [Muzio et al., 1998; Muzio et al., 1998], die dann eine Kaskade von Caspasen aktiviert.

Apoptose kann auch durch UV-induzierte DNA-Schädigung und daraus erfolgende p53-Induktion oder Hypoxie und virale Proteine, wie z.B. E1A, das Rb bindet und damit den Transkriptionsfaktor E2F freisetzt, eingeleitet werden.

Die wesentlichen hier genannten Proteine des Apoptose-Signalweges sind in Abb. 6. dargestellt und in Zusammenhang mit anderen Sensoren externer Signale sowie interner Fehleranhäufungen gebracht, die in dieser Arbeit von Bedeutung sind und im Diskussionsteil unter 4.1.6. noch einmal erläutert werden.

Auch das Proto-Onkogen c-Myc hat proapoptotische Aktivität in unter Serummangel kultivierten Zellen, die jedoch im Gegensatz zur Fas-induzierten Apoptose unabhängig von Cdks zu sein scheint [Rudolph et al., 1996]. Bcl-2 kann die c-Myc-induzierte Apoptose inhibieren [Bissonnette et al., 1992; Wagner et al., 1993].

Auch die Funktion von Mad1 in der Regulation der Apoptose scheint konträr zu der von c-Myc zu sein. So weisen Granulozyten-Vorläufer aus Mad^{-/-}-Mäusen eine um 30-50% gesteigerte Sensitivität gegenüber verschiedenen Apoptose-Induktoren auf [Foley et al., 1998]. In meiner Diplomarbeit konnte ich schließlich zeigen, daß Mad1 auch die Fas- und TRAIL-abhängige Apoptose inhibiert. Der Mechanismus dieser Inhibierung wurde in einem Teil (s. 3.1.) der vorliegenden Arbeit untersucht.

2.1.1.4. Zielgene von Mad1

Um Einblick in die Funktion und Rolle der Mad-Proteine im Netzwerk der Signaltransduktion zu bekommen, ist es entscheidend, die Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren zu kennen. Aber im Gegensatz zur Myc-Familie, wo schon viele Zielgene charakterisiert worden sind, sind innerhalb der Mad-Familie lediglich für Mad1 zwei Zielgene sicher identifiziert. Und obwohl die DNA-Bindungseigenschaften der Mad/Max-Heterodimere denen der Myc/Max-Heterodimere *in vitro* ähneln [James et al., 2002; Sommer et al., 1998], ist noch unklar, inwieweit dies *in vivo* zutrifft, ob also alle E-Boxen von Myc-Zielgen-Promotoren auch von Mad-Proteinen besetzt werden können.

Eines der beiden gut charakterisierten Mad1-Zielgene ist **hTERT** (*human telomerase reverse transcriptase*). hTERT codiert für die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase, die für

die Replikation der Chromosomenenden verantwortlich ist. In Hinsicht auf Immortalisierung, Tumorgenese und Seneszenz ist die korrekte Regulation des hTERT-Gens essentiell. Dies zeigt sich auch darin, daß die Telomerase in vielen humanen Tumoren hochreguliert ist, während ihre Expression in differenzierten Geweben gar nicht nachzuweisen ist. hTERT ist zudem auch als c-Myc-Zielgen beschrieben worden [Wang et al., 1998; Wu et al., 1999; Greenberg et al., 1999; Kyo et al., 2000].

Daher wurde auch Mad1 als Regulator von hTERT postuliert und in einem genetischen Screen als hTERT Repressor nachgewiesen [Oh et al., 2000]. Weitere Reporteragen-Assays bestätigten dies [Gunes et al., 2000] und auch die Abhängigkeit von einer Histon Deacetylase [Cong et al., 2000].

Aber obwohl c-Myc und Mad1 an die E-Box des hTERT-Promoters binden können [Wu et al., 1999; Oh et al., 2000], ist nicht klar, ob dies auch *in vivo* durch die endogenen Faktoren geschieht und von Relevanz für die Transformation von Zellen ist. Bisher hat nur eine Studie die endogene hTERT-Promoter-Besetzung in HL60 analysiert und festgestellt, daß die Mad1-Bindung mit der Induktion von Differenzierung korreliert und dies auch von Histon-Deacetylierung abhängig ist [Xu et al., 2001]. Andererseits gibt es eine Untersuchung, die zeigt, daß zwar die überexprimierten c-Myc- und Mad1-Proteine den hTERT-Promoter regulieren können, die endogenen Mengen aber nicht [Horikawa et al., 2002].

Neben hTERT ist auch **Cyclin D2** als Mad1-Zielgen *in vitro* im Reporteragen-Assay [Bouchard et al., 1999] und *in vivo* im ChIP-Assay bestätigt worden [Bouchard et al., 2001]. Dieses Zielgen ist besonders interessant, da es eine Verbindung zwischen Zellzyklus-regulierenden Cyclinen und der biologischen Funktion von Myc/Max/Mad-Proteinen erlaubt. D.h. c-Myc und Mad1 regulieren durch direkte Aktivierung oder Inhibierung von Cyclin D2 den G1-S-Kontrollpunkt des Zellzyklus (s. Abb. 9.).

Zusätzlich zu hTERT und Cyclin D2 sind viele Zielgene für c-Myc beschrieben, die möglicherweise auch von Mad1 reguliert werden. Für einige von ihnen ist in Reporteragen-Assays eine Mad1-vermittelte Regulation bestätigt worden, so z.B. für TNFAIP3 und EIF2B1 [O'Hagan et al., 2000]; ob diese Gene auch *in vivo* in dem Mad1-Signalweg zur Regulation des Zellzyklus und der Apoptose liegen, ist noch unklar.

Für alle anderen Mad-Familienmitglieder sind keine Zielgene beschrieben. Allerdings gibt es eine Studie, die postuliert, daß Mxi1 *in vitro* und *in vivo* ein direkter Repressor von c-Myc ist

[Lee et al., 1999]. Durch diese negative Rückkopplung würde der Übergang zwischen Proliferation und Differenzierung noch distinkter und feiner reguliert.

Neben solchen Ansätzen des *best guess* wurden auch ganz allgemeine Screens für Mad1-Zielgene unternommen. Hier ging es vornehmlich darum, ob c-Myc und Mad1 dieselben Zielgene regulieren oder nicht. Typisch sind hier die *swap approaches*, d.h. es wurden entweder die HLH- oder basische Region von c-Myc durch die der Mad-Proteine ausgetauscht und z.B. im Microarray die Veränderung der Zielgen-Zusammensetzung analysiert. Während aber eine Studie schlußfolgert, daß c-Myc und Mad sowohl gemeinsame Zielgene aufweisen, die in die Bereiche Metabolismus, Proliferation, genomische Stabilität und Apoptose einzuordnen sind, als auch separate Zielgene ansteuern [O'Hagan et al., 2000], gibt es auch eine Arbeit, die zeigt, daß zumindest die Apoptose-Regulation verschieden ist [James et al., 2002]. Eine dritte Studie letztendlich stellt eine Myc(Mad1-BR)-Chimäre vor, die keine veränderten Fähigkeiten bei der Transformation, Apoptose und der Besetzung von c-Myc-Zielgen-Promotoren aufweist [Nikiforov et al., 2003]. Hier wird geschlußfolgert, daß Mad- und Myc-Proteine ein identisches Set an Zielgenen regulieren.

Diese Experimente sind allerdings kritisch zu betrachten; auch läßt sich ihre Divergenz erklären. Zum einen wurden immer unterschiedliche Chimären konstruiert, die somit untereinander nicht direkt vergleichbar sind. Zum zweiten ist unklar, ob bei solchen Chimären die übertragene Domäne strukturell dem "Spender"-Protein entspricht oder sich nicht anders faltet, so daß z.B. Interaktionen mit anderen Proteinen nicht mehr stattfinden. Drittens ist das *read-out* dieser Experimente zu beachten. Es werden teilweise sehr allgemeine Phänotypen wie Proliferation oder Apoptose bewertet, wobei aber nicht davon ausgegangen werden kann, daß Wildtyp und Chimäre z.B. die Apoptose über die Regulation derselben Zielgene und derselben Signaltransduktionswege stimulieren, nur weil das Ergebnis das gleiche ist. Und auch die CHIP-Assays als endgültiger Beweis für ein Zielgen sind kritisch zu beurteilen, da sie nur die Promoterbesetzung widerspiegeln und damit eine Korrelation aufzeigen, die aber keine Aussage über die funktionelle Konsequenz dieser Interaktion machen kann.

Diese Studien sind zusammengenommen also schwer zu interpretieren, was die Frage nach dem gemeinsamen *pool* an c-Myc- und Mad1-Zielgenen angeht. Daher sind direkte Rückschlüsse von c-Myc-Zielgenen auf eine gleichzeitige Regulation durch Mad1 nicht uneingeschränkt möglich.

2.1.1.5. Mad1 als Teil des HDAC-Mediator-Komplexes

2.1.1.5.1. Übersicht zum Chromatinremodeling

Die Transkription in eukaryontischen Zellen ist stark von der Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren, d.h. von dem Verpackungszustand des Chromatins abhängig. Die fundamentale Untereinheit des Chromatins ist ein hochorganisierter, dynamischer Protein-DNA-Komplex, das Nukleosom. Es besteht aus vier Kern-Histonen, dem H3-H4-Tetramer, und zwei H2A-H2B-Dimeren, um die 146bp DNA gewickelt sind [Strahl et al., 2000].

Bisher sind eine Reihe verschiedener posttranskriptioneller Modifikationen von Histonen und Chromatin-modulierenden Proteinen beschrieben, die mit der Packungsdichte des Chromatins korrelieren. Verglichen mit Methylierung [Robertson et al., 2002], Phosphorylierung [Davie et al., 1998], Glycierung und Glycoxidation [Cervantes-Laurean et al., 1996], Ubiquitinierung [Jason et al., 2002] und Sumoylierung [Verger et al., 2003], ist die Acetylierung [Eberharter et al., 2002] der Kern-Histone wahrscheinlich die am besten charakterisierte Modifikation.

Die Histon-Acetylierung tritt an der Epsilon-Aminogruppe der evolutionär konservierten Lysine auf, die im N-terminalen Bereich der Histone liegen. Obwohl *in vivo* alle Kern-Histone acetyliert werden können, sind die Modifikation der Histone H3 (an K9) und H4 (an K5, K8, K12 und K16) am besten untersucht.

Das Gleichgewicht zwischen acetylierten und deacetylierten Histonen wird dabei durch die gegensätzlichen Aktivitäten von Histon Acetylasen (HAT) und Histone Deacetylasen (HDAC) reguliert. Dabei wird angenommen, daß die Acetylierung der Lysinreste an H3 und H4 die Interaktion benachbarter Nukleosomen [Fletcher et al., 1996] und die zwischen Histonen und DNA [Hong et al., 1993] schwächt. Dies scheint zu einer offeneren Chromatinstruktur zu führen, so daß die DNA nun leichter zugänglich für DNA-Bindeproteine wird, und korreliert mit einer Aktivierung von Transkription [Ito et al., 2000]. Diesem Modell entsprechend wurden einige Koaktivatoren mit intrinsischer HAT-Aktivität identifiziert, wie z.B. Gcn5, PCAF, TIP60, TAFII250 und p300/CBP [Lehrmann et al., 2002]. Andererseits gibt es auch transkriptionelle Repressorproteine wie Rb und Mad, die die HDACs an die DNA rekrutieren können [Wolffe et al., 1996].

Ein neuer Mechanismus transkriptioneller Aktivierung durch Acetylierung scheint durch p300 vermittelt zu werden. Hier rekrutiert das Onkoprotein Bcl6 HDACs. Dies korreliert mit der Repression von Transkription und der Induktion von Transformation. Aber die Acetylierung

durch den Koaktivator p300 stört die Bindung zwischen Bcl6 und HDACs, so daß die Rekrutierung von HDACs aufgehoben wird [Bereshchenko et al., 2002]. Nicht nur die Acetylierung von Histonen selber, sondern auch die Inhibierung von HDACs kann also zu einer Stimulation von Transkription führen.

2.1.1.5.2. Histon Deacetylasen und ihre Regulation

Die Histon Deacetylasen werden generell in zwei Proteinfamilien eingeteilt: die klassische HDAC-Familie und die SIR2-Familie der NAD-abhängigen HDACs. Die klassische HDAC-Familie wird weiter aufgeteilt in HDACs der Klasse I (enthält HDAC1, 2, 3 und 8, die nahe verwandt mit Rpd3 aus der Hefe sind) und die der Klasse II (enthält HDAC4, 5, 6, 7, 9 und 10, die Homologie mit Hda1 aus der Hefe aufweisen) [de Ruijter et al., 2003].

Es wurde bisher gezeigt, daß HDACs sowohl mit Onkoproteinen wie auch mit Tumorsuppressoren interagieren und dadurch mit der Entstehung von Leukämien, epithelialen Tumoren, dem Fragilen X Syndrom oder dem Rubinstein-Taybi Syndrom korrelieren [Timmermann et al., 2001; Klochendler-Yeivin et al., 2001].

Daher scheint es wichtig, die verschiedenen Regulationsmechanismen von HDACs zu charakterisieren.

Eine Möglichkeit der Regulation von HDACs ist die Ebene der Expressionskontrolle. Hier liegen konträre Daten vor: zum einen wurde beschrieben, daß die Expression des murinen HDAC1 in T-Zellen nach IL-2-Stimulation ansteigt und mit dem Eintritt in die S-Phase korreliert [Bartl et al., 1997]. Allerdings hängen die mRNA-Mengen des murinen HDAC1 nicht direkt von der Zellzyklusphase ab. Zum anderen zeigt aber das humane HDAC1 eine Abhängigkeit der Expression von der Zelldichte in der humanen Prostata Adenokarzinom-Zelllinie PC3 und in der Leberzellkarzinom-Zelllinie Hep3B [Dangond et al., 2000]. Außerdem scheint das murine HDAC1 ubiquitär in allen Geweben exprimiert zu sein, während sein Proteinlevel aber bis zu 10fach in drei verschiedenen Zelllinien variiert. Eine andere Studie berichtet, daß HDAC1 mRNA und Protein in 68% bzw. 61% der humanen Magenkrebsgewebe im Vergleich zu normalen Gewebe überexprimiert ist [Choi et al., 2001].

Als eine weitere Ebene der Regulation ist die Kontrolle der enzymatischen Aktivität der HDACs durch Kofaktoren zu nennen. Tatsächlich sind HDACs meist Teil großer Komplexe mit verschiedenen Eigenschaften wie Rekrutierung, Korepression und Chromatin Remodeling. Und

es ist bekannt, daß rekombinant exprimierte HDACs nicht enzymatisch aktiv sind, sondern die *in vivo* exprimierten Kofaktoren benötigen.

Eine dritte Möglichkeit der HDAC-Regulation sind posttranslationale Modifikationen. Besonders die Phosphorylierung wurde mit der Beeinflussung der Lokalisation, Aktivität und Komplexintegrität in Zusammenhang gebracht (s. 4.2.1.). Neben der Phosphorylierung wurde auch die Ubiquitinierung als posttranslationale Modifikation mit regulativem Einfluß beschrieben (s. 4.2.2.).

All diese Befunde zeigen, daß HDACs eng reguliert sind und daher besonders die Analyse der Regulation des Mad1-HDAC-Komplexes neue Erkenntnisse bezüglich der Mad1-vermittelten Repression versprechen.

2.1.1.5.3. Interaktionspartner der HDAC-Komplexe

Die HDAC-Komplexe interagieren mit vielen anderen Proteinen (s. Abb. 7.), wodurch sie eine weitere Regulation und auch funktionelle Spezifizierung erfahren. Hier soll zwischen zwei Gruppen unterschieden werden.

In der ersten Gruppe werden die HDAC-Komplexe über MeCpG-bindenden Proteinen (*methylated-CpG-binding proteins*), MBD Proteinen (*Methyl-CpG-binding domain containing proteins*) oder DNMTs (*DNA methyltransferase*) an die DNA rekrutiert. Kürzlich wurde für HDAC1 gezeigt, daß es zusammen mit Sin3A/B an eine neue H3-spezifische Methyltransferase bindet und daß dieser Komplex sogar unabhängig von der HMT-Aktivität der Methyltransferase Transkription reprimieren kann [Yang et al., 2003]. Auch eine andere Studie zeigt, daß Methyltransferasen unabhängig von ihrer Funktion als Enzym HDACs rekrutieren können. Z.B. bindet der Imprinting Regulator DNMT3L, der im Gegensatz zu anderen DNMTs keine Cytosin Methyltransferaseaktivität hat, an HDAC1 und führt so zur transkriptionellen Repression [Aapola et al., 2002].

In die zweite Gruppe von Interaktionspartnern, die gleichzeitig ein HDAC-Substrat sind, fallen Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine. So bindet z.B. p53 HDAC1, wird deacetyliert und damit für die anschließende Degradation markiert [Ito et al., 2002]. Auch der Transkriptionsfaktor YY1 wird deacetyliert [Yao et al., 2001]. Die Deacetylierung von α -Tubulin durch HDAC6 induziert die Depolymerisation und ist damit am Turn-Over von Mikrotubuli beteiligt [Zhang et al., 2003].

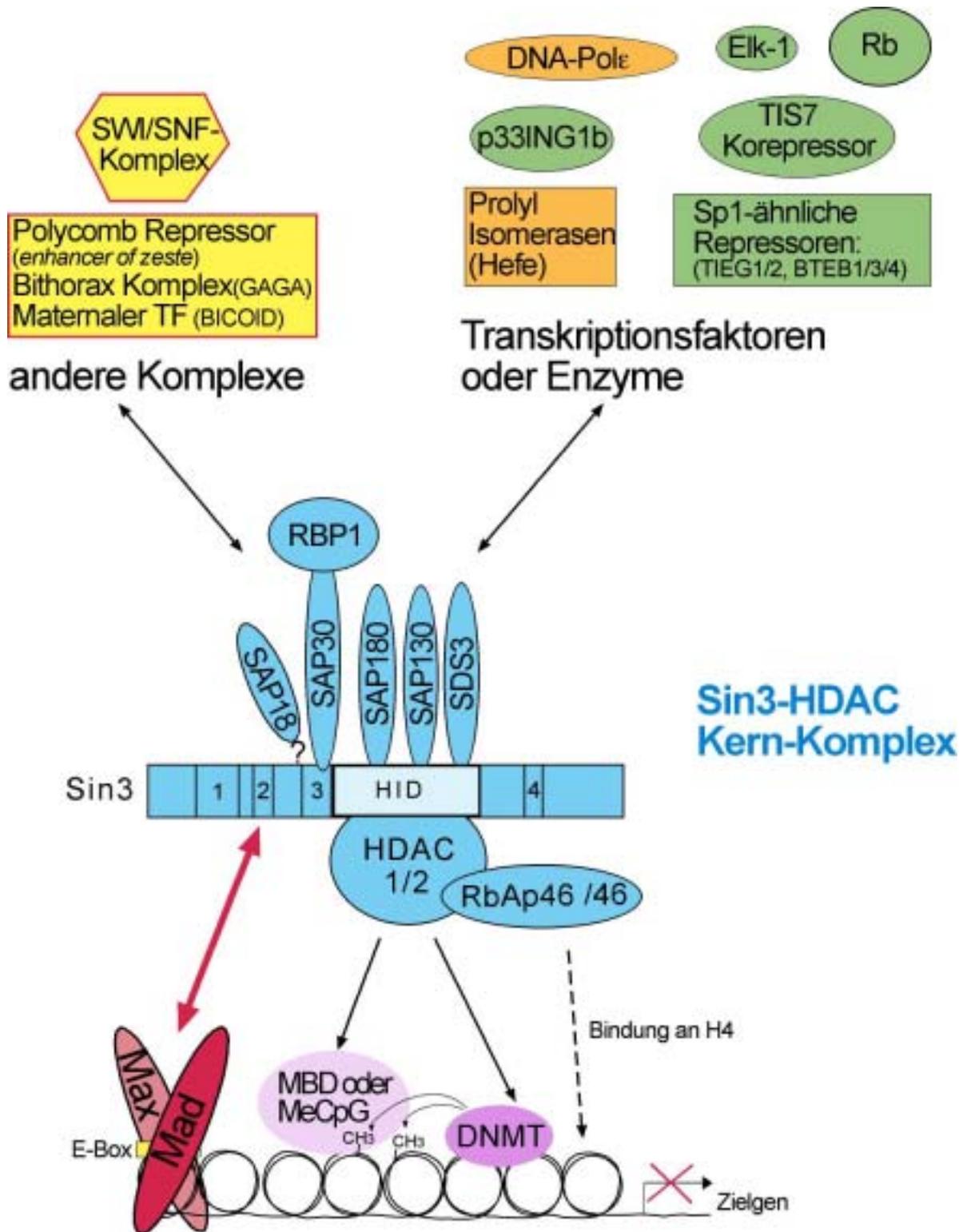


Abb. 7: Das Netzwerk des basalen Sin3-HDAC-Komplexes.

Dargestellt ist die Interaktion mit verschiedenen anderen Chromatin-modifizierenden Komplexen, Transkriptionsfaktoren oder Enzymen.

Die Identifizierung und Charakterisierung von solchen Interaktionspartnern der HDAC-Komplexe ist somit ausschlaggebend für ein Verständnis ihrer Funktion. Die Komplexität dieses Netzwerkes an Interaktionen macht vor allem auch deutlich, daß die HDAC-Komplexe als dynamische Modulatoren begriffen werden müssen, die ihre spezielle Funktion in einem biologischen Zusammenhang erst durch die Interaktion mit den jeweiligen Bindungspartnern und rekrutierenden Faktoren (s. 2.1.1.5.6.) erfahren.

2.1.1.5.4. Spezifische Inhibitoren von HDACs

Neben der Identifizierung von Interaktionspartnern der HDAC-Komplexe, war auch der Einsatz spezifischer HDAC-Inhibitoren von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der Funktion der HDACs. Der bisher potenteste Inhibitor ist Trichostatin (TSA), das reversibel an das aktive Zentrum aller HDACs bindet. Das aktive Zentrum besteht aus einer tubulären Tasche, bei der bestimmte Aminosäuren und Zn^{2+} als Ladungstauscher (*charge-relay system*) wichtig sind und die Deacetylierung katalysieren [Finnin et al., 1999].

Generell korreliert der Einsatz von HDAC-Inhibitoren mit einem Wachstumsarrest, Differenzierung und Apoptose von Krebszellen *in vitro* und *in vivo* [Kelly et al., 2002; Kwon et al., 2003].

Die Inhibitoren konnten auch eingesetzt werden, um mittels Mikroarrays HDAC-regulierte Gene zu identifizieren. Es wurden hier relativ kleine Gruppen von Zielgenen gefunden [Van Lint et al., 1996], wobei viele von ihnen aus den Bereichen Zellzyklus (Cyclin A, Cyclin B1, Cyclin E, Cyclin D1/ D3, p21, p53), Apoptose (Bcl2, Bax, CD95), Transkription (c-Myc), Genomische Stabilität (hTERT) oder Signalkaskaden (VEGF, Notch, Raf-1) stammen. Diese potentiellen HDAC-Zielgene sind deswegen hier von Interesse, da unter ihnen auch solche zu finden sind, die durch den Mad1-HDAC-Komplex reguliert werden, also Mad1-Zielgene sind. Tatsächlich ist hier schon eines der beiden einzigen bisher bekannten Mad1-Zielgene auch als HDAC-Zielgen aufgeführt, nämlich hTERT (s. 2.1.1.4.).

2.1.1.5.5. Die Zusammensetzung des HDAC-Komplexes

Die Tatsache, daß HDACs die transkriptionelle Repression initiieren können, hatte vermuten lassen, daß ihre Expression in Tumorzellen fehlreguliert ist oder zumindest mit Differenzierung

korreliert. Stattdessen zeigen die Studien über HDAC-Inhibitoren, daß TSA-behandelte Zellen differenzieren [Yamashita et al., 2003]. Außerdem ist von SAGE Daten bekannt, daß die HDAC-Expression in Tumorgewebe nicht vom normalen Gewebe abweicht [Caron et al., 2001]. Eine mögliche Erklärung hierfür mag sein, daß HDACs zuerst einmal *Chromatin Remodeling* Enzyme sind und ihre biologische Bedeutung davon abhängt, zu welchem Zielpromoter sie rekrutiert werden. In diesem Modell würde man dann keine veränderte Expression von HDACs in Tumorzellen erwarten, sondern eine andere Promoterbesetzung bestimmter HDAC-Zielgene, deren Repression mit der Stimulation von Proliferation korreliert.

Die Rekrutierung zu solchen Zielgenen und die individuelle Zusammensetzung der HDAC-Komplexe hängt im Wesentlichen von HDAC-Komplex-assoziierten Proteinen ab, die unter 2.1.1.5.6. vorgestellt werden. Hier soll zuvor mit der Einteilung der HDAC-Komplexe fortgefahren werden.

Da in der vorliegenden Dissertation der HDAC-Sin3-Mad1-Komplex analysiert wurde, sollen im folgenden lediglich die Sin3-Komplexe [Zhang et al., 1997] beschrieben werden. Der Sin3-Komplex wird zusammen mit dem Mi-2/NuRD-Komplex [Wade et al., 1998; Xue et al., 1998] und dem HDAC3-enhaltenen SMRT/Co-REST-Komplex [Guenther et al., 2000; Li et al., 2000] der HDAC-Klasse I-Komplexgruppen zugeordnet (s. Abb. 8.).

Der basale Sin3-Komplex enthält neben HDAC1/2 und Sin3A/B noch RbAp46/48, SAP18 [Zhang et al., 1997], SAP30, RBP1 und p33ING1b. Diese Komponenten scheinen an der Rekrutierung des Komplexes an Histone (z.B. durch RbAp46/48) und an der Komplexbildung beteiligt zu sein. So wird z.B. angenommen, daß SAP30 für die Interaktion von RBP1 und den katalytisch aktiven HDAC/RbAp-Moduls mit Sin3 essentiell ist [Laherty et al., 1998; Zhang et al., 1998; Lai et al., 2001]. Auch p33ING1b, ein negativer Wachstumsregulator im p53-Signalweg, scheint am Sin3-vermittelten Wachstumsarrest beteiligt zu sein [Kuzmichev et al., 2002]. Kürzlich wurden weitere Komponenten des Sin3-Komplexes identifiziert, nämlich SAP180, SAP130 und SAP45 [Fleischer et al., 2003].

Der eben beschriebene basale Komplex (*core complex*) besitzt nicht die maximale HDAC-Aktivität. Hierfür sind weitere Proteine wie MTA2, p70 und p32 im Falle des Mi-2/NuRD-Komplexes ausschlaggebend. Dieser Komplex enthält zusätzlich eine CHD3/4 ATPase als Chromatin-remodulierende Aktivität [Tong et al., 1998; Xue et al., 1998]. Der Sin3-Komplex andererseits enthält keine direkt assoziierte ATPase, aber seine Untereinheiten scheinen mit einem Swi/Snf-Chromatin-remodulierenden Komplex zu interagieren, wobei Brg1 der hBrm als zentrale ATPasen vorliegen [Sif et al., 2001; Kuzmichev et al., 2002].

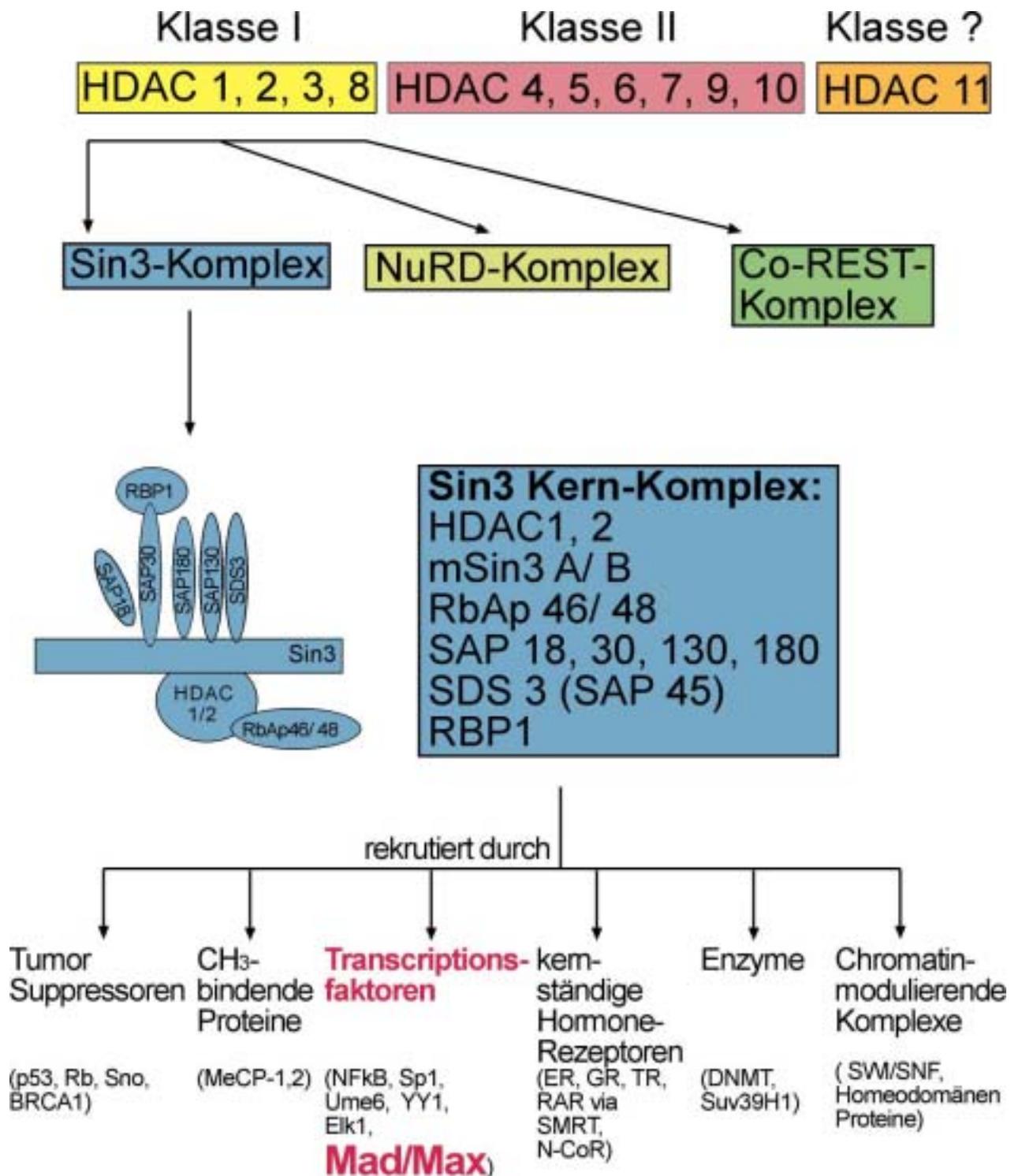


Abb. 8: Schematische Übersicht zur Einteilung der HDAC-Komplexe.

2.1.1.5.6. Die Rekrutierung des HDAC-Komplexes

Wesentlich für die funktionelle Spezifizierung der HDAC-Aktivität ist die Rekrutierung an die DNA. Dies wird durch eine bestimmte Untergruppe der unter 2.1.1.5.3. beschriebenen interagierenden Proteine vermittelt. Hierunter fallen Proteine wie Mad1, Mxi1, p53, Suv39H1, PML-RARa, MeCP-1, DNMT und weitere. Sie können entweder Transkriptionsfaktoren sein, die über die Erkennung ihrer DNA-Bindestelle eine gewisse Spezifität der HDAC-Rekrutierung bewerkstelligen; sie können aber auch selber Enzyme der Ubiquitinierung oder Methylierung sein, wobei hier die Spezifität der Rekrutierung durch dritte Proteine vermittelt werden muß.

All dies vermittelt den Eindruck, daß HDAC-Komplexe sehr dynamisch und interaktiv mit anderen Chromatin-modifizierenden Komplexen sind. Das bietet die Möglichkeit, über die Kooperation verschiedener Chromatin-modifizierender Komplexe ein *Silencing* verstärken und feiner regulieren zu können.

2.1.1.5.7. Der Mad1-HDAC-Komplex

Mad1 ist somit einer von vielen HDAC-rekrutierenden Proteinen. Aber trotz der Tatsache, daß HDACs entscheidend für die Mad- oder auch Rb-vermittelte transkriptionelle Repression sind, konnten HDAC-Mutationen nicht mit humanen Tumoren assoziiert werden. Man muß daher darauf hinweisen, daß bisher die Bedeutung der HDACs für die biologische Funktion von Mad- und Rb-Proteinen nur in transienten Assays untersucht wurde. Tatsächlich konnte die HDAC-Abhängigkeit von Rb auf endogenen Promotoren mit E2F-Bindestellen nur für DHFR, nicht für PCNA, E2F1, myb oder die Ribonukleotid Reduktase bestätigt werden [Luo et al., 1998]. Auch für Mad1 ist bisher noch keine endogene Kooperativität mit HDAC bestätigt worden. Man kann daher nicht direkt für jedes Mad1-Zielgen eine HDAC-vermittelte Repression annehmen.

Ursprünglich wurde vermutet, daß sowohl der Sin3- als auch der SMRT/N-CoR-Komplex an Mad1 binden [Alland et al., 1997; Laherty et al., 1997]. Es wurde dann aber aufgeklärt, daß Mad1 lediglich den Sin3-Komplex rekrutiert [Li et al., 2002]. Hier wird auch das Model vorgeschlagen, daß HDAC-Komplexe einerseits spezifisch an die DNA rekrutiert werden, zum anderen aber durch RbAp46/48 eine intrinsische Fähigkeit zur Histonbindung haben und dadurch zur globalen Chromatin-Deacetylierung beitragen können.

2.1.1.5.8. HDACs in der transkriptionellen Aktivierung

Wie oben beschrieben wurden die HDACs ursprünglich als transkriptionelle Repressoren entdeckt und gerade der Mad1-HDAC-enthaltene Sin3-Komplex wurde immer mit Induktion von Differenzierung assoziiert. Aber besonders die HDAC-Inhibitor-Experimente haben gezeigt, daß HDACs auch an Proliferation und Transformation beteiligt sind. Es gibt sogar Studien, die zeigen, daß HDACs transkriptionelle Aktivatoren sind. Gerade kürzlich wurde berichtet, daß die IL-3-abhängige Genexpression von Id-1, einem dominant-negativen Inhibitor der bHLH Transkriptionsfaktoren in der B- und T-Zell-Entwicklung, durch C/EBP β und STAT5 aktiviert, aber durch HDAC-Inhibitoren gehemmt wird [Xu et al., 2003]. Hier interagiert STAT5 mit HDAC1 und rekrutiert es an den Id-1-Promoter. HDAC1 deacetyliert aber nicht nur die Histone, sondern auch C/EBP β . Dagegen korreliert die Acetylierung von C/EBP β mit einer reduzierten DNA-Bindung. Die Rekrutierung von HDAC1 führt hier also indirekt zu einer transkriptionellen Aktivierung, indem die DNA-Bindung des Transaktivators C/EBP β durch seine Deacetylierung erhöht wird.

Für diesen negativen Einfluß der Acetylierung gibt es weitere Beispiele. So hebt die Acetylierung z.B. die Bindung zwischen Ko-Aktivatoren und ACTR oder TCF auf [Waltzer et al., 1998; Chen et al., 1999]. Außerdem ist eine häufig in Schilddrüsentumoren auftretende Mutation in β -Catenin an einer Acetylierungsstelle lokalisiert, die für die Regulation des β -Catenin entscheidend ist. Die fehlregulierte Mutante führt zu einer erhöhten Expression des β -Catenin-Zielgens c-Myc [Wolf et al., 2002].

Allerdings gibt es ebenso prominente Beispiele, wo die Acetylierung eine positive Regulation bewirkt. So stimuliert sie z.B. die DNA-Bindung von p53 [Gu et al., 1997], EKLF [Zhang et al., 1998], GATA1 [Boyes et al., 1998; Yamagata et al., 2000] und MyoD [Sartorelli et al., 1999].

Neben dieser Variabilität in der funktionellen Bedeutung einer Deacetylierung oder Acetylierung, liegen auch Daten zur Inhibierung von Genen nach einer TSA-Behandlung vor. Es ist zwar unbekannt, ob solche HDAC-Komplexe Mad1 enthalten, es soll aber festgehalten werden, daß HDACs nicht immer mit einer Genrepression assoziiert sind. So gehören zu den TSA-inhibierten Gene z.B. die STAT5-Zielgene CIS und Pim-1 [Xu et al., 2003], IL-2-stimulierte Gene [Koyama et al., 2000], IL-8 [Huang et al., 1997], IL-10 und CD154 [Mishra et al., 2001]. Auch die ursprünglichen Veröffentlichungen zeigen, daß in Hefe und Drosophila die Inhibierung der Deacetylase-Funktion sowohl Repression als auch Stimulation von Genexpression zur Folge hat [Vidal et al., 1991; Van Lint et al., 1996]. Es wurde auch gezeigt,

daß Hos2, ein Mitglied der Klasse I Rpd3-Familie der Hefe-HDACs, an die codierende Region von Genen während der Genaktivierung bindet und die Histone H3 und H4 deacetyliert [Wang et al., 2002].

In diesem Zusammenhang kann spekuliert werden, daß auch Mad1/HDAC-enthaltene Sin3-Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren am Promoter interagieren und über deren Deacetylierung auch eine Aktivierung eines Mad1-Zielgens erreicht werden könnte.

Für den Mad1/HDAC-enthaltenen Sin3-Komplex ist aber noch völlig unklar, wie die stöchiometrische Zusammensetzung ist, wie die Dynamik der qualitativen Zusammensetzung dieser Komplexe an verschiedenen Zielgen-Promotoren variiert, ob auch eine Mad1/HDAC-abhängige Genaktivierung existiert und ob die verschiedenen Mad-Familienmitglieder verschieden zusammengesetzte Sin3-Komplexe rekrutieren, wodurch sich ihre gewisse funktionelle Differenz erklären würde.

2.1.2. Die Zellzyklusregulation durch Cyclin E/Cdk2

Die Transkriptionsfaktoren des Myc-Max-Mad-Netzwerks spielen also eine essentielle Rolle in der Regulation von Proliferation und Differenzierung. Zumindest c-Myc scheint über sein Zielgen Cyclin E mit den Mechanismen der Zellzykluskontrolle verknüpft zu sein. Für Mad1 haben Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Prof. Lüscher vermuten lassen, daß auch Mad1 mit Cyclin E/Cdk2 interagiert. Dies ist ein weiterer Teil der vorliegenden Dissertation (s. 3.3.). Hier soll daher zunächst eine Übersicht über den Zellzyklus sowie die Funktion von Cyclin E/Cdk2 gegeben werden.

2.1.2.1. Die Phasen des Zellzyklus

Der Zellzyklus unterteilt sich in die DNA-Synthese-Phase (S-Phase) und die Mitose (M-Phase). Zwischen M- und S-Phase liegt die Vorbereitungsphase G1 (*gap/* Lücke) und zwischen S- und M-Phase die Vorbereitungsphase G2, in der das Zellwachstum stattfindet. Die Dauer der S- und M-Phasen sind festgelegt, während die G1- und G2-Phasen unterschiedlich lang sein können [Pardee et al., 1989]. Während der G1-Phase integriert die Zelle verschiedene proliferative (z.B. durch Wachstumsfaktoren, Cytokine oder Hormone aktivierte Signalkaskaden, virale Proteine)

und antiproliferative (z.B. Serumentzug, DNA-Schädigung, Differenzierung-induzierende Cytokine, Apoptose-Induktoren) Signale. Die endgültige Entscheidung, ob sich die Zelle weiter teilt, differenziert oder Apoptose begeht, wird am sogenannten Restriktionspunkt in der späten G1-Phase getroffen. Danach ist die Zelle unempfindlich gegen weitere Signale und durchläuft ein autonomes Zellteilungsprogramm [Sherr et al., 1996]. Auch am G2/M-Phasenübergang existiert ein Kontrollpunkt [Paulovich et al., 1997]. In Krebszellen sind häufig diese Kontrollpunkte durch Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen aufgehoben (s. Abb. 9.).

2.1.2.2 Restriktionspunkte und Cyclin/Cdk-Komplexe

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt über die Kontrollpunkte (*checkpoints*), an denen entschieden wird, ob die Zelle weiter proliferiert, ob sie in G1 arretiert, um z.B. DNA-Schäden zu reparieren, oder ob diese Schäden so groß sind, daß die Zelle Apoptose begehen muß (s. Abb. 9.). Das Zellzyklus-Kontrollsystem basiert auf zwei Protein-Familien: den Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (*cyclin-dependent protein kinases*) (Cdks) und den Cyclinen. Cdks ermöglichen ein Durchlaufen des Zellzyklus, indem sie bestimmte Substrate phosphorylieren. Ihre Kinaseaktivität basiert auf der Anwesenheit der aktivierenden Untereinheit, den Cyclinen. Die Menge an Cyclinen variiert in den einzelnen Zellzyklusphasen, während die Cdks stets gleich stark expremiert werden. So assoziiert Cyclin D mit Cdk4 oder Cdk6 in der frühen G1-Phase, während Cyclin E Cdk2 erst am G1-S-Übergang bindet. Cyclin A bindet Cdk2 oder Cdc2 während der S-Phase und am G2-M-Übergang und Cyclin B/Cdc2-Komplexe regulieren den G2-M-Übergang.

Cyclin E/Cdk2- und Cyclin D/Cdk4,6-Komplexe sind für die Progression durch G1 erforderlich, indem sie den antiproliferativen Effekt von pRb, p107 und p130 (*pocket* Proteine) aufheben. pRb bindet in seinem hypophosphorylierten Zustand (G1-Phase) den Transkriptionsfaktor E2F. E2F muß für eine effektive DNA-Bindung, transkriptionelle Aktivierung und Bindung an *pocket* Proteine mit DP heterodimerisieren. Nach Phosphorylierung von pRb in der späten G1-Phase durch Cyclin D/Cdk4,6 an verschiedenen Aminosäuren [Kitagawa et al., 1996; Connell-Crowley et al., 1997] kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch E2F freigesetzt wird. Das E2F-Gen trägt selber E2F-Bindungsstellen in seinem Promotor, so daß es zu einem Anstieg an E2F-Protein kommt, das auch die Transkription von S-Phase-Regulatoren (z. B. *B-myb*, Cyclin E und A) und Genen, die für die DNA-Replikation nötig sind (z.B. DHFR, DNA-Polymerase α),

aktiviert. Spät in der G1-Phase ist somit auch Cyclin E/Cdk2 induziert und kann ebenfalls pRb inaktivieren.

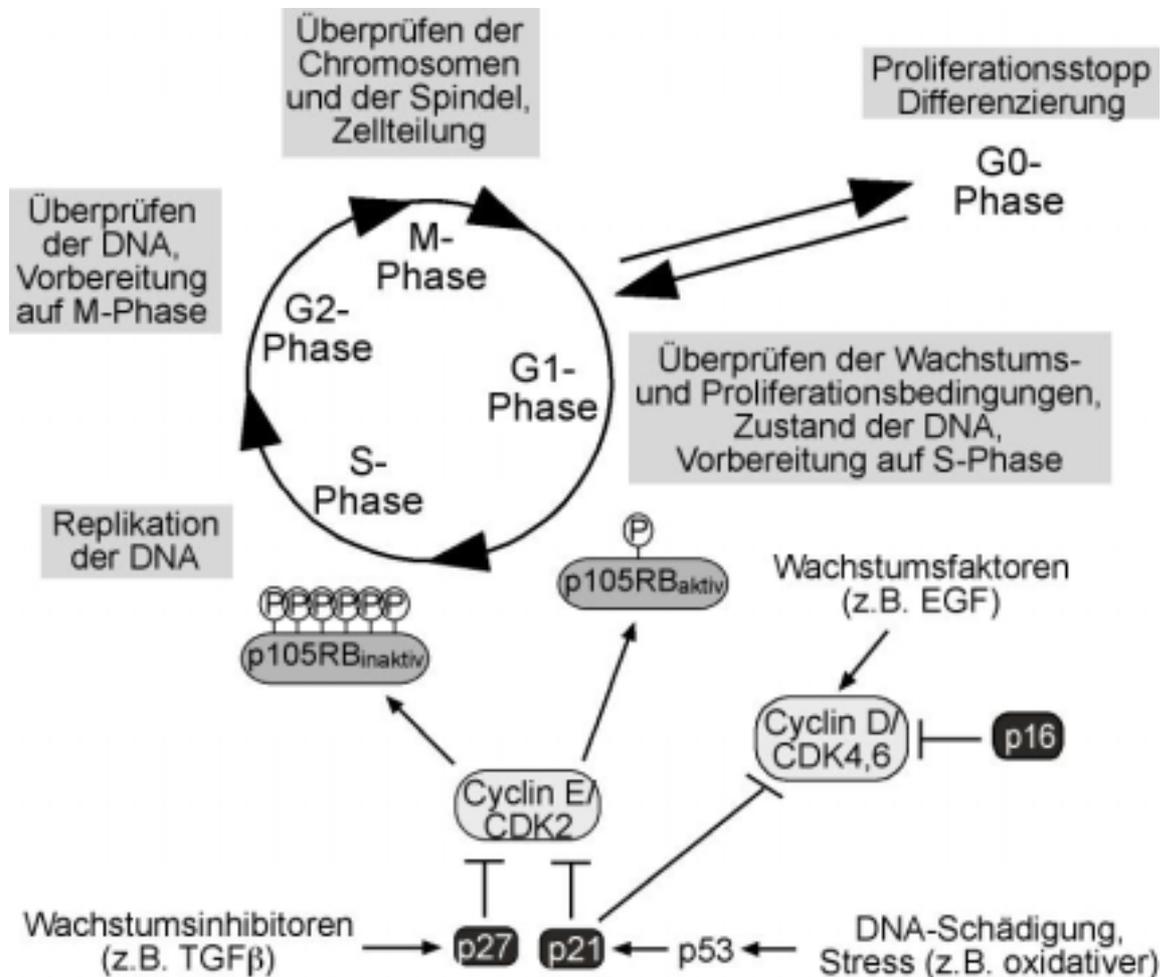


Abb. 9: Schematische Darstellung des Zellzyklus. Die grau unterlegten Boxen geben die Funktion der jeweiligen Zellzyklus-Phase an. Außerdem ist die Inhibierung des G1-arretierenden Rb-Proteins durch die Cyclin-vermittelte Phosphorylierung gezeigt. p27, p21 und p16 sind spezifische Inhibitoren der Cyclin/Cdk-Komplexe und stellen die Verbindung der Zellzyklusregulation mit externen Signalen wie Wachstumsbedingungen dar.

