

Die Regulation der c-MYC-abhängigen Genexpression durch SIRT1 und ASH2

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Karsten Kapelle

aus Berlin

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Bernhard Lüscher

Universitätsprofessor Dr. Cristoph Peterhänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

ZUSAMMENFASSUNG:

Das proto-Onkogen *c-Myc* kodiert einen Transkriptionsfaktor, der viele Aspekte des Zellverhaltens wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert. *c-Myc* ist eines der am häufigsten fehlregulierten Gene in humanen Tumoren. Trotz der gut charakterisierten biologischen Effekte sind die molekularen Mechanismen der *c-MYC*-abhängigen Aktivierung der Transkription und der Transformation von Zellen nur ansatzweise verstanden. Bei der Regulation des *c-MYC*-Proteins und bei der von ihm vermittelten Aktivierung der Genexpression spielt die Rekrutierung von Kofaktoren und Komplexen über *c-MYC* eine grosse Rolle. Diese rekrutierten Faktoren beeinflussen einerseits durch Modifizierung von *c-MYC* dessen Stabilität und Aktivität, andererseits können sie auf die basale Transkriptionsmaschinerie wirken und die Chromatinstruktur der *c-MYC*-gebundenen DNA-Bereiche durch Histon-Modifikationen verändern. Zu den rekrutierten Kofaktoren gehören Histon-Acetyltransferasen (HATs) wie CBP und p300, die *c-MYC* acetylieren, das Protein stabilisieren und die Transkription aktivieren. Ein weiterer *c-MYC*-bindender Faktor ist ASH2, ein Trithorax-Gruppen-Protein mit onkogenem Potential. Es ist integraler Bestandteil von Histon-Methyltransferase-Komplexen (HMT-Komplexen), welche an die DNA rekrutiert werden und über die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3-K4) die Genexpression aktivieren. Ziel der Arbeit war es zu eruieren, ob die HAT-abhängige Acetylierung von *c-MYC* durch antagonistisch wirkende Histon-Deacetylasen (HDACs) rückgängig gemacht werden kann und welche funktionellen Auswirkungen dieses zu Folge hat. Des Weiteren sollte die Rolle von ASH2 im Zellverhalten von Tumorzellen und die funktionelle Interaktion mit *c-MYC* analysiert, sowie gemeinsame Zielgene von ASH2 und *c-MYC* durch eine Microarray-Analyse gefunden werden.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die zur Familie der Sirtuine gehörende HDAC SIRT1 mit *c-MYC* interagiert und *c-MYC* ein direktes Substrat von SIRT1 ist. Folgend wurde der Frage nachgegangen, ob SIRT1 auch in der Zelle für die Deacetylierung von *c-MYC* verantwortlich ist, was durch Koexpressions-Experimente von SIRT1 und den HATs CBP und p300 sowie durch die Inhibierung der SIRT1-Aktivität bestätigt werden konnte. Da CBP und p300 die *c-MYC*-abhängige Transaktivierung stimulieren, wurde der Einfluss von SIRT1 auf diese Stimulation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Stimulation von SIRT1 reprimiert wird. Durch die Verwendung einer p300-Mutante konnte eine zuvor beschriebene Regulation von p300 durch SIRT1 bei diesem Effekt ausgeschlossen werden, so dass die Repression vermutlich Resultat der Reduktion der *c-MYC*-Acetylierung ist. Da die Acetylierung von *c-MYC* eine reduzierte Ubiquitinierung zur Folge hat, wurde der Einfluss von SIRT1 auf *c-MYC* in einem Ubiquitinierungs-Assay analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Ubiquitinierung von *c-MYC* abhängig von der enzymatischen Aktivität von SIRT1

gesteigert wird, vermutlich da unmodifizierte Lysin-Reste generiert werden, die für die Ubiquitin-Konjugation genutzt werden können.