2.1.2.3. Die Funktion von Cyclin E/Cdk2

Im Laufe der G1-Progression führt also die Freisetzung von E2F durch Cyclin D/Cdk4,6 zu einer Induktion von Cyclin E. Dieses interagiert mit Cdk2, stimuliert den G1-S-Übergang und induziert die DNA-Synthese. Während aber die Regulation der Cdk2 und des Cyclin E sehr gut

verstanden ist (Cyclin E wird vornehmlich über Degradation durch den SCF-Komplex reguliert, Cdk2 dagegen durch Inhibitoren wie p21, 27, 57 oder Aktivatoren wie die Cyclin-aktivierenden Kinasen), sind die Substrate von Cyclin E/Cdk2 und damit der Mechanismus, wie Cyclin E/Cdk2 den G1-S-Übergang stimuliert, wenig erforscht. Da aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Lüscher bekannt war, daß Cyclin E/Cdk2 möglicherweise Mad1 reguliert und somit in dem Mad1-HDAC-Mediator-Komplex ein Substrat für Cyclin E/Cdk2 vermutet werden mußte, soll hier zunächst ein Überblick über die Funktion von Cyclin E/Cdk2 und seine bisher identifizierten Substrate gegeben werden.

Zu den Substraten von Cyclin E/Cdk2 zählen die Rb-Proteinfamilie [Clark et al., 2000] (zur Funktion s. 2.1.2.2.), hHR6A [Sarcevic et al., 2002], BRCA1 [Ruffner et al., 1999], Nucleophosmin/B23 [Okuda et al., 2000], HIRA [Hall et al., 2001] und NPAT/p220 [Ma et al., 2000].

p220: Die Überexpression von p220 stimuliert den G1-S-Übergang und die Transkription der Histonen H2B und H4. p220 ist in den *Cajal bodies* des Nucleus lokalisiert und am G1-S-Übergang kolokalisiert auch Cyclin E/Cdk2 mit p220 in den *Cajal bodies*. Die Mutation der Cyclin E/Cdk2-Phosphoakzeptorstelle inhibiert die transkriptionelle Aktivierung des Histon H2B.

HIRA: HIRA ist das Homolog von zwei Zellzyklus-regulierten Repressoren der Histongenexpression in der Hefe, Hir1p und Hir2p. Die Überexpression von HIRA induziert den S-Phase-Arrest. Es wird postuliert, daß die Phosphorylierung von HIRA den HIRA-abhängigen S-Phase-Arrest aufhebt. Der S-Phase-Arrest mag auf einem Mangel an Histonen beruhen, deren Transkription durch HIRA inhibiert wird.

B23: B23 bindet an nicht-duplizierte Zentrosomen und inhibiert ihre Duplikation. Nach einer Phosphorylierung durch Cyclin E/Cdk2 dissoziiert B23 von den Zentrosomen. Hier wird postuliert, daß B23 somit für die Koordinierung der Duplikation von Zentrosomen und DNA verantwortlich ist.

BRCA1: BRCA1 wird am G1-S-Übergang phosphoryliert und scheint als Sensor von DNA-Schäden zu fungieren.

hHR6A: hHR6A ist das Homolog des Hefeproteins RAD6/UBC2, einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym. Die Phosphorylierung durch Cyclin E/Cdk2 aktiviert diese Enzymaktivität. *In vivo* findet die Phosphorylierung am G2/M-Übergang statt und korreliert mit einer gesteigerten Histon H2B-Ubiquitinierung, dem Substrat von hHR6A. Die Funktion der Histon-Ubiquitinierung ist zwar noch weitestgehend unbekannt, es wird aber postuliert, daß es

eine Rolle bei der Kondensation spezifischer chromosomaler Regionen [Mueller et al., 1985] und der S- bzw. G2/M-Progression [Robzyk et al., 2000] spielt.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß Cyclin E/Cdk2 über die Phosphorylierung seiner verschiedenen Zielgene entscheidend zur Regulation des Zellzyklus, speziell zur G1/S-Progression beiträgt. Damit wäre auch eine regulatorische Verbindung zwischen Cyclin E/Cdk2 und Mad1 sinnvoll; dies wird im Ergebnis- und Diskussionsteil (s. 3.3. und 4.2.) dieser Arbeit untersucht.

2.2. Die Analyse der differentiellen Genexpression

Um Informationen über verschiedene zelluläre Aspekte wie Transformation, Apoptose und Differenzierung zu erhalten, kann die Analyse der zugrunde liegenden Genexpression aufschlußreich sein. Hier können z.B. zwei Zellpopulationen miteinander verglichen werden, die sich in einem der oben genannten Merkmale unterscheiden. Dabei wird angenommen, daß die Gene, die nur in einer der beiden Populationen oder quantitativ anders exprimiert werden, für den zellulären Phänotyp verantwortlich sind.

In neuester Zeit werden solche Fragestellungen vornehmlich mit sogenannten DNA-Mikroarrays bearbeitet. Hier sind cDNA-Sequenzen auf Glass immobilisiert und können nach Hybridisierung mit einer markierten Probe Aufschluß über Identität bzw. Quantität einzelner cDNAs in der Probe geben. Diese Arrays sind aufgrund der neuen Mikrotechnologie sehr klein und ersetzen damit die herkömmlichen Filterhybridisierungen. Allerdings sind sie kostenintensiver und erfordern eine spezielle Software zur Auswertung der Signale.

Es sollen im Folgenden drei herkömmliche Methoden zur systematischen Analyse differentieller Genexpression (*differential display*, *serial analysis of gene expression* = SAGE, subtraktive Genbank) vorgestellt und dann gegenüber dem hier verwendeten PCR-Select System abgegrenzt werden.

Beim *differential display* [Liang et al., 1992] werden die beiden zu vergleichenden mRNA-Populationen mit speziellen Primern (einem T₁₁GC-Primer für das PolyA-Ende und einem degenerierten Primer) revers transkribiert und dann in einer PCR amplifiziert. Auf diese Weise werden selektiv nur Fragmente mit wenigen hundert Basenpaaren Länge generiert, die im Agarosegel gut auftrennbar sind und gegeneinander verglichen werden können. Gelbanden, die

nur in einer der beiden Populationen vorkommen, werden ausgeschnitten, aufgereinigt und kloniert. Bei dieser Methode ist allerdings der Anteil falsch positiver Kandidaten sehr groß, etwa 70% [Mou et al., 1994], so daß ein *rescreening* erforderlich ist.

Die zweite Methode zur Analyse differentiell exprimierter Gene ist *serial analysis of gene expression* (SAGE) [Velculescu et al., 1995]. Sie beruht auf zwei Fakten:

1. Ein 9-12 Nukleotide langer "sequence tag" eines Transkriptes enthält genügend Information, um diese Sequenz eindeutig zu identifizieren.
2. Die Verkettung dieser "sequence tags" ermöglicht die effiziente Analyse von Transkripten durch eine serielle Sequenzierung mehrerer solcher "tags" in einem einzigen Klon.

Dazu werden vom 3'-Ende der mRNA einer Population solche "tags" synthetisiert, mit Adaptern versehen und durch Ligation aneinandergereiht. Diese verketteten cDNA-Fragmente werden dann kloniert und sequenziert. Die Identifikation differentiell exprimierter Gene erfolgt bei dieser Methode durch statistische Auswertung der Sequenzierergebnisse. Die Häufigkeit, mit der ein "tag" vorkommt, spiegelt den Grad der Genexpression in der Zelle wieder. Der Nachteil bei dieser Methode liegt in seinem enormen Arbeitsaufwand, da man zwischen 200.000 und 300.000 solcher "tags" sequenzieren muß, um auch seltene Gene zu identifizieren. Zudem muß der "tag" ausreichend charakteristisch für das Transkript sein, um das Gen identifizieren zu können.

Bei der dritten Methode der subtraktiven Hybridisierung (SH) wird die cDNA der einen Population (*tester*) mit einem Überschuß von cDNA der anderen (*driver*) möglichst vollständig hybridisiert, so daß die in beiden Populationen vorkommenden Sequenzen Doppelstränge bilden und die differenziell exprimierten Sequenzen als Einzelstränge verbleiben. Die Doppelstränge können dann auf verschiedene Weise, z.B. durch eine Hydroxylapatit-Chromatographie abgetrennt werden, wo einzelsträngige Nukleinsäuren weniger stark an das Mineral binden als doppelsträngige und somit die Hybride aus dem Reaktionsansatz entfernt werden können, oder durch Verwendung von Oligo(dT)₃₀-Latex *beads* [Hara et al., 1993]. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von Biotin-markierten *driver*-Sequenzen. Hier wird dann zum Hybridisierungsansatz Streptavidin zugegeben, das sehr affin an die Biotin-Hybride bindet, und anschließend eine Phenolextraktion durchgeführt, bei der sich die wasserunlöslichen Biotin-Hybride von den Einzelsträngen trennen lassen [Duguid et al., 1990; Sargent et al., 1983].

Ein generelles Problem der SH war vor allem der enorme zeitliche Aufwand mehrerer Hybridisierungsrunden, der Einsatz großer Mengen von Poly(A)⁺ RNA (> 20mg) und die Schwierigkeit, auch niedrig exprimierte mRNAs zu erfassen.

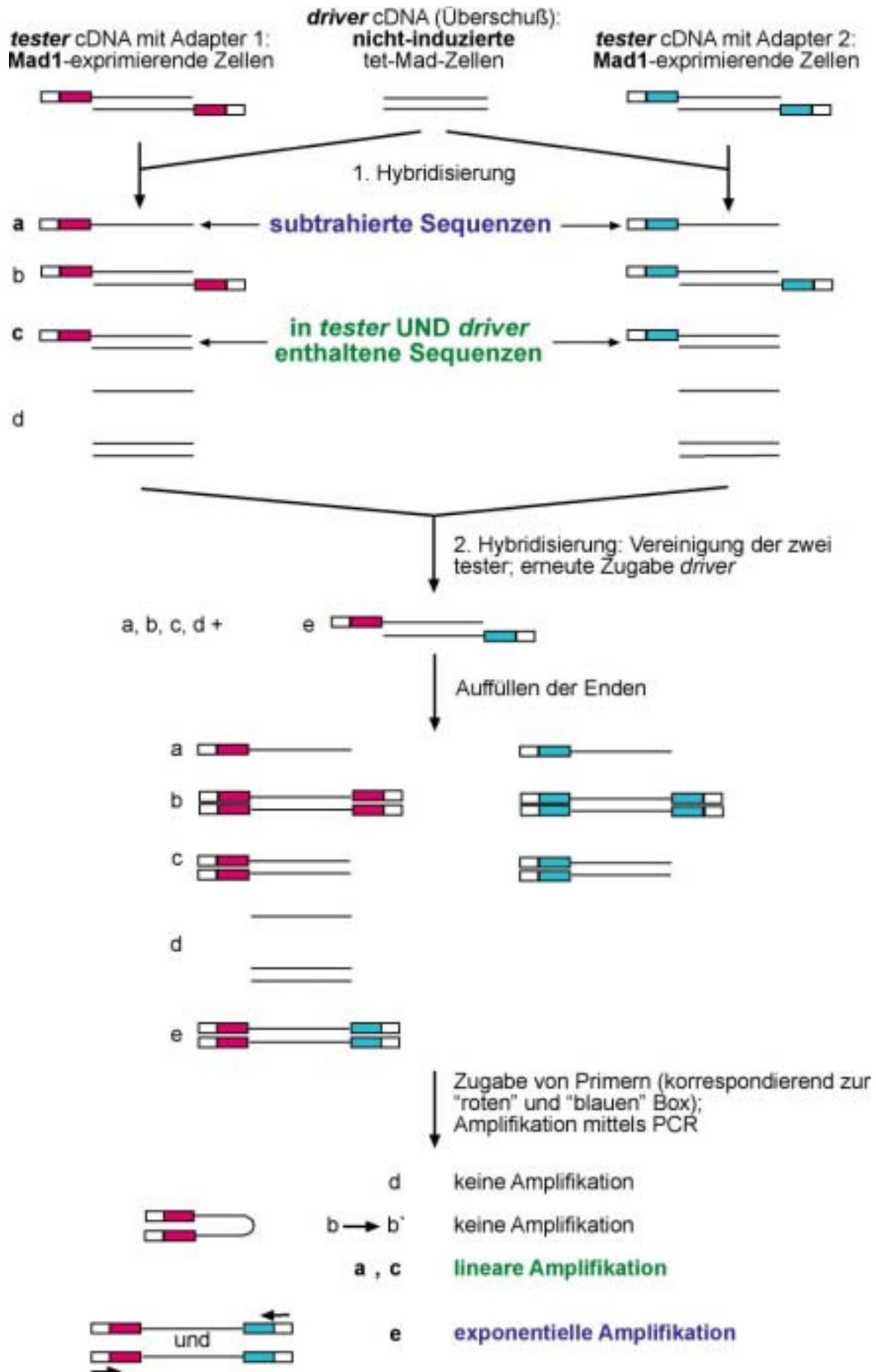


Abb. 10.: Dargestellt ist der generelle Ablauf der einzelnen Schritte des PCR-Select-Systems. Mit a-e sind die möglichen Kombinationen von cDNA-Fragmenten bezeichnet, die sich nach der Adapterligation und den Hybridisierungsrounds ergeben.

Als Abwandlung dieser Grundidee subtraktiver Hybridisierung wurde die *suppression subtractive hybridization* (SSH) entwickelt [Gurskaya et al., 1996 ; Diatchenko et al., 1996], die die Basis des PCR-Select Systems ist (s. Abb. 10.).

Hier wird die *tester* cDNAs in zwei Ansätze aufgeteilt und ihr 5'-Ende an jeweils einen von zwei verschiedenen Adaptern ligiert. In der anschließenden Hybridisation wird wieder ein Überschuß an *driver* cDNA eingesetzt. In einer zweiten Hybridisation werden dann die beiden Ansätze vereint. Nach Auffüllen der überhängenden Enden gibt es verschiedene Arten von Hybriden (a-e), wobei in der anschließenden PCR nur solche amplifiziert werden können, die beide Adaptertypen enthalten. Im Gegensatz zu den ursprünglichen SH-Verfahren werden also folgende Verbesserungen erreicht:

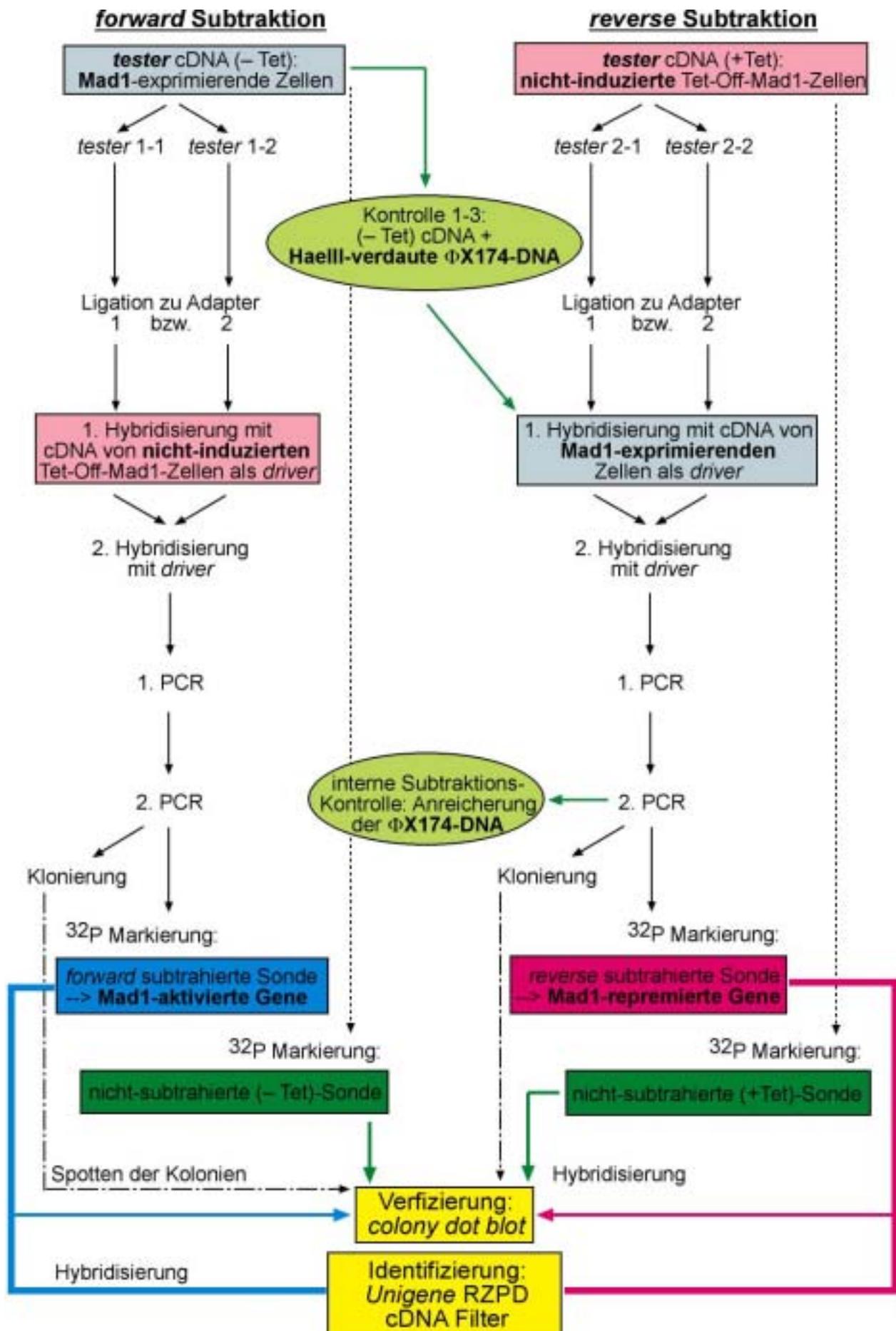
1. In der 1. Hybridisierung wird unter Einsatz von *driver* im Überschuß und entsprechend der Kinetik einer Hybridisierungsreaktion zweiter Ordnung eine Normalisierung aller cDNAs von Typ a erreicht, da das *reannealing* der zahlreicher vorliegenden *tester* cDNAs häufiger geschieht. Es werden also spezifisch die einzelsträngigen *tester* cDNAs differentiell exprimierter Sequenzen (Typ a) gegenüber solchen cDNAs angereichert, die in *tester* und *driver* Population vorkommen (Typ c).
2. Da in diesem SSH-Verfahren zwei *tester* Populationen mit zwei verschiedenen Adaptern erstellt wurden, erfolgt im 2. Hybridisierungsschritt (ohne vorherige Denaturierung!) eine Hybridisierung nur zwischen zuvor einzelsträngig verbliebenen Sequenzen. Es entstehen Hybride von Typ b,c und e.
3. Es entfällt die oben erwähnte physikalische Abtrennung einzelsträngiger und doppelsträngiger Moleküle, da allein aufgrund des Vorliegens zweier verschiedener Adaptersequenzen in den Hybriden zwischen Typ a-e unterschieden werden kann (s. Abb. 10.). Die alleinige Isolierung der Typ e Moleküle erfolgt über PCR mit zwei den verschiedenen Adaptersequenzen entsprechenden Primern. Typ b Moleküle enthalten invertierte *repeats* und formen stabile "*panhandle-like*" Sekundärstrukturen (*suppression* PCR). Typ c Moleküle werden nur linear amplifiziert, Typ e Moleküle jedoch exponentiell.
4. Aufgrund entsprechender Adaptersequenzen kann eine zweite *nested* PCR angeschlossen werden, um eine weitere spezifische Anreicherung differenziell exprimierter Sequenzen zu erhalten.

5. Auf diese Weise wird eine 1.000-5.000 fache Anreicherung niedrig aber differenziell exprimierter Sequenzen erreicht. Je unterschiedlicher die beiden zu vergleichenden Populationen sind, desto eher erreicht der Anteil der auch im *rescreening* bestätigten Sequenzen 100%. Generell kann mit einem Anteil falsch positiv subtrahierter Klone von weniger als 2% gerechnet werden [Diatchenko et al., 1996].
6. Es werden nur 0,5- 2mg Poly(A)⁺ RNA benötigt.
7. Es wird nicht mit *full-length* cDNA Sequenzen gearbeitet, sondern mit zuvor Rsa I-verdauten (durchschnittlich 0,2-2 kb) Fragmenten, um eine bessere Hybridisierungseffizienz zu erreichen. Lange cDNA Fragmente neigen zur Bildung von Sekundärstrukturen, die eine Hybridisierung verhindern würden. Außerdem erhält man eine bessere Repräsentation individueller Gene, weil kürzere Fragmente seltener die für Genfamilien typischen konservierten Domänen enthalten, so daß eine Hybridisierung allein über solche konservierten Boxen eine Anreicherung einzelner, doch differenziell exprimierter Familienmitglieder verhindern würde.
8. Die finale Population angereicherter subtraktiver Sequenzen von Typ e kann idealerweise direkt als Sonde für ein *rescreening* über Reversen Northern bzw. Dot Blot oder andere Filter-Systeme verwendet werden.
9. Die Adapter enthalten auch Restriktionsstellen, die für ein Klonieren der Fragmente genutzt werden können.

Das PCR-Select System schien vor diesem Hintergrund sehr geeignet, um die Frage nach differenziell exprimierten Genen in zwei Zellpopulationen anzugehen. Hier wurde diese Methode auf das Tet-OFF-Zellsystem angewandt, um solche Gene zu identifizieren, die nur in Abhängigkeit von Mad1-Expression exprimiert bzw. reprimiert werden, also potentielle Mad1-Zielgene sind.

Die Abb.11. erklärt, mit welcher Population induzierter oder nicht-induzierter Zellen entweder Mad1-aktivierte oder Mad1-reprimierte Sequenzen angereichert wurden und wie sich die Schritte der Identifikation und gleichzeitigen ersten Verifizierung dieser Sequenzen über die Klonierungs-Dot-Blot-Strategie oder den Unigene Screen anschließen.

Abb. 11: Organisatorische Übersicht zu den verschiedenen Durchläufen des PCR-Select-Systems. Dargestellt sind die in dieser Dissertation als *tester* und *driver* verwendeten Populationen, sowie die sich daraus ergebenden Mad1-Zielgen-Gruppen. Gelb unterlegt sind die zwei im Anschluß durchgeführten Methoden zu Identifizierung und ersten Verifizierung der potentiellen Mad1-Zielgene.



2.3. Zielsetzung

Aus den bisher aufgeführten Fakten zu Mad1 wird deutlich, daß im Gegensatz zu dem Proto-Onkoprotein c-Myc nur wenig zur biologischen Funktion von Mad1 und vor allem den zugrundeliegenden Mechanismen bekannt ist. Es wurde aber aufgezeigt, daß c-Myc als Teil des Myc/Max/Mad-Netzwerkes zu begreifen ist und die von ihm induzierten Signaltransduktionswege letztendlich nicht getrennt von Mad1 aufgeklärt werden können. Daher ist es von wesentlicher Bedeutung, die Rolle von Mad1 als potentiellen Tumorsuppressor in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose zu studieren. Daraus ergeben sich direkt die drei Projekte dieser Dissertation.

Im ersten Projekt sollte die Rolle von Mad1 in der Regulation der Apoptose untersucht werden. In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, daß Mad1 die Fas- und TRAIL-induzierte Apoptose inhibieren kann. Es sollte daher in der vorliegenden Dissertation der Mechanismus dieser Inhibierung geklärt werden.

Das zweite Projekt ergab sich aus der Problematik, daß zwar die Funktion von Mad1 in Proliferation und Differenzierung bekannt war, aber -wie auch bei c-Myc- die zugrundeliegenden Signaltransduktionswege unbekannt sind. Es wurde daher ein genereller Ansatz zur Identifikation von Mad1-Zielgenen mittels der SSH-Methode gewählt.

Während die ersten beiden Projekte die durch Mad1-vermittelte Regulation analysieren, sollte im dritten Projekt umgekehrt die Regulation von Mad1 selbst untersucht werden. Diese Fragestellung ergab sich zum einen aus der Überlegung, daß so potente und basale Regulatoren zellulärer Schicksale wie c-Myc und Mad1 auch selber einer strengen Kontrolle unterliegen sollten und ihr Antagonismus koordiniert sein müßte. Zum anderen lagen bereits erste Hinweise vor, daß Cyclin E/Cdk2 eine solche Kontrolle über Mad1 ausüben könnte. Es wurde daher die Interaktion von Cyclin E/Cdk2 und dem Mad1-enthaltenen Sin3-Komplex untersucht, in dem Mad1 *in vivo* vorliegt und über den es seine Funktion als transkriptioneller Repressor vermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Die Rolle von Mad1 in der Apoptose

In meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, daß Mad1 die Fas- und TRAIL-induzierte Apoptose hemmen kann und Mad1 damit wie erwartet als Antagonist von c-Myc wirkt. In der vorliegenden Dissertation sollten nun weitere Details zum Mechanismus untersucht werden. Es wurden dazu zum einen Analysen zur Spaltung und Aktivierung von Caspasen durchgeführt (s. 3.1.1.). Zum anderen wurde unter Verwendung der Tet-OFF-Mad1-Zelllinie die differenzielle Expression von verschiedenen Mitglieder der Caspase- und Bcl-Familie, der TNF-Rezeptorsuperfamilie, der DISC-assoziierten Proteine und Apoptose-regulierenden Kinasen getestet (s. 3.1.2.). Unter 3.1.3. wird dagegen die Proteinmenge eines möglichen, indirekten Zielgens untersucht.

3.1.1. Mad1 inhibiert die Spaltung der Pro-Caspase-8

Es war bekannt, daß Mad1 Apoptose inhibiert. Um den Mechanismus zu klären, sollte zunächst die Ebene innerhalb des Apoptose-Signaltransduktionsweges, über den Mad1 eingreift, identifiziert werden.

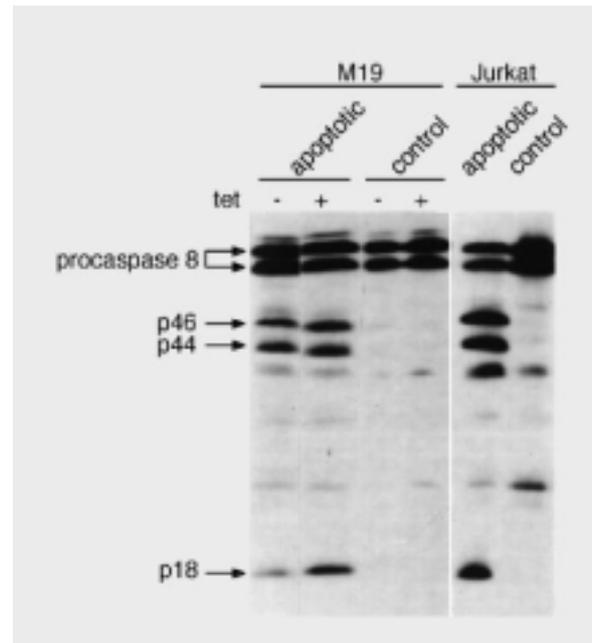
Dazu wurde die Spaltung der Caspase-8 im Western Blot untersucht.

In Mad1-induzierten und nicht-induzierten Zellen wurde durch Zugabe von einem Fas-Antikörper Apoptose induziert (s. 1.5.14.). 30h nach Induktion der Mad1-Expression und 15h nach Induktion des Apoptose-Signalweges (s. 1.2.8.) wurden die Zellen geerntet und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wurde dann die Caspase-8-Spaltung mit dem Anti-Caspase-8 Antikörper C-15 detektiert, der Caspase-8 *full-length* erkennt, sowie die Spaltprodukte p44, p46 (es werden zwei Isoformen exprimiert) und p18 (aktive Untereinheit).

In Abb. 12. ist deutlich zu sehen, daß in den Mad1-exprimierenden, Apoptose-induzierten Zellen weniger p18 zu detektieren ist, d.h. die Spaltung der Pro-Caspase-8 wurde durch die Expression von Mad1 inhibiert. Daraus ist zu schließen, daß Mad1 schon direkt an der DISC in den Apoptose-Signalweg eingreift.

Abb. 12.: Mad1 inhibiert die Spaltung von Pro-Caspase-8.

In Mad1-exprimierenden Zellen (tet⁻) und nicht-induzierten Zellen (tet⁺) wurde mit 100 ng/ml Fas-Antikörper Apoptose induziert. Als Kontrolle für die spezifischen Spaltprodukte der Caspase-8 wurden parallel Jurkat-Zellen behandelt. Die Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Inkubation der Membran erfolgte mit dem Caspase-8 Antikörper C-15 über Nacht. Die Pfeile zeigen die Pro-Caspase-8 bei 62 und 64 kDa, sowie die nach Induktion der Apoptose auftretenden Spaltprodukte bei 44 und 46 kDa und die katalytische Untereinheit bei 18 kDa.



Im nächsten Schritt sollte dieses Resultat durch eine andere Methode bestätigt werden. Hier wurde nun die Enzymaktivität der Caspase-8 und Caspase-3 gemessen, die von der vorherigen Aktivierung ihrer Pro-Caspaseform abhängig ist. Dafür wurden fluorogene Caspase-8- und 3-Substrate verwendet (Ac-IETD-AFC/ Pharmingen; Z-DEVD-AMC/ Alexis) (s. 1.5.14.). Die Abb. 13. zeigt, daß sowohl Caspase-3 als auch Caspase-8 in Mad1-exprimierenden Zellen eine wesentlich geringere Aktivität aufweisen als in den nicht-induzierten Zellen. Auch hier korreliert also die Expression von Mad1 mit einer Inhibierung der Caspase-8-Aktivität.

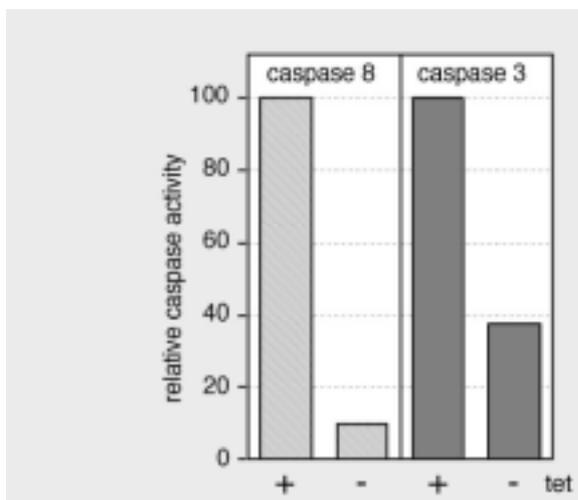


Abb. 13.: Mad1 inhibiert die Caspase-8-Aktivität.

In Mad1-exprimierenden Zellen (tet⁻) und nicht-induzierten Zellen (tet⁺) wurde mit 100 ng/ml Fas-Antikörper Apoptose induziert. In diesen Lysaten wurde nach Zugabe von fluorogenen Substraten für Caspase-3 und Caspase-8 die Enzymaktivität im Spektralfluorometer bestimmt.

Die Spezifität der Enzymaktivität wurde in diesen Experimenten parallel mit einem spezifischen Inhibitor von Caspase-8 überprüft (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 *RNase Protection Assays*

Um den Signalweg zwischen Mad1, einem Transkriptionsfaktor, und Caspase-8, deren enzymatische Spaltung bei gleichzeitiger Expression Mad1 gehemmt ist, aufzuklären, wurde die differenzielle Transkription verschiedener Gene, die am Apoptose-Signalweg beteiligt sind, untersucht. Dies erfolgte mittels eines *RNase-Protection Assays*. Zur Gewinnung der linearen Fragmente der zu testenden Gene wurden die hApo-1c, -2c, -3b, 3d, -6 *Multi-Probe Template Sets* von Pharmingen verwendet, nach dem *RNase Protection* Protokoll unter s. 1.6.2. markiert und mit den RNA-Populationen der Mad1-Klone hybridisiert. Hier wurden jeweils die Transkriptmengen der einzelnen RNAs aus Mad1-exprimierenden und nicht-induzierten Zellen miteinander verglichen.

Die Abb. 14. zeigt, daß weder innerhalb der Caspase- (hApo-1c), der Bcl-Familie (hApo-2c) oder der TNF-Rezeptorsuperfamilie (hApo-3d), noch unter den DISC-assoziierten Proteinen (hApo-3b) und Apoptose-regulierenden Kinasen (hApo-6) eine differenzielle Signalstärke zu detektieren war. Keines dieser Gene scheint also ein Mad1-Zielgen zu sein, so daß auf diese Weise keine weiteren Aufschlüsse über die Verbindung zwischen der transkriptionellen Repression durch Mad1 und der enzymatischen Hemmung von Pro-Caspase-8 erhalten werden konnten.

3.1.3. Mad1 steigert die c-Flip-Expression

Bisher wurde davon ausgegangen, daß ein Zielprotein von Mad1 eine Regulation auf Transkriptionsebene erfährt. Das mag für direkte Zielgene gelten, da Mad1 ein transkriptioneller Repressor ist. Hier wurden aber mittels *RNase Protection Assay* keine differentiellen Transkriptmengen detektiert. Möglicherweise reguliert Mad1 aber indirekt über posttranskriptionelle Mechanismen und Halbwerts-Zeiten die Menge und Stabilität der entsprechenden Proteine. Es wurde hier die Protein-Expression von c-Flip untersucht. c-Flip (*FLICE-inhibitory protein*) bindet an das Adapterprotein FADD und verhindert damit die Bindung von Pro-Caspase-8 an FADD, so daß diese nicht mehr gespalten und aktiviert werden kann.

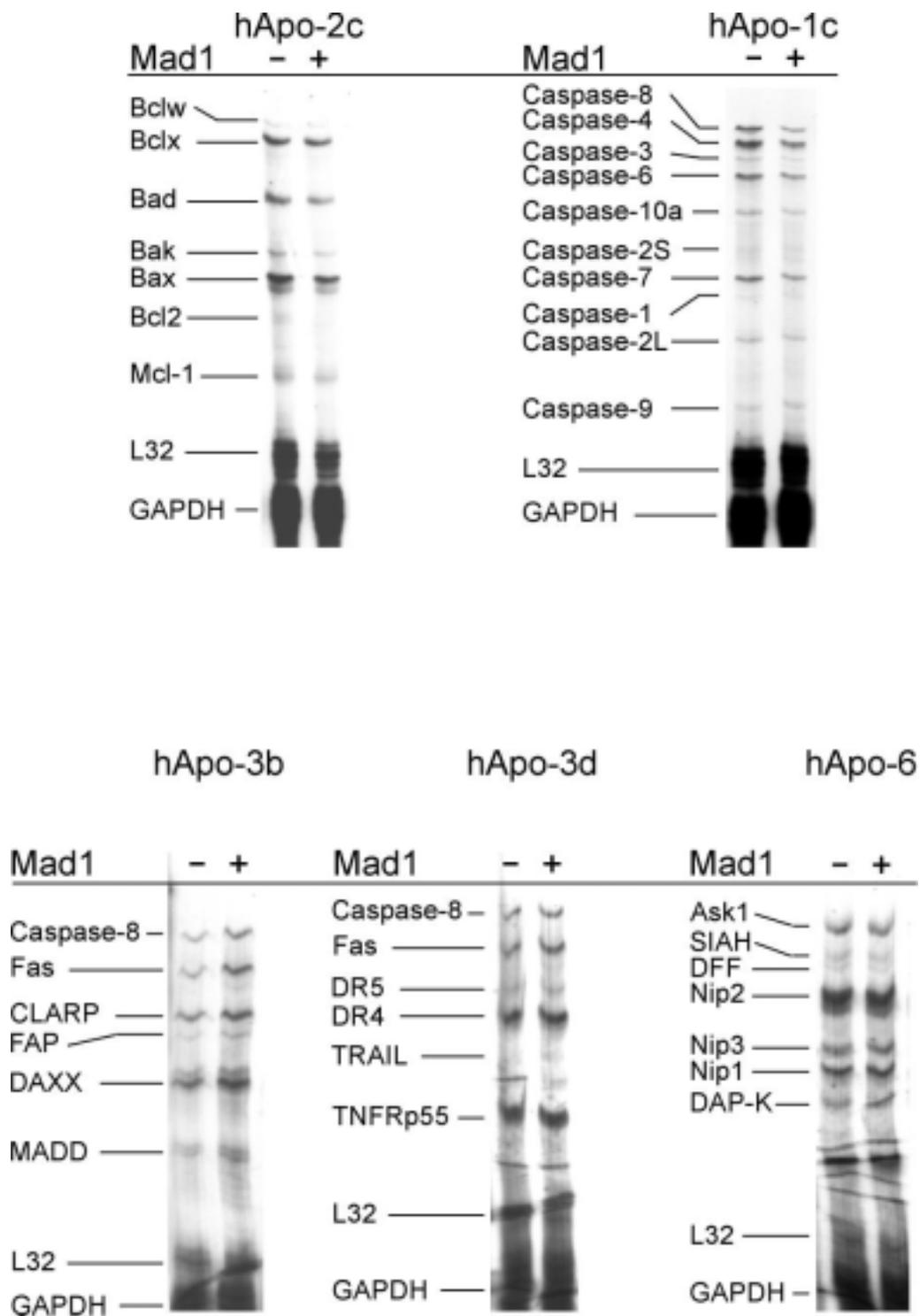


Abb. 14.: RNase Protection Assay mit den hApo-1c, -2c, -3b, 3d, -6 *Multi-Probe Template Sets* von Pharmingen. Verglichen wurde jeweils die RNA-Population nicht-induzierter Zellen (Mad1-) mit der von Mad1-exprimierenden Zellen (Mad1+).

Um den Signalweg von Caspase-8 zu Mad1 zurück zu verfolgen, schien dieser direkte Inhibitor von Caspase-8 der nächste Schritt zu sein, den es zu überprüfen galt. Zur Analyse wurde die Proteinebene gewählt, da diese auch die Möglichkeiten posttranskriptioneller Regulation einschließt. Die Auswahl von c-Flip fand später in einer Veröffentlichung zu Tumoren mit amplifizierten Myc-Genen und deregulierter Expression von Caspase-8 und c-Flip eine Bestätigung [Shivapurkar et al., 2002] (Diskussion 4.1.6.1.).

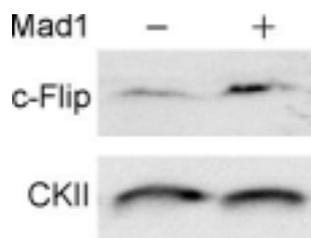


Abb. 15.: Mad1 induziert die Expression von c-Flip.

Dargestellt ist ein Western Blot mit Lysaten von Mad1-exprimierenden Zellen (+) und nicht-induzierten Zellen (-). Der Blot wurde mit Antikörpern gegen c-Flip bzw. CKII entwickelt.

In der Abb. 15. ist zu sehen, daß die induzierte Expression von Mad1 in den Tet-OFF-Mad1-Zellen mit einer erhöhten Protein-Expression von c-Flip korreliert. Im Vergleich dazu ist parallel die gleiche Lysatmenge geladen und der Blot zur Standardisierung mit CKII entwickelt worden.

Ein Synonym für c-Flip ist CLARP (*Caspase-eight-related protein*). Dieses war im *RNase Protection Assay* (s. 3.1.2.) bereits auf eine transkriptionelle Regulation durch Mad1 getestet worden, zeigte aber keine erhöhte Transkription der mRNA. c-Flip scheint somit erst einer posttranskriptionellen Regulation im Mad1-Signalweg zu unterliegen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß c-Flip tatsächlich ein Bindeglied zwischen der inhibierten Caspase-8-Aktivität und der Expression von Mad1 ist. Weiterhin bleibt aber offen, welches das direkte Zielgen von Mad1 ist, das den Apoptoseweg reguliert.

Fazit zur Rolle von Mad1 in der Apoptose

Es konnte gezeigt werden, daß Mad1 die Fas- und TRAIL-induzierte Apoptose hemmt, indem es die Spaltung und damit die Aktivierung der Pro-Caspase-8 inhibiert. Damit ist der Angriffspunkt von Mad1 in der Regulation der Apoptose auf die DISC einzugrenzen. Als erstes Verbindungsglied des Mad1-Signaltransduktionsweges zur enzymatischen Hemmung

von Pro-Caspase-8 wurde c-Flip identifiziert. c-Flip konkurriert mit Pro-Caspase-8 um die Bindung an FADD und den Rezeptor, so daß es dominant negativ wirkt und die Prozessierung von Pro-Caspase-8 verhindert.

Welche Signale wiederum *upstream* von c-Flip liegen und wie Mad1 die Induktion von c-Flip aktiviert ist noch unbekannt.

Um diese Fragen anzugehen, wurde ein allgemeiner Screen nach Mad1-Zielgenen begonnen, der zur detaillierten Beschreibung der Signaltransduktionswege von Mad1 in Proliferation und Apoptose hilfreich sein sollte (s. 3.2.).

3.2. Identifizierung von potentiellen Mad1-Zielgenen mittels PCR-Select

Im vorhergehenden Kapitel 3.1. wurde die Funktion von Mad1 in der Apoptose untersucht. Dabei wurde geschlossen, daß Mad1 über die Inhibierung der Pro-Caspase-8 die Formierung der DISC beeinträchtigt. Allerdings ist der genaue Signalweg beginnend bei einem ersten Mad1-Zielgen noch ungeklärt. Da unter den *best guess* Kandidaten bislang nur c-Flip als weiteres Verbindungsglied identifiziert werden konnte, wurde nun ein allgemeiner Screen für Mad1-Zielgene gewählt. Dazu wurde ein unter 2.2. vorgestelltes SSH (*suppression subtractive hybridization*)-basiertes Verfahren genutzt. Es sollen hier zunächst die Anwendung dieser Methode zu Isolation potentieller mad1-Zielgene und die endogenen Kontrollen vorgestellt werden (s. 3.2.1.) und danach die ersten unabhängigen Verifizierungsschritte der favorisierten Kandidaten (s. 3.2.2.).

3.2.1. Gewinnung der subtrahierten Populationen mittels PCR-Select

Es wurden jeweils Populationen der mRNA von Mad-induzierten und nicht-induzierten Tet-OFF-Mad1-Zellklonen präpariert (s. 1.6.1.). Diese mRNAs wurden dann entsprechend dem PCR-Select Protokoll (s. 1.7.1.1.) in cDNA umgeschrieben, mit den Adaptern ligiert und den Hybridisierungen unterzogen (s. Abb. 10.). Hier werden nun beispielhaft für die mehrfachen Durchläufe mit mRNAs von verschiedenen langen Induktionszeiten, von verschiedenen Tet-OFF-Mad1-Klonen und von einem Tet-On-Mad1-Klon (erhalten von L. G. Larsson, Uppsala) die einzelnen Stufen der Überprüfung eines qualitativ und quantitativ optimalen Durchlaufes gezeigt.

3.2.1.1. RsaI-Verdau der cDNA-Population

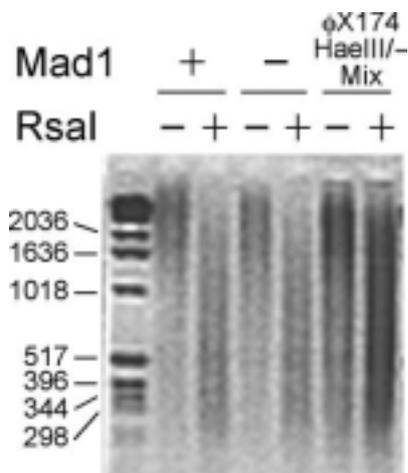


Abb. 16.: RsaI-Verdau der cDNAs.

cDNA von *tester* und *driver* wurden mit RsaI verdaut und zusammen mit unverdauter cDNA im Elektrophoresegel aufgetrennt.

Als Kontrolle für alle weiteren Schritte der Anreicherung differenziell exprimierter Sequenzen wurde ein Gemisch von *tester* oder *driver* cDNA zusammen mit HaeIII-verdauter ϕ X174-DNA dem PCR-Select-Verfahren unterzogen.

Nach der Umschreibung der beiden mRNA-Populationen (*tester* und *driver*) in cDNA wurde ein RsaI-Verdau durchgeführt, um möglichst Fragmente von 200 bp bis 2 kb zu erhalten. Diese wiesen eine optimale Größe für eine vollständige Hybridisierung auf und waren auch gut zu klonieren. Die Abb. 16. zeigt, daß nach dem RsaI-Verdau genau solche Fragmente vorlagen.

3.2.1.2. Ligationseffizienz der Adapter

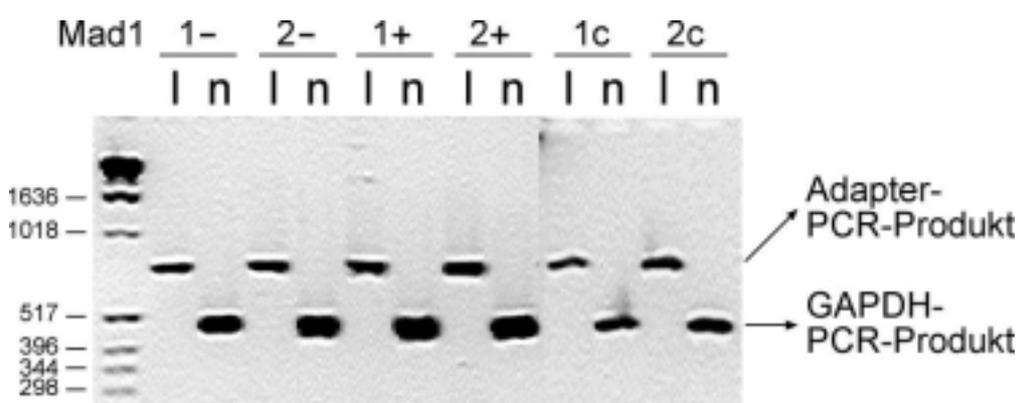


Abb. 17.: Bestimmung der Ligationseffizienz.

Dazu wurde eine PCR mit den beiden Primern für GAPDH (Reihe "n") durchgeführt. In den Reihen "l" wurde der *forward* GAPDH-Primer durch einen Adapter-Primer ersetzt. "n"= nicht-ligiert; "l"= ligiert; 1- bzw. 2- = beide Ansätze der nicht-induzierten Population; 1+ bzw. 2+ = beide Ansätze der Mad1-induzierten Population; c = Kontrolle mit HaeIII-verdauter ϕ X174-DNA.

Die *RsaI*-verdauten Fragmente der *tester*-Population wurden dann in zwei Ansätze aufgeteilt und mit zwei verschiedenen Adaptern am 5'-Ende versehen. Zur Kontrolle der Effizienz dieser Ligation wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die zum einen alle GAPDH-Fragmente aus dem *pool* von cDNAs erkannten. Zum anderen wurde der *forward* Primer durch einen solchen ersetzt, der mit dem Adapterstrang hybridisiert. Hier wurden also nur die GAPDH-Fragmente amplifiziert, die auch an den Adapter ligiert waren. Der Adapter-Primer hybridisiert mit beiden Adaptern der zwei gespaltenen *tester*-Ansätze. Die untere Grenze der Effizienz liegt bei 25%. Meist wurden, wie auch die Abb. 17. zeigt, 60-90% erreicht.

3.2.1.3. Subtraktion der *driver*-Population von der *tester*-Population

Die ligierten *tester*-Fragmente wurden dann zusammen mit den *driver*-Fragmenten hybridisiert. Die *forward* und *reverse* Subtraktion wurden jeweils parallel durchgeführt, d.h. im einen Hybridisierungsansatz war die cDNA der induzierten Zellen der *tester*, im anderen der *driver*. Als Kontrolle wurde das Gemisch aus der *HaeIII*-verdauter ϕ X174-DNA gegen einen der beiden anderen cDNA-Populationen als *driver* subtrahiert. Es folgten zwei Runden der PCR-Amplifizierung.

Zur Überprüfung der erfolgten Subtraktion wurde nun jeweils ein Aliquot der subtrahierten PCR-Populationen mit einem der cDNA-Populationen vor der 1. Hybridisierung verglichen (s. Methodenteil 1.7.1.2.). Typischerweise ergab sich ein Bild wie in Abb. 18.

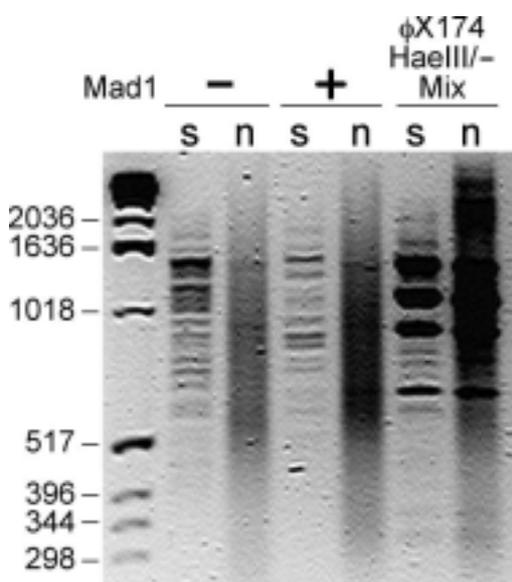


Abb. 18.: Kontrolle der Subtraktion. cDNA-Populationen vor (n) und nach (s) der Subtraktion in den Hybridisierungsschritten wurden im Elektrophoresegel aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurde ein ϕ X174-DNA/*tester*-Gemisch verwendet. n= nicht-subtrahiert; s= subtrahiert

Hier sieht man sehr deutlich die Anreicherung der HaeIII-verdauten ϕ X174-DNA gegenüber dem Gemisch. Auch in den Reihen der subtrahierten Populationen erkennt man eine deutliche Anreicherung spezifischer Banden gegenüber dem "cDNA-Schmier". Wichtig ist auch zu bemerken, daß die Bandenmuster der *reverse* (-Mad1) und *forward* (+Mad1) Subtraktion sehr verschieden aussehen, daß also tatsächlich differenziell exprimierte Sequenzen angereichert wurden, die entweder durch Mad1 reprimiert oder aktiviert werden. Schon hier wird deutlich, daß in der Population, in der Mad1 nicht induziert war (-Mad1), wo also Mad1-reprimierte Gene angereichert werden (s. Abb.11.), sehr viel mehr Banden zu sehen sind. Die Subtraktion war hier also wider Erwarten effizienter. Die Gründe hierfür werden im Diskussionsteil unter 4.1.2. erläutert.

Eine andere Möglichkeit, die Subtraktion zu überprüfen und prinzipiell sogar zu quantifizieren, ist die folgende. Hier wurde eine semi-quantitative PCR auf die subtrahierten Populationen im Vergleich zu den nicht-subtrahierten Populationen durchgeführt (s. Methodenteil 1.7.1.2.). Die Abb. 19. zeigt eine PCR mit einem Primer für Max. Es ist bekannt, daß Max relativ hoch exprimiert wird und sowohl in proliferierenden als auch in differenzierten Zellen vorkommt. Es wurde als Kontrolle gewählt, da es nach erfolgreicher, vollständiger Subtraktion nicht mehr in der subtrahierten Population zu detektieren sein sollte (*tester* und *driver* enthalten beide Max-cDNA). Tatsächlich ist die gesamte Max-cDNA in der Hybridisierung "abgefangen" worden, so daß selbst nach 38 Zyklen keine Bande zu sehen ist.

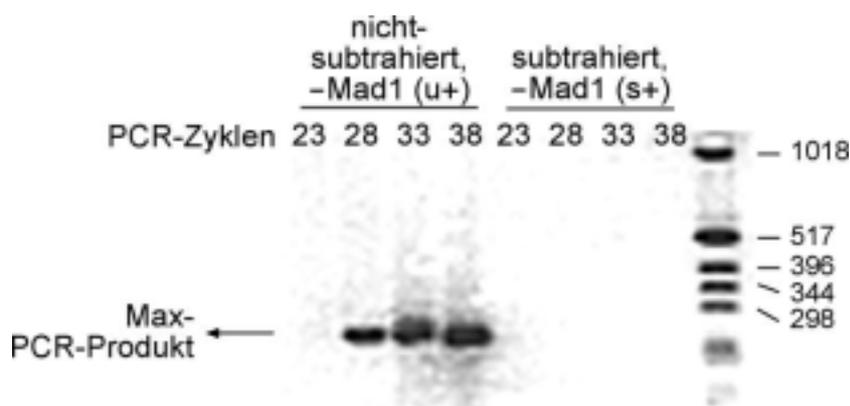


Abb. 19.: Kontrolle der Effizienz der Subtraktion.

Es wurde eine PCR mit Max-Primern auf den nicht-induzierten Populationen vor (u+) und nach der Hybridisierung (s+) durchgeführt. Alle 5 Zyklen wurde ein Aliquot des PCR-Ansatzes entnommen und auf dem DNA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Diese Kontrolle kann nun auch mit anderen Genen durchgeführt werden. Eine Quantifizierung der Anreicherung ergibt sich dann über die zusätzliche Zyklenzahl, die für gleichmäßig starke Signale nötig ist.

Wenn zu einem Durchlauf all diese Kontrollen durchgeführt worden waren, wurde er als erfolgreich bewertet und auf einem der beiden folgenden Weisen einer Identifizierung und ersten Verifizierung der Kandidaten-Zielgene unterzogen.

Es wird zunächst die Identifizierung der subtrahierten Fragmente mittels der Klonierungs-Dot-Blot-Strategie (s. 3.2.1.4.) dargestellt, dann unter 3.2.1.5. die mittels des Unigene Screens.

3.2.1.4. Identifizierung und Verifizierung mittels der Klonierungs-Dot-Blot-Strategie

Die subtrahierten Sequenzen aus dem PCR-Select Durchlauf vom 18.-24.4.2000 wurden in den Vektor pZERO kloniert (s. 1.7.2.) und anschließend im Kolonie-Dot-Blot Verfahren einer ersten Verifizierung unterzogen. Dieselbe Population an subtrahierten Sequenzen wurde später auch zur Hybridisierung des Unigene cDNA Filter vom RZPD verwendet, wo Identifizierung und Verifizierung der differentiellen Expression zusammen fallen. Auch dort wurden einige der Gene, die auf dem Wege der Klonierung, Sequenzierung und des Kolonie-Dot-Blot-Verfahrens favorisiert worden waren, erneut als potentielle Zielgene gefunden, so daß der Status eines echten Zielgenes bestärkt wurde (s. Diskussionsteil 4.1.3.).

Aus dem PCR-Select Durchlauf vom 18.-24.4.2000 wurden 72 Kolonien nach der pZERO-Klonierung erhalten. Die Klone 1.-23. entstammen dem Transformationsansatz mit der Population an subtrahierten (-Tet)-Sequenzen, d.h. cDNA von Mad1-exprimierenden Tet-Off-Mad1-Zellen wurde als *tester* eingesetzt und von der cDNA von nicht-induzierten Zellen als *driver* subtrahiert. Auf diese Weise sollten also Mad1-aktivierte Gene angereichert werden, worunter bei der Annahme, daß Mad1 ausschließlich als transkriptioneller Repressor agiert, indirekte Mad1-Zielgene fallen. Die Klone 24.-72. entstammen umgekehrt der Transformation mit der Population an subtrahierten (+Tet)-Sequenzen, d.h. es sollten solche Sequenzen angereichert vorliegen, die sonst unter Einfluß von induziertem Mad1 nicht oder nur gering exprimiert werden, also Mad1-reprimierte bzw. direkte Zielgene.

Der Kolonie-Dot-Blot wurde für die Klone 24.-72. zweimal (s. Abb. 21.), für die Klone 1.-23. (s. Abb. 20.) einmal durchgeführt. Bei der Auswertung der Hybridisierungssignale gibt es die in der Tabelle 1. aufgelisteten Möglichkeiten.

Tabelle 1.: Auswertung der Dot-Blot-Signale.

forward Subtraktion	reverse Subtraktion	nicht-subtrahierter tester	nicht-subtrahierter driver	Interpretation	Kürzel
+	-	+	-	differenziell exprimiertes Gen (zu 95%)	A
+	-	-	-	guter Kandidat; meist gering exprimiert; wurde angereichert	B
+	-	+	+	falsch positiv oder Splice-Varianten bzw. Multi-Gen-Familien	C
++	+	+	+ or -	eventuell	D
+	+	+	+	nicht differenziell expr.	E
-	-	-	-	nicht differenziell expr.	F

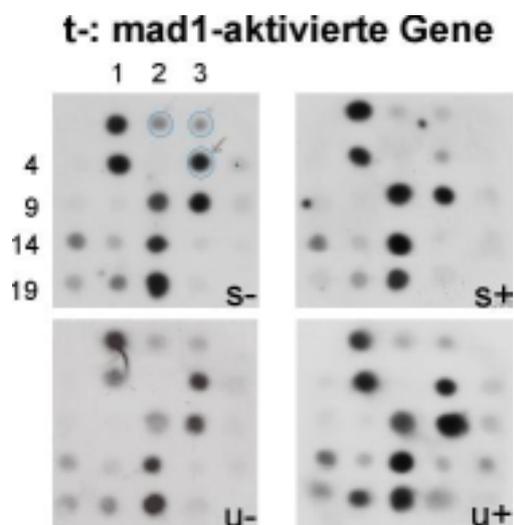


Abb. 20.: Dot-Blot zu den Klonen 1.-23.

Die Kolonien 1.-23., die aus der Transformation mit der (s-)-Population erhalten worden waren, wurden auf vier identische Membranen gespottet (s. 1.7.3.). Sie wurden dann mit den in der 2. PCR radioaktiv-markierten Populationen s+, s-, u+, u- hybridisiert.

s+= nicht-induzierter, subtrahierter *pool*;

s-= induzierter, subtrahierter *pool*;

u+= nicht-induzierter, nicht-subtrahierter *pool*;

u-= induzierter, nicht-subtrahierter *pool*

In der folgenden Tabelle 2. wird zunächst die Auswertung für den ersten Dot Blot (s. Abb. 20.) gezeigt: die Klone 1.-23. aus der Transformation mit der Population an **Mad1-aktivierten Genen (forward Subtraktion)** lagen auf die Membran gespottet vor und wurden mit den Sonden sowohl aus den *forward* und *reverse* Subtraktionen als auch vom nicht-subtrahierten *tester* und *driver* hybridisiert. In der Liste werden für die Auswertung die Kürzel aus Tabelle 1. benutzt.

Tabelle 2.: Identität und Spezifität der Klone 1.-23.

Klon-Nr.	dot blot Auswertung	Gen	Informationen
1.	E	EEF1 α	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha
2.	B	CLK3	CDC-like kinase 3
3.	B	Ferredoxin Reductase	sehr ähnlich zu NADPH:Adrenodoxin Oxoreductase precursor
4.	F	cDNA FLJ32016 fis	unbekannt
5.	E	DKFZp434I0130	unbekannt
6.	F	?	nicht sequenziert
7.	C	pZERO	leerer Vektor
8.	F	β -Tubulin 4	Zytoskelett
9.	F	MAGE-8	melanoma antigen encoding
10.	F	HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A
11.	E	RAL A	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A
12.	E	U5 snRNP-specific protein	RNA helicase family
13.	F	GAPDH	housekeeping gene der Glykolyse
14.	E	pZERO	leerer Vektor
15.	E	tsg24	meiotic check point regulator
16.	E	mitochondrion	haplotype As10F
17.	F	GAPDH	housekeeping gene der Glykolyse
18.	F	U4/U6 snRNP-associated 61 kDa protein bzw. PRP31	pre-mRNA processing factor 31 homolog
19.	E	?	nicht sequenziert
20.	E	?	nicht sequenziert
21.	E	Naf1	Nef-associated factor 1
22.	F	EEF1 α	s.o.
23.	F	p55CDC20/ ZNF173	cell division cycle protein 20, zinc finger protein 173, Klasse I Region des humanen MHC

Aus der Tabelle 2. wird ersichtlich, daß eigentlich nur 2 Klone mögliche Kandidaten sind. Klon Nr. 7 ist eindeutig falsch positiv, da es die Sequenz des Klonierungsvektors ist und zudem in die Kategorie C fällt, also in beiden nicht-subtrahierten *testern* vorhanden ist und damit nicht differenziell exprimiert vorliegt. Klon 2 und 3 sind nur sehr schwach differenziell exprimiert. Allerdings ist dieser Durchlauf des Dot Blots, der identisch ist mit dem 1. Durchlauf für die Klone 24.-72., offensichtlich suboptimal, da auch bei den Klonen 24.-72. nur etwa 60% der Klone aus dem 2. Durchlauf gefunden werden konnten. Nähere Erörterungen zu der

Verlässlichkeit der Verifizierung von Klon 2 und 3 als potentielle Zielgene sind im Diskussionsteil zu finden.

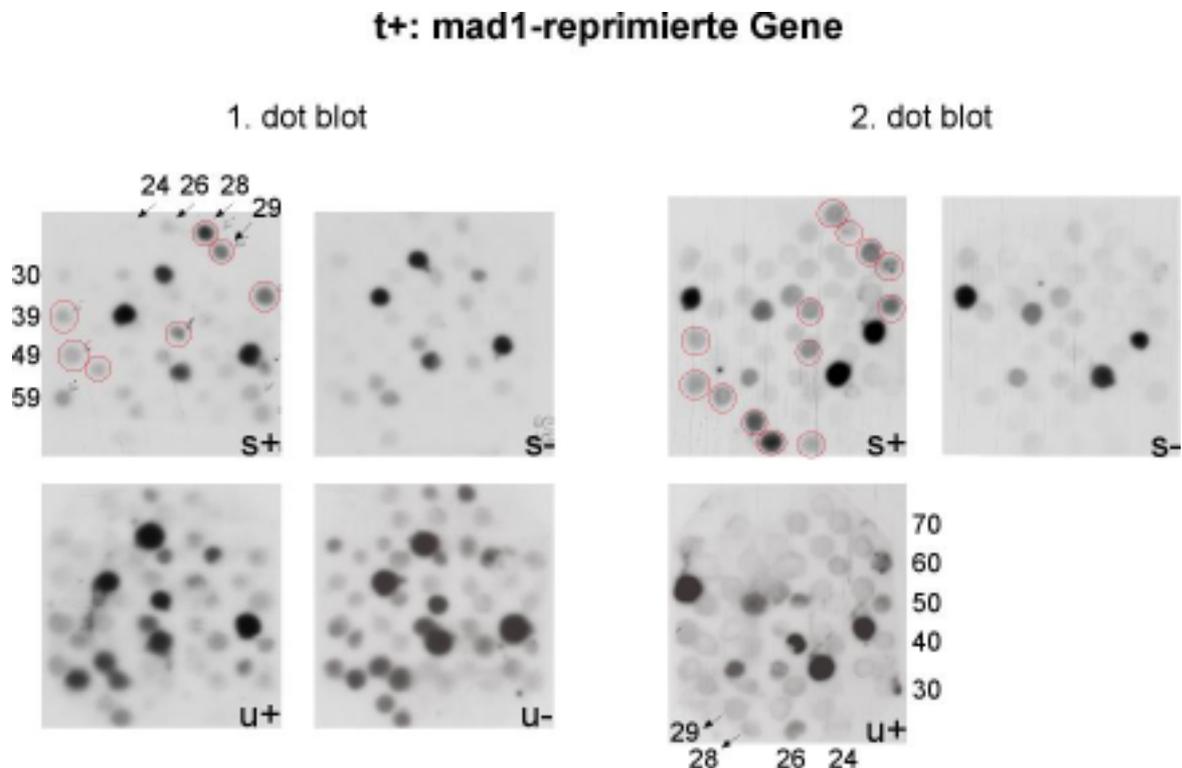


Abb. 21.: Dot-Blot zu den Klonen 24.-72.

Die Kolonien 24.-72., die aus der Transformation mit der (s+)-Population erhalten worden waren, wurden auf drei bzw. vier identische Membranen gespottet (s. Methodenteil 1.7.3.). Sie wurden dann mit den in der 2. PCR radioaktiv-markierten Populationen s+, s-, u+, (u-) hybridisiert.

s+= nicht-induzierter, subtrahierter *pool*;

s-= induzierter, subtrahierter *pool*;

u+= nicht-induzierter, nicht-subtrahierter *pool*;

u-= induzierter, nicht-subtrahierter *pool*

Die Tabelle 3. zeigt die Auswertung für den zweiten Dot Blot (s. Abb. 21.): die Klone 24.-72. aus der Transformation mit der Population an **Mad1-reprimierten Genen (reverse Subtraktion)** lagen auf die Membran gespottet vor und wurden mit den Sonden sowohl aus den *forward* und *reverse* Subtraktionen als auch vom nicht-subtrahierten *tester* und *driver* hybridisiert. Da zumindest der 2. Dot Blot Durchlauf für diese Klone nur mit der nicht-subtrahierten *tester* Sonde als Kontrolle durchgeführt wurde, kann in diesem Durchlauf zwischen Interpretation A und C nicht unterschieden werden.

Tabelle 3.: Identität und Spezifität der Klone 24.-72.

Klon-Nr.	dot blot (1, 2) Auswertung	Gen	Informationen
24.	F	TACC1	transforming, acidic coiled-coil
25.	F	Vektor	-
26.	A oder C (1)	Integrin α3	VLA-3 Rezeptor
27.	F	LDL-Rezeptor	low density lipoprotein receptor
28.	B	FLJ20596	DEAD/H box polypeptide 27
29.	B	ARFGAP	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein
30.	F	Pyruvatkinase	
31.	F	DKFZp586P2321	ähnlich zu probable guanine nucleotide regulatory protein: TIM
32.	F	KIAA1470/ TD-60	RCC1-ähnlich; chromosome condensation regulator (cytokinesis)
33.	E	Pyruvatkinase	
34.	F	CLDN4	claudin 4
35.	F	beta-Tubulin	Zytoskelett
36.	F	Vektor	
37.	E	Na, K-ATPase	
38.	B	EZH (enhancer of zeste)	bindet HDAC1; Polycombgruppe
39.	B	DIPP2	Diphosphoinositol Polyphosphat Phosphohydrolase
40.	F	MMP4	M-phase phosphoprotein 4
41.	E	beta-Aktin	Zytoskelett
42.	F	gamma-Aktin	Zytoskelett
43.	F	gamma-Aktin	Zytoskelett
44.	A oder C	Dynaktin 1	Zytoskelett
45.	F	FLJ11066 fis	unbekannt
46.	F	Vektor	
47.	F	Vektor	
48.	F	Vektor	
49.	B	HNRNP-K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)	Transport/ processing von pre-mRNA; DNA-Bindeprotein (rekrutiert SP1, TBP, Repressor Zik1); transkriptioneller Aktivator des c-myc Promoters; Interaktion mit Proteinkinasen (Src, PKC) + Proto-Onkogen Vav
50.	A oder C	ribosomales Protein L19 + KIAA0104	unbekannt
51.	F	Vektor	
52.	F	TAB2B	ABC-Transportprotein
53.	F	Mef2A	myocyte-specific enhancer factor 2A
54.	A oder C	Klon 23967/ MMS19L	MMS19-like: humanes Homolog vom Hefe DNA repair und TFIIF

			Reguator MMS19; ein AF-1-spezifischer Koaktivator des Östrogen Rezeptors
55.	D	beta-Aktin	Zytoskelett
56.	E	TI-227H	mitochondriale Sequenz
57.	F	pZERO	leerer Vektor
58.	F	pZERO	leerer Vektor
59.	E	GAPDH	housekeeping gene der Glykolyse
60.	A oder C	HCA66	hepatocellular carcinoma-associated antigen 66
61.	B	DKFZp434N1435	unbekannt
62.	F	FLJ10830 fis	unbekannt
63.	F	Vanilloid-Rezeptor	
64.	F	pZERO	leerer Vektor
65.	F	Kollagen Typ IV	
66.	F	Kollagen Typ IV	
67.	F	Kollagen Typ IV	
68.	F	Golf alpha (G-Protein)	guanine nucleotide binding protein
69.	F	Hsp70	heat shock protein 70kD
70.	B	alpha NAC	nascent polypeptide-associated complex: ribosomale Translation + Koaktivator bei Differenzierung
71.	B	EST365472/ IMAGE Klon 4454305	unbekannt
72.	F	pZERO	leerer Vektor

Aus der Tabelle 3. wird deutlich, daß 13 Klone in die engere Wahl eines Mad1-Zielgens kommen. Sie werden unter 4.1.3 einem weiteren Kriterium, nämlich schon als c-Myc-Zielgen identifiziert worden zu sein, unterworfen und dann einzeln diskutiert.

3.2.1.5. Identifizierung und Verifizierung mittels des Unigene Screens

Der PCR-Select-Durchlauf vom 18.-24.4.2000 und alle folgenden Durchläufe wurden auf einem alternativen Weg verifiziert. Hierzu wurden die subtrahierten Populationen in der 2. PCR radioaktiv markiert und in eine Hybridisierung mit den Unigene Filterset eingesetzt (s. 1.7.4.). Die Abb. 22. zeigt etwa vierfach verkleinert ein typisches Hybridisierungsergebnis. Dargestellt ist ein Filter, der zunächst mit der (s-)-Population und nach erfolgtem Strippen mit der (s+)-Population hybridisiert wurde. Die markierten Hybridisierungssignale markieren gespottete EST-Klone. Über ihre Koordinaten und Doppelpot-Anordnung auf dem Filter konnte in der RZPD-

Datenbank die entsprechende Unigene-Identität des Klons ermittelt werden. Dieser wurde dann über die Datenbank des NCBI ein Genname zugeordnet, sofern der EST-Klon schon als Gen bekannt war.

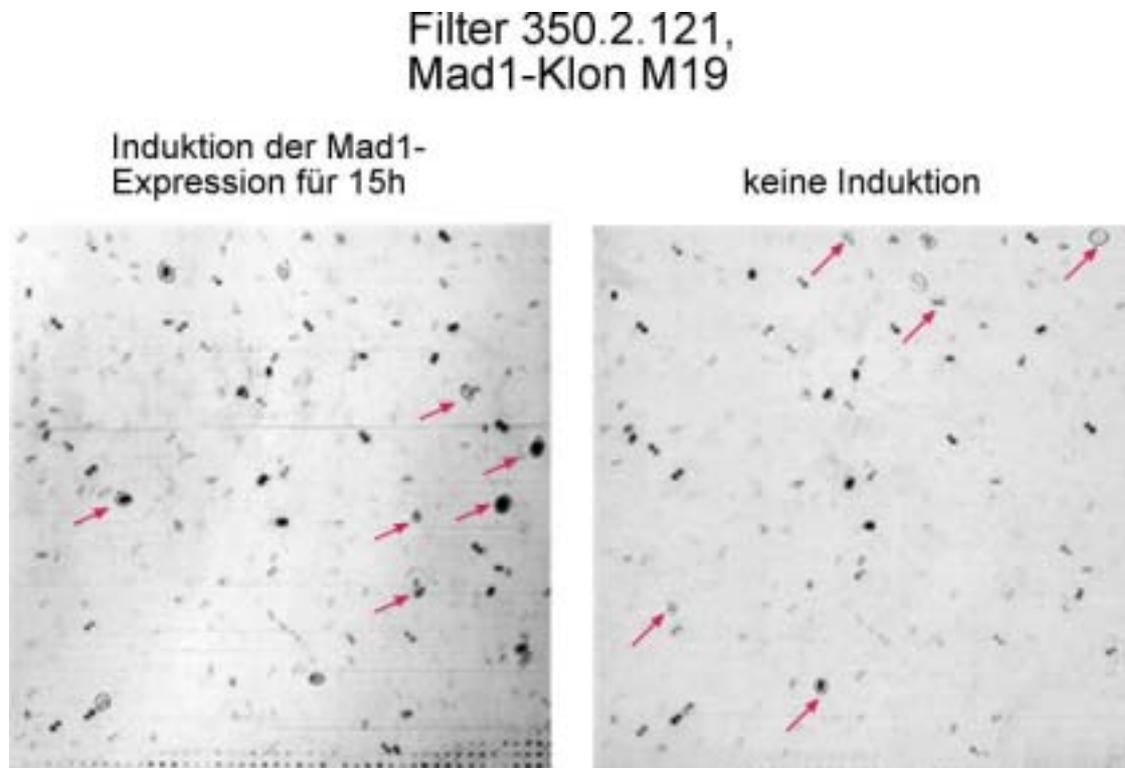


Abb. 22.: Hybridisierung der Unigene-Filter.

Das Unigene Filterset vom RZPD (*Library No. 950 Human Unigene 1 cDNA*) wurde mit der (s-)-Population (links) bzw. der (s+)-Population (rechts) hybridisiert. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie. Die Pfeile markieren beispielhaft differenziell auftretende Hybridisierungssignale.

s+= nicht-induzierter, subtrahierter *pool*; s-= induzierter, subtrahierter *pool*.

Dieses Verfahren wurde für alle PCR-Select-Durchläufe durchgeführt, da es sowohl den zeitlichen und finanziellen Klonierungs- und Sequenzierungsaufwand einspart. Allerdings ist die Verwendung der Filter durch das Strippen limitiert. Die Signale wurden über die Zeit immer schwächer und weniger. Dies mag auch ein Grund sein, warum besonders die zuerst identifizierten Kandidaten nicht in allen folgenden Hybridisierungen wieder gefunden wurden (s. 4.1.4.). D.h., das Kriterium der wiederholten Identifizierung eines potentiellen Zielgens mittels Unigene Screen ist in der Praxis einer Einschränkung zu unterwerfen. In der Auswertung wurde daher vor allem auf das Kriterium einer unabhängigen Verifizierung mittels ChIP, Northern oder Western bzw. auf das Kriterium eines bereits beschriebenen c-Myc-Zielgens Wert gelegt.

Es wurden auf diese Weise rund 600 Hybridisierungssignale ausgewertet, die einfach bis mehrfach gefundene Klone enthielten. Davon wurden etwa 350 verschiedene Klone ausgewählt, die entweder mehrfach gefunden wurden, ein sehr deutlich differenzielles Signal ergaben oder nicht als falsch positiv in beiden Hybridisierungen (mit der (s+)-bzw. (s-)-Population) identifiziert wurden. Der hohe Anteil noch unbekannter EST-Klone ist hierbei auffällig. Bei den Mad1-reprimierten Zielgenkandidaten sind etwa 51,8%, bei den Mad1-aktivierten etwa 54,7% unbekannte ESTs.

Da für die unbekanntes EST-Klone noch kaum unabhängige Verifizierungen mittels Northern oder ChIP vorgenommen wurden, kann bei der dort erfolgenden Auswertung vornehmlich das Kriterium des c-Myc-Zielgens herangezogen werden. D.h., sofern die noch unbekanntes EST-Klone nicht tatsächlich mehrfach und auch parallel mit der Klonierungs-Dot-Blot-Strategie gefunden wurden, fallen sie aus der Menge der guten Zielgenkandidaten heraus. Daher wird die Diskussion zum bisherigen Zeitpunkt auf etwa 23 Zielgenkandidaten beschränkt (s. Tabelle 5. im Diskussionsteil). Unter 4.1.6.2. werden die potentiellen Kandidaten im Einzelnen diskutiert.

Fazit zur Identifizierung von Mad1-Zielgenen

Es wurde eine SSH-basierte Methode zur Erstellung einer Population von Mad1-Zielgen-Sequenzen etabliert. Zur Identifikation und ersten Verifizierung dieser Sequenzen wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, die Klonierungs-Dot-Blot-Strategie und der Unigene Screen. Die hier favorisierten Kandidaten-Zielgene werden im Diskussionsteil in einen funktionellen Zusammenhang zur Rolle von Mad1 in Apoptose und Proliferation gestellt. Es stehen nun noch weitere Verifizierungen mittels ChIP oder RT-PCR aus, sowie der Einsatz dieser Kandidaten-Zielgene in funktionelle Assays, wo z.B. mittels RNAi-Konstrukten geprüft werden könnte, inwieweit das jeweilige Kandidatengen für einen bestimmten Signalweg in der Regulation von Apoptose oder Proliferation durch Mad1 involviert ist.

3.3. Regulation des Mad1-HDAC-Komplexes durch Cyclin E/Cdk2

In den Abschnitten 3.1. und 3.2. wurde die durch Mad1-vermittelte Regulation untersucht; zum einen auf der Ebene der Apoptose im Speziellen, zum anderen auf der Ebene der Zielgene im Allgemeinen. Hier soll nun umgekehrt die Regulation der Mad1-Aktivität, die nach bisherigen Studien vom HDAC-Mediator-Komplex abhängt, untersucht werden. Aus vorhergegangenen Versuchen in der Arbeitsgruppe von Prof. Lüscher lagen erste Hinweise vor, daß Cyclin E/Cdk2 Mad1 inhibiert. So kann die Mikroinjektion von Plasmiden, die für Cyclin E/Cdk2 codieren, den durch Mad1 vermittelten Zellzyklusarrest am G1-S-Übergang aufheben. Auch im Reportergen-Assay führt die Koexpression von Cyclin E/Cdk2 und Mad1 zu einer Inhibierung der Mad1-abhängigen Repression des Reporterkonstruktes.

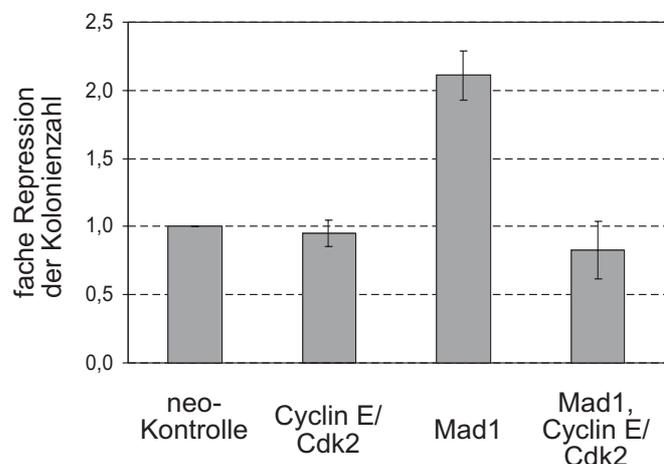
Hier soll nun zunächst diese Beobachtung bestätigt werden (s. 3.3.1.). Im Anschluss werden verschiedene Modelle zur Erklärung des Mechanismus der Regulation von Mad1 durch Cyclin E/Cdk2 untersucht und ein finaler Erklärungsansatz favorisiert (s. 3.3.2.). Schließlich wird ein dabei entdeckter neuer Interaktionspartner von HDAC in ersten Experimenten in seiner Bedeutung für den Mad1-HDAC-Komplex charakterisiert (s. 3.3.3.).

3.3.1. Cyclin E/Cdk2 hebt die Mad1-vermittelte Inhibierung der Proliferation auf

Um die Befunde aus dem Mikroinjektions- und Reportergen-Assays zu bestätigen, wurde ein Koloniebildungsassay durchgeführt (s. 1.2.7.).

Abb. 23.: Cyclin E/Cdk2 hebt die durch Mad1-vermittelte Inhibierung des Koloniewachstums auf.

Dargestellt ist die Repression der Koloniebildung. Sago-Zellen wurden mit den angegebenen Kombinationen von Plasmiden transfiziert und für etwa 3 Wochen mit G418 selektioniert. Zur Auswertung wurden die Kolonien gezählt.



Hierzu wurden Saos-Zellen mit den Plasmiden für Mad1, Cyclin E, Cdk2 und dem Resistenzgen für Neomycin in den in Abb. 23. angegebenen Kombinationen transfiziert. Unter G418-Selektion bildeten sich stabile Kolonien, deren Anzahl bei der Auswertung bestimmt wurde. Dargestellt ist die Repression der Koloniebildung, die mit einer Inhibierung der Proliferation korreliert. Tatsächlich führt die Expression des stabil integrierten Mad1 zu einer etwa zweifachen Repression der Koloniebildung, während die Koexpression von Cyclin E/Cdk2 diese Repression wieder aufheben kann. Damit liegen drei unabhängige Experimentssysteme vor, in denen Cyclin E/Cdk2 Mad1 inhibiert.

3.3.2. Generelle Modelle zur Inhibierung von Mad1 durch Cyclin E/Cdk2

Im nächsten Schritt sollte der Mechanismus der Cyclin E/Cdk2-abhängigen Inhibierung der Mad1-Funktion im Rahmen der Proliferation geklärt werden. Zunächst wurden drei Modelle aufgestellt, die die möglichen Beziehungen zwischen Cyclin E/Cdk2 und Mad1 darstellen (s. Abb. 24.).

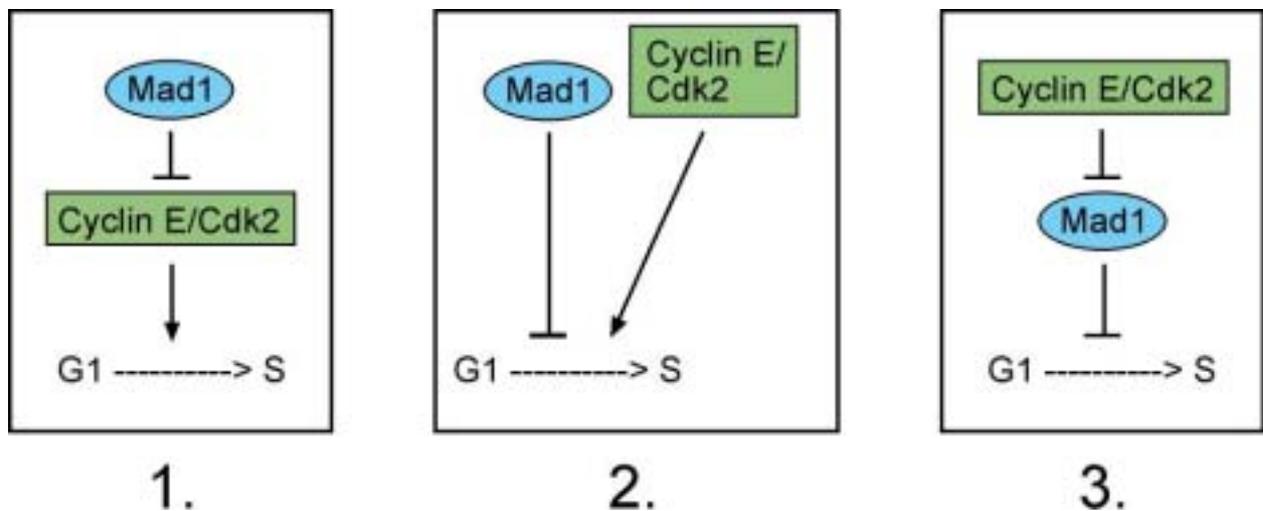


Abb. 24.: Mögliche Modelle zur Interaktion von Cyclin E/Cdk2 und Mad1.

In Modell 1 agiert Mad1 oberhalb von Cyclin E/Cdk2. Die Überexpression von Cyclin E/Cdk2 führt in diesem Modell zu einem dominant-positiven Effekt, so daß die Mad1-Funktion ausgeschaltet wird. Diese Modell würde fordern, daß die Expression von Mad1 einen

regulatorischen Einfluß auf Cyclin E/Cdk2 hat. Ich konnte aber schon in meiner Diplomarbeit zeigen, daß in den Tet-OFF-Mad1-Zellen weder die Expression noch die Kinaseaktivität von Cyclin E/Cdk2 in Abhängigkeit von der Mad1-Induktion reguliert ist. Dieses Modell scheidet also aus.

In Modell 2 wird angenommen, daß Mad1 und Cyclin E/Cdk2 unabhängig voneinander auf den G1-S-Übergang Einfluß nehmen. Wahrscheinlich würde hier dem Dosis-Effekt entsprechend das jeweils dominante Signal die finale Induktion des G1-S-Überganges regulieren. Allerdings sprechen folgende experimentelle Daten gegen dieses Modell. Zum einen konnte in den Vorarbeiten auch im Reporter-gen-Assay eine Inhibierung der Mad1-Funktion durch Cyclin E/Cdk2 gemessen werden. Hier werden die anderen Signalwege, über die Cyclin E/Cdk2 die S-Phase induzieren kann, getrennt von dem hier zu untersuchenden Signalweg, der Mad1 involviert. Damit spricht die Tatsache, daß Cyclin E/Cdk2 weiterhin Mad1 inhibieren kann, dafür, daß Cyclin E/Cdk2 und Mad1 nicht in getrennten Signalwegen liegen. Andererseits ist hier noch nicht auszuschließen, daß Cyclin E/Cdk2 über einen weiteren am Reporter-gen-promoter lokalisierten Faktor Einfluß nimmt und so die Transkription aktiviert. Ein zweites Argument gegen das 2. Modell ergibt sich aus den Versuchen zum 3. Modell.

Im Modell 3 liegt Cyclin E/Cdk2 im Signaltransduktionsweg oberhalb von Mad1. Hier wird also eine Regulation von Mad1 durch Cyclin E/Cdk2 postuliert, so daß die Inhibierung der transkriptionellen (z.B. Reporter-gen-Assay) bzw. funktionellen (z.B. G1-S-Übergang in der Mikroinjektion und im Koloniebildungs-Assay) Repression durch Mad1 zu einer transkriptionellen bzw. funktionellen Aktivierung führt.

Ein erster Beweis dafür, daß Mad1 und Cyclin E/Cdk2 diesem 3. Modell entsprechend in einem Signalweg liegen, ist die direkte Interaktion beider Proteine (s. 3.3.2.1.). Ein weiteres Indiz für dieses Modell ist die Regulation des Mad1-HDAC-Komplexes durch Cyclin E/Cdk2 (s. 3.3.2.2.).

3.3.2.1. Cyclin E bindet an HDAC1

Um eine mögliche direkte Interaktion von Cyclin E/Cdk2 mit dem Mad1-Mediator-Komplex zu untersuchen, wurden Cos7-Zellen mit den Plasmiden für beide Interaktionspartner transfiziert und die Interaktion in einer Koimmunpräzipitation (s. 1.5.7.) analysiert. Aus den Arbeiten zu meiner Diplomarbeit war bekannt, daß Cyclin E/Cdk2 nicht direkt an Mad1 bindet. Es wurde hier also ein anderes Protein aus dem Mad1-Mediator-Komplex auf eine Interaktion mit Cyclin E/Cdk2 überprüft.

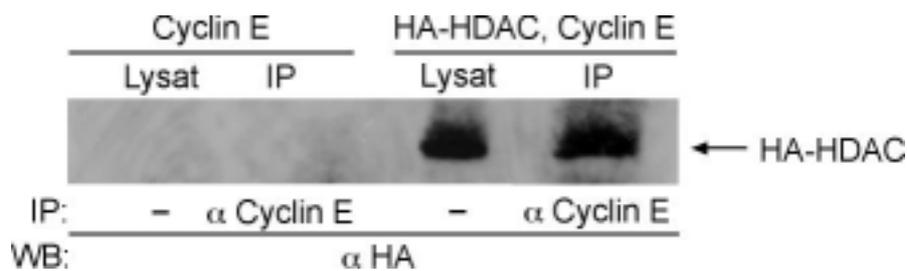


Abb. 25.: Mad1 bindet an Cyclin E/Cdk2.

Cos-7 Zellen wurden mit den Plasmiden, die für die angegebenen Proteine codieren, transfiziert. Nach der Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper gegen Cyclin E wurden die koimmunpräzipitierten Komplexe in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Western Blot-Membran wurde dann mit einem Antikörper gegen den HA-tag des HDAC1-Proteins analysiert.

Die Abb. 25. zeigt, daß HDAC1 mit Cyclin E/Cdk2 koimmunpräzipitiert. Da hier eine HA-getagte Version von HDAC1 verwendet wurde, kann das endogene HDAC1, das möglicherweise in der Kontrolle an Cyclin gebunden ist, nicht detektiert werden. Die Spezifität des Signals in der IP ergibt sich daraus, daß es auf der gleichen Höhe wie HA-HDAC1 im Lysat läuft und es in den Kontrollansätzen keine unspezifischen Signale gibt.

Diese in Transfektionsstudien dargestellte *in vivo* Bindung sollte *in vitro* überprüft werden, um die Bindungsdomäne im HDAC-Protein einzugrenzen. Hierzu wurde ein GST-Pulldown durchgeführt (1.5.9.), in dem das S³⁵-markierte Cyclin E an rekombinant hergestelltes GST-HDAC1 gebunden wurde. Die Kartierung der Bindungsdomäne erfolgte unter Einsatz von Deletionsmutanten von HDAC1 (T. Kouzarides).

Abb. 26. zeigt, daß trotz gleicher Mengen von GST-HDAC-Konstrukten unterschiedlich viel Cyclin E gebunden wurde. Hierbei kann allerdings keine explizite Bindungsdomäne angegeben werden. Vielmehr lassen sich zwei Bereiche eingrenzen, nämlich zwischen den Aminosäuren 101-150 und 382-482.

Es mag sein, daß in der nativen dreidimensionalen Faltung von HDAC1 diese Epitope beieinander liegen und zusammen die Interaktionsdomäne ausmachen; daher sind GST-Pull-Down-Analysen mit den kurzen, linearen Epitopen nur für eine ganz generelle Regionalisierung der Bindung geeignet.

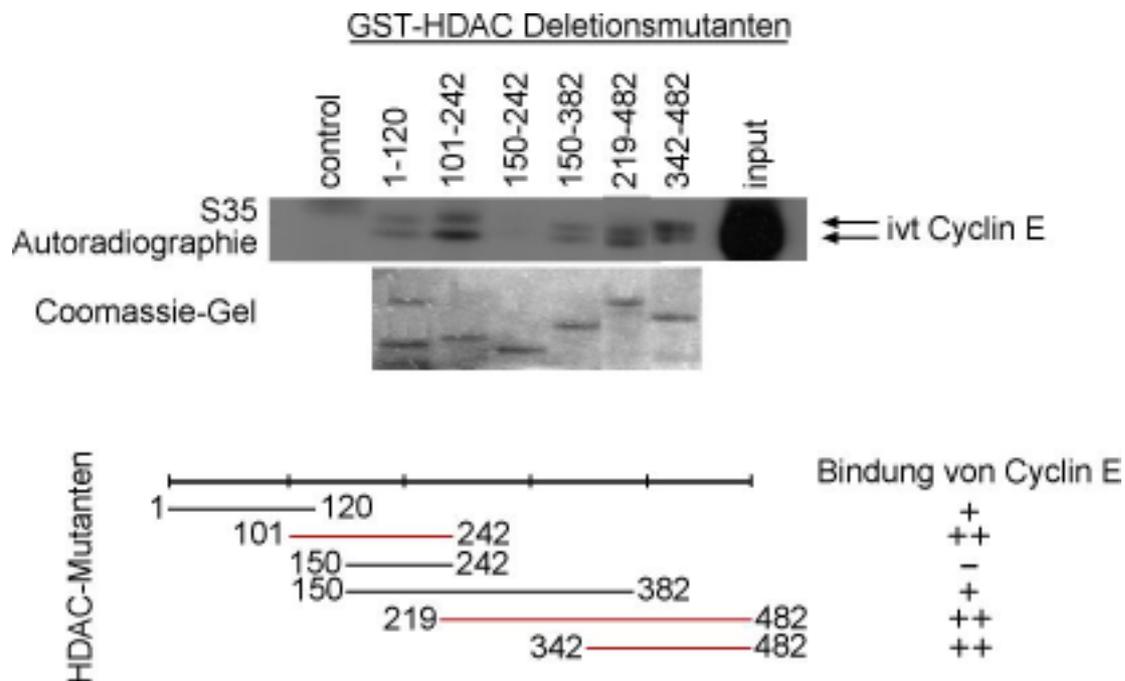


Abb. 26.: Kartierung der Cyclin E/Cdk2-Bindungsdomänen in HDAC1.