In Untersuchungen zur Rolle von ASH2 in Tumorzelllinien konnte gezeigt werden, dass ASH2 ein für die Proliferation essentieller Faktor ist, wobei Hinweise auf einen kooperativen Effekt von c-MYC und ASH2 deuten. In *knockdown* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Menge von ASH2 in Zellen mit der globalen Trimethylierung von H3-K4 korreliert, einer Modifikation, die eng mit aktiver Genexpression verknüpft ist. Da bekannt ist, dass c-MYC HMT-Aktivität rekrutiert und an ASH2 bindet, wurde die Spezifität der von c-MYC gebundenen HMT untersucht und der Einfluss von ASH2 auf ihre Aktivität. Hier zeigte sich, dass diese HMT H3-K4 trimethylieren kann und ihre Aktivität von ASH2 abhängig ist. Als weiteren Hinweis auf eine funktionelle Interaktion wurde zuvor beobachtet, dass ASH2 wie c-MYC zusammen mit RAS Rattenembryo-Fibroblasten (REFs) transformieren kann aber die c-MYC vermittelte REF-Transformation abhängig vom endogenen ASH2 ist. Um Zielgene von c-MYC und ASH2 in c-MYC/RAS- und ASH2/RAS-transformierten Zellen zu identifizieren wurden in einer Microarray Analyse durch die Bildung von Schnittmengen der durch ASH2 und c-MYC differentiell exprimierten Gene mögliche gemeinsam regulierte Gene gefunden und durch den Abgleich mit bereits bekannten Array-Daten verifiziert werden, ob es sich um c-MYC Zielgene handelt. In der Analyse konnten 543 Gene identifiziert werden die in beiden Linien in die gleiche Richtung reguliert sind, wovon 41 bekannte c-MYC-Zielgene sind. Zusammenfassend beschreiben die Ergebnisse dieser Arbeit c-MYC als Substrat der HDAC SIRT1, welche die c-MYC-abhängige Transaktivierung durch Deacetylierung negativ reguliert. Des Weiteren wird postuliert, dass ASH2 mit c-MYC bei der Aktivierung von Zielgenen und in der Transformation kooperieren könnte.

ABSTRACT:

The c-MYC oncoprotein acts as a transcription factor and regulates different aspects of cell behaviour including proliferation, transformation and apoptosis. Deregulated expression of c-MYC is a common feature of many human malignancies and contributes to the transformation of normal to malignant cells. In spite of the well-characterised biological relevance of c-MYC, little information is available how c-MYC affects gene regulation at the molecular level. Transcriptional regulation of target genes is at least in part achieved by recruiting cofactors and complexes to target promoters. These factors act by modifying c-MYC and histones on c-MYC bound promoters, resulting in altered c-MYC stability and transcriptional activity as well as in changes in chromatin structure. The histone acetyltransferases (HATs) CBP and p300 act as such cofactors, acetylating c-MYC and thereby increasing its stability and its capacity to activate transcription. Another c-MYC interacting protein is the Trithorax protein ASH2, an oncoprotein and core member of several histone methyltransferase (HMT) complexes, which methylate histone H3 at lysine 4 (H3-K4) resulting in activation of gene expression. The aim of this work was to investigate, if the HAT-dependent acetylation of c-MYC is antagonized by histone decetylases (HDACs) and to analyse the functional consequences. Furthermore, the role of ASH2 in cell behaviour and its functional interaction with c-MYC should be investigated and overlapping c-MYC and ASH2 target genes should be identified.