In einem GST-Pulldown wurde die Bindung von radioaktiv-markiertem Cyclin E an rekombinant exprimiertes GST-HDAC1 und seine Deletionsmutanten analysiert. Das Schema faßt die Bindungsstärken der einzelnen Mutanten zusammen. ivt= *in vitro* translatiert.

3.3.2.2. Cyclin E/Cdk2 hemmt die HDAC-Aktivität

Nachdem nun gezeigt wurde, daß Cyclin E/Cdk2 direkt an HDAC1 binden kann, sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Bindung von Cyclin E/Cdk2 auf die Aktivität von HDAC1 hat. Dazu wurden zweierlei HDAC-Assays durchgeführt (s. 1.5.10.).

Zum einen wurden Cos-7-Zellen mit den angegebenen Plasmiden transfiziert, wobei die potentielle Regulation durch Cyclin E/Cdk2 *in vivo* zu erfolgen hatte, und dann wurde der HDAC-Komplex immunpräzipitiert und dessen Aktivität *in vitro* gemessen (s. Abb. 27.). Zum anderen wurden die Zellen lediglich mit HDAC transfiziert, der *in vivo* gebildete HDAC-Komplex immunpräzipitiert und dann einem *in vitro* angeschlossenen Kinase-Assay mit rekombinant in Baculozellen hergestellten Cyclin E/Cdk2 unterzogen. Anschließend wurde dann

die HDAC-Aktivität gemessen (s. Abb. 28.). Die mögliche Modifikation des HDAC-Komplexes erfolgte also im ersten Fall *in vivo*, im zweiten Fall *in vitro*.

Abb. 27. zeigt die HDAC-Aktivitäten für den Fall, daß der Komplex *in vivo* unter Koexpression von verschiedenen Proteinen gebildet wurde. Im Vergleich zur Kontrolle (1. Balken von links), reduziert die Koexpression von Cyclin E/Cdk2 die HDAC-Aktivität um etwa 50% (2. Balken). Wird der Cyclin E/Cdk2-Inhibitor p27 koexprimiert, kann sogar eine 200%ige HDAC-Aktivität gemessen werden (3. Balken). Das mag sich dadurch erklären, daß nun auch endogenes Cyclin E/Cdk2 inhibiert wird, das in der Kontrolle (1. Balken) die Grundaktivität schon negativ beeinflußt hat, nun aber entfällt. Eine Koexpression von Cyclin E/Cdk2 und seinem Inhibitor p27 ergibt das gleiche Resultat (4. Balken). p27 wirkt offensichtlich dominant über Cyclin E/Cdk2. Interessant ist der 5. Ansatz. Hier wurde statt der Wildtyp Cdk2 eine dominant negative Mutante von Cdk2 eingesetzt. Diese kann die HDAC-Aktivität nicht mehr hemmen. Im 6. Ansatz wurde Cyclin D/Cdk4 eingesetzt, das keinen Einfluß auf die HDAC-Aktivität hat und damit die Spezifität der Regulation durch Cyclin E/Cdk2 belegt.

Aus diesem Experiment muß schlußgefolgert werden, daß Cyclin E/Cdk2 die HDAC-Aktivität hemmt, dies aber von der Kinaseaktivität von Cdk2 abhängig ist.

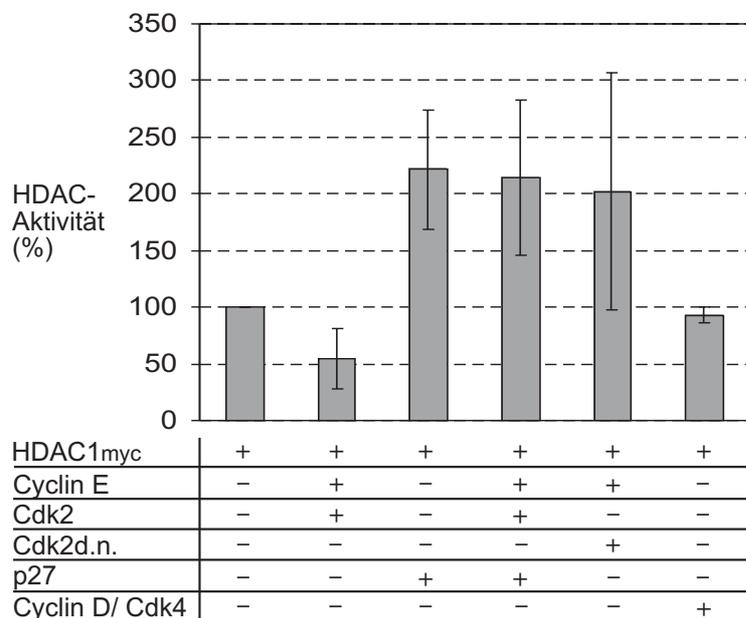


Abb. 27.: HDAC-Assay nach Koexpression.

Dargestellt ist die Zusammenfassung von mehreren HDAC-Assays, bei denen die in der Tabelle angeführten Proteine koexprimiert wurden. Der *in vivo* gebildete HDAC-Komplex wurde mit einem spezifischen myc-tag Antikörper immunpräzipitiert und in

in vitro mit markierten *core* Histonen inkubiert. Die hier erfolgte Deacetylierung wurde anhand der freigesetzten markierten Acetylgruppen gemessen. Die Standardabweichung beruht auf vier unabhängigen Experimenten.

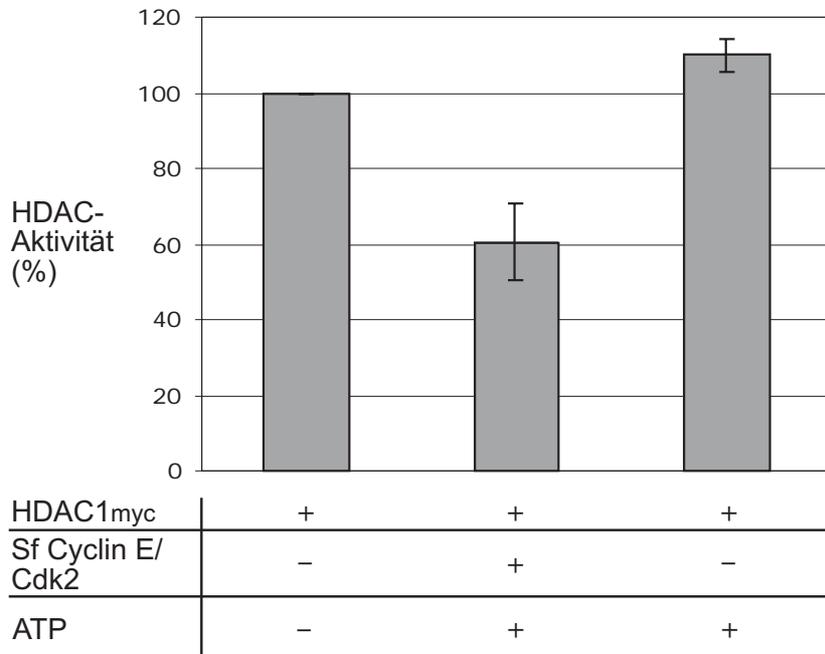


Abb. 28.: HDAC-Assay nach *in vitro* Kinase-Assay.

Dargestellt ist die Zusammenfassung mehrerer HDAC-Assays, bei denen der HDAC-Komplex immunpräzipitiert wurde, auf die vier Ansätze aufgeteilt und einem Kinase-Assay mit den angegebenen Kombinationen von Baculoextrakt und ATP unterzogen wurde. Die Standardabweichung beruht auf drei unabhängigen Experimenten. Sf Cyclin E/Cdk2= rekombinant in Baculozellen hergestelltes und über *tags* aufgereinigtes Cyclin E/Cdk2 (R. Lilischkis).

In der Variante zum HDAC-Assay, in der der Kinase-Assay *in vitro* an die Immunpräzipitation angeschlossen wurde, sind folgende Beobachtungen zu machen (s. Abb. 28.). Die HDAC-Aktivität des präzipitierten Komplexes nach Inkubation ohne Kinase wurde auf 100% gesetzt. Wurde dem Kinase-Assay Cyclin E/Cdk2 aus Baculozellen plus ATP zugesetzt, so konnte wiederum eine Inhibierung der HDAC-Aktivität gemessen werden (2. Balken). Die Negativkontrolle mit ATP ohne Enzym zeigt keinen Einfluß auf die HDAC-Aktivität. Aus beiden Varianten des HDAC-Assays kann somit zusammengefaßt werden, daß Cyclin E/Cdk2 die HDAC-Aktivität hemmt und dies die Kinasefunktion von Cdk2 erfordert.

3.3.2.3. Untersuchung der biochemischen Ursache der HDAC-Inhibierung

Aus den Resultaten von 3.3.2.2. wurde gefolgert, daß Cyclin E/Cdk2 die HDAC-Aktivität hemmt. Nun stellte sich die Frage, wie Cyclin E/Cdk2 die Inhibierung von HDAC bewirkt, welches also die biochemische Grundlage ist. Neben verschiedenen Möglichkeiten der Beeinflussung der Lokalisation, Halbwertszeit, Komplexintegrität, soll hier zuerst der naheliegende Mechanismus der Phosphorylierung untersucht werden.

Für Cyclin E/Cdk2 war bereits eine *consensus*-Sequenz der Phosphorylierungsstelle bekannt (S/T-P-X-K/R oder S/T-P). Es wurden nun die bis dahin bekannten Mad1-HDAC-Untereinheiten auf diese *consensus*-Sequenz geprüft. Mad1 und Max weisen keinerlei S/T-P Kombinationen auf. In den Proteinsequenzen von Sin3, SAP30, SAP18 und HDAC1 findet sich zwar nie die vollständige *consensus*-Sequenz, wie sie für die Rb-Proteinfamilie beschrieben wurde, jedoch die S/T-P Kombinationen. Neben der Rb-Familie wurde kürzlich auch hHR6A als Cyclin E/Cdk2-Substrat beschrieben. Die Phosphoakzeptorstelle in hHR6A entspricht auch nicht der *consensus*-Sequenz, sondern ist lediglich eine S-P Kombination [Sarcevic et al., 2002]. Da schon eine Bindung zwischen HDAC1 und Cyclin E gezeigt werden konnte (s. 3.3.2.1.), nicht aber zwischen Sin3 und Cyclin E (Daten nicht gezeigt), sollte zunächst HDAC1 als potentielles Phosphorylierungssubstrat von Cyclin E/Cdk2 untersucht werden.

Der Kinase-Assay (s. 1.5.11.) wurde zunächst mit überexprimierten, myc-getagtem HDAC1 durchgeführt, da das rekombinante GST-HDAC1 nur sehr schwer präpariert werden konnte. Dazu wurden Cos-7-Zellen mit wie in Abb. 29. angegeben mit HDAC1_{myc} bzw. Cdk2d.n. transfiziert. Nach einer Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen den Myc-tag wurde *in vitro* ein Kinase-Assay mit aus Baculozellen aufgereinigtem Cyclin E/Cdk2 angeschlossen. In Reihe 8 ist die Autophosphorylierung von Sf Cyclin E/Cdk2 zu sehen. Wurde HDAC1_{myc} exprimiert, ergibt sich eine schwache Bande für phosphoryliertes HDAC1_{myc} (Reihe 7). Diese Bande stammt tatsächlich von einer Cdk2-vermittelten Phosphorylierung, da die Lysate in 1% SDS gewonnen wurden und jegliche Bindung anderer endogener Kinasen wie z.B. CKII damit aufgehoben ist. Zudem zeigen die Kontrollen in Reihe 5 und 6, daß keine koimmunpräzipitierte Kinase mehr an HDAC1_{myc} gebunden ist, somit auch kein Signal zu sehen ist. In den Reihen 1-4 wurde das Lysat in Ripa erstellt, d.h. endogene Kinasen können unter diesen Bedingungen möglicherweise koimmunpräzipitiert werden, so auch die koexprimierte Cdk2d.n.. So ergibt sich neben der Autophosphorylierung in Reihe 4 auch eine Phosphorylierung von HDAC1_{myc}, die wahrscheinlich durch CKII vermittelt wurde oder durch das dynamische Gleichgewicht zwischen der koexprimierten Cdk2d.n. und der Cdk2 aus dem Baculoextrakt (Reihe 3).

Interessanterweise ergibt sich auch eine Phosphorylierung von HDAC1_{myc}, wenn kein Baculoextrakt zugesetzt wurde, d.h. hier ist die Phosphorylierung allein durch Nicht-Cdk2-Kinasen vermittelt (Reihe 1).

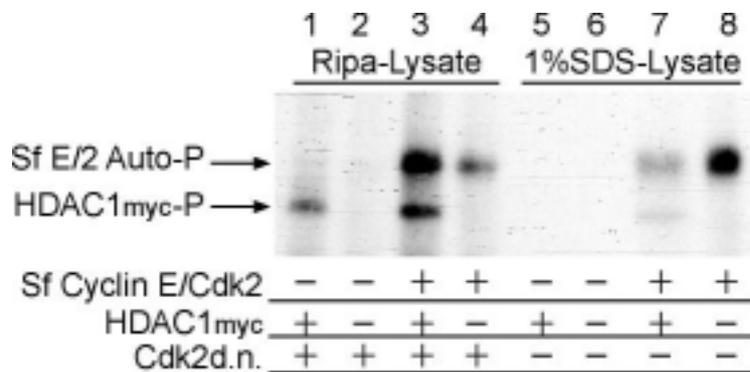


Abb. 29.: Kinase-Assay mit überexprimiertem HDAC1.

Cos-7-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Die Lysate wurden entweder in Ripa oder 1% SDS präpariert. Überexprimiertes HDAC1_{myc} wurde mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop immunpräzipitiert und *in vitro* mit Sf Cyclin E/Cdk2 phosphoryliert. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie.

Sf E/2 Auto-P= Autophosphorylierung von Sf Cyclin E/Cdk2;

HDAC1_{myc}-P= Phosphorylierung von HDAC1_{myc}.

Aus diesem Experiment wurde geschlossen, daß zumindest überexprimiertes HDAC1 *in vivo* durch verschiedene Kinasen und *in vitro* durch Sf Cyclin E/Cdk2 phosphoryliert werden kann.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und auch zu prüfen, ob es neben HDAC1 noch andere mögliche Substrate von Cyclin E/Cdk2 im HDAC-Komplex gibt, wurde folgender Versuch durchgeführt. GST-HDAC1 bzw. GST alleine wurde mit HL60-Zell-Lysat (5×10^8 Zellen) inkubiert und an GST-beads gebunden, gewaschen (s. 1.5.9.) und der auf diese Weise über GST-HDAC1 rekrutierte HDAC-Komplex aus endogenen HL-60-Proteinen in einen *in vitro* Kinase-Assay eingesetzt (s. 1.5.11.).

In der Abb. 30. ist zu sehen, daß in Reihe 3 bei 85 kDa eine Phosphorylierungssignal auftritt, das sehr wahrscheinlich dem GST-HDAC1 zuzuordnen ist. Außerdem ist hier bei 60 kDa eine Bande etwas stärker, die in Reihe 1 zum Hintergrund zählt. Dies könnte endogenes HDAC sein

(HDAC1 oder 2). Eine dritte Bande bei 30 kDa könnte aufgrund der Größe SAP30 sein. Diese drei Proteine sind spezifisch an GST-HDAC1 gebunden, da sie in Reihe 1 nicht an GST alleine binden. Zumindest die ersten beiden Banden sind außerdem spezifisch durch Sf Cyclin E/Cdk2 phosphoryliert, da in Reihe 4 keine Phosphorylierung durch eine endogen rekrutierte Kinase (wie CKII) erfolgt. Jedoch ist das dritte 30 kDa-Protein hier weiterhin eindeutig zu detektieren.

Dieses Experiment ist kritisch zu betrachten, da zum einen die eindeutige Identifizierung der drei Banden mittels Western oder Massenspektrometrie noch aussteht und zum anderen bedacht werden muß, daß möglicherweise nicht alle endogen im HDAC-Komplex vorliegenden Faktoren durch ein GST-getagtes HDAC1 *in vitro* rekrutiert werden können, ob hier also tatsächlich der funktionelle *in vivo* Komplex angereichert werden kann. So ist die Aussage, daß hier keine Phosphorylierung auf Höhe des Sin3-Proteins zu detektieren war, nicht endgültig. Das gleiche gilt für alle anderen Proteine des basalen Sin3-Komplexes.

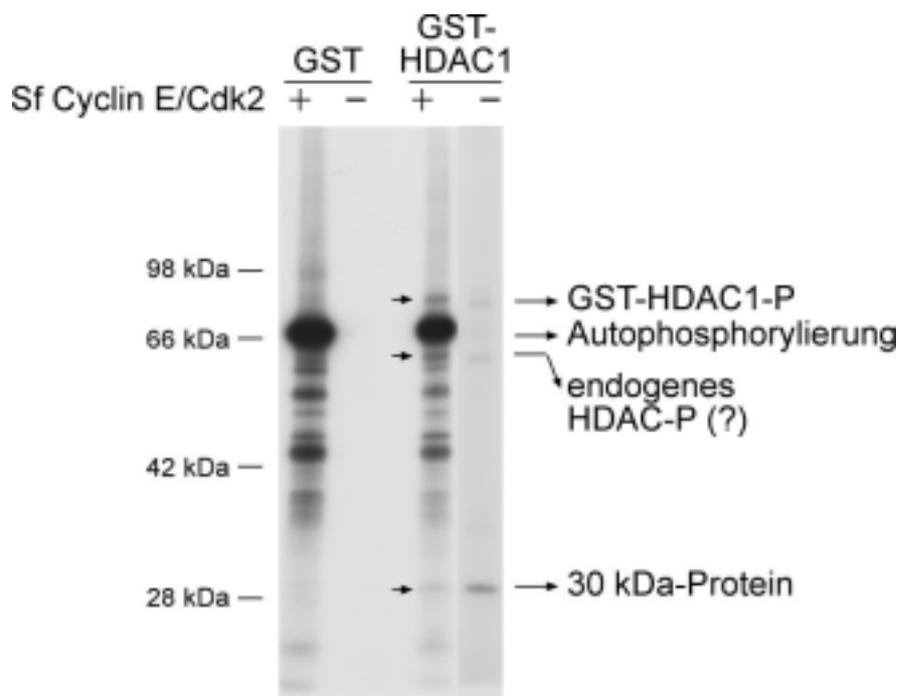


Abb. 30.: *In vitro* Kinase-Assay auf den durch GST-HDAC1 rekrutierten endogenen HDAC1-Komplex.

Dargestellt ist ein Pull-Down-Experiment mit endogenen durch GST-HDAC1 rekrutierten Proteinen aus HL-60 Lysat. Der aufgereinigte Komplex wurde in einen *in vitro* Kinase-Assay mit Sf Cyclin E/Cdk2 eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie. Die Pfeile markieren die drei phosphorylierten HDAC-Komplex-spezifischen Protein bei 85, 60 und 30kDa.

Es kann aber festgestellt werden, daß (zumindest unter den hier gewählten Bedingungen einer Koimmunpräzipitation endogener Interaktionspartner des HDAC-Komplexes) außer HDAC selber und dem 30 kDa-Protein kein anderes ein offensichtliches Substrat für Cyclin E/Cdk2 *in vitro* ist und daß außerdem weitere, endogene Kinasen assoziiert sind, die andere Komplexuntereinheiten wie das 30 kDa-Protein phosphorylieren können.

In der Diskussion unter 4.2.1. wird auf neu identifizierte Interaktionspartner des basalen Sin3-Komplexes hingewiesen (SAP45, SAP130, SAP180), deren Sequenzen *consensus sites* für Cyclin E/Cdk2 aufweisen. In dem eben beschriebenen Experiment gibt es jedoch keine spezifischen, phosphorylierten Banden bei 45, 130 oder 180 kDa. Dies mag allerdings wiederum ein Problem der vollständigen Koimmunpräzipitation endogener Faktoren mittels eines GST-Proteins sein.

3.3.2.4. Die Cyclin E/Cdk2-Aktivität korreliert *in vivo* mit der Inhibierung des Mad1-induzierten G1-Arrests

Da *in vitro* eine Phosphorylierung von HDAC1 durch Cyclin E/Cdk2 möglich war, sollte nun geprüft werden, ob diese *in vivo* von Relevanz ist. Dazu wurde zunächst untersucht, ob eine Korrelation beider Ereignisse vorliegt, d.h. ob der Zeitpunkt innerhalb des Zellzyklus, an dem eine Injektion von Mad1 keinen Zellzyklusarrest mehr induzieren kann, mit der Kinasesaktivität von Cyclin E/Cdk2 zusammenfällt. Aus Vorarbeiten war bekannt, daß mikroinjiziertes Mad1 noch bis zu 9h nach synchronisiertem Zellzyklusstart einen Zyklusarrest induzieren kann. Eine parallel durchgeführte BrdU-Färbung zeigte an, daß in den verwendeten NIH3T3-L1-Zellen genau hier der Beginn der S-Phase auszumachen ist.

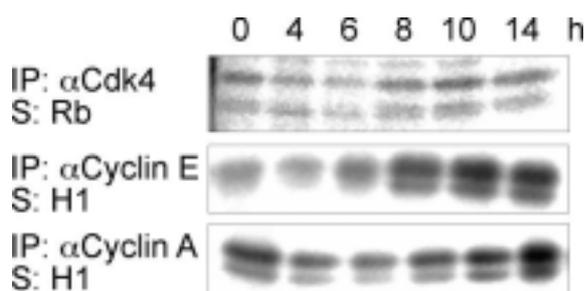


Abb. 31.: Kinase-Assay auf Cyclin/Cdk-Komplexe im Verlauf des Zellzyklus.

NIH3T3-L1-Zellen wurden synchronisiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Beginn des Zellzyklus wurden die Zellen geerntet, die entsprechenden Kinasekomplexe immunpräzipitiert und *in vitro* in einen Kinase-Assay mit den angegebenen Substraten eingesetzt.

IP= Immunpräzipitation; S= Substrat.

Um dies zu bestätigen und auch mit der Kinaseaktivität von Cyclin E/Cdk2 zu korrelieren, wurden hier von den synchronisierten NIH3T3-L1-Zellen (s. 1.2.5.) alle 2h nach Zellzyklusbeginn Frackelton-Lysate bzw. Cyclin D-Puffer-Lysate gewonnen. In einem *in vitro* Kinase-Assay wurde die Kinaseaktivität auf H1 bzw. Rb als Substrat bestimmt (s. 1.5.11.). Die Proteinmengen wurden im Bradford-Assay standardisiert.

Die Abb. 31. zeigt, daß die Cyclin A/Cdk2-Kinaseaktivität bei etwa 14 h maximal ist, während die Cyclin D/Cdk4- und Cyclin E/Cdk2-Aktivitäten zwischen 8 und 10 h maximal sind. Dieser Zeitpunkt fällt sehr gut zusammen mit dem oben erläuterten 9h-Wert für den Verlust des Mad1-Effektes. Damit korreliert also die Kinaseaktivität von Cyclin E/Cdk2 mit dem Mad1-Effekt auf Proliferation *in vivo*.

3.3.2.5. Kartierung der Cyclin E/Cdk2-Phosphorylierungsstelle in HDAC1

Nachdem nun *in vitro* die Phosphorylierung von HDAC1 durch Cyclin E/Cdk2 und die funktionelle *in vivo* Korrelation gegeben war, sollte die Phosphorylierungsstelle in HDAC1 genau kartiert werden. Dazu wurden zunächst die GST-Deletionsmutanten von T. Kouzarides in *in vitro* Kinase-Assays (s. 1.5.11.) auf eine Phosphorylierung untersucht (s. Abb. 32.) und in dem am besten phosphorylierten Fragment wurde dann mittels Phosphopeptid-Kartierung und Phosphoaminoacids-Bestimmung die Phosphoakzeptorstelle (s. 1.5.13.) identifiziert (s. Abb. 33.). Aus der Abb. 32. ist zu entnehmen, daß eigentlich nur das Fragment aa 342-482 signifikant durch Sf Cyclin E/Cdk2 zu phosphorylieren war. Zur Kontrolle wurden auch Cyclin A/Cdc2 und Cyclin B/Cdk2 als Kinasekomplexe eingesetzt, die aber aa 342-482 nicht phosphorylierten.

In dem GST-Fragment aa 342-482 wurde dann, wie in Abb. 33. gezeigt, die Anzahl der tryptischen Peptide, die durch Cyclin E/Cdk2 phosphoryliert werden können, auf eins eingeschränkt und Threonin und Tyrosin als Akzeptorstellen ausgeschlossen, Serin positiv bestätigt. Aus diesen Daten läßt sich sehr gut die potentielle Phosphoakzeptorstelle bestimmen. Folgende tryptische Fragmente von GST-HDAC1 (aa 342-482) enthalten zudem ein Serin:

LHISPSNMTNQNTNEYLEK

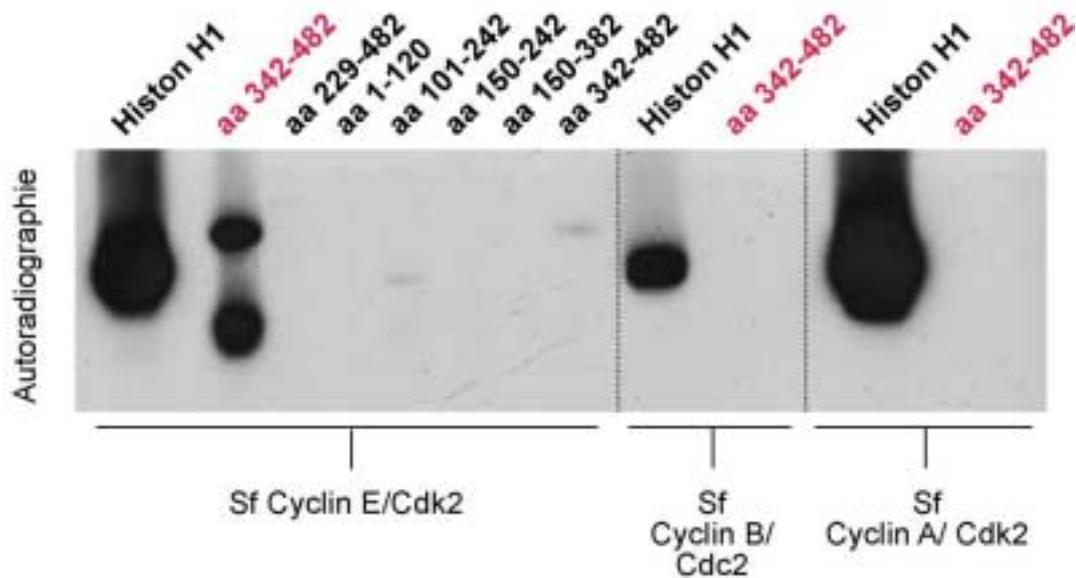
MLPHAPGVQMQAIPEDAIPEESGDEDEEDPDK

ISICSSDK

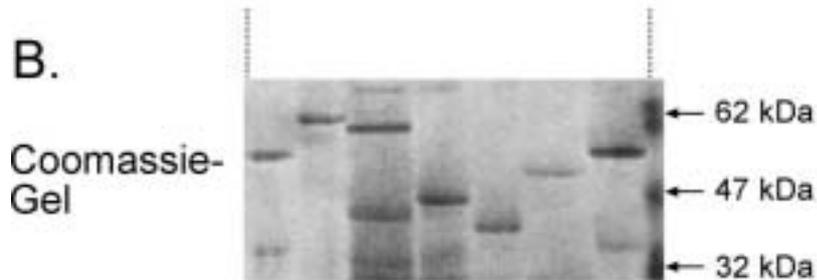
IACEEEFSDSDEEGEGGR

KNSSNFK

A.



B.



C.

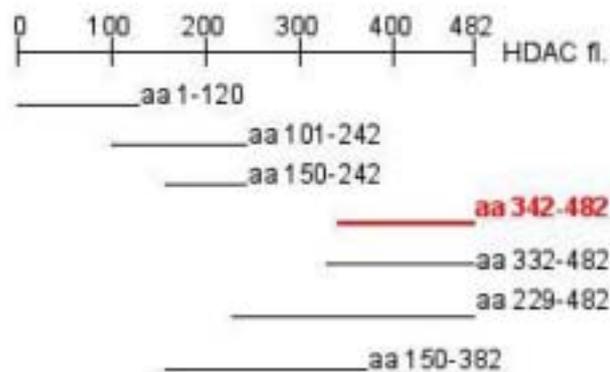


Abb. 32. : Kinase-Assay mit GST-HDAC1-Deletionsmutanten.

Deletionsmutanten von GST-HDAC1 wurden im *in vitro* Kinase-Assay mit den angegebenen Kinasekomplexen aus Baculozellen phosphoryliert (A.). Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie. Das spezifisch durch Sf Cyclin E/Cdk2 phosphorylierte Fragment aa 342-482 ist rot hervorgehoben. Zur Standardisierung der eingesetzten GST-Proteinmengen wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (B.). In C. ist schematische eine Übersicht über die Lokalisation des phosphorylierten Fragmentes aa 342-482 gezeigt.

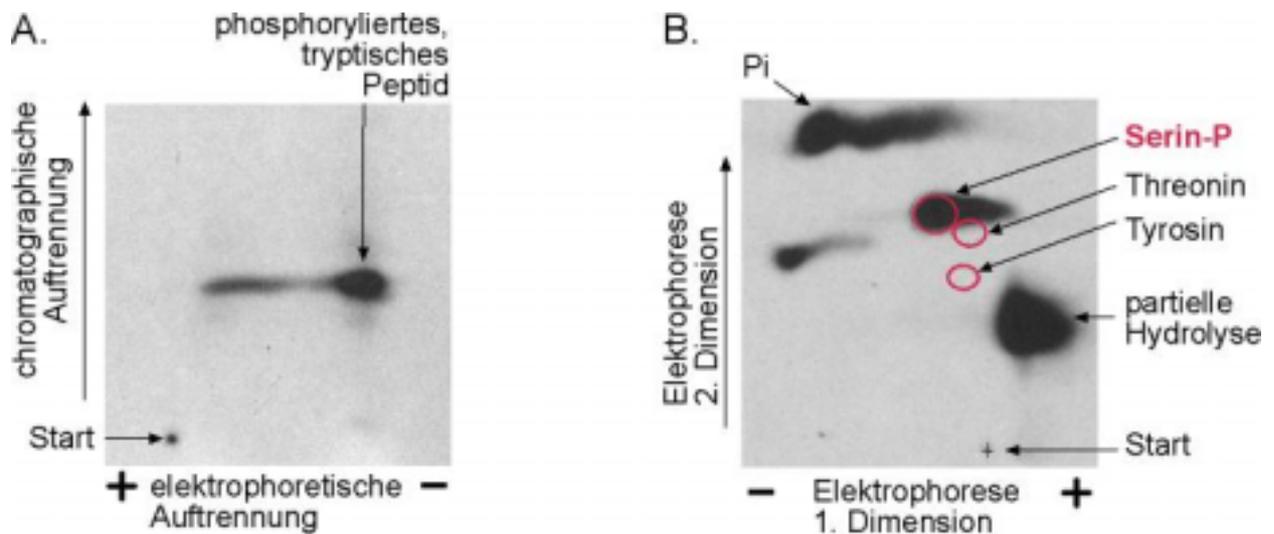


Abb. 33.: Phosphopeptid-Kartierung (A.) und Phosphoaminosäuren-Bestimmung (B.) von GST-HDAC1 (aa 342-482). Pi= nicht-inkorporiertes Phosphat.

Von diesen Fragmenten weist nur eines eine SP-Kombination auf; damit läßt sich die potentielle Phosphoakzeptorstelle auf das SPSNM-Motif bei aa346 eingrenzen.

Im nächsten Schritt wurde genau dieses SPSNM-Motif mutiert, um zu prüfen, ob dies tatsächlich die *in vitro* durch Cyclin E/Cdk2 phosphorylierte Stelle ist. Mittels *in vitro* Mutagenese (s. 1.4.4.) wurde das SP-Motif zu AP mutiert. Die Mutante wurde erneut in einen *in vitro* Kinase-Assay eingesetzt, zusammen mit 25µM Roscovitin, einem spezifischen Inhibitor von Cyclin E/Cdk2 (s. Abb. 34.).

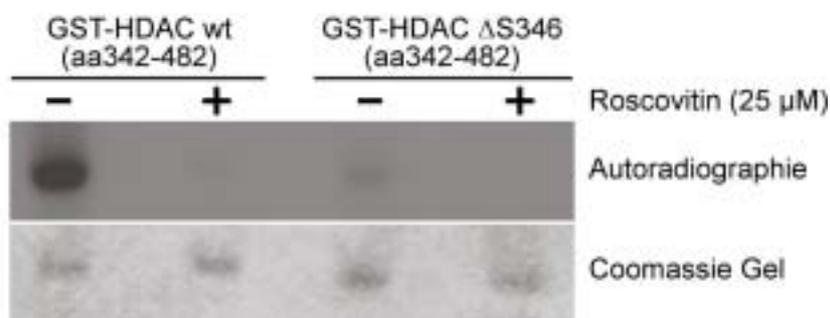


Abb. 34.: *In vitro* Kinase-Assay mit GST-HDAC1-wt (aa 342-382) und GST-HDAC1-ΔSP (aa 342-382). Gleiche Mengen der GST-Proteine (s. Coomassie-Gel) wurden in einem *in vitro* Kinase-Assay mit Sf Cyclin E/Cdk2 phosphoryliert. Zur Kontrolle der Spezifität der Phosphorylierung wurde ein spezifischer Cyclin E/Cdk2-Inhibitor, Roscovitin, eingesetzt.

Aus der Abb. 34. wird sehr deutlich, daß GST-HDAC1-wt (aa 342-382) weiterhin phosphoryliert wird, während die Mutation des SPSNM-Motifs zu APSNM in GST-HDAC1-DSP (aa 342-382) jegliche Phosphorylierung verhindert. Damit ist die *in vitro* Phosphorylierung von Ser346 durch Cyclin E/Cdk2 eindeutig belegt.

3.3.2.6. *In vivo* Relevanz der Phosphorylierung von Ser346 in HDAC1

Zur Prüfung der *in vivo* Relevanz der Phosphorylierung von Ser346 wurde außerdem die *full-length* HDAC1-Sequenz an Ser346 zu Alanin und Asparagin mutiert und zur Überprüfung sequenziert. Es wurde dann versucht, eine *in vivo* Phosphorylierung an dieser Stelle nachzuweisen. Dies konnte aber nicht gezeigt werden (s. 4.2.1.).

Außerdem wurde diese Mutante im HDAC-Aktivitäts-Assay mit dem Wildtyp verglichen (Daten nicht gezeigt). Hier konnte aber weiterhin ein Effekt von Cyclin E/Cdk2 gemessen werden. Drittens wurden diese Konstrukte wie unter 3.3.2.3 beschrieben in einem *in vitro* Kinase-Assay getestet (s. Abb. 35.).

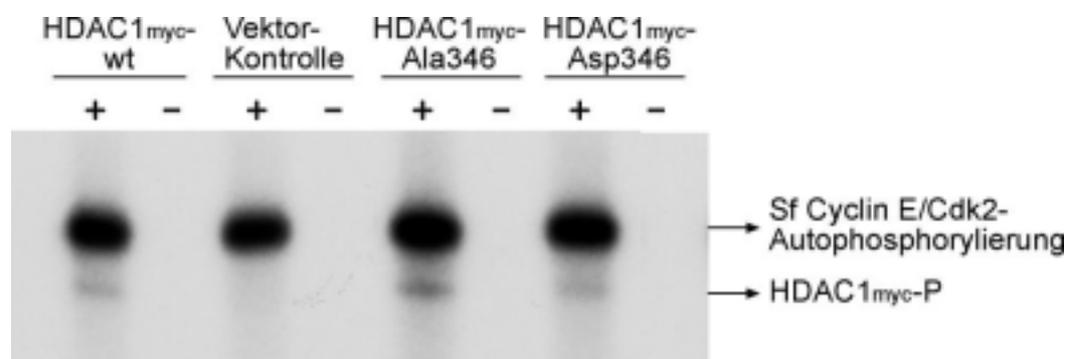


Abb. 35.: Kinase-Assay mit immunpräzipitiertem, überexprimiertem HDAC1_{myc}.

Die angegebenen Konstrukte des WT bzw. der Mutanten von Ser346 in HDAC1 wurden in Cos7-Zellen transfiziert, die Zellen in 1%SDS lysiert und das immunpräzipitierte HDAC1_{myc} in einen *in vitro* Kinase-Assay eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels Autoradiographie.

Deutlich ist zu sehen, daß weiterhin eine Phosphorylierung beider Mutanten stattfindet, die mit der des Wildtyps vergleichbar ist. Daraus muß gefolgert werden, daß es doch noch eine andere Phosphoakzeptorstelle im *full length* Protein gibt. Daß diese *in vitro* mittels der

Deletionsmutanten nicht identifiziert wurde, mag daran liegen, daß eine spezielle Faltung für die Interaktion mit Cyclin E/Cdk2 nötig ist, die *in vitro* mit den eher linearen GST-Fragmenten ineffizient ist, so daß die *in vivo* Stelle nicht phosphoryliert werden konnte.

Dadurch erklärt sich auch, warum in dem funktionellen Assay (s. 3.3.2.7. Abb. zur HDAC-Komplexintegrität) weiterhin ein Effekt von Cyclin E/Cdk2 auf die Ser346-Mutante von HDAC1 zu messen war.

Hieraus kann zum einen geschlossen werden, daß Ser346 *in vivo* nicht phosphoryliert wird bzw. die Phosphorylierung *in vivo* für die Aktivität von HDAC1 nicht relevant ist. Zum anderen kann vermutet werden, daß Cyclin E/Cdk2 ein anderes Substrat im HDAC-Komplex phosphoryliert; dies konnte noch nicht ausgeschlossen werden.

3.3.2.7. Untersuchung der funktionellen Ursache der HDAC-Inhibierung

Aus den bisherigen Resultaten konnte die Relevanz der Phosphorylierung von HDAC1 an Ser346 durch Cyclin E/Cdk2 *in vivo* zwar ausgeschlossen werden, nicht aber die Hypothese, daß Cyclin E/Cdk2 über Phosphorylierung anderer Stellen in HDAC1 oder sogar anderer Substrate im Komplex oder möglicherweise unabhängig von der Cdk2-Kinaseaktivität den Mad1-HDAC-Komplex beeinflusst. Aus den vorhergegangenen Arbeiten der Mikroinjektion und Reporteragen-Assays wurde allerdings eine Cdk2-Abhängigkeit geschlossen, da der Einsatz von Cdk2d.n., einer Kinase-inaktiven Form, den Mad1-Effekt nur unvollständig hemmen konnte (Daten nicht gezeigt).

Es sollte nun zunächst untersucht werden, welche Bedeutung denn eine mögliche Phosphorylierung bzw. zunächst die Bindung von Cyclin E/Cdk2 für den Mad1-HDAC-Komplex hat, d.h. was die funktionelle Ursache für die Inhibierung von HDAC1 ist. Hierfür kamen folgende Parameter in Betracht: Lokalisation, Halbwertszeit, Aktivität/Komplexintegrität.

Es wurde daher erstens untersucht, ob die Koexpression von Cyclin E/Cdk2 die Lokalisation von HDAC1 beeinflusst. Zweitens wurde gefragt, ob Cyclin E/Cdk2 die Halbwertszeit von HDAC1 verändert. Der dritte Punkt zur Regulation der HDAC1-Aktivität ist eng verbunden mit der Integrität des Komplexes an sich.

Es wurde schon unter 3.3.2.2. gezeigt, daß Cyclin E/Cdk2 die HDAC1-Aktivität inhibiert. Es war aber noch unklar, ob die Ursache dafür in einer rein enzymatischen Hemmung von HDAC1

liegt oder darin, daß der HDAC-Komplex seine Integrität verliert, wodurch die nicht Komplexgebundene HDAC1 enzymatisch inaktiv wäre.

Die Regulation der Lokalisation wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden 293-Zellen mit HDAC1_{myc} bzw. Cyclin E/Cdk2 kotransfiziert und einer Immunfärbung mit einem Cy³-markierten zweiten Antikörper unterzogen (s. 1.5.5.).

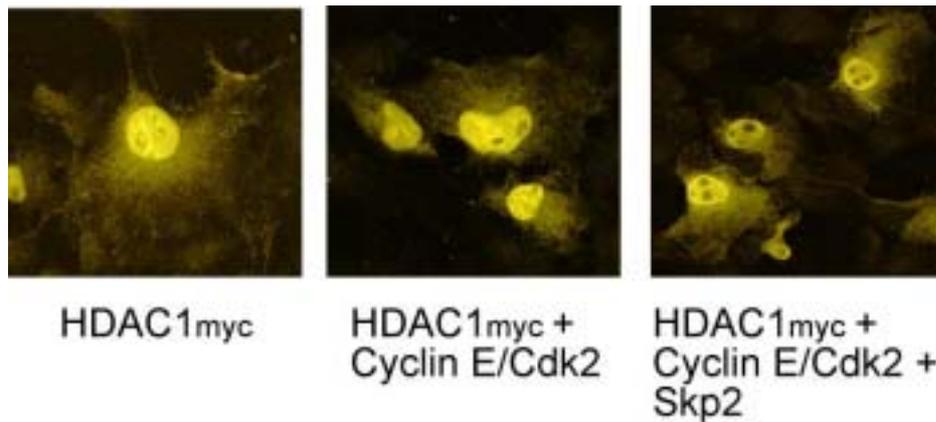


Abb. 36.: Nukleäre Lokalisation von HDAC1_{myc}.

293-Zellen wurden mit HDAC1_{myc} bzw. Cyclin E/Cdk2 bzw. Skp2 transfiziert. Am 3. Tag erfolgte die Detektion mit einem Antikörper gegen den Myc-tag (9E10, Maus) und dem Cy³-markierten 2. Antikörper im Fluoreszenzmikroskop.

Der Abb. 36. kann entnommen werden, daß überexprimiertes HDAC1_{myc} vornehmlich im Kern lokalisiert ist. Die Koexpression von Cyclin E/Cdk2 hatte darauf keinen Effekt. Es soll hier schon vorweggenommen werden, daß auch die Koexpression von Skp2, einem Adapterprotein des SCF-Komplexes der Ubiquitin-abhängigen Proteindegradation, keinen Einfluß auf die Lokalisation hatte und auch die Proteinmengen von HDAC1 unverändert blieben.

Als zweites sollte die Halbwertszeit von HDAC1 in Abhängigkeit von Cyclin E/Cdk2 untersucht werden. Phosphorylierung ist in der Literatur als bekanntes Signal für Proteindegradation durch den SCF-Komplex beschrieben. Daher sollte hier auch geprüft werden, ob HDAC1 an ein als Adapter fungierendes Protein dieses SCF-Komplexes bindet. Es wurde Skp2 gewählt, da dieses auch für andere Proteine des Zellzyklus wie p27 und Cyclin E als Adapter bekannt war und deren Degradation nach Phosphorylierung induziert. Es konnte hier nun gezeigt werden, daß überexprimiertes Skp2 mit HDAC1 koimmunpräzipitiert (s. Abb. 37.).

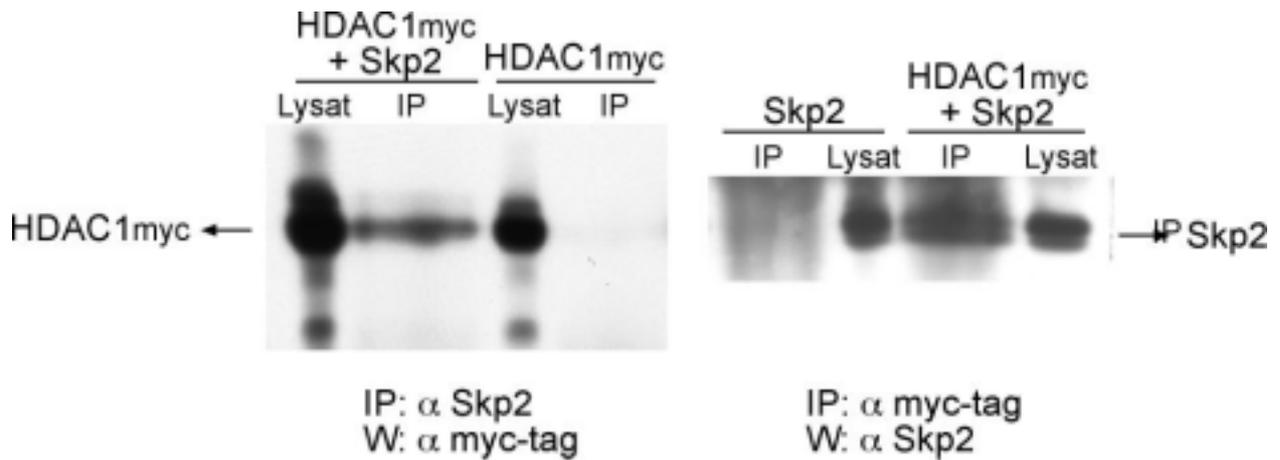


Abb. 37.: Koimmunpräzipitation von HDAC1 und Skp2.

293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfektiert. Die Immunpräzipitation (IP) wurde entweder mit dem spezifischen Skp2-Antikörper oder dem 9E19-Antikörper gegen den Myc-tag durchgeführt. Der Western Blot (W) wurde dann entsprechend mit dem Antikörper für das koimmunpräzipitierte Protein entwickelt.

Die Tatsache, daß HDAC1 tatsächlich mit einem Protein des SCF-Komplexes interagiert, führte zu der Hypothese, daß womöglich die Halbwertszeit von HDAC1 durch den SCF-Komplex reguliert wird. Es wurde daher ein Emetine-Experiment zur Bestimmung der Halbwertszeit von HDAC1 in Abhängigkeit von koexprimiertem Cyclin E/Cdk2 angeschlossen (s. 1.5.12.).

Hier war aber erstaunlicherweise keine Senkung der Halbwertszeit durch Cyclin E/Cdk2 festzustellen (s. Abb. 38.). Auch die Koexpression von Cdk2d.n. führte nicht zu einer Stabilisierung des Proteins. Umgekehrt wurde erwartet, daß die Koexpression von Skp2 zu einem beschleunigten Abbau von HDAC1wt führen würde. Stattdessen wurde aber eher eine Stabilisierung von HDAC1myc detektiert, die jedoch von der F-Box des Skp2-Proteins abhängig war. Über die F-Box interagiert Skp2 mit den anderen Komponenten des SCF-Komplexes.

In diesem Experiment ist zunächst nur eine Aussage über die Kinetik verschiedener Ansätze möglich. Die absolute Proteinexpression kann nicht quantitativ verglichen werden, da die Transfektionseffizienzen in den einzelnen Ansätzen nicht standardisiert wurden. Daher kann aus Abb. 38. nicht gefolgert werden, daß die Koexpression von Skp2 zu einer Minderung der Proteinexpression führt.



Abb. 38.: Halbwertszeit-Bestimmung von HDAC1.

293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfektiert. Die Inhibierung der Proteinsynthese erfolgte durch 100 μ M Emetine. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von Emetine wurden die Zellen geerntet und im Western Blot die jeweilige Proteinmenge detektiert. Als Positivkontrolle wurde c-Myc eingesetzt, das eine Halbwertszeit von etwa 20 min hat.

Abschließend ist festzuhalten, daß erstens die Inhibierung von HDAC1 durch Cyclin E/Cdk2 nicht über eine Herabsetzung der Halbwertszeit geschieht und zweitens wurde auf diesem Wege Skp2 als neuer Interaktionspartner von HDAC1 gefunden, der in diesem Zusammenhang aber eine neue Funktion aufzuweisen scheint (s. 3.3.3.).

Nachdem nun die Regulation der Lokalisation und der Halbwertszeit ausgeschlossen worden waren, sollte der Einfluß von Cyclin E/Cdk2 auf die Integrität des Mad1-HDAC-Komplexes untersucht werden. Dazu wurden die wesentlichen Komponenten des Komplexes überexprimiert und in Koimmunpräzipitationen die Bindung der einzelnen Proteinen aneinander in Abhängigkeit von koexprimiertem Cyclin E/Cdk2 getestet.

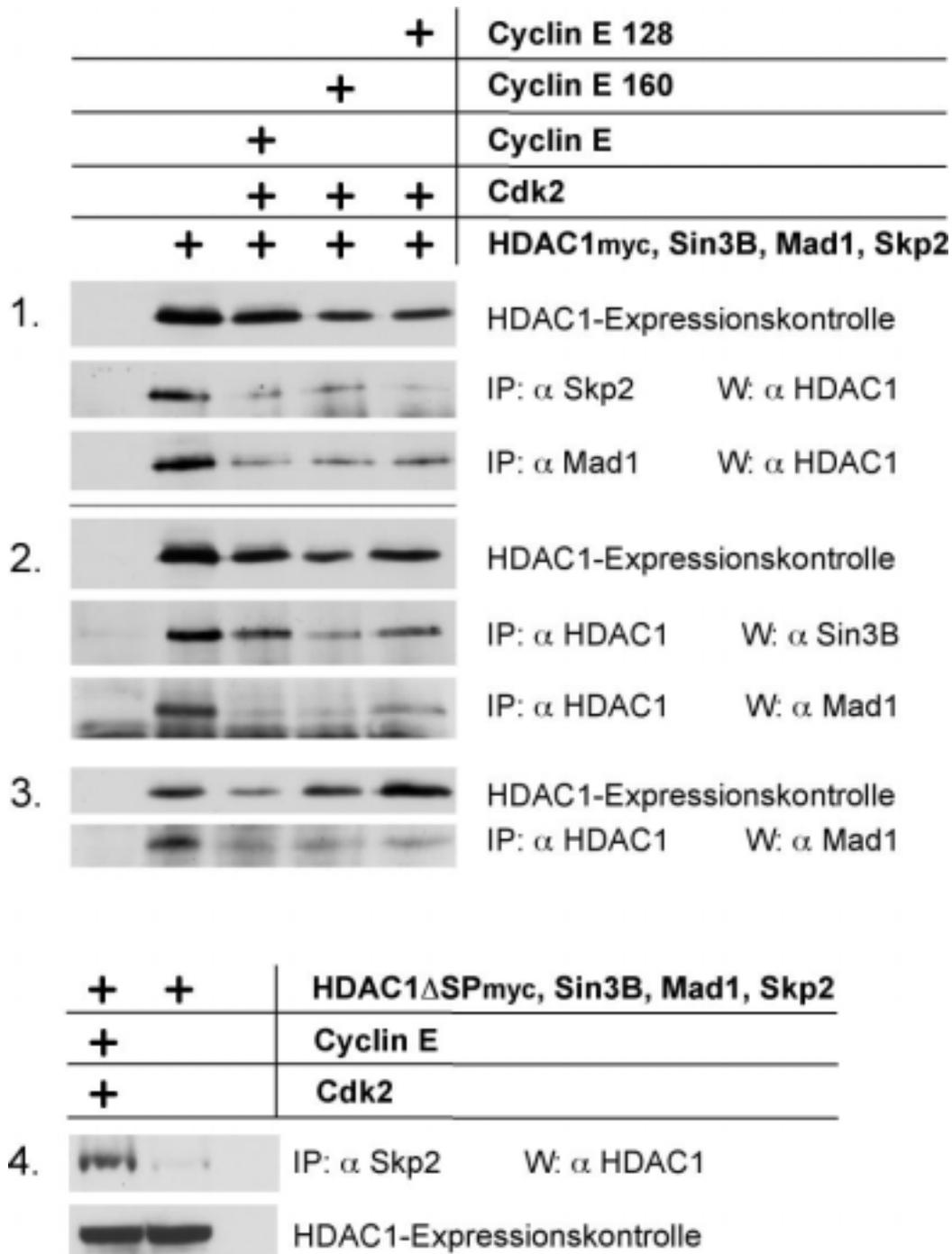


Abb. 39.: Integrität des Mad1-HDAC-Komplexes.

293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfektiert. Die Immunpräzipitation (IP) und Entwicklung des Western Blots (W) wurde mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle für die Spezifität der Bande dient die erste Reihe (Transfektion mit den leeren Vektoren). Es werden drei einzelne Experimente gezeigt; jeweils mit der Kontrolle gleicher HDAC1-Expression in den miteinander zu vergleichenden Lysaten.

Cyclin E 160= aa 1-160 + aa 221-395; Cyclin E 128= aa 1-128 + aa 216-395 (Möröy).

Abb. 39. zeigt, daß tatsächlich die Koexpression von Cyclin E/Cdk2 zu einem Verlust der Komplexintegrität führt, d.h. die Bindung von Mad1 an HDAC1 und von Skp2 an HDAC1 werden aufgehoben. Auch die Ser346-Mutante von HDAC1 zeigt einen Verlust der Bindung zu Skp2 an HDAC1, wenn Cyclin E/Cdk2 koexprimiert wurde. Dies ist wiederum ein Hinweis, daß die *in vitro* Phosphorylierungsstelle *in vivo* nicht von Relevanz zu sein scheint. Außerdem wurden zwei Cyclin E-Mutanten eingesetzt (s. 1.1.1.1.; Möröy). Cyclin E 160 und Cyclin E 128 weisen Deletionen der Cyclin-Box auf, so daß sie keine Kinaseaktivität (Cdk2) rekrutieren können. Dennoch führte die Koexpression dieser Cyclin E-Mutanten zu einem Verlust der Bindungen der einzelnen Komplexkomponenten zueinander.

Aus diesen Experimenten konnte erstens geschlossen werden, daß Cyclin E/Cdk2 die Komplexintegrität stört. Zweitens scheint dieser Effekt nicht vollständig auf der Kinaseaktivität von Cyclin E/Cdk2 zu beruhen. Das würde auch erklären, warum in den funktionellen Assays der Einsatz der Cdk2d.n. Mad1 nicht mehr vollständig hemmen konnte oder warum in den *in vitro* Kinase-Assays unter 3.3.2.2. allein die Bindung von Cyclin E/Cdk2 auszureichen schien.

Die Tatsache, daß Cyclin E/Cdk2 auch die Kinase-Aktivität von HDAC1 reduziert, mag somit als Folge des Bindungsverlustes von HDAC1 an andere (für seine Kinase-Aktivität essentielle) Komplexuntereinheiten gesehen werden. Es ist aber noch unklar, ob Cyclin E/Cdk2 nicht nach Verdrängen anderen Komplexuntereinheiten wie Mad1 und Skp2 noch an HDAC1 gebunden bleibt und das aktive Zentrum hemmt. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß Cyclin E/Cdk2 doch ein Substrat im Mad1-HDAC-Komplex phosphoryliert und dadurch das Auseinanderbrechen der Bindungen untereinander einleitet bzw. verstärkt.

3.3.3. Die Funktion von Skp2 im Mad1-HDAC-Komplex

Der unter 3.3.2.7. beschriebene neue Interaktionspartner von HDAC1, Skp2, sollte nun in seinem Bezug zum Mad1-HDAC-Komplex näher analysiert werden.

Zunächst wurde die Interaktion von Skp2 und HDAC1 in einem GST-Pulldown erneut bestärkt (s. 3.3.3.1.). Es wurden dann Assays zur Analyse der biologischen Bedeutung dieser Interaktion durchgeführt (s. 3.3.3.2.).

3.3.3.1. Interaktion von Skp2 und HDAC1

In Abb. 37. wurde schon gezeigt, daß überexprimiertes Skp2 und HDAC1 koimmunpräzipitieren. Hier wurde ein GST-Pulldown-Assay (s. 1.5.9.) mit *in vitro* translatiertem Skp2 und einer F-Box-Deletionsmutante durchgeführt, um dies noch einmal zu bestätigen und die Bindungsdomänen einzugrenzen.

Die Abb. 40. zeigt, daß die Bindung von Skp2 an HDAC1 spezifisch ist, sich auf die Region aa 120-219 von HDAC1 eingrenzen läßt und nicht von der F-Box des Skp2-Proteins abhängig ist.

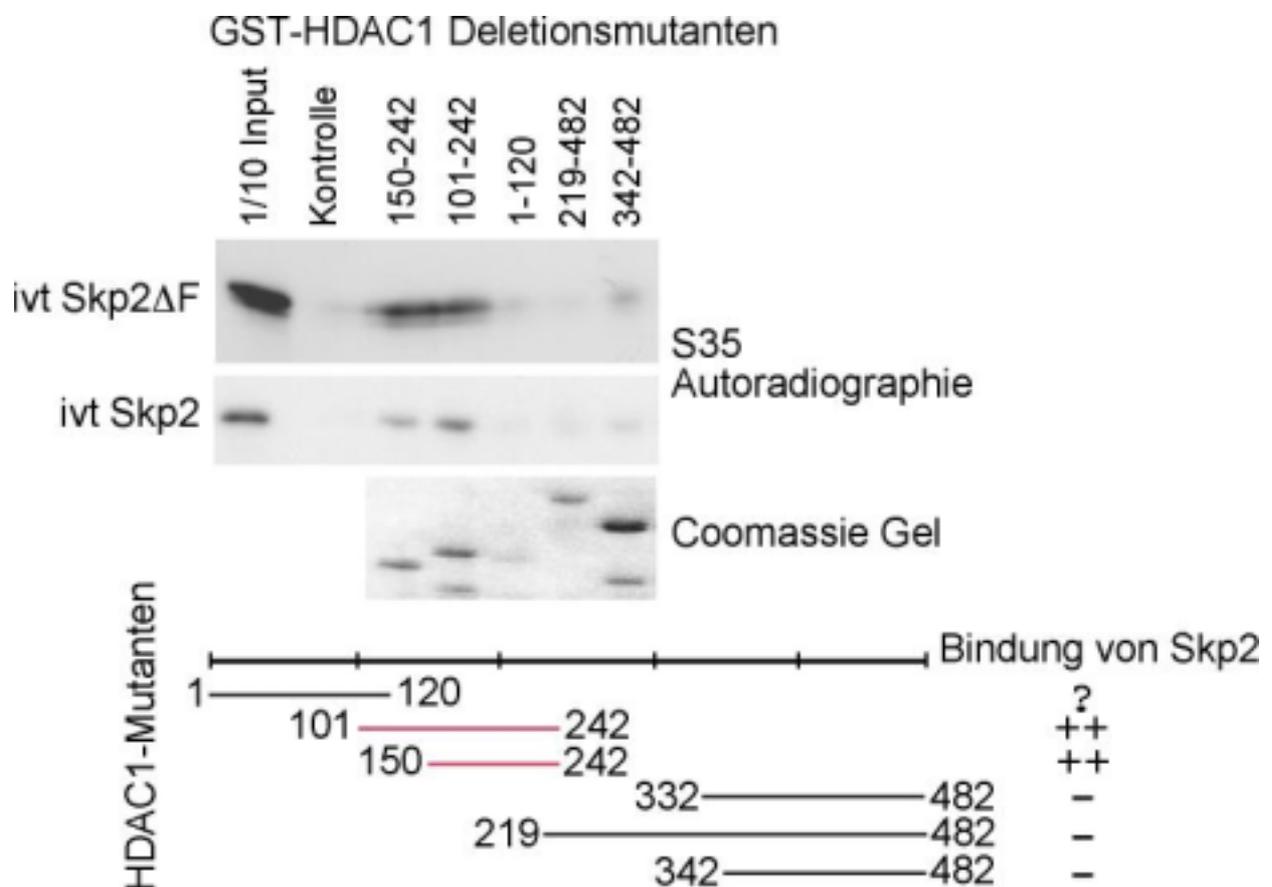


Abb. 40.: Kartierung der Skp2-Bindungsdomäne in HDAC1.

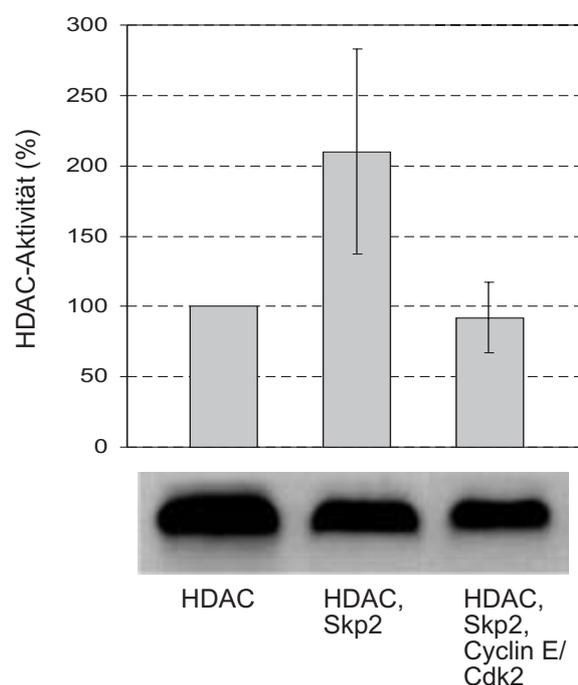
In einem GST-Pulldown wurde die Bindung von radioaktiv-markiertem Skp2 bzw. Skp2 Δ F an rekombinant exprimiertes GST-HDAC1 und seine Deletionsmutanten analysiert. Das Schema faßt die Bindungsstärken der einzelnen Mutanten zusammen. ivt= *in vitro* translatiert; ?= geringere Menge an GST-Protein eingesetzt.

3.3.3.2 Biologische Bedeutung der Interaktion von Skp2 und HDAC1

Die Tatsache, daß die Bindung von Skp2 an HDAC1 nicht zu seiner Degradation über den SCF-Komplex führt, war unerwartet. Daher sollten andere mögliche Bedeutungen dieser Interaktion für HDAC1 skizziert werden. Es wurden daher erstens die HDAC1-Aktivität, zweitens die Zellzyklus-inhibierende Wirkung von Mad1, die offensichtlich über den Mad1-HDAC-Komplex vermittelt wird, und drittens die Promoterbesetzung durch HDAC1, Mad und Skp2 auf eine Korrelation getestet.

Abb. 41.: HDAC1-Aktivitätsassay mit Skp2.

293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukte transfektiert. Aus den Frackelton-Lysaten wurden die HDAC-Komplexe immunpräzipitiert und die Aktivitäten unter Verwendung von Tritium-markierten, acetylierten Histonen als Substrat gemessen. Der untere Teil zeigt die Expression von HDAC1 im Western Blot.



Zunächst sollte also die HDAC1-Aktivität in Abhängigkeit von koexprimiertem Skp2 bestimmt werden. In Abb. 41. zeigt der HDAC-Assay (s. 1.5.10.) eine gering, aber signifikant stimulierte HDAC1-Aktivität bei Koexpression von Skp2 (s. 2. Säule). Um hier einen reinen Expressionseffekt auszuschließen, ist parallel die Expression von HDAC1 in den Aliquots der einzelnen Ansätze gezeigt. In diesen HDAC-Assays hat Cyclin E/Cdk2 kaum einen hemmenden Effekt auf die HDAC1-Aktivität (s. 3.Säule). Das mag daran liegen, daß durch die Koexpression von Skp2 der HDAC-Komplex weniger sensitiv gegenüber Cyclin E/Cdk2 ist, wie es auch schon der Halbwertszeitassay vermuten ließ (s. 3.3.2.7.). Die Koexpression von Cyclin E/Cdk2 kann zwar die zusätzliche HDAC1-Aktivierung durch Skp2 hemmen, wirkt aber nicht vollständig dominant, da die HDAC1-Aktivität nicht mehr auf die 60% minimiert wird, die in Abb. 27. und 28. gemessen wurden.

Neben der Aktivität von HDAC1 an sich wurde auch die funktionelle Aktivität des HDAC-Komplex-rekrutierenden Mad1 im Kolonie-Bildungsassay (s. 1.2.7.) bestimmt.



Abb. 42.: Kolonie-Bildungsassay.

RK13- bzw. Saos-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfektiert und die stabilen Klone über 2-3 Wochen mit G418 selektioniert. Nach Anfärben mit Methylenblau wurden alle Kolonien über einer kritischen Größe gezählt und gegen die Kontrolle normalisiert. Dargestellt ist die x-fache Repression.

Hierzu ist der Abb. 42. zu entnehmen, daß Mad1, wie schon unter 3.3.1. gezeigt, zu einer etwa zweifachen Inhibierung der Koloniebildung führt, während die Koexpression von Skp2 zu einer synergistischen Zunahme der Repression führt. Der Synergismus mag erstens darauf beruhen, daß Skp2 zumindest in RK13-Zellen unabhängig von Mad1 bei Überexpression zum G1-Arrest führt und zweitens darauf, daß die Bindung von Skp2 an HDAC1 dieses, wie zuvor gezeigt, in seiner Aktivität stimuliert. Würde Skp2 allein auf einem Mad1-unabhängigen Wege zur Inhibierung der Koloniebildung führen, hätte schon die Expression von Skp2 allein zu einer vergleichbar starken Repression führen müssen; dies ist aber nicht der Fall.

Dies ist somit ein zweites Experiment, das die Kooperativität von Skp2 und HDAC1 belegt.

In einem dritten Experiment wurde mittels einer ChIP-Analyse (s. 1.4.5.) die Promoterbesetzung von Cyclin D2 und eIF2 α untersucht. Cyclin D2 ist bereits als Mad1-

Zielgen beschrieben, eIF2 α zumindest als c-Myc-Zielgen und in der vorliegenden Arbeit ist die gamma Untereinheit des eIF-Trimers als Mad1-Zielgen identifiziert worden (s. Tabelle 5. unter 4.1.4.).

Die Abb. 43. zeigt, daß in beiden Zelltypen die Induktion der Differenzierung bzw. von Mad1 selber mit einer Zunahme der Bindung von Mad1 an beide getesteten Promotoren einhergeht. In den HL-60 Zellen ist Mad1 allerdings fast gleich stark gebunden; hier ändert sich eher die Besetzung durch c-Myc. Das mag sich dadurch erklären, daß erst später festgestellt wurde, daß die Mad1-Induktion bei etwa 8h TPA-Behandlung maximal ist und danach wieder abnimmt; hier wurde über Nacht induziert. Daher lassen sich auch die potentiell Mad1-rekrutierten Faktoren wie HDAC1 und Skp2 in diesem Versuchsansatz nicht diskutieren. Diese ChIP muß mit optimal induzierten Zellen wiederholt werden.

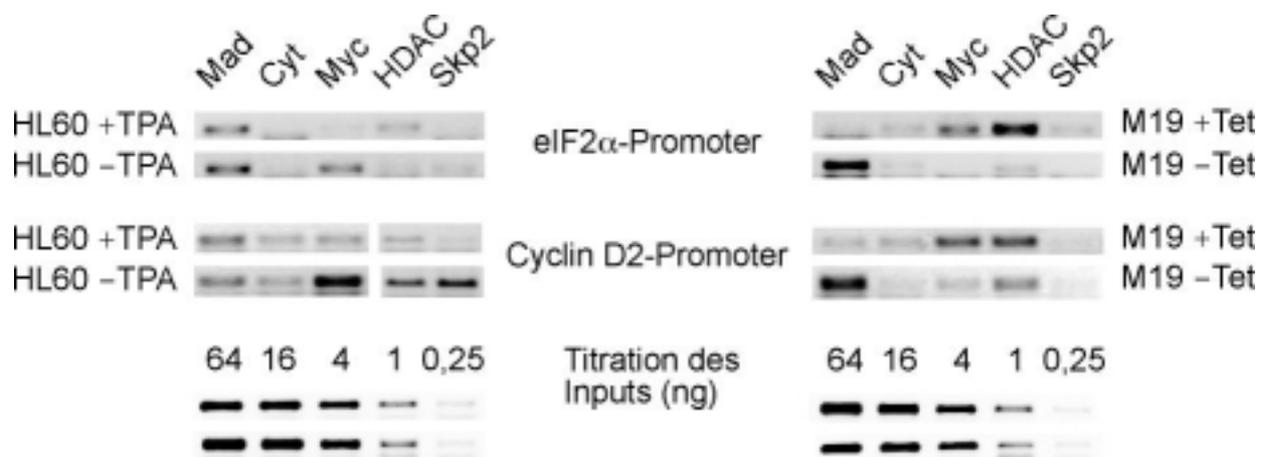


Abb. 43.: ChIP-Analyse des Cyclin D2 und eIF2 α -Promoters.

HL60 bzw. Tet-Off-Mad1-Zellen wurden wie angegeben mit TPA zur Differenzierung stimuliert bzw. durch Tet-Entzug wurde Mad1 induziert. Auf die Zell-Lysate wurden Immunpräzipitationen (IPs) für Mad1, Cytochrom c (Negativkontrolle), c-Myc, HDAC1 und Skp2 durchgeführt. In einer PCR wurde dann die Koimmunpräzipitation des Cyclin D2- bzw. eIF2 α -Promoters in diesen IPs getestet. Außerdem wurde zur Normalisierung der Signalstärken eine Titration des DNA-Inputs vorgenommen.

In dem Tet-OFF-Zellklon M19 ist dagegen auf beiden Promotoren eine eindeutige Rekrutierung von Mad1 nach Induktion zu sehen. Auch die c-Myc-Bindung fällt wie erwartet aus; jeweils in den nicht-induzierten Zellen. In diesem System korreliert auch die Bindung von HDAC1 wie erwartet eindeutig mit der von Mad1, wodurch sich auch das Ausbleiben

eindeutiger Signale für HDAC1 im HL-60-System erklärt. Eine Skp2-Bindung ist allerdings nicht zu detektieren. Hier sind daher noch einige Fragen zu klären, wie z.B., ob dieser Zellklon überhaupt Skp2 exprimiert, ob der Antikörper in diesem Versuchsansatz verlässlich funktioniert und ob die Formaldehyd-Behandlung ausreichend war, um alle indirekt rekrutierten Faktoren an die DNA zu fixieren.

Die ChIP-Experimente müssen somit noch weiter optimiert werden, um Aufschluß über die mögliche Rekrutierung von Skp2 durch den Mad1-HDAC-Komplex an die DNA zu geben.

Zusammenfassend soll festgehalten, daß Skp2 ein neuer Bindungspartner von HDAC1 ist, aber nicht zur Degradierung von HDAC1 beiträgt, sondern umgekehrt eher stabilisiert, seine Enzymaktivität stimuliert und möglicherweise auch über HDAC1 an Chromatin rekrutiert wird. Daß diese HDAC-Komplexe auch solche sind, die Mad1 enthalten, wird dadurch nahegelegt, daß im Koloniebildungsassay eine synergistische Steigerung des Mad1-Effektes durch Skp2 Koexpression zu messen war. Diese Experimente sollen als erste Hinweise gelten; weitere Studien stehen noch aus.

Fazit zur Regulation des Mad1-HDAC-Komplexes durch Cyclin E/Cdk2

In diesem Abschnitt wurden zum einen die Vorarbeiten bestätigt, daß Cyclin E/Cdk2 Mad1 in seiner Funktion als Inhibitor des G1-S-Überganges hemmen kann. Zum anderen wurde hier der Mechanismus der Cyclin E/Cdk2-vermittelten Hemmung aufgeklärt. Hierzu konnte ausgeschlossen werden, daß Cyclin E/Cdk2 die Halbwertszeit oder Lokalisation des Mad1-HDAC-Komplexes reguliert; vielmehr stört Cyclin E/Cdk2 die Mad1-HDAC-Komplex-Integrität. Es wurde außerdem eine *in vitro* Phosphorylierungsstelle in HDAC1 bei aa346 kartiert, die jedoch *in vivo* nicht von Relevanz für den Cyclin E/Cdk2-Effekt zu sein scheint. Der Einsatz von Cyclin-Box-Mutanten sowie von Cdk2d.n. weisen darauf hin, daß der Cyclin E/Cdk2-Effekt zumindest teilweise Kinase-abhängig ist; hierbei ist noch unklar, welches das Cyclin E/Cdk2-Substrat im Mad1-HDAC-Komplex ist.

4. Diskussion

4.1. Identifizierung von Mad1-Zielgenen

In diesem Abschnitt der vorliegenden Dissertation sollten Mad1-Zielgene, speziell mit Hinblick auf die Inhibierung von Apoptose, identifiziert werden. Dazu wurde sich an das PCR-Select System, eine Optimierung der *suppression subtractive hybridization* (SSH), angelehnt. Die Gründe für die Auswahl dieser Methode zur Analyse differenzieller Expression von Genen wurden ausführlich in der Einleitung Abschnitt 2.1.1.4. besprochen. Als Quelle der differenziellen mRNA-Populationen wurde das induzierbare Tet-OFF-Mad1-System gewählt. Als Methoden des *rescreening* bzw. der Verifizierung wurde der Reverse Dot Blot, Northern Blot und die CHIP verwendet.

Hier soll zunächst die Wahl des Tet-OFF-Mad1-Systems für den Einsatz im PCR-Select System kritisch diskutiert werden (Abschnitt 4.1.1.).

Im Folgenden werden dann die Effizienz und Beweiskraft des PCR-Select Systems in Theorie und Praxis und speziell in Kombination mit dem Tet-OFF-Mad1-System erörtert (Abschnitt 4.1.2.).

Im dritten Abschnitt werden die im PCR-Select Verfahren identifizierten Zielgen-Kandidaten diskutiert, speziell ihr qualitativer Status vor dem Hintergrund einer ersten Verifizierung im Dot Blot und einer bereits publizierten Funktion als Myc-Zielgen (Abschnitt 4.1.3.).

Es wird dann der parallele Ansatz der Identifizierung und Verifizierung der gefundenen Kandidaten mittels RZPD-Unigene Filter dargestellt und verglichen mit dem Dot Blot-Verfahren (Abschnitt 4.1.4.).

Im fünften Abschnitt wird ein Ausblick auf noch anstehende Verifizierungsschritte gegeben bzw. die damit zusammenhängenden Schwierigkeiten diskutiert (Abschnitt 4.1.5.).

Und im letzten Abschnitt sollen schließlich die sichersten Mad1-Zielgen-Kandidaten vor dem Hintergrund ihrer *in vivo* Funktion mit den Daten zur Funktion von Mad1 in der Apoptose in einen Zusammenhang gebracht werden (Abschnitt 4.1.6.).

4.1.1. Kritische Erörterungen einer Verknüpfung zwischen der Tet-Off-Zelllinie und dem PCR-Select-System zur Identifizierung von Mad1-Zielgenen

Das Tet-Off-Mad1-Zellsystem wurde in der Doktorarbeit von Stefanie Hilfenhaus generiert. Hier findet sich auch eine kritische Diskussion der Mad1-Zelllinie. Es wurden im folgenden einige biologische Assays mit diesen Zellen durchgeführt, um die Funktion von Mad1 in Proliferation und Apoptose zu untersuchen (s. meine Diplomarbeit). Es muß betont werden, daß dieses Zellsystem einige Nachteile aufweist, die speziell in Verbindung mit der PCR-Select-Methode zu einigen grundsätzlichen Problemen bei einer Identifizierung von Mad1-Zielgenen führen.

Es soll hier zunächst darauf hingewiesen werden, daß es in mehreren verschiedenen Zelllinien unmöglich war, stabile, induzierbare Mad1-Zellen zu generieren. Womöglich war die "undichte", basale Expression des Mad1-Konstruktes in diesen Zellen ausreichend, um positive Klone, die dem negativen Selektionsdruck der Mad1-Expression unterliegen, zu verlieren. Die Tatsache, daß schließlich doch in U2OS solche stabilen Klone generiert werden konnten, deutet eher darauf hin, daß diese Zellen möglicherweise generell oder unter der Selektion begünstigte Mutationen in Mad1-Signalwegen aufweisen, die diese Mad1-Klone etwas weniger sensitive gegenüber der basalen, exogenen Mad1-Expression machen.

Aus diesem Blickwinkel würde sich auch erklären, warum diese Klone in den früheren Arbeiten im Allgemeinen einen relativ schwachen Effekt von Mad1 auf Proliferation und Apoptose zeigten. Es kann also nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, daß die stabilen Mad1-Klone, die hier für die Identifizierung von Mad1-Zielgenen benutzt wurden, tatsächlich alle relevanten Mad1-Signalwege unbeschädigt aufweisen.

Hingegen wird eher befürchtet, daß folgende Punkte eine erfolgreiche Kombination von stabilen Mad1-Klonen und dem PCR-Select-System erschweren:

1. Zum einen mögen gerade die besonders relevanten Mad1-Zielgene bzw. Signalwege unter dem Selektionsdruck mutiert bzw. fehlreguliert vorliegen und damit als Mad1-Zielgene nicht erfaßt werden. Um dieses Problem einzugrenzen, wurde die Subtraktion mit verschiedenen Mad1-Klonen mehrfach durchlaufen, in der Annahme, daß mögliche Mutationen in Mad1-Signalwegen nicht in allen Klonen gleichermaßen vorliegen. Zusätzlich wurden die Induktionszeiten variiert und auch mRNA von Dox-On-Mad1-Zellen aus dem Labor von Lars Gunnar Larsson eingesetzt. Die so gewonnenen subtrahierten Sequenzen wurden mittels RZPD-Unigene Filter identifiziert und werden im Abschnitt 4.1.4. diskutiert. Allerdings wird

hier deutlich, daß der Großteil zumindest der sehr guten Zielgenkandidaten am Apoptose-Signalweg beteiligt sind und weniger an der Regulation der Proliferation. Das mag sich dadurch erklären, daß auf alle Regelmechanismen zur Proliferation über den gesamten Zeitraum der Zellkultivierung ein großer Selektionsdruck liegt, der zu Anreicherung von Mutationen in diesem Bereich führen mag. Der Apoptose-Signalweg ist aber, solange die Zellen relativ streßfrei gehalten werden, nicht aktiviert, d.h. er unterliegt keinem Selektionsdruck. Daher scheint die Wahrscheinlichkeit höher, daß solche Signalwege unversehrt vorliegen und vornehmlich in diesem Bereich differenziell exprimierte Mad1-Zielgenen identifiziert werden können.

2. Außerdem liegt allein schon die basale Expression des exogenen Mad1-Konstruktes weit über den physiologisch Mad1-Mengen, die z.B. in differenzierenden Zellen zu detektieren sind. Dadurch mag der Schwellenwert des linearen Bereiches Mad1-abhängiger transkriptioneller Regulation überschritten sein. Die beiden zu vergleichenden Zellpopulationen weisen also möglicherweise nur eine sehr schwache differentielle Expression auf. Hier wird also eher eine Population von maximal Mad1-reprimierten Zielgenen mit einer solchen verglichen, wo Mad1 noch nicht ausreichend stark exprimiert ist, um alle Zielgene vollständig zu reprimieren. Im Abschnitt 4.1.2. wird im Detail gezeigt, wie sich diese Ausgangssituation auf die Anreicherung von subtrahierten Sequenzen im PCR-Select-Verfahren und auch im *rescreening* mittels Dot Blot auswirkt (s. Abb. 44.).

3. Die im PCR-Select Verfahren identifizierten Zielgene müssen einer Verifizierung unterzogen werden. Der dazu üblicherweise durchgeführte Northern Blot erweist sich hier aber in der vorliegenden Kombination als kritisch. Die hohe basale Expression von Mad1 in beiden Populationen führt zu einer ständig leicht reprimierten Expression direkter Zielgene. Zudem werden im PCR-Select Verfahren (aufgrund der Normalisierung der Transkriptmengen in der ersten Hybridisierungsrunde) niedrig exprimierte Sequenzen genauso effizient subtrahiert wie hoch exprimierte Sequenzen. Die Transkripte der niedrig exprimierten Gene sind im Northern Blot schwer zu detektieren. Solche Transkripte aber sogar in den Mad1-Klonen im Northern Blot als differenziell exprimiert nachzuweisen, erscheint problematisch. Es mußten daher andere Methoden der Verifizierung gewählt werden (s. Abschnitt 4.1.5.).

4. Die Präparation der RNA aus Zellen, die mit Mad1 bzw. einem Kontrollplasmid transfektiert wurden, das einen schwachen Promoter hat, mag den physiologischen Bedingungen der Mad1-Expression näher kommen, allerdings nehmen durch die üblichen Transfektionsmethoden nur etwa 1-5% der Zellen die Plasmide tatsächlich auf. Dadurch würde der Hintergrund nicht-transfektierter Zellen eine mögliche Regulation der Transkriptmenge wieder verdecken. Es wurde nun aber im Labor eine Zelllinie etabliert (293 Zellen), die sich mit der Calcium-Chlorid-Methode mit einer Effizienz von bis zu 80% transfektieren läßt. Diese wäre sicherlich für die Überprüfung einiger potentieller Zielgene im Northern geeignet.

4.1.2. Allgemeine Validierung der Effizienz der Bestimmung von Mad1-Zielgenen

Die Verifizierung der subtrahierten Sequenzen mittels *Colony Dot Blot* zeigt zuerst einmal, daß der Dot Blot durchaus reproduzierbare Ergebnisse liefert, da ein zweiter unabhängiger Durchlauf für die Klone 24.-72. ähnliche Ergebnisse erbrachte. 60% der im 2. Durchlauf bestätigten Klone sind auch im 1. gefunden worden.

Da alle Klone sequenziert und über *Blast Search* identifiziert worden sind, kann auch hier abgeschätzt werden, wie aussagekräftig der *Dot Blot Screen* als Mittel zur Verifizierung ist. Nach den Ergebnissen der Sequenzierung lassen sich eindeutig solche Klone als falsch positiv bezeichnen, die den leeren Klonierungsvektor tragen. Diese wurden auch nie im Dot Blot als potentielle Zielgene bestätigt gefunden. Diese 16% aller sequenzierten Klone sind als Klonierungsartefakt zu interpretieren und gelten im Dot Blot als Negativkontrolle. Da bei 15 von diesen 16 Klonen ein Signal vom Typ F im Dot Blot auftrat, zeigt dies, daß die Hybridisierung an sich keinen unspezifischen Hintergrund gibt, der beispielsweise auf endogenen bakteriellen DNA-Sequenzen und unspezifischer Kreuzhybridisierung beruhen mag. Damit gewinnen die übrigen Hybridisierungssignale an Beweiskraft und mögen damit einem reversen Northern vergleichbar sein. Es entfällt zwar die Information der Transkriptgröße, ein hoher unspezifischer Hintergrund ist allerdings weitestgehend auszuschließen.

Die übrigen 84% der Klone enthalten Fragmente. Die differenzielle Anreicherung dieser Sequenzen kann im Dot Blot geprüft werden, der mit denselben Populationen (jeweils subtrahiert und nicht-subtrahiert) an cDNA-Sequenzen durchgeführt wurde wie der

entsprechende PCR-Select Durchlauf. Der Dot Blot stellt damit den Abgleich des internen Vergleichs einer Anreicherung mit einem externen Vergleich zu den ursprünglichen, nicht-subtrahierten Populationen dar.

Es kann hier nun unterschieden werden, ob eine Anreicherung gegenüber der nicht-subtrahierten cDNA-Population erfolgte (Kürzel B entsprechend der Tabelle zum Dot Blot) bzw. diese zwar schon in den nicht-subtrahierten Populationen zu detektieren war (ausreichende Expression, Kürzel A), aber weiterhin in den subtrahierten Populationen zu finden ist. Im letzten Fall entsprechen die Sequenzen sehr sicher exprimierten Genen. Im ersten Fall ist zwar eine Anreicherung erfolgt, die aber auch artifiziell sein könnte. Dies ist aber sehr unwahrscheinlich, da nur solche Sequenzen exponentiell über PCR angereichert werden konnten, die beide Adapter aufweisen (s.Abb. 10., Fragment e). Die Hybridisierungsreaktion müßte also in beiden Teilansätzen für Fragmente von Typ b unabhängig voneinander unvollständig gewesen sein, trotz eines absoluten Überschusses an *driver* (zumal es sich zusätzlich um ein niedrig exprimiertes Gen handelt, das in den nicht-subtrahierten Populationen kein Hybridisierungssignal liefert). Diese können dann aber im 2. Hybridisierungsschritt nicht in ein Fragment von Typ e überführt werden, weil keine Denaturierung der *tester* Population, nur des *drivers*, erfolgte, so daß doppelsträngig vorliegende Fragmente von Typ b bestehen bleiben. Es gibt also mehrere Mechanismen, die eine spezifische Anreicherung sichern:

1. Es liegt ein Überschuß an *driver* vor.
2. Die *tester* Population wird zwei voneinander unabhängigen Hybridisierungen mit zwei verschiedenen Adaptoren unterzogen, wobei ein zweimaliges Unterbleiben einer unvollständigen Subtraktion derselben Sequenz absolut unwahrscheinlicher wird.
3. Die 2. Hybridisation kann nur zwischen solchen Fragmenten erfolgen, die dem *driver* oder den einzelsträngigen Fragmenten aus der 1. Runde entsprechen.
4. In zwei PCRs mit Primern zu den beiden Adaptoren können nur Fragmente von Typ e exponentiell amplifiziert werden.
5. Fragmente vom Typ b' sind unvollständig subtrahiert, können aber wegen der Adapter-vermittelten Sekundärstruktur nicht amplifiziert werden.

Neben den Möglichkeiten A und B gibt es auch die von C-F. Hier kann mit Hilfe des Dot Blot entschieden werden, ob Sequenzen zwar kloniert worden sind, aber ursprünglich in beiden nicht-subtrahierten Populationen zu finden waren bzw. zwar kloniert wurden, aber in allen

oder keiner der vier Populationen vorkommen. Dies sind falsch positiv- oder nicht-differenziell exprimierte Sequenzen.

Zum Typ E gehören z.B. *housekeeping genes* bzw. generell solche Sequenzen, die bei *high-throughput screens* (*microarrays*, *yeast-two-hybrid screens*) als Artefakte den unspezifischen Hintergrund auszumachen scheinen. Darunter fallen allgemein Enzyme und Strukturproteine. Sie sind meist sehr hoch exprimiert und konnten während der Hybridisierungsrunden möglicherweise nicht vollständig subtrahiert werden.

Im vorliegenden Fall würde man hier zunächst solche Kandidaten wie GAPDH, Pyruvatkinase, beta-Aktin, beta-Tubulin, Kollagen Typ IV, ribosomale Proteine wie das L19 vermuten. Aus der Tabelle für die Mad1-reprimierten Gene ergibt sich aber, daß sie in 82% der Fällen dem Typ F angehören. Für die Mad1-aktivierten Gene sind es lediglich 44% (s. Abschnitt 4.1.3.1.).

Aus den oben erläuterten Gründen kann die Subtraktion an sich theoretisch nie unvollständig verlaufen. Die Tatsache, daß letztendlich doch noch 18% bzw. 56% der Sequenzen ein Hybridisierungssignal vom Typ E ergeben, begründet sich eher in der finalen Relation exponentiell amplifizierter (also subtrahierter) zu linear amplifizierten (also in *tester* und *driver* enthaltenen) Sequenzen. Je weniger tatsächlich differenziell exprimierte cDNAs in der *tester* Population vorlagen, desto verhältnismäßig mehr linear amplifizierte Fragmente liegen im zu klonierenden PCR-*pool* vor. Diese ergeben dann die Hybridisierungssignalen von Typ E, die keine unspezifische Kreuzhybridisierung der Dot Blot Methode sind, sondern die Fehlerquote unter den subtrahierten Sequenzen in der über das PCR-Select Verfahren erhaltenen Population widerspiegeln.

Auch von anderer Seite wird offenbar, wie hoch der Hintergrund an falsch positiven Sequenzen nach dem PCR-Select Durchlauf ist. Das ergibt sich aus dem Verhältnis von nachweislich differenziell exprimierten Genen (Hybridisierungssignal von Typ A+B) zu den oben erläuterten falsch positiven Sequenzen (Hybridisierungssignal von Typ C-F). Zumindest von den Klonen 24.-72. fallen etwa 83% als falsch positiv aus, für die Klone 1.-23. sind es sogar 90%.

Hierbei muß allerdings bedacht werden, daß möglicherweise nicht alle Fragmente einer vergleichbaren Ligationseffizienz unterliegen. Außerdem mögen bei dem Klonierungsvorgang unproportional mehr echt positive Sequenzen, insbesondere Mad1-aktivierte Sequenzen, verloren gegangen sein, da sie z.B. bei ihrer Expression in den Bakterien toxisch oder wachstumsinhibierend wirken.

Es wurde allerdings erwartet, daß der Hintergrund an falsch positiven Sequenzen sehr hoch sein würde, da generell eine schwache Anreicherung differenziell exprimierter mRNAs und ein geringerer Unterschied in der Quantität der differenziell exprimierten mRNAs innerhalb des PCR-Select-Verfahrens zu einem höheren Hintergrund führt.

Da hier eine Zelllinie mit einem induzierbaren Genkonstrukt als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von mRNA verwendet wurde (Tet-OFF-Mad1-Zellen), belief sich der Unterschied beider mRNA-Pools ursächlich auf die induzierte Expression eines einzigen Gens und im weiteren auf seine Zielgene. Zum zweiten waren bisher lediglich Cyclin D2 und hTERT als Mad1-Zielgene beschrieben (s. 2.1.1.4.), weswegen die Anzahl weiterer Zielgene und auch deren Expressionsstärke unbekannt war. Und drittens ist ein bekanntes Problem die schon oben erwähnte "Undichtigkeit" (*leakiness*) des Tet-OFF-Systems. Das heißt, daß selbst im nicht-induzierten Zustand, wenn durch Zugabe von Tetrazyklin die Expression des exogenen Mad1-Gens eigentlich inhibiert sein sollte, dennoch eine höhere Mad1-Expression im Western nachzuweisen ist als es für das endogene Mad1 der Fall ist. Dieses Zellsystem zeigt allerdings weiterhin einen Mad1-Phänotyp im Sinne einer verlangsamten Proliferation und einer gewissen Protektion gegenüber Apoptose. Daher scheint der relative Expressionsunterschied des exogenen Mad1 für diese phänotypischen Aspekte, die auf unterschiedlicher Gentranskription der Mad1-Zielgene beruhen sollten, zu genügen. Es mag allerdings sein, daß nun zwar absolut gesehen eine starke differenzielle Expression von exogenem Mad1 gegeben ist, diese Mengen aber sicher unphysiologisch hoch sind und die Regulation der Mad1-Zielgene nicht mehr im linearen Bereich erfolgt (s. Abb. 44.). Dadurch kann erwartet werden, daß die differenzielle Expression der Mad1-Zielgene y und z relativ schwach ausfällt im Vergleich zu der physiologischen Situation mit den Zielgenen w und x. Damit kommt zu dem quantitativen Problem (tester und driver unterscheiden sich ursächlich in nur einem Gen) auch noch ein qualitatives (die Expressionsunterschiede sind möglicherweise sehr gering).

Weiterhin ist zu bemerken, daß etwa zweimal so viele Klone mit Mad1-reprimierten Zielgenen erhalten wurden, also direkten Zielgenen, und hier mehrere gute Kandidaten hervorzuheben sind. Dies erscheint zunächst überraschend, da das physiologische Verhältnis von direkten und dann von diesen wiederum regulierten, damit indirekten Zielgenen eigentlich umgekehrt sein sollte.

Die Abb. 44. zeigt aber ein Modell zur Erklärung. Es mag nämlich sein, daß aufgrund der unphysiologisch hohen Mad1-Mengen zwar noch eine differenzielle Expression von direkten

Mad1-Zielgenen y und z existiert, die mittels der Anreicherung im PCR-Select-Verfahren als Klone mit dem Hybridisationssignal vom Typ B (eben wegen der äußerst geringen Expression) noch detektierbar sind.