In this study it could be shown that c-MYC and the Sirtuin family member SIRT1, an NAD⁺-dependent deacetylase, interact and that c-MYC serves as a direct substrate of SIRT1. Furthermore it could be demonstrated in coexpression experiments and inhibitor studies that SIRT1 is responsible for c-MYC deacetylation in cells. Since CBP and p300 stimulate c-MYC-dependent activation, the influence of SIRT1 on this stimulation was examined. SIRT1 represses the HAT-mediated transcriptional stimulation, which is not due to a general inhibitory effect of SIRT1 on p300, suggesting that the repression is the result of the SIRT1-dependent deacetylation of c-MYC. Furthermore, the deacetylation of c-MYC enhances its ubiquitination, presumably by generating unmodified lysine residues, which afterwards can be targeted by E3 ubiquitin ligases. Analysis of ASH2 in tumour lines demonstrates that ASH2 is essential for proliferation. Preliminary findings indicate that c-MYC and ASH2 cooperate in regulating proliferation. Knockdown experiments revealed that the amount of ASH2 protein correlates with the level of global H3-K4 trimethylation in cells, a modification tightly associated with active transcription. Since c-MYC recruits HMT activity and binds to ASH2, the specificity of the c-MYC-bound HMT and its dependency on ASH2 was analysed. It could be shown that the HMT recruited by c-MYC trimethylates H3-K4 and that this is dependent on ASH2. Assuming that c-MYC and ASH2 cooperate in the regulation of gene

expression, which is supported by the observation that the transformation of primary rat cells by c-MYC is dependent on ASH2, a gene expression analysis was performed in c-MYC and ASH2 transformed cells, to detect overlapping subsets of genes, that are differentially regulated in both settings. Comprehensive comparison of these regulated genes to known c-MYC target genes revealed 41 potential candidates that are regulated by c-MYC and ASH2.

Together, the present study describes c-MYC as a substrat for SIRT1 dependent deacetylation, whereby SIRT1 is repressing c-MYC transactivation and enhances its ubiquitination. Furthermore this work suggests a cooperation of c-MYC and ASH2 in target gene activation and transformation.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG I

ABSTRACT III

INHALTSVERZEICHNIS V

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Regulation der Genexpression in Eukaryoten.....	1
1.1.1	Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren.....	1
1.1.2	Modifikation von Transkriptionsfaktoren und Genexpression	2
1.1.3	Chromatinstruktur	2
1.1.4	Modifikation von Chromatin und Genexpression	3
1.2	Das Proto-Onkoprotein c-MYC	10
1.2.1	Funktion, Expression und Struktur von c-MYC	10
1.2.2	Struktur und konservierte Domänen von c-MYC	12
1.2.3	Das c-MYC/MAX/MAD-Netzwerk	13
1.2.4	Transkriptionelle Regulation durch c-MYC	14
1.2.5	Transaktivierung durch c-MYC.....	15
1.2.6	c-MYC-vermittelte Genrepression	17
1.3	Die zellulären Koaktivatoren CBP und p300	19
1.4	Histon-Deacetylasen und Sirtuine	19
1.5	SIRT1 und Sir2	21
1.5.1	Einfluss von SIRT1 auf Heterochromatin und Transkription	22
1.5.2	Einfluss von SIRT1 auf Apoptose und Zell-Überleben.....	22
1.5.3	Einfluss von SIRT1 auf Seneszenz	23
1.5.4	Einfluss von SIRT1 auf Entwicklung.....	24
1.5.5	SIRT1 und Krebs	24
1.6	ASH2.....	24
1.6.1	Trx- und Pc-Proteine	24
1.6.2	Das Trithoraxprotein Ash2 in Drosophila.....	25
1.6.3	ASH2 im Menschen	26
1.7	Zielsetzung.....	32

2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Allgemeine Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.2	Reaktionskits	33
2.2	Antikörper	33
2.3	Plasmide.....	34
2.3.1	Eukaryotische Expressionsvektoren:	34
2.3.2	Reporterkonstrukte	35
2.3.3	siRNA-Expressionsvektoren	36
2.3.4	Bakterielle Expressionsvektoren	36
2.4	Primer	36
2.5	si-RNA Oligonukleotide.....	37
2.6	Arbeiten mit DNA und RNA.....	37
2.6.1	Agarosegelelektrophorese und Extraktion.....	37
2.6.2	Präzipitation von DNA.....	38
2.6.3	Konzentrationsabschätzung von DNA.....	38
2.6.4	Real Time quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR)	38
2.6.4.1	Probenvorbereitung	39
2.6.4.2	RNA-Isolation	39
2.6.4.3	cDNA-Synthese.....	39
2.6.4.4	RT-PCR.....	39
2.7	Arbeiten mit prokaryotischen Zellen.....	40
2.7.1	Material für die Arbeit mit Bakterien	40
2.7.2	Bakterienstämme	40
2.7.3	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	40
2.7.4	Transformation.....	41
2.7.5	Aufreinigung von Maltose-bindendes-Protein-Fusionsproteinen.....	41
2.7.6	Aufreinigung der TEV-Protease	42
2.8	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen (Zellkultur)	43
2.8.1	Allgemeine Materialien für Zellkultur	43
2.8.2	Eukaryotische Zellen.....	43
2.8.3	Kulturbedingungen.....	44
2.8.4	Kryokonservierung	44
2.8.5	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	45
2.8.6	Transiente Transfektion	45
2.8.7	CD4-Selektion von Zellen	46
2.8.8	Proliferations- Assay.....	46