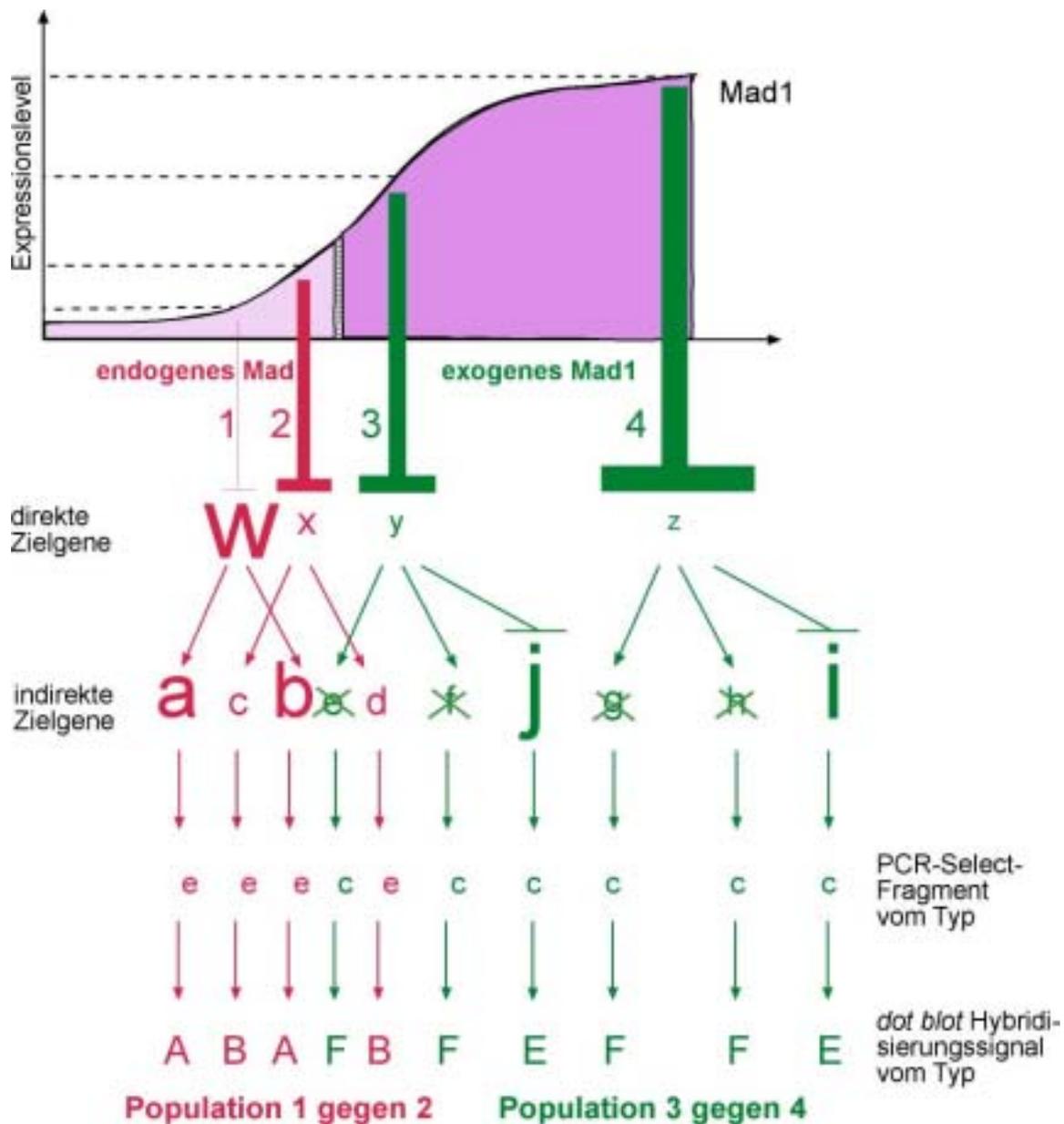


Abb. 44.: Einfluß des Tet-OFF-Mad1-Systems auf die Ergebnisse im PCR-Select-System.

Schema zur unphysiologisch hohen Mad1-Expression im Tet-OFF-System und den möglichen Auswirkungen auf die Regulation der Mad1-Zielgene.

Dadurch erklärt sich auch, warum 7 von 11 Kandidaten dem Typ B angehören, also niedrig exprimiert zu sein scheinen. Auf der anderen Seite liegt möglicherweise aber die Expression solcher direkten Zielgene y und z unter dem ihrerseits physiologischen Bereich für eine lineare Regulation ihrer Zielgene, also der indirekten Mad1-Zielgene a-j. Da keine 1:1 Übersetzung der Signale von y und z anzunehmen ist und sicher auch die Schwellenwerte anders gelagert sind, fallen die Gene e-j sehr rasch unter die Detektionsgrenze bzw. sind in beiden Populationen fast gleich hoch exprimiert. Damit würde man bei einem Vergleich von den Populationen 1 und 2, die den physiologischen Verhältnissen entsprechen, nach wie vor eine deutliche Subtraktion und Anreicherung von PCR-Select-Fragmenten von Typ e erwarten, die im Dot Blot Signale von Typ A und B liefern. Vergleicht man aber die Populationen 3 und 4, dann ist der Expressionslevel der direkten und besonders der indirekten Zielgene so ähnlich, daß in der 1. Hybridisierung der Anteil an Molekülen vom Typ b und c weit über dem von Typ a liegt. Dadurch erklärt sich dann auch der ungewöhnlich hohe Anteil an Hybridisierungssignalen von Typ E und F.

Zurückblickend wäre es daher sinnvoller gewesen, proliferierende Wildtyp-Zellen, die kein Mad1 exprimieren, mit induzierten oder sogar nicht-induzierten Zellen der Tet-Off-Mad1-Zelllinie zu vergleichen.

4.1.3.1. Potentielle Mad1-aktivierte Gene

Dieser Dot Blot zeigt im Gegensatz zu denen für die Klone 24.-72. keine deutlich differenziellen Signale. Aus dem *pool* der Mad1-aktivierten Sequenzen (Klone 1.-23.), die also potentielle indirekte Mad1-Zielgene enthalten, können lediglich Klon 2 und 3 als Kandidaten vorgeschlagen werden. Klon 2 ist die CDC-ähnliche Kinase 3. CLK3 ist ein Mitglied der LAMMER-Familie dual-spezifischer Proteinkinasen und besonders hoch exprimiert in reifen Spermatozoen. Außerdem wird eine Funktion bei dem mRNA-Splicing vermutet [Menegay et al., 1999].

Klon 3 zeigt im *Blast Search* hohe Ähnlichkeit zur Ferredoxin Reduktase, zu der es aber keine Publikationen als potentielles Myc- oder Mad-Zielgen gibt. Zudem ist dieser PCR-Select-Durchlauf sehr suboptimal verlaufen, was sich daran zeigt, daß weiterhin 56% (s.o.) der Dot Blot Signale dem Typ E angehören. Die Gründe hierfür wurden im vorhergehenden Abschnitt erläutert.

Bemerkenswert ist, daß eEF1- α zweimal kloniert wurde, allerdings nie im Dot Blot bestätigt werden konnte. Stattdessen wurde eEF1- α -1 auch als potentielles Zielgen in der reversen Subtraktion gefunden. Mögliche Gründe und die Schwierigkeiten einer Verifizierung werden unter 4.1.6. (Abschnitt eEF1- α) erläutert.

Aufgrund der genannten Unsicherheit und der ausstehenden finalen Verifizierung mittels Northern Blot oder Light Cycler kann hier abschließend kein guter Kandidat für ein Mad1-aktiviertes Zielgen vorgeschlagen werden.

4.1.3.2. Potentielle Mad1-reprimierte Gene

Aus dem *pool* der Mad1-reprimierten Sequenzen (Klone 24.-72.) ergaben sich nach dem ersten Screen zur Verifizierung im Dot Blot immerhin 11 gute Kandidaten. Davon sind 4 noch uncharakterisierte Klone bzw. EST-Sequenzen.

Auffällig ist, daß 7 der 11 Klone der Kategorie B entsprechen, also erst nach einer Anreicherung im PCR-Select Durchlauf zu detektieren sind. Zu ihnen gehören DDX27, ARFGAP, EZH, DIPP2, hnRPK, DKFZp434N1435 und EST365472. Sie weisen also sehr wahrscheinlich eine niedrige Expression auf, so daß ihre Verifizierung mittels Northern Blot entfällt.

Die übrigen 4 Kandidaten sind Integrin α 3, Dynaktin1, das ribosomale Protein L19, MMS19L und HCA66. Hiervon erscheinen die ersten drei zunächst falsch positiv, da sie zu der oben erwähnten Gruppe hoch exprimierter und Artefakt-verdächtiger Sequenzen gehören. Außerdem fehlt zumindest im 2. Dot Blot Durchlauf die u- Kontrolle, so daß nicht eindeutig zwischen Typ A und C unterschieden werden kann. Jedoch wurden sowohl Dynaktin als auch L19 im 1. Dot Blot als Signal des Typs A verifiziert. Hinzu kommt, daß für c-Myc bekannt ist, daß seine Zielgene nicht nur in den Bereich Zellzyklus und Apoptose fallen, sondern gerade an Proteinsynthese und Stoffwechsel allgemein beteiligt zu sein scheinen [Dang et al., 1999].

Es muß daher angenommen werden, daß z.B. ribosomale Proteine, Glykolyse-Enzyme oder Strukturproteine durchaus auch potentielle Mad1-Zielgene sein können. Gerade kürzlich wurden mit der DamID Methode die Bindungsstellen von Myc, Max und Mnt, ein anderes Mad-Familienmitglied, im Drosophila Genom untersucht [Orian et al., 2003]. Hier wurde auch für Mnt eine Bindung an Promotoren von Genen nachgewiesen, die in die oben zunächst

kritisch bewerteten Gruppen (ribosomale Proteine, Zytoskelett, Proteinsynthese) fallen. Damit liegt auch die Vermutung näher, Mad1 könne eben solche Gene regulieren.

Die Tabelle 4. vergleicht die hier für Mad1 gefundenen sehr guten Kandidaten, die aus dem Klonierungs-Dot-Blot-Durchlauf stammen, mit denen aus der Zusammenfassung mehrerer unabhängig voneinander durchgeführter Unigene Filter Hybridisierungen und den für N-Myc und c-Myc veröffentlichten Zielgenen.

Tabelle 4.: Bewertung der (s+) -Zielgen-Kandidaten vom Dot-Blot-Verfahren.

Dot Blot (s+): reprimierter Kandidat	Unigene- Filter	Myc-Zielgen (Referenzen 1.- 12.)
Integrin α3		Integrin β (7.)
DEAD/H-Box Polypeptid 27 (DDX27)	DDX5+16: Nr. 274, Nr. 9	DEAD/H-Box Polypept. 21 (4.)
EZH2		
DIPP2		
Dynaktin 1		
hnRNP-K	Nr. 104	hnRNP-G, -D (4.) hnRNP-A (12.)
ribosomales Protein L19 + AIAA0104 (2 inserts)		RP-S19 (4.), RP-L19 (1., 3., 6., 7.)
MMS19L (Klon 23967)		
HCA 66		
DKFZp434N1435		
α NAC	Nr. 132	(1.), (3.)
EST 365472		

Referenzen:

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1. [Guo et al., 2000] | 6. [Orian et al., 2003] |
| 3. [Boon et al., 2001] | 7. [Fernandez et al., 2003] |
| 4. [Menssen et al., 2002] | 12. [O'Connell et al., 2003] |

Aus der Tabelle 4. wird ersichtlich, daß zumindest die rot markierten Kandidaten hnRNP-K, DDX27 und α NAC sowohl im Dot Blot als auch im Unigene Filter Screen unabhängig voneinander bestätigt werden konnten und zudem auch schon als Myc-Zielgene beschrieben worden sind. Sie werden hier aus der Gruppe der Mad1-reprimierten Gene, die über die Klonierungs-Dot-Blot-Strategie identifiziert wurden, als die sichersten Zielgen-Kandidaten favorisiert und im Abschnitt 4.1.6 im Einzelnen diskutiert.

Solche Kandidaten (blau), die lediglich als Myc-Zielgen beschrieben vorliegen, aber nicht im Unigene Filter Screen gefunden wurden, mögen z.B. nicht als gespotteter EST-Klon auf dem

Unigene Filter vorkommen. Da die Identität der gespotteten ESTs erst durch Angabe der Koordinaten der Spots bei der RZPD-Datenbank abgefragt werden konnte, liegen keine Angaben über die Gesamtheit der gespotteten EST-Klone vor. Ihnen wird aber eine gewisse Spezifität eingeräumt, werden daher auch als potentielle Zielgene betrachtet und im Abschnitt 4.1.6 diskutiert.

Die dritte Klasse von Zielgenen wurde nur im Dot Blot bestätigt. Dies sind besonders noch unbekannte Klone wie EST 365472, DKFZp434N1435, Klon 23967, deren Verlässlichkeit als Mad1-Zielgen ohne weitere Verifizierung nicht abgeschätzt werden kann.

4.1.4. Identifizierung von PCR-Select-Zielgenen mittels RZPD-Unigene Filter

Die Tabelle 5. vergleicht, umgekehrt zu der Tabelle 4., die über das Unigene Screening identifizierten potentiellen Zielgene mit denen, die im Dot-Blot-Verfahren verifiziert werden konnten, und mit denen, die bisher als Myc-Zielgen beschrieben worden sind.

Tabelle 5.: Bewertung der (s+)/(s-) -Zielgen-Kandidaten vom Unigene-Filter.

Unigene-Filter s+ (reprimierter) Kandidat (mehrfach)	Verifizierung (Northern, ChIP, Dot Blot)	Myc-Zielgen (Referenzen 1.- 17.)
Strukturproteine:		
β Aktin (Nr. 90, 405)	Dot Blot: E	χ Aktin (6.)
Translation + Faltung:		
eEF-1α-1 (Nr. 278, 282, 406)		eEF-1α-1, β (3.) eEF-1δ, γ (3., 4.), eEF-2 (1., 3., 8.)
eIF-2χ-1 (Nr. 425, 466, 589)	(ChIP eIF-2α)	eIF-1α/β (14., 15.), eIF-2α/β-1 (12., 16.) eIF-3, -4/5α, -9 (2., 3., 4., 7., 8.) eIF-6 (6. als dMnt Zielgen)
DDX5, DDX16 (Nr. 274, 9)		DDX5 (1., 4.), DDX18 (16., 17.) DDX21 (12., 8.), DDX40 (8.)
Apoptose:		
PTEN (Nr. 122, 458, 484)	(Northern)	(14.)
unbekannte Funktion:		

KIAA0118 (Nr. 110, 409)		
R99269 (Nr. 286, 346)		
H-2K binding factor-2 (Nr. 323, 38)		
Unigene-Filter s+ (reprimierter) Kandidat (einfach)	Dot Blot (Signal-Typ)	Myc-Zielgen (Referenzen 1.- 17.)
Strukturproteine:		
Kollagen (Nr. 209)	F	(1., 2., 5., 11., 12.)
Cathepsin O (Nr. 325)		Cathepsin B (5.), Cathepsin C (8.)
mRNA + Translation:		
4ε-BP1 (Nr. 190)		s. Abschnitt eIF-2 γ -1
CCT8 (Chaperonin)		CCT3 (4.) CCT6A (1.) Chaperonin 10 (4., 8.)
hnRNP-K (Nr.104.)	B	hnRNP-G, -D (4.) hnRNP-A (12.)
Apoptose:		
α Nac (Nr. 132)	B	(1., 3.)
APEX (Nr. 47.)		(1., 4., 5., 12.)
BRCA2 (Nr. 182)		BRCA2 (7.), BRCA1 (4.)
Metabolismus:		
S-Adenosylhomocystein Hydrolase (Nr. 417)		(2.), (8.)
Spermidin Synthase (Nr.127)		(1., 4., 8.)
Enolase (Nr. 416.)		(1.,4., 13., 14.)
Proliferation:		
BMI-1 (Nr. 24)		c-Myc kooperierendes Onkoprotein (9.), aktiviert hTERT (10.)
Unigene-Filter s- (aktivierter) Kandidat (mehrfach)	Verifizierung	Myc-Zielgen (reprimiert) (Referenzen 1.- 17.)
ATM (Nr. 214, 355, 597)	(Western)	
MDM2 (Nr. 150)	s. Apoptose-Modell	
VBP1 (Nr. 77, 336, 598)		(12.)

Referenzen:

- [Guo et al., 2000]
- [Colle et al., 2000]
- [Boon et al., 2001]
- [Menssen et al., 2002]
- [Watson et al., 2002]
- [Orian et al., 2003]
- [Fernandez et al., 2003]
- [Schuhmacher et al., 2000]
- [Jacobs et al., 1999]
- [Dimri et al., 2002]
- [Yang et al., 1991]
- [O'Connell et al., 2003]
- [Osthus et al., 2000]
- [Neiman et al., 2000]
- [Yu et al., 2002]
- [O'Hagan et al., 2000]
- [Grandori et al., 1996]

Von den Kandidaten des ersten Tabellenabschnittes (Tabelle 5.), die in mehrfach unabhängig voneinander präparierten mRNA-Populationen, PCR-Select-Durchläufen und Unigene Filter Hybridisierungen gefunden wurden, sind Aktin, eEF-1 α , eIF-2 γ , DDX-Mitglieder, Cyclophilin und PTEN schon als Myc-Zielgene bekannt. Teilweise gibt es auch schon weitere bestätigende Hinweise aus Northern oder ChIP-Analysen, d.h. sie gehören damit zu den sehr guten Zielgen-Kandidaten und werden unter Abschnitt 4.1.6 näher erläutert.

KIAA0118 und KIAA0118 können hier aufgrund fehlender Informationen nicht weiter bewertet werden; hier könnten nur weitere Verifizierungsschritte wie ChIP oder Light Cycler-Analysen Aufschluß geben. Aktin wird vor allem wegen des Hybridisierungssignals vom Typ E (es lag also keine Subtraktion im *forward* und *reverse* Ansatz vor) ausgeschlossen.

Die mehrfache Bestätigung eines Zielgens in unabhängigen Hybridisierungen ist teilweise auch ein problematisches Kriterium, da immer dieselben Filter verwendet wurden. Je häufiger sie für die nachfolgenden Hybridisierungen gestrippt wurden, desto schwächer wurden auch die Signale. Es werden daher im zweiten Teil der Tabelle auch solche Kandidaten aufgelistet, die in den ersten Screens gefunden wurden und dort sehr eindeutig differenzielle Signale ergeben haben, in folgenden Screens aber nicht wieder gefunden wurden, weil ihre Signalstärke zu schwach war.

4.1.5. Anschließende Möglichkeiten der Verifizierung

Eine abschließende Bestätigung der potentiellen Zielgene mittels Northern Hybridisierung steht noch aus, obwohl sie ja eigentlich im Dot Blot durch die beiden nicht-subtrahierten Populationen eingeschlossen ist. Es fehlt allerdings die abschließende Darstellung des Transkripts mit seiner korrekten Größe im Northern. Dafür gibt es folgenden Grund. Über das PCR-Select-Verfahren werden besonders die niedrig-exprimierten Gensequenzen angereichert. Das ergibt sich aus der Hybridisierungskinetik und zeigt sich z.B. daran, daß von 10 potentiellen Zielgenen nur 7 in einer Hybridisierung des Kolonie-Filters mit der *forward* subtrahierten *tester* Sonde, nicht aber mit der unsubtrahierten Sonde der *tester* cDNA zu einem Hybridisierungssignal führen; sie unterlagen also einer Anreicherung auf dem Wege der Subtraktion. Dies kann nur als grobe Schätzung gelten, da auch diese Zahlenverhältnisse durch mögliche Sequenzverluste während der Klonierung beeinflußt sind. Dennoch gilt das

Argument, daß die Mehrheit der auf diese Weise identifizierten potentiellen Mad1-Zielgene niedrig exprimiert sein wird, und es daher sehr schwer ist, sie im Northern zu verifizieren. Tatsächlich wurden bei den durchgeführten Northern Blots zwar Signale für die GAPDH- und Mad1-Kontrolle erhalten, selten aber für die aus dem PCR-Select-Verfahren erhaltenen Sequenzen, aus denen Northern-Sonden erstellt worden waren.

Als Alternative zur endgültigen Verifizierung kann hier die quantitative RT-PCR im Light Cycler vorgeschlagen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Verifizierung ist die ChIP. Sie basiert allerdings darauf, daß es sich um direkte Zielgen-Kandidaten handelt, d.h. daß in ihrem Promoterbereich eine E-Box vorliegt, an der man die differenzielle Bindung von Mad1 und c-Myc untersuchen kann. Mad1-aktivierte Kandidaten bzw. indirekt reprimierte Kandidaten können so nicht verifiziert werden.

Hier mag aber der funktionelle Zusammenhang einen Hinweis über den möglichen Signalweg geben. So könnte dann in funktionellen Assays, z.B. im Apoptose-Assay oder Kolonie-Bildungsassay unter Verwendung der Tet-Off-Mad1-Zellen und spezifischer Inhibitoren der jeweiligen Kandidaten (entweder siRNA, Überexpression eines Inhibitors oder chemische Verbindungen) eine tatsächliche Relevanz dieses Kandidaten für den jeweiligen Signalweg in Abhängigkeit von Mad1 gezeigt werden.

4.1.6. Abschließende Bewertung der finalen Mad1-Zielgenkandidaten vor dem Hintergrund der Funktion von Mad1 in Proliferation und Apoptose

Die in der vorliegenden Dissertation abgeschlossenen Arbeiten zu der Funktion von Mad1 in Apoptose haben gezeigt, daß Mad1 Apoptose inhibiert, indem es die Spaltung von Pro-Caspase-8 inhibiert [Gehring et al., 2000]. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde bereits in meiner Diplomarbeit dargelegt, der zweite Teil, der sich mehr mit der Klärung des Mechanismus beschäftigte, liegt hier vor (s. 3.1.) und soll unter diesem Abschnitt von Mad1-Zielgenen diskutiert werden.

4.1.6.1. Modell zum Mechanismus der Mad1-vermittelten Inhibierung der Apoptose

Um den Mechanismus der Inhibierung von Apoptose durch Mad1 zu klären, wurden in der vorliegenden Dissertation verschiedene Ebenen des Signalweges untersucht.

Dazu wurde zunächst die Pro-Caspase-8 getestet, um zu evaluieren, ob Mad1 ober- oder unterhalb dieser ersten Caspase in den Apoptose-Signalweg eingreift (s. 3.1.1.). Es konnte hier gezeigt werden, daß Mad1 die aktivierende Spaltung und damit die Enzymaktivität von Caspase-8 hemmt.

Um die Verbindung zwischen dem Transkriptionsfaktor Mad1 und der enzymatischen Inhibierung von Pro-Caspase-8 aufzudecken, wurden dann im *RNase Protection Assay* verschiedene Mitglieder der Caspase- und Bcl-Familie, der TNF-Rezeptorsuperfamilie, der DISC-assoziierten Proteine und Apoptose-regulierenden Kinasen getestet (s. 3.1.2.). Hier konnten keine eindeutig differenziellen Transkriptmengen detektiert werden.

Bisher ist wenig über den Mechanismus der Mad1-vermittelten Inhibierung von Apoptose bekannt. Es gibt eine Arbeit, die zeigt, daß Mad1 unter Serum-limitierenden Bedingungen Apoptose reduziert [Bejarano et al., 2000]. Auch hämatopoetische Zellen von transgenen Mad1-Mäusen sind weniger sensitiv gegenüber Apoptose [Queva et al., 1999]. Und umgekehrt ist die Apoptoserate in myeloiden Vorläuferzellen von Mad1-Knock-out-Mäusen erhöht [Foley et al., 1998]. Hinweise zum Mechanismus belaufen sich lediglich auf die Daten, die es zur c-Myc-induzierten Apoptose gibt. Es wird dabei spekuliert, daß Mad1 möglicherweise genau diesen von c-Myc induzierten Apoptose-Signalweg inhibiert. Es muß aber bedacht werden, daß generell noch unklar ist, ob c-Myc und Mad1 tatsächlich in jedem funktionellen Zusammenhang dieselben Zielgene regulieren oder ob sie für den gleichen biologischen Zusammenhang verschiedene Signalwege ansteuern.

Es wird angenommen, daß c-Myc zumindest teilweise den p53-abhängigen Apoptoseweg aktiviert [Hermeking et al., 1994; Rupnow et al., 1998]. Außerdem gibt es Studien, die belegen, daß viele der N-Myc-basierten Neuroblastoma resistent gegen Induktion von Apoptose sind und ein methyliertes, inaktives Caspase-8-Gen aufweisen [Teitz et al., 2000]. Die Autoren konnten aber wie auch in der vorliegenden Dissertation keine veränderte Expression der Bcl-2-Familienmitglieder nachweisen.

Dies paßt zu der hier formulierten Annahme, daß Mad1 oberhalb von Pro-Caspase-8-Spaltung regulativ an der DISC eingreift. Auch andere Gruppen konnten zumindest für die c-Myc-induzierte Apoptose eine Verbindung zur DISC aufstellen, die jeweils RIP [Klefstrom et al., 2002], c-Flip [Amanullah et al., 2002], Akt [Rohn et al., 1998] oder den NFkB-Signalweg [Bian et al., 1999] involviert.

Eine erste Unterstützung erfährt diese Hypothese von einer Arbeit mit SCLC (small cell lung cancer)-Tumoren, die häufig eine Amplifikation der Myc-Gen-Familienmitglieder zeigen. All

diese Tumoren mit amplifizierten Myc-Genen zeigen einen Verlust der Caspase-8-Expression [Shivapurkar et al., 2002]. Außerdem ist auch die Expression von Komponenten der DISC wie Caspase-10, DR5, Fas und FasL vermindert und die Expression von einem proteolytisch inaktiven Homolog der Caspase-8 (=FLICE), nämlich c-Flip, ist erhöht [Shivapurkar et al., 2002].

Dies konnte für Mad1 nicht gezeigt werden (s. 3.1.2.). Allerdings wurden hier nur Transkriptmengen verglichen.

Unter 3.1.3. wurde die Proteinexpression von c-Flip in Abhängigkeit von Mad1 untersucht. c-Flip (*FLICE-inhibitory protein*) inhibiert die Fas-induzierte Apoptose [Irmeler et al., 1997], indem es an das Adapterprotein FADD bindet und damit die Bindung von Pro-Caspase-8 an FADD verhindert, die Voraussetzung für eine Spaltung und Aktivierung von Pro-Caspase-8 ist. Hier konnte eine leichte Zunahme der Expression in Mad1-exprimierenden Zellen detektiert werden. Das entspricht den oben beschriebenen Studien zu den Myc-Genen.

Zu bemerken ist, daß es sich in der vorliegenden Arbeit um die kurze Splice-Variante von c-Flip handelt, die im Gegensatz zur langen Form die Spaltung von Caspase-8 vollständig hemmt [Krueger et al., 2001].

Eine weitere Studie stellt dann einen Zusammenhang zwischen Histon-Deacetylierung und der c-Flip-Expression her [Aron et al., 2003]. Dort wird gezeigt, daß die Inhibierung der Histon-Deacetylierung in der chronischen Lymphozytenleukämie mit der Aktivierung der Caspase-8-vermittelten Apoptose und der Abnahme der c-Flip-Proteinexpression korreliert. Diese Beobachtung entspricht genau der hier für Mad1 vorliegenden Situation. Mad1 vermittelt transkriptionelle Repression über seinen HDAC-Mediator-Komplex und führt dann über noch unbekannt Schritte zu einer erhöhten Expression von c-Flip und einer Inaktivierung von Caspase-8.

In diesem Zusammenhang sei noch eine Arbeit zu erwähnen, die die Inhibierung von HDAC mittels TSA in einer akuten promyelozytischen Leukämie-Zelllinie zur Induktion von Apoptose führt, die mit der Abnahme der Expression von DAXX korreliert [Amin et al., 2001]. DAXX wurde kürzlich in seiner Funktion als anti-apoptotisch und transkriptioneller Repressor beschrieben [Michaelson et al., 2003]. Außerdem interagiert DAXX mit Chromatin-assoziierten Proteinen wie HDAC2, worüber es die transkriptionelle Repression vermittelt [Hollenbach et al., 2002]. Damit ist auch hier eine direkte Verbindung von

transkriptioneller Repression mittels HDACs und der Inhibierung von Apoptose aufgezeigt, die ebenso für Mad1 gültig sein könnte.

Schlußfolgernd kann gesagt werden, daß Mad1 Apoptose auf der Ebene der DISC inhibiert und hier wahrscheinlich Proteine wie c-Flip als Mediatoren zwischenschalten sind. Eine genaue Entschlüsselung des Mechanismus steht noch aus. Dazu sollten vor allem die Proteinmengen der schon im *RNase Protection Assay* untersuchten Kandidaten und ihre mögliche Verbindung zu einem gemeinsamen Signalweg mit den vorgeschlagenen direkten Zielgenkandidaten des folgenden Abschnitts geprüft werden.

4.1.6.2. Die funktionelle Einordnung der besten Zielgen-Kandidaten

Die im Mad1-Zielgenscreen identifizierten besten Kandidaten sollen nun im Einzelnen in ihrer bisher bekannten Funktion vorgestellt und somit in einen Zusammenhang mit der physiologischen Rolle von Mad1 in Proliferation und Apoptose gebracht werden.

DDX Proteine (*DEAD box helicase*) gehören einer großen Familie an, die an Prozessen wie Splicing, RNA Editing, rRNA-Prozessierung, Initiation der Translation, mRNA-Kernexport und mRNA-Degradation beteiligt sind. Auch Translationsfaktoren wie eIF4A gehören hierzu (s. Abschnitt EIF-2 χ -1).

Hier wurden DDX5 und 16 als potentiell Mad-reprimierte Gene gefunden. DDX5 und Verwandte wurden auch ausführlich als c-Myc-Zielgene beschrieben. Mad1 fällt hier wieder in den großen Zusammenhang von RNA- und Translationsregulation.

hnRNP-K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) wurde zuerst zusammen mit 20 anderen Proteinen als Teil eines Ribonucleoproteinkomplexes identifiziert, wo es RNA bindet [Krecic et al., 1999]. Seine hoch modulare Struktur ermöglicht eine Interaktion mit einem breiten Spektrum von Molekülen wie z.B. einzel-, doppelsträngiger DNA, TBP [Michelotti et al., 1996], Zik-1 [Denisenko et al., 1996], dem Onkoprotein Vav [Hobert et al., 1994] und Src-Familie Tyrosinkinase [Ostrowski et al., 2000]. Das führte zu der Annahme, das hnRNP-K als eine Art Gerüst verschiedene Faktoren miteinander in Beziehung setzt. HnRNP-K ist damit an einer Vielzahl verschiedener Prozesse wie Transkription, mRNA Transport, Spleißen und Regulation der Translation beteiligt. Es wird durch viele Kinasen wie Src, PKC,

CKII und ERK phosphoryliert und somit in seiner Funktion/ Lokalisation reguliert. Von besonderem Interesse scheint hier zu sein, daß die Überexpression von hnRNP-K in Brustkrebszellen zu einer Aktivierung des c-myc-Promoters führt und hiermit eine Zunahme an Myc-Protein, verstärkte Proliferation und ein Matrix-unabhängiges Wachstum korreliert [Mandal et al., 2001]. c-Myc und hnRNP-K scheinen sich also gegenseitig zu aktivieren. Würde sich hnRNP-K als Mad1-Zielgen final bestätigen, könnte Mad1 über die Regulation von hnRNP-K auch indirekt auf c-Myc Einfluß nehmen und damit seiner Rolle als potentieller Tumorsuppressor gerecht werden.

α NAC (*nascent-polypeptide-associated complex*) wurde zunächst aufgereingt als Komplex, der die gerade am Ribosom translatierten Polypeptide vor einer falschen Interaktion mit Cytosolproteinen schützt und so eine korrekte Translokation gewährleistet [Wiedmann et al., 1994]. Seine Chaperon-ähnliche Bedeutung wird auch dadurch hervorgehoben, daß der knock-out von α Nac noch vor der Einnistung der Eizelle lethal wirkt [Deng et al., 1995].

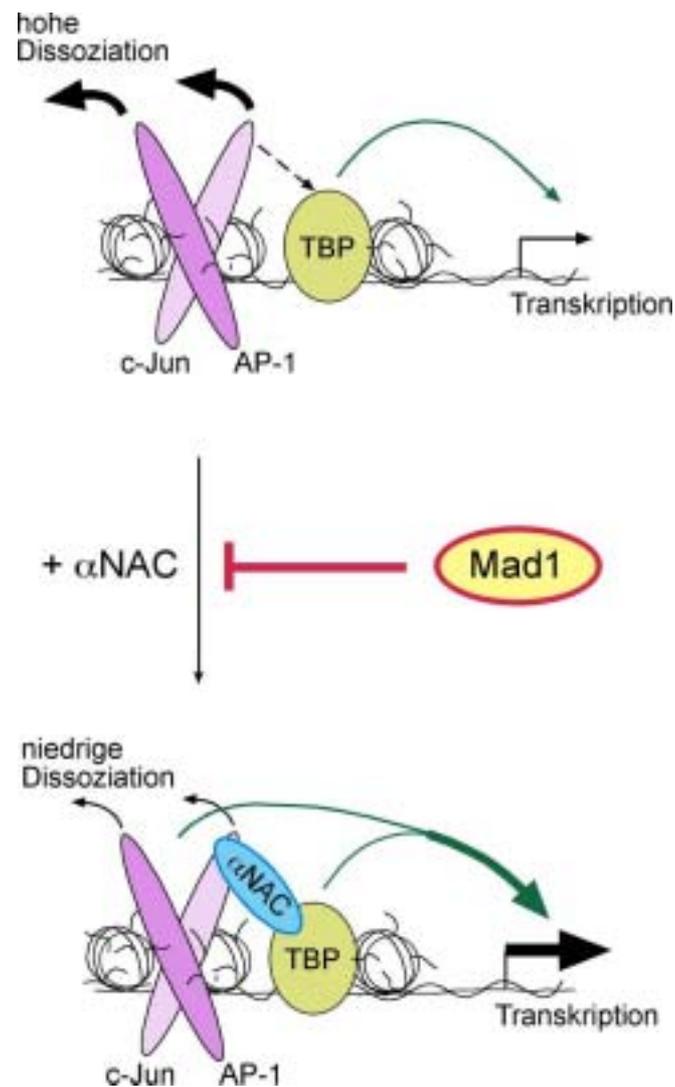
Außerdem wurde α Nac als transkriptioneller Aktivator beschrieben [Yotov et al., 1998] [Moreau et al., 1998]. Die Abb. 45. zeigt das hierzu aufgestellte Modell. α Nac bindet c-Jun und stabilisiert den DNA-gebundenen c-Jun/AP-1-Komplex, indem es seine Dissoziationskonstante 8fach reduziert [Moreau et al., 1998]. Außerdem bindet α Nac TBP [Yotov et al., 1998], wodurch es den Kontakt des c-Jun/ AP-1-Komplexes mit der basalen Transkriptionsmaschinerie stärken könnte.

Die Expression von α Nac korreliert mit dem Beginn der Ossifikation während der Embryogenese und läßt sich spezifisch auf die Zentren der Ossifikation in differenzierten Osteoblasten eingrenzen. α Nac scheint daher ein Knochen-spezifischer transkriptioneller Aktivator zu sein [Moreau et al., 1998].

Die im PCR-Select Verfahren verwendeten Tet-OFF-Mad1-Zellen stammen ebenfalls von der Osteosarkoma-Zelllinie U2OS ab. Hier wurde α Nac als potentiell Mad1-reprimiertes Gen identifiziert. Es wäre also zu prüfen, ob die Expression von Mad1 tatsächlich den Koaktivator α Nac reprimiert und damit Einfluß auf die Stabilität des c-Jun/ AP-1-Komplexes nimmt.

eEF1- α (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha*) transferiert in seinem GTP-gebundenem Zustand aminoacyl-tRNAs an die A-Stelle des Ribosoms [Merrick et al., 1992]. Zudem wurden noch viele weitere Funktionen von eEF1- α beschrieben. Es wurde z.B. gezeigt, daß eEF1- α in engem Zusammenhang mit Aktinfilamenten [Dharmawardhane et al., 1991], Mikrotubuli [Shiina et al., 1994] und der mitotischen Spindel [Ohta et al., 1990] steht.

Abb. 45.:
Schematische
Darstellung der
postulierten
Funktion von α Nac
in der
transkriptionellen
Aktivierung
 [Moreau et al., 1998].



Außerdem wird angenommen, daß eEF1- α ein Aktivator der Phosphoinositol-Kinase 4 ist [Yang et al., 1994], die UV-induzierte Transformation stimuliert [Tatsuka et al., 1992] und am Ubiquitin-vermittelten Abbau von Proteinen beteiligt ist [Gonen et al., 1994]. Weiterhin ist bekannt, daß es zu den am höchsten exprimierten Proteinen gehört und die beiden Isoformen eEF1- α -1 und eEF1- α -2 zwar auf der Aminosäureebene zu 92% identisch sind, aber unterschiedlich exprimiert sind. eEF1- α -2 korreliert mit terminaler Differenzierung, während eEF1- α -1 in dieser Phase niedrig exprimiert wird [Lee et al., 1993]. eEF1- α -1 wird in fast allen Geweben außer im Skelettmuskel exprimiert, eEF1- α -2 nur in nicht-proliferierenden Geweben wie Hirn, Herz und Muskel.

Es ist daher wichtig zu bemerken, daß im Unigene Screen die Isoform eEF1- α -1 identifiziert wurde, im Klonierungsdurchlauf hingegen ein Fragment von eEF1- α , das als Mad1-aktivierte

Sequenz subtrahiert wurde, aber im Dot Blot ein Hybridisierungssignal vom Typ E ergab. Letzteres erklärt sich dadurch, daß eEF1- α zu den hoch exprimierten *housekeeping genes* wie GAPDH gehört, die aber dennoch zumindest für c-Myc als Zielgene beschrieben worden sind. Es liefert daher auch in der Hybridisierung mit den nicht-subtrahierten Sonden u⁺ und u⁻ ein Signal. Außerdem gehört eEF1- α zu einer Proteinfamilie und hat selbst zwei Isoformen, so daß selbst zwischen s⁺ und s⁻ (den *reverse* und *forward* subtrahierten Populationen) die Hybridisierung keinen Unterschied zeigte. Das gleiche galt für den Northern Blot, der mit einer Sonde aus dem pZero-Klon für eEF1 durchgeführt wurde. Das mag sich nun damit erklären, daß beide Isoformen nun auch noch unterschiedlich differenziell exprimiert werden, mit der eEF1- α -Sonde aber (aufgrund der 92%igen Identität) nicht zwischen beiden Isoformen unterschieden werden kann. So konnte also eEF1- α (wahrscheinlich eEF1- α -2) weder im Dot Blot als Mad1-aktiviertes, noch eEF1- α -1 im Northern als Mad1-reprimiertes Zielgen bestätigt werden.

Wegen der Kreuzaktivität jeglicher eEF1- α -Sonde scheidet also der Northern Blot trotz hoher Expression der eEF1- α -Transkripte als Weg der Verifizierung aus. Um eEF1- α -1 als direktes Zielgen von Mad1 zu bestätigen, könnte eine CHIP durchgeführt werden. Das würde sich anbieten, da trotz der hohen Homologie auf der Proteinebene, die UTRs beider Isoformen sehr unterschiedlich sind.

Bisher wurden in der Promoterregion (etwa -400 bis +1000) von eEF1- α -1 nur SP1 und Ap1 Bindestellen beschrieben [Wakabayashi-Ito et al., 1994]. Innerhalb dieses Bereiches gibt es keine E-Box. Im Blast Search wurden aber für eEF1- α -1 nur genomische Klone gefunden, die das Pseudogen tragen. Somit sind noch keine Angaben möglich, ob nicht weiter upstream doch noch eine E-Box liegt.

Für eEF1- α -2 wurde eine E-Box (gCACGTGa) bei -353 bis -348 beschrieben [Bischoff et al., 2000]. Da eEF1- α -2 aber speziell in differenzierenden Muskelzellen hoch exprimiert ist und möglicherweise die Isoform ist, die über die Klonierungsstrategie gefunden wurde, müßte hier noch eine Verifizierung über z.B. einen Reporter-gen-Assay angeschlossen werden. Neben dem Northern und auch der Light Cycler Methode entfällt nämlich auch die CHIP, da eEF1- α -2 als Mad1-aktiviertes Gen eher ein indirektes Zielgen wäre.

eIF-2 γ -1 (*eukaryotic translation initiation factor 2 gamma 1*) ist eine Isoform von eIF-2 γ . Zusammen mit der alpha und beta Untereinheit formt sich das Heterotrimer eIF-2. eIF-2 ist damit einer von mindestens 12 Faktoren, die an der Initiation der Translation beteiligt sind [Pain et al., 1996]. Zu den drei essentiellen Schritten gehört erstens die Bildung eines Dreier-

Komplexes aus eIF2, Met-tRNA und GTP. Daraufhin erfolgt der Transfer der Met-tRNA auf die 40S ribosomale Untereinheit und drittens die Bildung eines Met-tRNA-40S-mRNA Komplexes. eIF-2 γ scheint hierbei die Bildung des Dreier-Komplexes zu stimulieren und diesen wie auch den tRNA-40S-mRNA Komplex zu stabilisieren. eIF-2 γ -1 wurde später in einem *differential cDNA cloning screen* als ein mit dem Wilms Tumor assoziiertes Gen gefunden, das signifikant höher exprimiert wird, wenn das Wilms Tumor Suppressor Gen WT1 in diesen Tumorzellen mutiert ist [Koesters et al., 1999]. eIF-2 γ -1 ist interessanterweise in einer chromosomalen Region lokalisiert (1p34-p35), die in vielen Tumoren deletiert bzw. fehlreguliert ist (Wilms Tumor, Neuroblastoma, Karzinome der Brust, Leber und des Dickdarms).

Sehr viele der eIFs wurden als c-Myc-Zielgene identifiziert. c-Myc scheint damit ganz generell die Translation an verschiedenen Punkten zu regulieren.

Zur Verifizierung des eIF-2 γ -1 bietet sich die CHIP an, da es als reprimiertes Gen ein direktes Zielgen sein könnte.

Die Aktivierung von Translationfaktoren durch c-Myc wurde zunächst nie in einen speziellen funktionellen Rahmen gestellt. Neue Arbeiten zeigen aber, daß eIF4 ϵ die c-Myc-induzierte Apoptoserate senkt, indem es speziell die Translation von Bcl-2 unterstützt, so daß der mitochondriale Signalweg inhibiert ist [Li et al., 2003]. Da eIF4 ϵ auch als c-Myc-Zielgen identifiziert wurde, wird damit ein Mechanismus bereit gestellt, durch den das Onkoprotein c-Myc die selbst-induzierte Apoptose umgehen könnte. Daher soll hier erwähnt werden, daß im Unigene Screen auch das 4 ϵ -BP1 als Mad1-reprimiertes Gen gefunden wurde. 4 ϵ -BP1 ist ein Repressor von eIF-4 ϵ und damit proapoptotisch wirksam [Li et al., 2002].

PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosom 10*) ist ein ebenso häufig in Tumoren mutiert vorgefundener Tumorsuppressor wie p53 [Cantley et al., 1999]. Viele Arbeiten zeigen, daß es eine Rolle bei der Induktion von Zellzyklusarrest, Apoptose und auch anderen Aspekten wie Zelladhäsion, Migration und Differenzierung spielt [Di Cristofano et al., 2000]. Die meisten Mutationen liegen in der PTP (*protein tyrosine phosphatase*) Domäne von PTEN, die essentiell für die Dephosphorylierung seines eigentlichen *in vivo* Substrates ist: des *second messenger* Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat (PIP-3). PTEN ist damit wesentlich an der Regulation von Apoptose beteiligt (s. Abb. 45.).

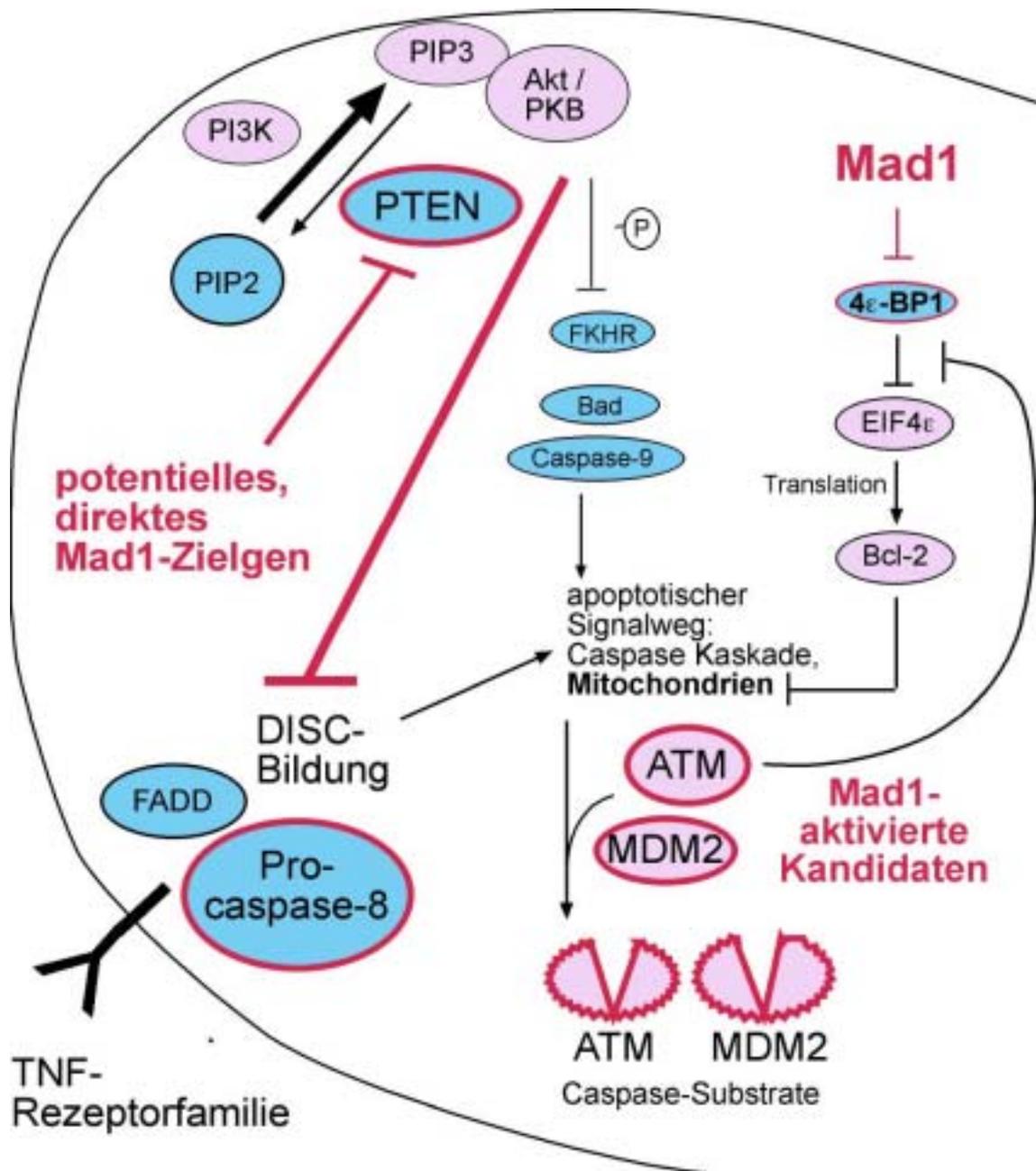


Abb. 46.: Schematische Darstellung der Apoptose-Signalwege und der funktionellen Einordnung möglicher Mad1-Zielproteine wie ATM, PTEN, 4ε-BP1 und MDM2 (rot umrandet).