2.9	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	47
2.9.1	Präparation von Zell-Lysaten	47
2.9.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.9.3	Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau.....	48
2.9.4	Western-Blot.....	48
2.9.5	Strippen und Rehybridisieren von Western Blots	49
2.9.6	Nachweis von Proteinen in der Immunofluoreszenz.....	50
2.9.7	Immunpräzipitation (IP).....	50
2.9.8	Reinigung von Baculovirus HIS-CBP	51
2.9.9	Reinigung von TAP-SIRT1.....	51
2.9.10	Reporter-Gen-Assay.....	53
2.9.11	BrdU-Markierung von replizierender DNA	54
2.9.12	Acetyltransferase- Assay	54
2.9.13	Histon-Deacetylase-Assay (HDAC-Assay)	55
2.9.14	HMT-Assay.....	56
3	ERGEBNISSE	58
3.1	Untersuchungen zur funktionellen Interaktion von c-MYC und SIRT1	58
3.1.1	Interaktion von SIRT1 und c-MYC.....	58
3.1.2	c-MYC ist ein direktes Substrat von SIRT1	59
3.1.3	c-MYC ist ein Substrat von SIRT1 in HEK293 Zellen	61
3.1.4	Der Acetylierungsstatus von c-MYC wird durch Deacetylierung reguliert.....	63
3.1.5	SIRT1 reprimiert die CBP abhängige Transaktivierung von c-MYC.....	64
3.1.6	c-MYC wird als Folge der SIRT1 abhängigen Deacetylierung verstärkt ubiquitiniert	66
3.2	Untersuchungen zum Onkoprotein ASH2.....	68
3.2.1	Der Einfluss von ASH2 auf die Proliferation von Tumorzellen	68
3.2.2	ASH2 ist für die S-Phase essentiell.....	69
3.2.3	ASH2 ist für die Histon H3 Lysin4 Methylierung der Zelle essentiell.....	72
3.2.4	ASH2/RAS- und c-MYC/RAS-transformierte Rattenfibroblasten haben erhöhte H3-K4 trimethylierungs-Level.....	74
3.2.5	c-MYC rekrutiert ASH2-abhängig H3-K4 Trimethyltransferase Aktivität	75
3.2.6	Microarray Analyse von ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten embryonalen Rattenfibroblasten	77
3.2.7	Regulierte Gene in ASH2/RAS transformierten Zellen	80
3.2.8	Regulierte Gene in c-MYC/RAS transformierten Zellen.....	83
3.2.9	Regulierte Gene in ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten Zellen	86

3.2.10 Vergleich der in ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen regulierten Gene mit bekannten c-MYC Zielgenen.....	87
3.2.11 Vergleich der in ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen regulierten Gene mit bekannten RAS Zielgenen	90
3.2.12 Validierung der Expressionsergebnisse aus der Microarray Analyse in der RT-PCR.....	92
4 DISKUSSION	93
4.1 Regulation von c-MYC durch SIRT1.....	93
4.2 Untersuchungen zum Onkoprotein ASH2.....	97
4.3 Microarray Analyse von ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten embryonalen Rattenfibroblasten.....	100
5 LITERATURVERZEICHNIS	104
6 ANHANG.....	123
6.1 Informationen zu den Tabellen und Abbildungen auf der beigelegten CD:....	123
6.2 Abkürzungsverzeichnis.....	123
6.3 Veröffentlichungen	126
6.4 Lebenslauf.....	127
6.5 Eidesstattliche Erklärung.....	128
6.6 Danksagung	129