In ruhenden Zellen ist nämlich die Menge an PIP-3 sehr gering. Stimulation durch Wachstumsfaktoren aktivieren jedoch die PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), die PIP-3 generiert und damit ein Gegenspieler von PTEN ist. PIP-3 wiederum akkumuliert nun an der

Membran und bindet dort unter anderem die Protoonkogen Serin/Threonin Kinase Akt (= PKB). Akt wird dort phosphoryliert und aktiviert und ist nun ein gut charakterisierter *survival factor*. Durch seine antiapoptotische Aktivität hemmt Akt die Freisetzung von Cytochrom c und inaktiviert Forkhead Transkriptionsfaktoren (FKHR), die ansonsten die Transkription proapoptotischer Gene aktivieren. Außerdem phosphoryliert und inaktiviert Akt Bad und Caspase-9. Zentral scheint aber zu sein, daß Akt die Rekrutierung von Pro-Caspase-8 an die DISC verhindert [Jones et al., 2002].

Die Spaltung von Caspase-8 an der DISC (*death inducing signaling complex*) ist nur bei gleichzeitiger Rekrutierung von FADD an die DISC möglich. Der eben beschriebene PIK-3/Akt-Signalweg inhibiert die vollständige Bildung der DISC. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, aber PTEN senkt durch Dephosphorylierung von PIP-3 die aktiven Akt-Mengen und kann sogar zu einer Ligand-unabhängigen Aktivierung des Apoptosesignalweges führen, die aber von intaktem FADD abhängig ist [Stambolic et al., 1998 ; Yuan et al., 2002].

PTEN wurde in der vorliegenden Dissertation mehrfach im Unigene Screen identifiziert, ist bereits als c-Myc-Zielgen beschrieben und konnte hier auch im Northern als zumindest schwach differenziell exprimiert nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daß der Northern relativ schwach ausfällt, obschon PTEN optimal in den auch für Mad1-vorgeschlagenen apoptotischen Signalweg fällt, mag an den eingangs diskutierten Problemen seitens der Tet-OFF-Mad1-Zelllinie liegen. Hier müssen sich nun andere Experimente zur Verifizierung anschließen.

Eine Möglichkeit wäre die ChIP. Das bietet sich an, da eine Analyse des PTEN-Promoters ergab, daß im PTEN *core promoter*, der auch noch das 1. Exon einschließt, eine E-Box (ACACGTGA) liegt.

Eine publizierte Promoterdeletionsstudie zu PTEN [Sheng et al., 2002] zeigt, daß das Fragment, das nahezu alle möglichen Transkriptionsstartstellen enthält, die maximale Luziferaseaktivität aufweist. Ein Promoterfragment, das noch weiter 5' gelegene Basenpaare einschließlich der E-Box enthält, reduziert die maximale Luziferaseaktivität auf etwa 1/3. Dies mag ein Hinweis sein, daß die Repression der Promoteraktivität durch Mad1 vermittelt werden kann. Hier müßten aber weitere Versuche mit Deletionen der E-Box in den entsprechenden Fragmenten angeschlossen werden. PTEN erfüllt damit vier wesentliche Kriterien für einen sehr guten direkten Mad1-Zielgenkandidaten:

1. PTEN wurde nach einer spezifischen Anreicherung im PCR-Select-Verfahren mehrfach als differenziell exprimiert im Unigene Screen identifiziert.
2. PTEN ist bereits als c-Myc-Zielgen beschrieben [Neiman et al., 2001].

3. PTEN zeigt auch im Northern mit der RNA der Tet-OFF-Mad1-Zellen, wenn auch schwach, eine differenzielle Expression seines Transkriptes.

4. Im *core promoter* von PTEN liegt eine E-Box.

Cathepsin O gehört zu der Familie der Proteinasen und scheint eine Rolle im Proteinabbau zu haben. *In vitro* zeigt es die Aktivität einer Cystein Proteinase.

Die besser studierten anderen Familienmitglieder scheinen unter anderem an der Stärke von Tumorerkrankungen beteiligt zu sein, indem sie über ihre enzymatische Aktivität z.B. das Zytoskelett regulieren [Bervar et al., 2003]. Cathepsin O wurde nur einmal im Screen gefunden und ist damit ein recht schwacher Kandidat.

CCT8 (*chaperonin*) gehört zu dem zytosolischen Chaperonin-Komplex, der unter ATP-Verbrauch die korrekte Faltung von Proteinen ermöglicht [Valpuesta et al., 2002]. Zu ihnen gehören nicht nur Strukturproteine wie Aktin und Tubulin, sondern auch Cyclin E [Won et al., 1998]. Außerdem interagiert der Komplex mit dem Von-Hippel-Lindau-Protein, das wiederum Teil des SCF-ähnlichen Degradationskomplexes ist (s.u. VBP1).

CCT8 wurde im Screen als Mad1-reprimiertes Gen gefunden. Damit ist ein wichtiger Zusammenhang zwischen Proteinfaltung und Proliferation, die ja abhängig von Cyclinen und Strukturproteinen ist, gegeben, der hier durch Mad1 antagonistisch zu c-Myc reguliert zu sein scheint.

Außerdem wurde gezeigt, daß auch die korrekte Faltung und Aktivität des HDAC3-SMRT-Komplexes von dem CCT-Komplex abhängig ist [Guenther et al., 2002]. Damit ergibt sich ein Zusammenhang zum *chromosome remodelling*, der wiederum der transkriptionellen Regulation von Genen zugrunde liegt.

Diese Sammlung von Fakten kann lediglich als Anhaltspunkt für eine mögliche Rolle von CCT8 als Mad1-Zielgen dienen; weitere Verifizierungsschritte sind hier unerlässlich.

APEX (*apurinic/apyrimidinic endonuclease*, Ref-1, Hap1) spielt eine wesentliche Rolle bei dem *DNA base excision repair*. Es ist außerdem ein Redoxfaktor, der die DNA-Bindungsaktivität mehrerer Transkriptionsfaktoren wie AP-1, Myb, p53, CREB und ATF stimuliert [Xanthoudakis et al., 1992; Evans, 2000].

Hier wurde es als Mad1-reprimiertes Gen identifiziert. Zur Verifizierung liegen noch keine Daten vor, allerdings wurde APEX auch schon als c-Myc-Zielgen bestätigt. Es finden sich auch

drei E-Boxen im 5'UTR und 1. Exon von APEX [Ikeda et al., 2002]. Daher bieten sich für weitere Verifizierungsschritte ChIP-Analysen an.

BRCA2 (*breast cancer associated protein2*) ist in vielen Brusttumoren mutiert und spielt eine wesentliche Rolle bei der homologen Rekombination und der DNA-Strangbruchreparatur zusammen mit der Rad51 Rekombinase [Lou et al., 2003]. Wie BRCA1 scheint es mit vielen anderen Proteinen wie Tumorsuppressoren (p53, Rb, ATM), Onkoproteinen (c-Myc, E2F, CKII), Zellzyklusregulatoren (Cycline, CDKs), transkriptionellen Aktivatoren und Repressoren (RNAPol II, HDACs) interagieren zu können. Es wurde auch als c-Myc Zielgen beschrieben, hier als Mad1-reprimiertes Gen gefunden. Weitere Verifizierungen sind nötig.

S-Adenosylhomocystein (SAH-) Hydrolase ist ein cytoplasmatisches Enzym und nimmt eine Schlüsselstellung zwischen Transmethylierungsprozessen, dem Transsulfurierungsstoffwechsel und dem Energiestoffwechsel ein. Das Substrat der SAH Hydrolase, SAH, entsteht durch Demethylierung des S-Adosylmethionin (SAM), dem wichtigsten Methylgruppendonator bei Säugetieren. SAH ist an vielen Methylierungsreaktionen beteiligt, die durch Methyltransferasen katalysiert werden und ist selber ein Hemmstoff vieler SAM abhängiger Methyltransferasen. Die Hauptaufgabe der SAH Hydrolase ist die Regulation der intrazellulären SAH Konzentration. Das Enzym katalysiert die reversible Bildung von Adenosin und Homocystein. Das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite der Synthese, unter physiologischen Bedingungen aber wird jedoch die Hydrolyse favorisiert. Adenosin entsteht fortlaufend als ein Metabolit des Energiestoffwechsels. Damit ist über die Kontrolle der Methyltransferasen eine Verbindung zwischen Energiestoffwechsel und Genexpression gegeben (s. Abb. 47.).

Interessante Rückschlüsse auf die Bedeutung der SAH-Hydrolase ergeben sich aus Studien mit spezifischen Inhibitoren [Chiang et al., 1998]. Der Einsatz von solchen Inhibitoren resultiert in einer Anreicherung von SAH und auch von SAM wegen der negativen Rückkopplung. Die Hemmung der SAH-Hydrolase ist pharmakologisch so bedeutsam, weil dadurch eine Blockade der zellulären Methylierung von Phospholipiden, Proteinen, DNA und RNA erreicht wird. Dies korreliert mit einer Induktion zellulärer Differenzierung, einer erhöhten Expression von Transkriptionsfaktoren und teilweise der Repression von Genen. Einige der Inhibitoren zeigten auch antivirale Aktivität. Außerdem zeigen viele Studien eine Inhibierung der Neuroblastoma-Proliferation bei Behandlung mit solchen Inhibitoren [Zhang et al., 1993; Hamre et al., 1995; Mizutani et al., 1995].

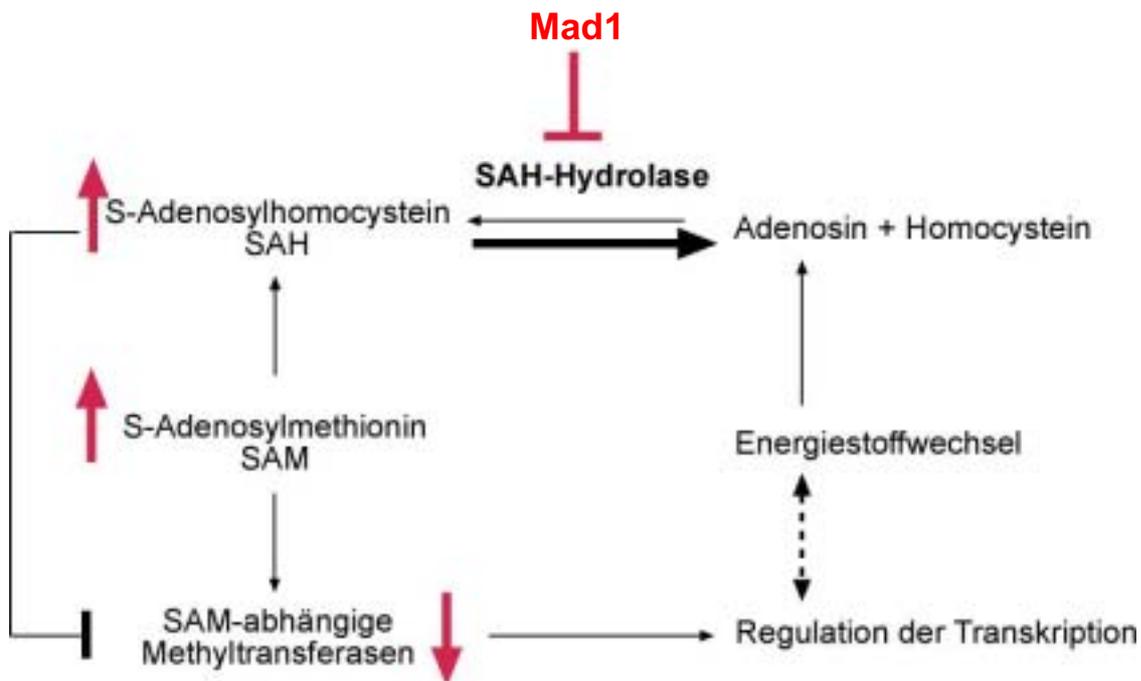


Abb. 47.: Schematische Übersicht über die Wirkungsweise der SAH-Hydrolase.

In diesem Zusammenhang kann Mad1 als Äquivalent zu den SAH-Hydrolase Inhibitoren betrachtet werden. Die SAH-Hydrolase wurde als Mad1-reprimiertes Gen gefunden, ist auch als c-Myc Zielgen beschrieben und bietet sich wie eben erläutert auch funktionell im Kontext von Proliferationsregulation als Mad1-Zielgen an. Eine Verifizierung bietet sich mit der ChIP an.

Spermidin Synthase bildet Spermidin aus Putrescin. Beide gehören zusammen mit Spermin zu den Polyaminen, die essentiell für Zellwachstum und Differenzierung zu sein scheinen. Dabei ist Putrescin der Vorläufer von Spermidin und Spermin und wird durch Decarboxylierung mittels der Ornithin Decarboxylase (ODC), einem klassischen c-Myc-Zielgene, aus Ornithin gebildet. Spermidin wird dann durch Transfer eines Aminopropylrestes vom decarboxylierten S-Adenosylmethionin zu Spermin. Die Spermidin Synthase scheint während der Zellproliferation induziert zu werden, wie z.B. bei Leberregeneration [Hannonen et al., 1972] und Hormon-induziertem Wachstum [Oka et al., 1977]. Außerdem spielen die einzelnen Polyamine eine Rolle bei der Expression spezifischer Wachstums-assoziiierter Gene. So führt z.B. die Verminderung von Spermidin zu einer 60-90%igen Abnahme der c-myc mRNA [Celano et al., 1989]. Der

Einsatz spezifischer Inhibitoren wiederum führt zur Hemmung der Proliferation von z.B. Hirntumorzellen [Feuerstein et al., 1985].

Die Spermidin Synthase wurde hier als Mad1-reprimiertes Gen gefunden. Funktionell paßt sie sehr gut in das Modell, daß Mad1 Proliferation hemmt und auch c-Myc-induzierte Transformation inhibiert. Zur Verifizierung bietet sich also eine ChIP an, da 192 bp vor dem 1. Exon bzw. 274 bp vor dem Translationsstart eine E-Box (cCACGTGg) liegt.

Enolase (MBP-1) ist eines von drei Isoformen in Säugern. Das Gen codiert für die alpha-Enolase, und durch einen alternativen Translationsstart auch für TaucrySTALLIN, ein Strukturprotein der Linse. Die alpha-Enolase katalysiert Schritte in der Gluconeogenese und in der Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese. Außerdem wurde beschrieben, daß die Enolase eine alternativ translatierte Form von MBP-1 (*Myc promoter-binding protein-1*) ist und über seine Bindung an den c-myc Promoter die Expression von c-myc vermindert [Feo et al., 2000].

Hier wurde die Enolase als Mad1-reprimierter Kandidat gefunden. Das Gen ist 23047 bp groß, weist mehrere Exons und mindestens 3 Isoformen auf, wobei die Isoform 1 erst nach dem 3. Exon beginnt. In der Sequenz (AL 356299) wurde eine E-Box (tCACGTGc) gefunden, die im 2. Intron liegt. Diese könnte für eine Verifizierung mittels ChIP genutzt werden, sofern sie auch *in vivo* eine relevante E-Box darstellt.

Bmi-1 und **EZH2** (*enhancer of zeste 2*) gehören beide zu der Gruppe der Polycomb-Proteine (PcG), die multimere Gen-reprimierende Komplexe formen können und somit axiale Musterbildung, Hämatopoese und Zellzyklus regulieren [Pirrotta et al., 1998]. Beide sind zudem an der Lymphomagenese beteiligt.

EZH2 ist hochreguliert in Lymphomen und führt bei Überexpression in B-Zellen zu einer erhöhten Proliferation [Visser et al., 2001]. Es ist schon länger bekannt, daß EZH2 über seine Interaktion mit SAP18 Teil des HDAC-Sin3-Komplexes ist [Wang et al., 2002; van der Vlag et al., 1999] und somit Genrepression vermittelt. Außerdem ist es in Prostatakrebszellen überexprimiert, während eine siRNA-vermittelte Inhibierung zu einer Verminderung der Proliferation führte. Die ektopische Expression von EZH2 wiederum reprimiert ein spezifisches Set von Genen und ist HDAC-abhängig [Varambally et al., 2002].

Bmi-1 wurde ursprünglich als c-Myc kooperierendes Onkoprotein gefunden [Jacobs et al., 1999] und führt ebenso zur Aktivierung von hTERT, allerdings offenbar unabhängig von E-Boxen im hTERT-Promoter [Dimri et al., 2002]. Bmi-1 ist in sich normal teilenden B-Zellen nicht zu

detektieren, aber in neoplastischen B-Zell hochreguliert [van Kemenade et al., 2001]. Umgekehrt wurde gezeigt, daß das Fehlen von Bmi-1 in leukämischen Stamm- und Vorläuferzellen zu einem proliferativen Arrest, Differenzierung und Apoptose führt [Lessard et al., 2003]. Außerdem zeigen aktuelle Knock-out-Studien, daß Bmi-1 essentiell für die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen zu sein scheint und dieser Signalweg die Inhibierung von p16 und p19 einschließt [Park et al., 2003].

Bmi-1 und EZH2 wurden beide im Klonierungs-Dot-Blot-Verfahren bzw. Unigene Screen als Mad1-reprimierte Gene identifiziert. Sie wurden allerdings nicht mehrfach gefunden. Diese Problematik wurde schon oben diskutiert, weswegen weitere Argumente wie ein Zusammenhang mit c-Myc als Zielgen oder Interaktionspartner ebenfalls als Kriterium gelten. Würden sich beide Gene als (indirekte) Zielgene von Mad1 bestätigen, so wäre hier ein Signalweg aufgedeckt, über den Mad1 als Tumorsuppressor fungieren würde, nämlich indem es ungesteuerte Proliferation hemmt.

Für beide Gene konnten bisher keine E-Boxen in den Promoterregionen gefunden werden. Eine CHIP kann daher nicht als nächster Verifizierungsschritt vorgeschlagen werden. Hier bieten sich RT-PCR und Light Cycler an.

ATM (ataxia telangiectasia) ist wohl der prominenteste Sensor von DNA-Doppelstrangbruch-Schäden. Das mutierte ATM-Gen wurde ursprünglich in der multi-systemischen, neuronalen Degeneration AT identifiziert. ATM ist zudem eine Serin/ Threonin-Kinase und neuere Arbeiten zeigen, daß es auch an der Regulation von Streßantwort und Zellzyklus-Checkpoints beteiligt ist [Abraham et al., 2001].

Dabei scheint speziell einzelsträngige DNA (nach UV-induzierten Doppelstrangbrüchen) ATM und damit den p53-Signalweg zu aktivieren [Nur et al., 2003]. ATM stabilisiert durch Phosphorylierung p53. p53 wiederum induziert Gene wie p21, gadd45 und bax, die Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren.

Gäbe es nun durch Mad1 tatsächlich eine Rückkopplung zu ATM, könnte darüber der Mad1-induzierte Zellzyklusarrest erklärt werden. Die Tatsache, daß ATM-Aktivierung mit Apoptose-Induktion korreliert und Mad1 auf der anderen Seite Apoptose inhibiert scheint zunächst widersprüchlich. Allerdings gibt es auch Studien, die zeigen, daß ATM-Überexpression Apoptose inhibiert [Hotti et al., 2000]. Hier wurde auch gezeigt, daß ATM selber ein Substrat von Caspasen ist und degradiert wird. Dies geschieht aber vor dem Hintergrund einer c-Myc-induzierten Apoptose. ATM muß daher vielleicht primär als Sensor von DNA-Schäden speziell durch UV-Strahlung begriffen werden, der dann über p53 Zellzyklusarrest induziert, so daß eine

weitere Proliferation und mögliche Transformation der Zelle vermieden wird. Der zweite durch ATM induzierte Signalweg, die Apoptose, mag davon unabhängig reguliert sein und nicht in jedem Fall von ATM-Aktivierung vorliegen. Diese Frage ist allerdings noch ungeklärt.

Hier soll aber darauf verwiesen werden, daß ATM zwar nicht direkt als c-Myc-Zielgen beschrieben wurde, allerdings wurde gezeigt, daß ATM in dysplastischen Leberzellen von TGF α /c-Myc transgenen Mäusen herunter reguliert ist [Hironaka et al., 2003].

Besonders interessant ist auch eine Studie [Yang et al., 2000], die zeigt, daß ATM im Insulin-stimulierten Signalweg 4 ϵ -BP1 phosphoryliert und damit die Freisetzung von eIF-4 ϵ von 4 ϵ -BP1 bewirkt. Wie im Abschnitt zu eIF-2 γ -1 beschrieben, stimuliert eIF-4 ϵ die Translation von Bcl-2, das wiederum Apoptose hemmt. Außerdem scheint ATM wie PARP und Lamin ein Caspase-Substrat zu sein, d.h. es wird am Ende des Apoptose-Signalweges gespalten und degradiert [Hotti et al., 2000].

ATM wurde in der vorliegenden Dissertation mehrfach im Unigene Screen als bester Kandidat für ein Mad1-aktiviertes-Zielgen gefunden und konnte in ersten Western Blot-Analysen als Mad1-induziertes Protein verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Für den funktionellen Zusammenhang mit Mad1 gibt es zwei Modelle. Zum einen paßt ATM sehr gut in das bisher durch die anderen potentiellen Kandidaten formulierte Modell zur Mad1-regulierten Apoptose (s. Abb. 46.). ATM würde in diesem Modell durch seine Phosphorylierung von 4 ϵ -BP1 die Freisetzung von eIF-4 ϵ bewirken und damit letztendlich Apoptose hemmen. Es wäre auch denkbar, daß die Freisetzung von eIF-4 ϵ auch die Translation anderer Proteine ermöglicht, über die ATM Zellzyklus-Arrest stimulieren könnte. Damit gäbe es eine Möglichkeit, den Mad1-regulierten G1-S-Übergang an ATM zu koppeln, d.h. bei gleichzeitiger Aktivierung von ATM durch DNA-Schäden oder andere Signale würde ein Arrest an diesem Punkt bekräftigt.

Zum anderen mag ATM auch an der Regulation der Proliferation durch Mad1 beteiligt sein, da ATM durch seine Stabilisierung von p53 zu einer Induktion von p21 und damit zum Zellzyklus-Arrest führen kann. Die genaue Entschlüsselung der Rolle von ATM für die verschiedenen Mad1-induzierten Signalwege steht noch aus.

VBP1 (*von Hippel-Lindau binding protein 1*, Prefoldin) wurde im Hefeinteraktionsscreen als Bindungspartner von VHL (*von Hippel-Lindau tumour suppressor protein*) gefunden [Tsuchiya et al., 1996]. Seine genaue Funktion ist aber noch ungeklärt. Es scheint aber an der

Mikrotubulibildung beteiligt zu sein [Geissler et al., 1998; Vainberg et al., 1998 ; Alvarez et al., 1998].

VHL [Kondo et al., 2001] selber liegt in dem von Hippel-Lindau Syndrom mutiert vor. Typische Tumore des Hippel-Lindau Syndroms sind Blutgefäßtumore in der Retina und dem zentralen Nervensystem oder auch Tumore der Niere und des Pankreas. VHL ist die Erkennungsuntereinheit eines SCF-ähnlichen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, der den Abbau von HIF (*hypoxia-inducible factor-1*) vermittelt [Pugh et al., 2003]. Bei Mutationen im VHL-Gen unterbleibt der Abbau von HIF1, was zu einer Anreicherung von HIF1-Zielgenen wie VEGF führt. Dies erklärt auch die angiogene Natur der Tumore.

VBP1 wurde hier im Unigene Screen dreifach unabhängig voneinander gefunden und ist damit ein relativ guter Kandidat für ein Mad1-aktiviertes Zielgen. Bekräftigend kommt hinzu, daß VHL selber ein Myc-reprimiertes Zielgen zu sein scheint. Es kann spekuliert werden, daß VBP1 die Funktionen von VHL unterstützt. Eine neue Studie zeigt, daß VBP1 auch noch an MSH4, ein neues Mitglied der *DNA mismatch repair* (MMR)-Familie bindet [Her et al., 2003]. Mad1 wird somit erneut in einen Zusammenhang mit Detektion von DNA-Schäden und Mikrotubuliaggregation gebracht, die entscheidend für zelluläre Vorgänge wie Mitose und Meiose sind.

Abschließend soll noch erwähnt werden, daß hier keines der beiden gut charakterisierten Mad1-Zielgene, hTERT oder Cyclin D2, gefunden wurde. Dies mag sich dadurch erklären, daß gerade diese beiden Proteine sehr entscheidend sind für eine Transformation, Immortalisierung oder zumindest schnelle Proliferation der Zellen. Da aber die basalen Mengen der Mad1-Expression in dem hier verwendeten Tet-OFF-Mad1-System schon relativ hoch sind (s. Abschnitt 4.1.1.), kann davon ausgegangen werden, daß solche endogenen Signaltransduktionswege wie die eben genannten zuerst desensibilisiert werden, da der Selektionsdruck in der Zellkultur in Richtung Proliferation und Immortalisierung geht. D.h. vielleicht weisen gerade diese Zielgene keine Regulation durch Mad1 mehr auf, weil sie der Selektion unterlagen.

4.2. Regulation des Mad1-HDAC-Komplexes

Nachdem nun unter 4.1. die Identifikation und erste Verifikation von *downstream* Zielgenen von Mad1 dargestellt wurde, sollte in diesem Abschnitt die Regulation von Mad1 selbst untersucht

werden. Aufgrund von Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe Lüscher war bekannt, daß Cyclin E/Cdk2 hier eine Rolle spielen könnte. Im Folgenden sollen nun unter 4.2.1. die in der vorliegenden Dissertation dazu durchgeführten Arbeiten diskutiert werden; unter 4.2.2. dann der dabei gefundenen potentielle, neue Interaktionspartner von HDAC1: Skp2.

4.2.1. HDAC1 und Cyclin E/Cdk2

Zur Interaktion von Cyclin E/Cdk2 und HDAC1 wurden folgende fünf Resultate gewonnen, die hier jeweils in einem Zusammenhang mit anderen Studien diskutiert werden sollen:

1. Die Inhibierung von Mad1 durch Cyclin E/Cdk2 wurde (zusätzlich zu den schon zuvor erhobenen Daten) bestätigt (s. 3.3.1.).

Dieses Resultat scheint sehr sinnvoll, da Cyclin E/Cdk2 als wesentlicher Induktor der S-Phase bekannt ist und durch eine negative Rückkopplung des Cyclins zu Mad1 ein gleichzeitiges *signalling* von konträren Zellzyklusregulatoren verhindert wird. Cyclin E/Cdk2 ist außerdem ein Zielgen von c-Myc, so daß hier indirekt eine Regulation von Mad1 durch c-Myc vorliegt und somit der Schnittpunkt zwischen Differenzierung und Proliferation sehr eng reguliert ist. Die Tatsache, daß in den Mikroinjektionsassays c-Myc selber Mad1 nicht hemmen konnte, mag zum einen daran liegen, daß das Zeitfenster einer möglichen Inhibierung von Mad1 so klein ist, daß die durch c-Myc aktivierte Transkription von Cyclin E/Cdk2 zu spät greifen kann. Zum anderen mag auch die c-Myc-abhängige Aktivierung von Cyclin E/Cdk2 nicht stark genug gewesen sein, um das überexprimierte Mad1 zu inhibieren.

2. Die Interaktion von Cyclin E/Cdk2 und HDAC1 wurde gezeigt (s. 3.3.2.1.).

Dies erfolgte *in vitro* im GST-Pull Down Experiment und *in vivo* in Überexpressionsstudien. Der Nachweis einer *in vivo* Interaktion der endogenen Proteine wurde noch nicht versucht, da zum einen Mad1 in äußerst geringen Mengen in der Zelle vorliegt und zum anderen angenommen wird, daß die Interaktion beider Proteine eine sehr dynamische ist und somit eine stabile Interaktion schwer zu detektieren wäre.

3. Für den Mechanismus der Hemmung von Mad1 durch Cyclin E/Cdk2 wurde eine Regulation der Lokalisation, Degradation und Phosphorylierung von Ser346 ausgeschlossen (s. 3.3.2.).

Diese Punkte wurden vornehmlich geprüft, da sie zu den prominenten Folgen einer Phosphorylierung zählen und hier angenommen wurde, daß zumindest ein Teil des Mechanismus der Cyclin E/Cdk2-vermittelten Hemmung von Mad1 auf der Kinaseaktivität von Cdk2 beruht.

Zur Regulation der Lokalisation gibt es speziell zu HDACs einige Studien. So scheinen zwar HDAC1 und 2 beide ausschließlich im Kern lokalisiert zu sein, da sie kein NES (*nuclear export signal*) tragen. Über eine Regulation des Imports ist aber noch nichts bekannt.

Im Gegensatz dazu sind besonders für HDAC4 und 5 der Klasse II komplexe Shuttle-Mechanismen beschrieben worden, die durch die CaMK-abhängige Phosphorylierung kontrolliert werden, was in einem Export dieser HDACs ins Zytoplasma und ihrem Verbleib dort durch Bindung an 14-3-3 Proteine resultiert [Grozinger et al., 2000; McKinsey et al., 2000; Kao et al., 2001]. Jedoch wurde andererseits auch berichtet, daß durch die Aktivierung des Ras-Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalweges HDAC4 vermehrt im Kern zu finden ist [Zhou et al., 2000].

All diese Fakten hatten in der vorliegenden Arbeit zu der Annahme geführt, daß auch der Transport bzw. die Lokalisation von HDAC1 durch Cyclin E/Cdk2 verändert werden könnte. Das wurde hier jedoch ausgeschlossen (s. Abb. 36.)

Es wurde dann auch die Phosphorylierung von HDAC1 als mögliche Art der Regulation durch Cyclin E/Cdk2 untersucht. Auch hierzu gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, die sich allerdings bisher vornehmlich auf CKII und PKA als Kinasen beschränken.

So ist für HDAC1 und 2 bekannt, daß die Hyperphosphorylierung mit einer geringen aber signifikanten Aktivitätszunahme korreliert, aber zugleich auch die Interaktion zwischen HDAC1 und 2 sowie zwischen HDAC1 und Sin3A/YY1 aufhebt [Galasinski et al., 2002]. Diese kontraproduktive Regulation mag eine bestimmte optimale Menge an HDAC-Aktivität gewährleisten. Außerdem konnten die Autoren hyperphosphoryliertes HDAC1 in mit Nocodazol oder Taxol synchronisierten Zellen anreichern, weswegen eine Rolle von HDAC1-Phosphorylierung während der Mitose angenommen werden kann.

In einer anderen Studie korreliert die Mutation von Ser421 und Ser423, zwei CKII Konsensus-Stellen in der HDAC1-Sequenz, mit reduzierter HDAC1-Aktivität und Komplexbildung [Pflum et al., 2001]. Eine weitere Gruppe zeigte, daß HDAC1 durch CKII und eine cAMP-abhängige Kinase phosphoryliert wird, nicht aber durch PKC, Cdc2 oder eine MAP Kinase. Sie konnten allerdings keinen Einfluß auf die HDAC1-Aktivität beobachten [Cao et al., 2001]. Übereinstimmend damit berichtet eine dritte Gruppe von einer Phosphorylierung von HDAC1 durch CKII und PKA, nicht aber durch PKC [Tsai et al., 2002]. Außerdem beschreiben sie

HDAC1 als PKG-Substrat und HDAC2 als CKII-Substrat *in vitro*. Zumindest für HDAC2 korreliert die Mutation dieser Phosphorylierungsstellen mit einer Abnahme der HDAC2-Aktivität und dem Verlust der Sin3- und Mi2-Bindung, wobei aber kein Einfluß auf transkriptionelle Repression im Reporter-gen-Assay zu sehen war. Man mag hier spekulieren, daß die Phosphorylierung von HDAC2 seine Aktivität auf *in vivo* Promotoren reguliert, indem es die Komplexintegrität stört. Die *in vivo* Situation der Chromatinstruktur ist im Reporter-gen-Assay nicht gegeben, weswegen dieser Assay hier kritisch zu bewerten ist.

Aus all diesen Studien kann zusammengefaßt werden, daß HDAC1 *in vivo* phosphoryliert wird und dies einen Einfluß auf die HDAC-Aktivität und Komplexintegrität haben kann. Zu einer Phosphorylierung durch Cyclin E/Cdk2 gibt es keine Daten. Ser346 konnte in der vorliegenden Arbeit zwar *in vitro* phosphoryliert werden, scheint aber *in vivo* nicht Ursache der Regulation von HDAC1 durch Cyclin E/Cdk2 zu sein.

4. Es wurde stattdessen gezeigt, daß Cyclin E/Cdk2 die Komplex-Integrität des Mad1-HDAC-Komplexes stört, die Bindung einzelner Komplex-Untereinheiten zueinander aufhebt und dadurch indirekt auch die HDAC1-Aktivität reduziert (s. 3.3.2.7.).

Dies korreliert gut mit den eben unter Punkt 3 beschriebenen Daten, daß z.B. die Hyperphosphorylierung von HDAC1 und 2 mit einer Störung der Komplex-Integrität zusammenfällt [Galasinski et al., 2002]. Für den Mad1-HDAC-Komplex ist allerdings das Substrat der Phosphorylierung noch unklar.

5. Der Cyclin E/Cdk2-Effekt scheint nur teilweise auf seiner Kinaseaktivität zu beruhen (s. 3.3.2.7.).

Es konnte zwar eine *in vivo* Relevanz der Phosphorylierung an Ser346 ausgeschlossen werden (bezüglich des Cyclin E/Cdk2-Effektes auf Mad1), allerdings mögen weiterhin andere Phosphoakzeptorstellen in HDAC1 vorliegen bzw. andere Substrate im Komplex von Cyclin E/Cdk2 genutzt werden.

Vor kurzem sind drei neue Untereinheiten des Sin3-Komplexes charakterisiert worden: SAP (*Sin3 associated polypeptide*) 130, SAP180 und SDS3 (SAP45) [Fleischer et al., 2003]. Während die bisher bekannten SAP18 und SAP30 keine *consensus site* für Cyclin E/Cdk2 aufweisen, findet man in den neu publizierten Interaktionspartnern des basalen Sin3-Komplexes viele potentielle Cyclin E/Cdk2-Phosphorylierungsstellen. So sind in den Sequenzen von SDS3 eine (SPKR), von SAP130 zwei (SPRK; SPPK) und von SAP180 vier (SPER; TPTK; SPAR; SPGK) potentielle *consensus sites* enthalten. Es bietet sich daher an, SAP130, SAP180 und SDS3 auf

eine Interaktion mit Cyclin E/Cdk2 zu prüfen, die potentielle *in vivo* Phosphorylierungsstelle zu identifizieren und in den funktionellen Assays (z.B. im Koloniebildungsassay) zu untersuchen, ob die Phosphorylierung dieser Proteine im Mad1-HDAC-Komplex der Angriffspunkt für die Inhibierung durch Cyclin E/Cdk2 sein könnten.

Die Phosphorylierung scheint allerdings nur einen Teil des Effektes von Cyclin E/Cdk2 auf den Mad1-HDAC-Komplex auszumachen, da Cdk2d.n. sowie Cyclin-Box-Mutanten von Cyclin E weiterhin die Komplexintegrität stören können. Hierzu sind noch weitere Arbeiten erforderlich. Auch für andere HDAC-Proteine sind keine Interaktionspartner bekannt, die allein aufgrund ihrer Bindung zu einer Instabilität des HDAC-Komplexes führen.

4.2.2. HDAC1 und Skp2

In Abschnitt 3.3.3. wurde die Interaktion von Skp2 und HDAC1 charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit vermittelt Skp2 nicht offensichtlich die Degradation von HDAC1, sondern scheint umgekehrt stimulierend und stabilisierend zu wirken.

Hier sollen zunächst die klassischen Funktionen von Skp2 skizziert werden, sowie neuere Arbeiten, die mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.3.3. in einen Zusammenhang diskutiert werden sollen.

Skp2 fungiert als Adapterprotein des SCF-Komplexes, der sich aus Skp1, Cull1 und Rbx1/Roc1 zusammensetzt. Skp2 ist eines von über 38 F-Box-Adapterproteinen, die über ihre F-Box (etwa 40 aa) an Skp1 binden und damit den SCF-Komplex an das zu degradierende Protein binden [Jackson et al., 2002]. Solche F-Box-Proteine weisen darüber hinaus noch andere Protein-Protein-Interaktionsdomänen wie Leucin-reiche Regionen und WD-40-Domänen auf, um an ihr Substrat zu binden.

Skp2 wurde zunächst zusammen mit Skp1 als Bindungspartner von Cyclin A/Cdk2 entdeckt, daher der Name "S-Phase Kinase-assoziiertes Protein". Die Induktion von Skp2 erfolgt durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren spät in der G1-Phase und beruht allein auf der Stabilisierung des Proteins, nicht auf transkriptioneller Aktivierung [Wirbelauer et al., 2000]. Zu den Substraten von Skp2 zählen Regulatoren der G1-Progression wie p27 [Carrano et al., 1999; Sutterluty et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999], p21 [Bornstein et al., 2003] und p130 [Bhattacharya et al., 2003], die durch S-Phase Cycline wie Cyclin E und D phosphoryliert wurden, aber auch Cyclin E selbst [Yeh et al., 2001], B-Myb [Charrasse et al., 2000], CDK9 [Kiernan et al., 2001] und E2F-1 [Marti et al., 1999]. Die Expression von Skp2 ist während der

S-Phase maximal und die Mikroinjektion von einem Skp2-Antikörper hemmt den Eintritt in die S-Phase [Zhang et al., 1995]. Auch die Skp2^{-/-} Maus zeigt einen entsprechenden Phänotyp; sie ist kleiner als der Wildtyp und weist große Mengen p27, Cyclin E (nicht an Cdk2 gebunden), Polyploidie und multiple Centrosomen auf [Nakayama et al., 2000]. Skp2 gilt daher als Regulator des G1-S-Überganges.

Skp2 ist in zahlreichen Veröffentlichungen als prognostischer Marker für verschiedene Tumore beschrieben [Shigemasa et al., 2003] und korreliert da mit einer reduzierten Menge von p27; aber die erhöhte Expression von Skp2 führte nicht immer zu einer erhöhten Proliferation, obwohl Skp2 zusammen mit H-Ras transformierend wirkt, also onkogen ist [Gstaiger et al., 2001]. Ein weiterer Aspekt ist, daß Skp2 in transformierten Zellen p21 aus dem üblichen Cyclin A/Cdk2/p21-Komplex verdrängt. Die außerdem durch Skp2-vermittelte Degradation von Cyclin E scheint zunächst konträr zu den allgemein S-Phase und Tumor-assoziierten Daten zu Skp2. Man kann aber vermuten, daß die Bindung von Skp2 z.B. an Cyclin A/Cdk2 zu einem verspäteten Anschalten oder verfrühten Ausschalten von Cyclin A/Cdk2 während der S-Phase führen würde. Damit wäre die korrekte S-Phasenlänge gestört und es könnte zur Transformation kommen. Ebenso ist die Degradation von positiven und negativen Regulatoren des Zellzyklus durch Skp2 eher als Regulation der korrekten Phasenübergänge, als primär einer Induktion von Proliferation zu verstehen.

Eine andere wesentliche Funktion von Skp2 und Skp1 ist ihre Assoziation mit dem Centrosom und der mitotischen Spindel [Gstaiger et al., 1999]. Hier ist aber noch unklar, inwieweit ihre Funktion dort von ihrer Rolle als Proteine des SCF-Komplexes abhängt.

Der einzige, publizierte Interaktionspartner, der nicht Teil des SCF-Komplexes ist oder durch Skp2 degradiert wird, ist bisher CksHs1 [Mongay et al., 2001]. Hier wird eine neue Funktion von Skp2 postuliert, die darin besteht, CksHs1 zu binden, wodurch dessen Bindung an Cyclin/Cdk2-Komplexe verhindert wird. CksHs1 ist ein deutlicher Inhibitor der Cdk2-Aktivität und Skp2 kann durch Abfangen von CksHs1 die Cdk2-Kinaseaktivität wiederherstellen. Damit liegt ein weiterer Mechanismus vor, wie Skp2 die S-Phase-Progression fördern kann. Ein weiterer interessanter Aspekt in dieser Arbeit ist, daß die Bindung von CksHs1 an Skp2 nicht von der F-Box abhängig ist, sondern der C-terminalen Leucin-reichen Region.

Dies erinnert daran, daß auch in der vorliegenden Arbeit HDAC1 im GST-Pull Down an die F-Box-Mutante binden konnte. Und auch hier wurde gezeigt, daß die Bindung von Skp2 an HDAC1 nicht dessen Degradation zur Folge hat und somit eine neue Funktion von Skp2 in diesem Zusammenhang angenommen werden muß.

Zu den Halbwertszeit-Experimenten muß kritisch bemerkt werden, daß theoretisch ein dominant-negativer Effekt der Überexpression von Skp2 bedacht werden muß, d.h. andere essentielle Komplexuntereinheiten könnten in limitierenden Mengen vorliegen, so daß unvollständige Komplexe aufgebaut würden, die z.B. keine Degradation des Zielproteins einleiten und somit zu dessen Stabilisierung führen würden. Allerdings konnte gezeigt werden, daß Skp1, der wesentliche Kofaktor von Skp2, wahrscheinlich im Überschuß in der Zelle vorliegt, also nicht limitierend ist [Yam et al., 1999].

Hinzu kommt, daß selbst bei stabiler Integration im Kolonie-Bildungs-Assay, wo eine Expression von physiologischen Mengen erfolgt, eine synergistische Steigerung der Mad1-vermittelten Inhibierung von Zellwachstum zu beobachten war. Hier kann nun zweierlei vermutet werden. Zum einen, aufbauend auf der Beobachtung, daß Skp2 auch zu einer Stimulation der HDAC1-Aktivität führt, mag dies zu einer gesteigerten biologischen Funktionalität von Mad1 führen. Zum anderen mag Skp2 unabhängig von seiner Interaktion mit HDAC1 z.B. Cyclin E und A degradieren und somit parallel zu Mad1 zu einem Zyklusarrest in der späten G1-Phase führen.

Um den scheinbaren Widerspruch zwischen dem Onkoprotein Skp2 und dem hier postulierten Kofaktor von HDAC1 zu erklären, mag man sich vorstellen, daß zwar in der transformierten Zelle die gleichzeitige Degradation von p21 und p27 den G1-Arrest kompensiert oder sogar dominiert, im Mad1-Kolonie-Bildungs-Assay favorisiert jedoch die gleichzeitige Expression von Mad1 den Zyklusarrest.

Um die Degradation von HDAC1 vor dem Hintergrund, daß die Überexpression von Skp2 doch dominant negativ wirken könnte, zu bestätigen, würde sich ein Ubiquitinierungsassay anbieten. Allerdings würde dies nicht unbedingt Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Degradation zulassen, da z.B. HDAC 4 und 6 *in vitro* und *in vivo* ubiquitiniert werden, aber keine veränderte Halbwertszeit aufweisen [Hook et al., 2002]. Hier mag eine neuer, regulativer Mechanismus der Ubiquitinierung vorliegen. Es ist aber noch unbekannt, ob HDAC1 ubiquitiniert wird. Außerdem interagiert HDAC6, nicht HDAC1 spezifisch mit Polyubiquitin und zwei Proteinen des Ubiquitin Signalweges [Hook et al., 2002; Seigneurin-Berny et al., 2001]. Es wird daher angenommen, daß HDAC6 eine Verbindung zwischen Acetylierung und Ubiquitinierung zur transkriptionellen Regulation herstellt.

Hier sei noch eine andere Modifikation von HDAC1 erwähnt, die Sumoylierung durch SUMO-1 [David et al., 2002]. Dort reduziert die Mutation der Sumoylierungsstelle die HDAC1-vermittelte transkriptionelle Repression in Reporter-gen-Assays, wobei jedoch die Bindung zumindest zu Sin3A bestehen bleibt.

Zum Fragenkomplex über die Bedeutung der Interaktion von HDAC1 und Skp2 stehen noch wesentliche Experimente aus. So müßte geklärt werden, ob neben Skp2 auch andere F-Box-Proteine an HDAC1 binden können. Das gäbe Aufschluß darüber, inwieweit Skp2 eine Sonderstellung unter den F-Box-Proteinen einnimmt und es könnte seine Rolle in der Protein-Degradation von seiner potentiellen Funktion als HDAC1-Kofaktor getrennt werden. Zur Klärung des letzten Punktes, müßten auch weitere biologische Assays mit der F-Box-Mutante durchgeführt werden, z.B. ob das Aufheben der Bindung zwischen HDAC1 und Skp2 Δ F weiterhin von Cyclin E/Cdk2 abhängig ist oder ob auch Skp2 Δ F die Aktivität von HDAC1 steigern kann.

Aufgrund der Ergebnisse aus 3.3. kann hier zusammenfassend aber gesagt werden, daß Cyclin E/Cdk2 den Mad1-HDAC-Komplex inhibiert, indem es seine Integrität stört, damit indirekt auch die HDAC1-Aktivität reduziert und all dies scheint zumindest teilweise von der Kinaseaktivität von Cdk2 abhängig zu sein. Es ist unklar, ob und welche Untereinheit(en) des Komplexes phosphoryliert wird/ werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß zwei der häufig über Phosphorylierung induzierten Parameter hier ausgeschlossen werden können, die Änderung der Lokalisation und die Degradation. Besonders der letzte Punkt der durch Cyclin E/Cdk2 induzierten Degradation von HDAC1 kann relativ sicher ausgeschlossen werden, da seine Halbwertszeit nicht verändert ist und selbst die Überexpression von Skp2, das an HDAC1 bindet, keinen Abbau, sondern eher eine Stimulation der HDAC1-Aktivität bewirkt.

Damit läßt sich der Mechanismus, wie Cyclin E/Cdk2 die Mad1-Funktion inhibiert, auf die Beeinträchtigung der Mad1-HDAC-Komplexintegrität zurückführen.

5. Literaturverzeichnis

Aapola, U., Liiv, I. and Peterson, P. (2002). Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* **30**, 3602-8.

Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* **15**, 2177-96.

Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N. and DePinho, R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**, 49-55.

Alvarez, P., Smith, A., Fleming, J. and Solomon, F. (1998). Modulation of tubulin polypeptide ratios by the yeast protein Pac10p. *Genetics* **149**, 857-64.

Amanullah, A., Liebermann, D. A. and Hoffman, B. (2002). Deregulated c-Myc prematurely recruits both Type I and II CD95/Fas apoptotic pathways associated with terminal myeloid differentiation. *Oncogene* **21**, 1600-10.

Amin, H. M., Saeed, S. and Alkan, S. (2001). Histone deacetylase inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and downregulation of daxx in acute promyelocytic leukaemia with t(15;17). *Br J Haematol* **115**, 287-97.

Aron, J. L., Parthun, M. R., Marcucci, G., Kitada, S., Mone, A. P., Davis, M. E., Shen, T., Murphy, T., Wickham, J., Kanakry, C. et al. (2003). Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase-8-mediated apoptosis and downregulation of c-FLIP protein. *Blood*.

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

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

Bartl, S., Taplick, J., Lagger, G., Khier, H., Kuchler, K. and Seiser, C. (1997). Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. *Mol Cell Biol* **17**, 5033-43.

Bejarano, M. T., Albiñ, A., Cornvik, T., Brijker, S. O., Asker, C., Osorio, L. M. and Henriksson, M. (2000). Inhibition of cell growth and apoptosis by inducible expression of the transcriptional repressor Mad1. *Exp Cell Res* **260**, 61-72.

Bereshchenko, O. R., Gu, W. and Dalla-Favera, R. (2002). Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet* **32**, 606-13.

Bervar, A., Zajc, I., Sever, N., Katunuma, N., Sloane, B. F. and Lah, T. T. (2003). Invasiveness of transformed human breast epithelial cell lines is related to cathepsin B and inhibited by cysteine proteinase inhibitors. *Biol Chem* **384**, 447-55.

Bhattacharya, S., Garriga, J., Calbo, J., Yong, T., Haines, D. S. and Grana, X. (2003). SKP2 associates with p130 and accelerates p130 ubiquitylation and degradation in human cells. *Oncogene* **22**, 2443-51.

Bian, J., Zhang, B. and Chen, S. (1999). [Antisense oligonucleotides inhibit c-myc and PCNA expression in the vascular smooth muscle cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **79**, 10-4.

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

- Bischoff, C., Kahns, S., Lund, A., Jorgensen, H. F., Praestegaard, M., Clark, B. F. and Leffers, H.** (2000). The human elongation factor 1 A-2 gene (EEF1A2): complete sequence and characterization of gene structure and promoter activity. *Genomics* **68**, 63-70.
- Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D. R.** (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* **359**, 552-4.
- 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**, 1211-7.
- Bonni, S., Wang, H. R., Causing, C. G., Kavsak, P., Stroschein, S. L., Luo, K. and Wrana, J. L.** (2001). TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat Cell Biol* **3**, 587-95.
- Boon, K., Caron, H. N., van Asperen, R., Valentijn, L., Hermus, M. C., van Sluis, P., Roobeek, I., Weis, I., Voute, P. A., Schwab, M. et al.** (2001). N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo J* **20**, 1383-93.
- Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M. and Hershko, A.** (2003). Role of SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 during S-phase. *J Biol Chem*.
- 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**, 2042-7.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M.** (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* **18**, 5321-33.
- Bousset, K., Henriksson, M., Luscher-Firzlaff, J. M., Litchfield, D. W. and Luscher, B.** (1993). Identification of casein kinase II phosphorylation sites in Max: effects on DNA-binding kinetics of Max homo- and Myc/Max heterodimers. *Oncogene* **8**, 3211-20.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y. and Ogryzko, V.** (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* **396**, 594-8.
- Cairo, S., Merla, G., Urbinati, F., Ballabio, A. and Reymond, A.** (2001). WBSCR14, a gene mapping to the Williams--Beuren syndrome deleted region, is a new member of the Mlx transcription factor network. *Hum Mol Genet* **10**, 617-27.
- Cantley, L. C. and Neel, B. G.** (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4240-5.
- Cao, Y. Z., Cohen, Z. S., Weaver, J. A. and Sordillo, L. M.** (2001). Selenium modulates 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF) biosynthesis in bovine aortic endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* **3**, 1147-52.
- Caron, H., van Schaik, B., van der Mee, M., Baas, F., Riggins, G., van Sluis, P., Hermus, M. C., van Asperen, R., Boon, K., Voute, P. A. et al.** (2001). The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science* **291**, 1289-92.
- Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A. and Pagano, M.** (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* **1**, 193-9.
- Carrano, A. C. and Pagano, M.** (2001). Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol* **153**, 1381-90.
- Celano, P., Berchtold, C. M., Giardiello, F. M. and Casero, R. A., Jr.** (1989). Modulation of growth gene expression by selective alteration of polyamines in human colon carcinoma cells. *Biochem*

Biophys Res Commun **165**, 384-90.

Cerni, C., Bousset, K., Seelos, C., Burkhardt, H., Henriksson, M. and Luscher, B. (1995). Differential effects by Mad and Max on transformation by cellular and viral oncoproteins. *Oncogene* **11**, 587-96.

Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L. and Jacobson, M. K. (1996). Glycation and glycooxidation of histones by ADP-ribose. *J Biol Chem* **271**, 10461-9.

Charrasse, S., Carena, I., Brondani, V., Klempnauer, K. H. and Ferrari, S. (2000). Degradation of B-Myb by ubiquitin-mediated proteolysis: involvement of the Cdc34-SCF(p45Skp2) pathway. *Oncogene* **19**, 2986-95.

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

Chen, J., Willingham, T., Margraf, L. R., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A. and Nisen, P. D. (1995). Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. *Nat Med* **1**, 638-43.

Chiang, P. K. (1998). Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther* **77**, 115-34.

Choi, J. H., Kwon, H. J., Yoon, B. I., Kim, J. H., Han, S. U., Joo, H. J. and Kim, D. Y. (2001). Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* **92**, 1300-4.

Clark, W., Black, E. J., MacLaren, A., Kruse, U., LaThangue, N., Vogt, P. K. and Gillespie, D. A. (2000). v-Jun overrides the mitogen dependence of S-phase entry by deregulating retinoblastoma protein phosphorylation and E2F-pocket protein interactions as a consequence of enhanced cyclin E-cdk2 catalytic activity. *Mol Cell Biol* **20**, 2529-42.

Coller, H. A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E. S., Eisenman, R. N. and Golub, T. R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3260-5.

Cong, Y. S. and Bacchetti, S. (2000). Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem* **275**, 35665-8.

Connell-Crowley, L., Harper, J. W. and Goodrich, D. W. (1997). Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell* **8**, 287-301.

Dang, C. V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**, 1-11.

Dangond, F., Henriksson, M., Zardo, G., Caiafa, P., Ekstrom, T. J. and Gray, S. G. (2001). Differential expression of class I HDACs: roles of cell density and cell cycle. *Int J Oncol* **19**, 773-7.

David, G., Neptune, M. A. and DePinho, R. A. (2002). SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities. *J Biol Chem* **277**, 23658-63.

Davie, J. R. and Chadee, D. N. (1998). Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**, 203-13.

Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R. and Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* **7**, 671-82.

de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. and van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-49.

Deng, J. M. and Behringer, R. R. (1995). An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res* **4**, 264-9.

Denisenko, O. N., O'Neill, B., Ostrowski, J., Van Seuning, I. and Bomsztyk, K. (1996). Zik1, a transcriptional repressor that interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle K protein. *J Biol Chem* **271**, 27701-6.

Dharmawardhane, S., Demma, M., Yang, F. and Condeelis, J. (1991). Compartmentalization and actin binding properties of ABP-50: the elongation factor-1 alpha of Dictyostelium. *Cell Motil Cytoskeleton* **20**, 279-88.

Di Cristofano, A. and Pandolfi, P. P. (2000). The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* **100**, 387-90.

Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. et al. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6025-30.

Dimri, G. P., Martinez, J. L., Jacobs, J. J., Keblusek, P., Itahana, K., Van Lohuizen, M., Campisi, J., Wazer, D. E. and Band, V. (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **62**, 4736-45.

Duguid, J. R. and Dinauer, M. C. (1990). Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res* **18**, 2789-92.

Eberharter, A. and Becker, P. B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* **3**, 224-9.

Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R. and Bishop, J. M. (1989). Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* **340**, 66-8.

Eilers, M., Schirm, S. and Bishop, J. M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *Embo J* **10**, 133-41.

Evans, A. R., Limp-Foster, M. and Kelley, M. R. (2000). Going APE over ref-1. *Mutat Res* **461**, 83-108.

Facchini, L. M. and Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* **12**, 633-51.

Feo, S., Arcuri, D., Piddini, E., Passantino, R. and Giallongo, A. (2000). ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* **473**, 47-52.

Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A. and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* **17**, 1115-29.

Feuerstein, B. G., Deen, D. F. and Marton, L. J. (1985). Effects of dicyclohexylamine sulfate, a spermidine synthase inhibitor, in 9L rat brain tumor cells. *Cancer Res* **45**, 4950-4.

Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R. and Pavletich, N. P. (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-93.

Fleischer, T. C., Yun, U. J. and Ayer, D. E. (2003). Identification and Characterization of Three New Components of the mSin3A Corepressor Complex. *Mol Cell Biol* **23**, 3456-67.

Fletcher, T. M. and Hansen, J. C. (1996). The nucleosomal array: structure/function

relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **6**, 149-88.

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

Galasinski, S. C., Resing, K. A., Goodrich, J. A. and Ahn, N. G. (2002). Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem* **277**, 19618-26.

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**, 10413-20.

Geissler, S., Siegers, K. and Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *Embo J* **17**, 952-66.

Gonen, H., Smith, C. E., Siegel, N. R., Kahana, C., Merrick, W. C., Chakraborty, K., Schwartz, A. L. and Ciechanover, A. (1994). Protein synthesis elongation factor EF-1 alpha is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N alpha-acetylated proteins and may be substituted for by the bacterial elongation factor EF-Tu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7648-52.

Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P. and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 653-99.

Grandori, C., Mac, J., Siebelt, F., Ayer, D. E. and Eisenman, R. N. (1996). Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites in vivo. *Embo J* **15**, 4344-57.

Greenberg, R. A., O'Hagan, R. C., Deng, H., Xiao, Q., Hann, S. R., Adams, R. R., Lichtsteiner, S., Chin, L., Morin, G. B. and DePinho, R. A. (1999). Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* **18**, 1219-26.

Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2000). Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7835-40.

Gstaiger, M., Jordan, R., Lim, M., Catzavelos, C., Mestan, J., Slingerland, J. and Krek, W. (2001). Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5043-8.

Gstaiger, M., Marti, A. and Krek, W. (1999). Association of human SCF(SKP2) subunit p19(SKP1) with interphase centrosomes and mitotic spindle poles. *Exp Cell Res* **247**, 554-62.

Gu, W. and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606.

Guenther, M. G., Lane, W. S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M. A. and Shiekhhattar, R. (2000). A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* **14**, 1048-57.

Guenther, M. G., Yu, J., Kao, G. D., Yen, T. J. and Lazar, M. A. (2002). Assembly of the SMRT-histone deacetylase 3 repression complex requires the TCP-1 ring complex. *Genes Dev* **16**, 3130-5.

Gunes, C., Lichtsteiner, S., Vasserot, A. P. and Englert, C. (2000). Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res* **60**, 2116-21.

Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N. H., Dang, C. V. and Liu, E. T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res* **60**, 5922-8.

Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A. and Sverdlov, E. D. (1996). Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem* **240**, 90-7.

Hall, C., Nelson, D. M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J. A., Seeholzer, S., Lipinski, M. and Adams, P. D. (2001). HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol Cell Biol* **21**, 1854-65.

Hamre, M. R., Clark, S. H. and Mirkin, B. L. (1995). Resistance to inhibitors of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in C1300 murine neuroblastoma tumor cells is associated with increased methionine adenosyltransferase activity. *Oncol Res* **7**, 487-92.

Hannonen, P., Raina, A. and Janne, J. (1972). Polyamine synthesis in the regenerating rat liver: stimulation of S-adenosyl methionine decarboxylase, and spermidine and spermine synthases after partial hepatectomy. *Biochim Biophys Acta* **273**, 84-90.

Hara, E., Yamaguchi, T., Tahara, H., Tsuyama, N., Tsurui, H., Ide, T. and Oda, K. (1993). DNA-DNA subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-Latex and PCR: identification of cellular genes which are overexpressed in senescent human diploid fibroblasts. *Anal Biochem* **214**, 58-64.

Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L. and Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* **89**, 341-7.

Henriksson, M. and Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* **68**, 109-82.

Her, C., Wu, X., Griswold, M. D. and Zhou, F. (2003). Human MutS homologue MSH4 physically interacts with von Hippel-Lindau tumor suppressor-binding protein 1. *Cancer Res* **63**, 865-72.

Hermeking, H. and Eick, D. (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* **265**, 2091-3.

Hironaka, K., Factor, V. M., Calvisi, D. F., Conner, E. A. and Thorgeirsson, S. S. (2003). Dysregulation of DNA Repair Pathways in a Transforming Growth Factor alpha/c-myc Transgenic Mouse Model of Accelerated Hepatocarcinogenesis. *Lab Invest* **83**, 643-54.

Hobert, O., Jallal, B., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1994). Novel signaling pathway suggested by SH3 domain-mediated p95^{vav}/heterogeneous ribonucleoprotein K interaction. *J Biol Chem* **269**, 20225-8.

Hollenbach, A. D., McPherson, C. J., Mientjes, E. J., Iyengar, R. and Grosveld, G. (2002). Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* **115**, 3319-30.

Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P. and Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* **268**, 305-14.

Hook, S. S., Oran, A., Cowley, S. M. and Eisenman, R. N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13425-30.

Horikawa, I., Cable, P. L., Mazur, S. J., Appella, E., Afshari, C. A. and Barrett, J. C. (2002). Downstream E-box-mediated regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transcription: evidence for an endogenous mechanism of transcriptional repression. *Mol Biol Cell* **13**, 2585-97.

Hotti, A., Jarvinen, K., Siivola, P. and Holttä, E. (2000). Caspases and mitochondria in c-Myc-induced apoptosis: identification of ATM as a new target of caspases. *Oncogene* **19**, 2354-62.

Huang, N., Katz, J. P., Martin, D. R. and Wu, G. D. (1997). Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* **9**, 27-36.

Hurlin, P. J., Queva, C. and Eisenman, R. N. (1997). Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes Dev* **11**, 44-58.

Hurlin, P. J., Queva, C. and Eisenman, R. N. (1997). Mnt: a novel Max-interacting protein and Myc antagonist. *Curr Top Microbiol Immunol* **224**, 115-21.

Hurlin, P. J., Queva, C., Koskinen, P. J., Steingrimsson, E., Ayer, D. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Eisenman, R. N. (1995). Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *Embo J* **14**, 5646-59.

Hurlin, P. J., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Eisenman, R. N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo J* **18**, 7019-28.

Ikeda, S., Ayabe, H., Mori, K., Seki, Y. and Seki, S. (2002). Identification of the functional elements in the bidirectional promoter of the mouse O-sialoglycoprotein endopeptidase and APEX nuclease genes. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 785-91.

Ingvarsson, S. (1990). The myc gene family proteins and their role in transformation and differentiation. *Semin Cancer Biol* **1**, 359-69.

Irmiler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C. et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-5.

Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C. H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E. and Yao, T. P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo J* **21**, 6236-45.

Ito, K., Barnes, P. J. and Adcock, I. M. (2000). Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* **20**, 6891-903.

Jackson, P. K. and Eldridge, A. G. (2002). The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Mol Cell* **9**, 923-5.

Jacobs, J. J., Scheijen, B., Voncken, J. W., Kieboom, K., Berns, A. and van Lohuizen, M. (1999). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev* **13**, 2678-90.

James, L. and Eisenman, R. N. (2002). Myc and Mad bHLHZ domains possess identical DNA-binding specificities but only partially overlapping functions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10429-34.

Jason, L. J., Moore, S. C., Lewis, J. D., Lindsey, G. and Ausio, J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* **24**, 166-74.

Johnson, C. A., White, D. A., Lavender, J. S., O'Neill, L. P. and Turner, B. M. (2002). Human class I histone deacetylase complexes show enhanced catalytic activity in the presence of ATP and co-immunoprecipitate with the ATP-dependent chaperone protein Hsp70. *J Biol Chem* **277**, 9590-7.

Jones, R. G., Elford, A. R., Parsons, M. J., Wu, L., Krawczyk, C. M., Yeh, W. C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J. R. and Ohashi, P. S. (2002). CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp*

Med **196**, 335-48.

Kao, H. Y., Verdel, A., Tsai, C. C., Simon, C., Juguilon, H. and Khochbin, S. (2001). Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J Biol Chem* **276**, 47496-507.

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**, 5914-20.

Kelly, W. K., O'Connor, O. A. and Marks, P. A. (2002). Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 1695-713.

Kiernan, R. E., Emiliani, S., Nakayama, K., Castro, A., Labbe, J. C., Lorca, T., Nakayama Ki, K. and Benkirane, M. (2001). Interaction between cyclin T1 and SCF(SKP2) targets CDK9 for ubiquitination and degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* **21**, 7956-70.

Kitagawa, M., Higashi, H., Jung, H. K., Suzuki-Takahashi, I., Ikeda, M., Tamai, K., Kato, J., Segawa, K., Yoshida, E., Nishimura, S. et al. (1996). The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *Embo J* **15**, 7060-9.

Klefstrom, J., Verschuren, E. W. and Evan, G. (2002). c-Myc augments the apoptotic activity of cytosolic death receptor signaling proteins by engaging the mitochondrial apoptotic pathway. *J Biol Chem* **277**, 43224-32.

Klochender-Yeivin, A. and Yaniv, M. (2001). Chromatin modifiers and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta* **1551**, M1-10.

Koesters, R., Adams, V., Betts, D., Moos, R., Schmid, M., Siermann, A., Hassam, S., Weitz, S., Lichter, P., Heitz, P. U. et al. (1999). Human eukaryotic initiation factor EIF2C1 gene: cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal bands 1p34-p35, and expression. *Genomics* **61**, 210-8.

Kohl, N. E., Kanda, N., Schreck, R. R., Bruns, G., Latt, S. A., Gilbert, F. and Alt, F. W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* **35**, 359-67.

Kondo, K. and Kaelin, W. G., Jr. (2001). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res* **264**, 117-25.

Koskinen, P. J., Ayer, D. E. and Eisenman, R. N. (1995). Repression of Myc-Ras cotransformation by Mad is mediated by multiple protein-protein interactions. *Cell Growth Differ* **6**, 623-9.

Koyama, Y., Adachi, M., Sekiya, M., Takekawa, M. and Imai, K. (2000). Histone deacetylase inhibitors suppress IL-2-mediated gene expression prior to induction of apoptosis. *Blood* **96**, 1490-5.

Krecic, A. M. and Swanson, M. S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 363-71.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**, 20633-40.

Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* **22**, 835-48.

Kwon, H. J., Kim, M. and Kim, D. H. (2003). Histone Deacetylase in Carcinogenesis and Its Inhibitors as Anti-cancer Agents. *J Biochem Mol Biol* **36**, 110-9.

Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H. and Inoue, M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse

transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res* **28**, 669-77.

Laherty, C. D., Billin, A. N., Lavinsky, R. M., Yochum, G. S., Bush, A. C., Sun, J. M., Mullen, T. M., Davie, J. R., Rose, D. W., Glass, C. K. et al. (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell* **2**, 33-42.

Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E. and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **89**, 349-56.

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**, 5503-7.

Lai, A., Kennedy, B. K., Barbie, D. A., Bertos, N. R., Yang, X. J., Theberge, M. C., Tsai, S. C., Seto, E., Zhang, Y., Kuzmichev, A. et al. (2001). RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Mol Cell Biol* **21**, 2918-32.

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.

Larsson, L. G., Pettersson, M., Oberg, F., Nilsson, K. and Luscher, B. (1994). Expression of mad, mxi1, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc. *Oncogene* **9**, 1247-52.

Lee, S., LeBlanc, A., Duttaroy, A. and Wang, E. (1995). Terminal differentiation-dependent alteration in the expression of translation elongation factor-1 alpha and its sister gene, S1, in neurons. *Exp Cell Res* **219**, 589-97.

Lee, S., Wolfrain, L. A. and Wang, E. (1993). Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development. *J Biol Chem* **268**, 24453-9.

Lee, T. C. and Ziff, E. B. (1999). Mxi1 is a repressor of the c-Myc promoter and reverses activation by USF. *J Biol Chem* **274**, 595-606.

Lehrmann, H., Pritchard, L. L. and Harel-Bellan, A. (2002). Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res* **86**, 41-65.

Lessard, J. and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*.

Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P. and Wong, J. (2002). Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev* **16**, 687-92.

Li, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J. M., Qin, J. and Wong, J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *Embo J* **19**, 4342-50.

Li, S., Sonenberg, N., Gingras, A. C., Peterson, M., Avdulov, S., Polunovsky, V. A. and Bitterman, P. B. (2002). Translational control of cell fate: availability of phosphorylation sites on translational repressor 4E-BP1 governs its proapoptotic potency. *Mol Cell Biol* **22**, 2853-61.

Li, S., Takasu, T., Perlman, D. M., Peterson, M. S., Burrichter, D., Avdulov, S., Bitterman, P. B. and Polunovsky, V. A. (2003). Translation factor eIF4E rescues cells from Myc-dependent apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *J Biol Chem* **278**, 3015-22.

Liang, P. and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967-71.

Lou, Z., Chen, J. and Last Name Fn, F. M. (2003). Brca proteins and DNA damage checkpoints.

Front Biosci **8**, S718-21.

Luo, R. X., Postigo, A. A. and Dean, D. C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**, 463-73.

Luscher, B. and Larsson, L. G. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* **18**, 2955-66.

Ma, T., Van Tine, B. A., Wei, Y., Garrett, M. D., Nelson, D., Adams, P. D., Wang, J., Qin, J., Chow, L. T. and Harper, J. W. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev* **14**, 2298-313.

Mandal, M., Vadlamudi, R., Nguyen, D., Wang, R. A., Costa, L., Bagheri-Yarmand, R., Mendelsohn, J. and Kumar, R. (2001). Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function. *J Biol Chem* **276**, 9699-704.

Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M. and Krek, W. (1999). Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* **1**, 14-9.

McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. and Olson, E. N. (2000). Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* **408**, 106-11.

Menegay, H., Moeslein, F. and Landreth, G. (1999). The dual specificity protein kinase CLK3 is abundantly expressed in mature mouse spermatozoa. *Exp Cell Res* **253**, 463-73.

Menssen, A. and Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6274-9.

Merrick, W. C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* **56**, 291-315.

Michaelson, J. S. and Leder, P. (2003). RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* **116**, 345-52.

Michelotti, E. F., Michelotti, G. A., Aronsohn, A. I. and Levens, D. (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol Cell Biol* **16**, 2350-60.

Mishra, N., Brown, D. R., Olorenshaw, I. M. and Kammer, G. M. (2001). Trichostatin A reverses skewed expression of CD154, interleukin-10, and interferon-gamma gene and protein expression in lupus T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2628-33.

Miyake, S., Sellers, W. R., Safran, M., Li, X., Zhao, W., Grossman, S. R., Gan, J., DeCaprio, J. A., Adams, P. D. and Kaelin, W. G., Jr. (2000). Cells degrade a novel inhibitor of differentiation with E1A-like properties upon exiting the cell cycle. *Mol Cell Biol* **20**, 8889-902.

Mizutani, Y., Masuoka, S., Imoto, M., Kawada, M. and Umezawa, K. (1995). Induction of erythroid differentiation in leukaemic K562 cells by an S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, aristeromycin. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 69-74.

Mongay, L., Plaza, S., Vigorito, E., Serra-Pages, C. and Vives, J. (2001). Association of the cell cycle regulatory proteins p45(SKP2) and CksHs1. Functional effect on CDK2 complex formation and kinase activity. *J Biol Chem* **276**, 25030-6.

Moreau, A., Yotov, W. V., Glorieux, F. H. and St-Arnaud, R. (1998). Bone-specific expression of the alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiating c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* **18**, 1312-21.

Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E. and Chalifour, L. (1994). Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun* **199**, 564-9.

- Mueller, R. D., Yasuda, H., Hatch, C. L., Bonner, W. M. and Bradbury, E. M.** (1985). Identification of ubiquitinated histones 2A and 2B in *Physarum polycephalum*. Disappearance of these proteins at metaphase and reappearance at anaphase. *J Biol Chem* **260**, 5147-53.
- Muzio, M.** (1998). Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res* **28**, 141-7.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. and Dixit, V. M.** (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**, 2926-30.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N. et al.** (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* **19**, 2069-81.
- Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O. W., Bertness, V., Hollis, G. F. and Minna, J. D.** (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* **318**, 69-73.
- Neiman, P. E., Ruddell, A., Jasoni, C., Loring, G., Thomas, S. J., Brandvold, K. A., Lee, R., Burnside, J. and Delrow, J.** (2001). Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6378-83.
- Nikiforov, M. A., Popov, N., Kotenko, I., Henriksson, M. and Cole, M. D.** (2003). The Mad and Myc basic domains are functionally equivalent. *J Biol Chem* **278**, 11094-9.
- Nur, E. K. A., Li, T. K., Zhang, A., Qi, H., Hars, E. S. and Liu, L. F.** (2003). Single-stranded DNA induces ataxia telangiectasia mutant (ATM)/p53-dependent DNA damage and apoptotic signals. *J Biol Chem* **278**, 12475-81.
- O'Connell, B. C., Cheung, A. F., Simkevich, C. P., Tam, W., Ren, X., Mateyak, M. K. and Sedivy, J. M.** (2003). A Large Scale Genetic Analysis of c-Myc-regulated Gene Expression Patterns. *J Biol Chem* **278**, 12563-73.
- O'Hagan, R. C., Schreiber-Agus, N., Chen, K., David, G., Engelman, J. A., Schwab, R., Alland, L., Thomson, C., Ronning, D. R., Sacchettini, J. C. et al.** (2000). Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nat Genet* **24**, 113-9.
- Oh, S., Song, Y. H., Yim, J. and Kim, T. K.** (2000). Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* **19**, 1485-90.
- Ohta, K., Toriyama, M., Miyazaki, M., Murofushi, H., Hosoda, S., Endo, S. and Sakai, H.** (1990). The mitotic apparatus-associated 51-kDa protein from sea urchin eggs is a GTP-binding protein and is immunologically related to yeast polypeptide elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem* **265**, 3240-7.
- Oka, T., Perry, J. W. and Kano, K.** (1977). Hormonal regulation of spermidine synthase during the development of mouse mammary epithelium in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **79**, 979-86.
- Okuda, M., Horn, H. F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A. G., Chan, P. K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Snyder, J. D., Bove, K. E. et al.** (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**, 127-40.
- Orian, A., Van Steensel, B., Delrow, J., Bussemaker, H. J., Li, L., Sawado, T., Williams, E., Loo, L. W., Cowley, S. M., Yost, C. et al.** (2003). Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev* **17**, 1101-14.
- Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A. and Dang, C. V.** (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* **275**, 21797-800.

- Ostrowski, J., Schullery, D. S., Denisenko, O. N., Higaki, Y., Watts, J., Aebersold, R., Stempka, L., Gschwendt, M. and Bomsztyk, K.** (2000). Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogenous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *J Biol Chem* **275**, 3619-28.
- Pain, V. M.** (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* **236**, 747-71.
- Pardee, A. B.** (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-8.
- Park, I. K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J. and Clarke, M. F.** (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P. and Hartwell, L. H.** (1997). When checkpoints fail. *Cell* **88**, 315-21.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G. and Evan, G.** (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* **3**, 565-77.
- Pelengaris, S., Rudolph, B. and Littlewood, T.** (2000). Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 100-5.
- Pflum, M. K., Tong, J. K., Lane, W. S. and Schreiber, S. L.** (2001). Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J Biol Chem* **276**, 47733-41.
- Pirrotta, V.** (1998). Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell* **93**, 333-6.
- Prendergast, G. C.** (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* **18**, 2967-87.
- Prendergast, G. C., Lawe, D. and Ziff, E. B.** (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* **65**, 395-407.
- Pugh, C. W. and Ratcliffe, P. J.** (2003). The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol* **13**, 83-9.
- Queva, C., McArthur, G. A., Ramos, L. S. and Eisenman, R. N.** (1999). Dwarfism and dysregulated proliferation in mice overexpressing the MYC antagonist MAD1. *Cell Growth Differ* **10**, 785-96.
- Robertson, K. D.** (2002). DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**, 5361-79.
- Robzyk, K., Recht, J. and Osley, M. A.** (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**, 501-4.
- Rohn, J. L., Hueber, A. O., McCarthy, N. J., Lyon, D., Navarro, P., Burgering, B. M. and Evan, G. I.** (1998). The opposing roles of the Akt and c-Myc signalling pathways in survival from CD95-mediated apoptosis. *Oncogene* **17**, 2811-8.
- Roussel, M. F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J., Eisenman, R. N. and Ayer, D. E.** (1996). Inhibition of cell proliferation by the Mad1 transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* **16**, 2796-801.
- Roussel, M. F., Cleveland, J. L., Shurtleff, S. A. and Sherr, C. J.** (1991). Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling. *Nature* **353**, 361-3.
- Roy, B. and Reisman, D.** (1995). Inducible expression of Mad accelerates growth arrest of serum deprived human glioblastoma cells. *Cell Biol Int* **19**, 307-13.

- Rudolph, B., Saffrich, R., Zwicker, J., Henglein, B., Muller, R., Ansorge, W. and Eilers, M.** (1996). Activation of cyclin-dependent kinases by Myc mediates induction of cyclin A, but not apoptosis. *Embo J* **15**, 3065-76.
- Ruffner, H., Jiang, W., Craig, A. G., Hunter, T. and Verma, I. M.** (1999). BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. *Mol Cell Biol* **19**, 4843-54.
- Rupnow, B. A., Alarcon, R. M., Giaccia, A. J. and Knox, S. J.** (1998). p53 mediates apoptosis induced by c-Myc activation in hypoxic or gamma irradiated fibroblasts. *Cell Death Differ* **5**, 141-7.
- Sarcevic, B., Mawson, A., Baker, R. T. and Sutherland, R. L.** (2002). Regulation of the ubiquitin-conjugating enzyme hHR6A by CDK-mediated phosphorylation. *Embo J* **21**, 2009-18.
- Sargent, T. D. and Dawid, I. B.** (1983). Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* **222**, 135-9.
- Sartorelli, V., Puri, P. L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J. Y. and Kedes, L.** (1999). Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol Cell* **4**, 725-34.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H. et al.** (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* **29**, 397-406.
- Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S. and Khochbin, S.** (2001). Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* **21**, 8035-44.
- Sheng, X., Koul, D., Liu, J. L., Liu, T. J. and Yung, W. K.** (2002). Promoter analysis of tumor suppressor gene PTEN: identification of minimum promoter region. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 422-6.
- Sherr, C. J.** (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-7.
- Shigemasa, K., Gu, L., O'Brien, T. J. and Ohama, K.** (2003). Skp2 overexpression is a prognostic factor in patients with ovarian adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **9**, 1756-63.
- Shiina, N., Gotoh, Y., Kubomura, N., Iwamatsu, A. and Nishida, E.** (1994). Microtubule severing by elongation factor 1 alpha. *Science* **266**, 282-5.
- Shivapurkar, N., Reddy, J., Matta, H., Sathyanarayana, U. G., Huang, C. X., Toyooka, S., Minna, J. D., Chaudhary, P. M. and Gazdar, A. F.** (2002). Loss of expression of death-inducing signaling complex (DISC) components in lung cancer cell lines and the influence of MYC amplification. *Oncogene* **21**, 8510-4.
- Shivapurkar, N., Toyooka, S., Eby, M. T., Huang, C. X., Sathyanarayana, U. G., Cunningham, H. T., Reddy, J. L., Brambilla, E., Takahashi, T., Minna, J. D. et al.** (2002). Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. *Cancer Biol Ther* **1**, 65-9.
- Sif, S., Saurin, A. J., Imbalzano, A. N. and Kingston, R. E.** (2001). Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes Dev* **15**, 603-18.
- Sommer, A., Bousset, K., Kremmer, E., Austen, M. and Luscher, B.** (1998). Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *J Biol Chem* **273**, 6632-42.
- Sommer, A., Hilfenhaus, S., Menkel, A., Kremmer, E., Seiser, C., Loidl, P. and Luscher, B.** (1997). Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase

activity. *Curr Biol* **7**, 357-65.

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P. and Mak, T. W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39.

Stilo, R., Liguoro, D., di Jeso, B., Leonardi, A. and Vito, P. (2003). The alpha-chain of the nascent polypeptide-associated complex binds to and regulates FADD function. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 1034-41.

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

Stroschein, S. L., Bonni, S., Wrana, J. L. and Luo, K. (2001). Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* **15**, 2822-36.

Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U. and Krek, W. (1999). p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* **1**, 207-14.

Tatsuka, M., Mitsui, H., Wada, M., Nagata, A., Nojima, H. and Okayama, H. (1992). Elongation factor-1 alpha gene determines susceptibility to transformation. *Nature* **359**, 333-6.

Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B., Vanin, E. F., Grenet, J., Valentine, V. A., Behm, F. G., Look, A. T., Lahti, J. M. and Kidd, V. J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6**, 529-35.

Timmermann, S., Lehmann, H., Poleskaya, A. and Harel-Bellan, A. (2001). Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci* **58**, 728-36.

Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E. and Schreiber, S. L. (1998). Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex. *Nature* **395**, 917-21.

Tsai, S. C. and Seto, E. (2002). Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2. *J Biol Chem* **277**, 31826-33.

Tsuchiya, H., Iseda, T. and Hino, O. (1996). Identification of a novel protein (VBP-1) binding to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene product. *Cancer Res* **56**, 2881-5.

Tsvetkov, L. M., Yeh, K. H., Lee, S. J., Sun, H. and Zhang, H. (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* **9**, 661-4.

Vainberg, I. E., Lewis, S. A., Rommelaere, H., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Klein, H. L. and Cowan, N. J. (1998). Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* **93**, 863-73.

Valpuesta, J. M., Martin-Benito, J., Gomez-Puertas, P., Carrascosa, J. L. and Willison, K. R. (2002). Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett* **529**, 11-6.

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**, 474-8.

van Kemenade, F. J., Raaphorst, F. M., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K. M., Satijn, D. P., Otte, A. P. and Meijer, C. J. (2001). Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**, 3896-901.

Van Lint, C., Emiliani, S. and Verdin, E. (1996). The expression of a small fraction of cellular

genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* **5**, 245-53.

Varambally, S., Dhanasekaran, S. M., Zhou, M., Barrette, T. R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M. G., Ghosh, D., Pienta, K. J., Sewalt, R. G., Otte, A. P. et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624-9.

Vastrik, I., Kaipainen, A., Penttila, T. L., Lymboussakis, A., Alitalo, R., Parvinen, M. and Alitalo, K. (1995). Expression of the mad gene during cell differentiation in vivo and its inhibition of cell growth in vitro. *J Cell Biol* **128**, 1197-208.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-7.

Verger, A., Perdomo, J. and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. *EMBO Rep* **4**, 137-42.

Vidal, M. and Gaber, R. F. (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 6317-27.

Vidal, M., Strich, R., Esposito, R. E. and Gaber, R. F. (1991). RPD1 (SIN3/UME4) is required for maximal activation and repression of diverse yeast genes. *Mol Cell Biol* **11**, 6306-16.

Visser, H. P., Gunster, M. J., Kluin-Nelemans, H. C., Manders, E. M., Raaphorst, F. M., Meijer, C. J., Willemze, R. and Otte, A. P. (2001). The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* **112**, 950-8.

Wade, P. A., Jones, P. L., Vermaak, D. and Wolffe, A. P. (1998). A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Curr Biol* **8**, 843-6.

Wagner, A. J., Small, M. B. and Hay, N. (1993). Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of Bcl-2. *Mol Cell Biol* **13**, 2432-40.

Wakabayashi-Ito, N. and Nagata, S. (1994). Characterization of the regulatory elements in the promoter of the human elongation factor-1 alpha gene. *J Biol Chem* **269**, 29831-7.

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

Wang, A., Kurdistani, S. K. and Grunstein, M. (2002). Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science* **298**, 1412-4.

Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D. and Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* **12**, 1769-74.

Wang, L., Ding, L., Jones, C. A. and Jones, R. S. (2002). Drosophila Enhancer of zeste protein interacts with dSAP18. *Gene* **285**, 119-25.

Watson, J. D., Oster, S. K., Shago, M., Khosravi, F. and Penn, L. Z. (2002). Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner. *J Biol Chem* **277**, 36921-30.

Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A. and Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**, 434-40.

Wirbelauer, C., Sutterluty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F. and Krek, W. (2000). The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *Embo J* **19**, 5362-75.

Wolf, D., Rodova, M., Miska, E. A., Calvet, J. P. and Kouzarides, T. (2002). Acetylation of

beta-catenin by CREB-binding protein (CBP). *J Biol Chem* **277**, 25562-7.

Wolffe, A. P. (1996). Histone deacetylase: a regulator of transcription. *Science* **272**, 371-2.

Won, K. A., Schumacher, R. J., Farr, G. W., Horwich, A. L. and Reed, S. I. (1998). Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol Cell Biol* **18**, 7584-9.

Wu, K. J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J. and Dalla-Favera, R. (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* **21**, 220-4.

Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C. and Curran, T. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *Embo J* **11**, 3323-35.

Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Menkel, A. R. and Henriksson, M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3826-31.

Xu, M., Nie, L., Kim, S. H. and Sun, X. H. (2003). STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta. *Embo J* **22**, 893-904.

Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Cote, J. and Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* **2**, 851-61.

Yam, C. H., Ng, R. W., Siu, W. Y., Lau, A. W. and Poon, R. Y. (1999). Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2. *Mol Cell Biol* **19**, 635-45.

Yamagata, T., Mitani, K., Oda, H., Suzuki, T., Honda, H., Asai, T., Maki, K., Nakamoto, T. and Hirai, H. (2000). Acetylation of GATA-3 affects T-cell survival and homing to secondary lymphoid organs. *Embo J* **19**, 4676-87.

Yamashita, Y., Shimada, M., Harimoto, N., Rikimaru, T., Shirabe, K., Tanaka, S. and Sugimachi, K. (2003). Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int J Cancer* **103**, 572-6.

Yang, B. S., Geddes, T. J., Pogulis, R. J., de Crombrughe, B. and Freytag, S. O. (1991). Transcriptional suppression of cellular gene expression by c-Myc. *Mol Cell Biol* **11**, 2291-5.

Yang, D. Q. and Kastan, M. B. (2000). Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat Cell Biol* **2**, 893-8.

Yang, L., Mei, Q., Zielinska-Kwiatkowska, A., Matsui, Y., Blackburn, M. L., Benedetti, D., Krumm, A. A., Taborsky, G. J., Jr. and Chansky, H. A. (2003). An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J* **369**, 651-7.

Yang, W. and Boss, W. F. (1994). Regulation of phosphatidylinositol 4-kinase by the protein activator PIK-A49. Activation requires phosphorylation of PIK-A49. *J Biol Chem* **269**, 3852-7.

Yao, Y. L., Yang, W. M. and Seto, E. (2001). Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol* **21**, 5979-91.

Yeh, K. H., Kondo, T., Zheng, J., Tsvetkov, L. M., Blair, J. and Zhang, H. (2001). The F-box protein SKP2 binds to the phosphorylated threonine 380 in cyclin E and regulates ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 884-90.

Yotov, W. V., Moreau, A. and St-Arnaud, R. (1998). The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* **18**, 1303-11.

- Yotov, W. V. and St-Arnaud, R.** (1996). Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev* **10**, 1763-72.
- Yotov, W. V. and St-Arnaud, R.** (1996). Mapping of the human gene for the alpha-NAC/1.9.2 (NACA/1.9.2) transcriptional coactivator to Chromosome 12q23-24.1. *Mamm Genome* **7**, 163-4.
- Yu, Q., He, M., Lee, N. H. and Liu, E. T.** (2002). Identification of Myc-mediated death response pathways by microarray analysis. *J Biol Chem* **277**, 13059-66.
- Yuan, X. J. and Whang, Y. E.** (2002). PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene* **21**, 319-27.
- Zervos, A. S., Gyuris, J. and Brent, R.** (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **72**, 223-32.
- Zhang, C., Bowlin, T. and Mirkin, B. L.** (1993). Suppression of C-1300 murine neuroblastoma cell proliferation in tissue culture and tumor growth in vivo by (Z)5'-fluoro-4',5'-didehydro-5'-deoxyadenosine (MDL 28,842), an irreversible inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Oncol Res* **5**, 433-9.
- Zhang, H., Kobayashi, R., Galaktionov, K. and Beach, D.** (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* **82**, 915-25.
- Zhang, W. and Bieker, J. J.** (1998). Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9855-60.
- Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D.** (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* **89**, 357-64.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. and Matthias, P.** (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* **22**, 1168-79.
- Zhang, Y., Sun, Z. W., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hampsey, M. and Reinberg, D.** (1998). SAP30, a novel protein conserved between human and yeast, is a component of a histone deacetylase complex. *Mol Cell* **1**, 1021-31.
- Zhou, X., Richon, V. M., Wang, A. H., Yang, X. J., Rifkind, R. A. and Marks, P. A.** (2000). Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14329-33.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J. and Roussel, M. F.** (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**, 2424-33.
- Zoll, W. L., Horton, L. E., Komar, A. A., Hensold, J. O. and Merrick, W. C.** (2002). Characterization of mammalian eIF2A and identification of the yeast homolog. *J Biol Chem* **277**, 37079-87.

6. Anhang

Eidesstattliche Erklärung

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

Sabine Rottmann

Aachen, den 13.06.2003

Lebenslauf

Name	Rottmann
Vorname	Sabine
Geburtsdatum	23.11.1974
Geburtsort	Wolfenbüttel
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

Schulbildung

1981-85	Grundschule Bredenbeck
1985-87	Orientierungsstufe Wennigsen
1987-94	Matthias-Claudius-Gymnasium, Gehrden
1994	Abitur

Studium

1994-99	Biologiestudium (Dipl.), Universität Hannover
Juli 1998	Diplom Biologie (Biochemie, Genetik, Immunologie, Molekularbiologie, Mikrobiologie)
1.8.1998-6.4.1999	Diplomarbeit im Institut für Molekularbiologie der Medizinische Hochschule Hannover, AG Prof. B. Lüscher

Berufserfahrung

1.6.1999 - 2003	Promotion im Institut für Molekularbiologie der Medizinischen Hochschule Hannover, ab August 2001 am Institut für Biochemie des RWTH-Uniklinikums Aachen, AG Prof. B. Lüscher
-----------------	---

Veröffentlichungen

Publikationen:

Gehring, S.*, **S. Rottmann***, **A. R. Menkel**, **J. Mertsching**, **A. Krippner-Heidenreich**, and **B. Luscher**. 2000. Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1. Repression of Fas-induced caspase-8 activation. *J Biol Chem* **275**:10413-20.

*contributed equally

Vervoorts, J., **J. M. Luscher-Firzlaff**, **S. Rottmann**, **R. Lilischkis**, **G. Walsemann**, **K. Dohmann**, **M. Austen**, and **B. Luscher**. 2003. Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* **4**:484-90.

Vorträge:

"Inhibition of Fa-induced Caspase-8 activation by the transcriptional repressor Mad1"

Swiss Apoptosis Meeting (Bern), 24.-26.8.2000

"Mad1 function in cell growth is antagonized by Cyclin E/Cdk2"

17th Annual Meeting on Oncogenes (Frederick, MD), 20.-23.6.2001

Danksagung

Prof. Dr. Bernhard Lüscher möchte ich danken für das Überlassen so vieler interessanter Themen, die ständige Gesprächsbereitschaft, den unglaublichen Optimismus und vor allem für das ansteckende Engagement.

Herrn Prof. Dr. Achim Gossler danke ich für die Übernahme des Referats.

Den ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lüscher- Poornima Basavarajaiah, Tone Berge, Dominique Brand, Elena Buerova, Hannelore Burkhardt, Oliver Dittrich, Karen Dohmann, Kolja Eckhard, Gabi Fahrbüchel, Andrea Graf, Alexandra Greindl, Kan Jiang, Karsten Kapelle, Anja Krippner, Angelina Kriescher, Richard Lilischkis, Juliane Lüscher-Firzlaff, Annette Menkel, Jürgen Mertsching, Sabine Schreek, Jürgen Stahl, Angelika Szameit, Jörg Vervoorts, Gesa Walsemann und Mei Yu danke ich für die angenehme Atmosphäre, Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft.

Bei Gesa Walsemann bedanke ich mich für das Korrekturlesen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung in allen Lebenslagen.