1 EINLEITUNG

1.1 Regulation der Genexpression in Eukaryoten

In eukaryotischen Zellen werden lediglich die sogenannten Haushaltsgene, die zum Erhalt der allgemeinen Zellfunktionen dienen, konstitutiv exprimiert. Der Hauptteil der Gene unterliegt einer zelltyp-, entwicklungs- und signalabhängigen differentiellen Expression. Diese dynamische Expression von Genen ist eine fundamentale Voraussetzung aller grundlegenden Prozesse einer Zelle. Bei der Zellteilung, der Differenzierung, der Zellalterung und dem Zelltod werden unterschiedliche Proteine in genau definierten Abfolgen benötigt, was zumindest teilweise durch das gezielte An- und Abschalten der entsprechenden Gene erreicht wird. Auch um auf Einflüsse von Außen, wie Stress und Pathogene zu reagieren, sind Zellen auf eine dynamische Regulation der Genexpression angewiesen. Dazu kommt, dass in Eukaryoten eine Vielzahl von Zelltypen mit identischem Genotyp unterschiedliche Aufgaben übernehmen, welche völlig verschiedene Programme von Genaktivitäten erfordern. Die Regulation der Genexpression ist ein komplexer, hoch stringent kontrollierter Vorgang, die Fehlregulation von Genen ist Ursache zahlreicher Krankheiten, zum Beispiel von Krebs (1).

1.1.1 Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die über DNA-Bindungsdomänen sequenzspezifisch an DNA-Elemente in als Enhancer- und Promotorbereich bezeichneten regulatorischen Sequenzen von Genen binden. Über ihre regulatorischen Domänen aktivieren oder reprimieren sie die Expression der Zielgene (2). In den regulatorischen Sequenzen eines Gens findet sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Durch die Wechselwirkungen mehrerer am gleichen Promotor gebundener Transkriptionsfaktoren ist ein Gen in der Lage, auf unterschiedliche Signale zu antworten und es erlaubt eine kooperative Regulation der Expression (3, 4).

Die Transkriptionsfaktoren können auf unterschiedliche Art die Transkription von Genen modulieren. Häufig wirken sie auf die Initiation der Transkription, indem sie durch Rekrutierung von Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie den Zusammenbau des Präinitiationskomplexes am Promotor steuern. Auch an der Prozessierung der basalen Transkriptionsmaschinerie während der Initiation, des *promotor clearance* und der Elongation

sind Transkriptionsfaktoren beteiligt. Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wiederum wird durch Kofaktoren reguliert, zum Teil durch Modifikationen. Kofaktoren binden nicht selber DNA sondern werden von den Transkriptionsfaktoren zu Promotor- und Enhancer-Sequenzen rekrutiert. Sie lassen sich in 5 Klassen unterteilen: Zur ersten Klasse gehören Kofaktoren die auf die RNA-Polymerase II und die generellen Transkriptionsfaktoren wirken. Zu diesen Kofaktoren gehören die TAFs (TBP-assoziierte Faktoren). Die zweite Klasse beinhaltet solche, die an die spezifischen Transkriptionsfaktoren binden wie OCA-B, Groucho, Notch, CtBP, HCF und die viralen Koregulatoren E1A und VP16 (5). Zur dritten Klasse gehören die Kofaktoren-Komplexe wie der Mediator- und USA-Komplex (6, 7). In der vierten und fünften Klasse werden die Kofaktoren zusammengefasst, die Änderungen der Chromatinstruktur bewirken. Dies geschieht entweder durch kovalente Modifikation von Histonen durch die Mitglieder der Klasse 4 oder durch ATP-abhängiges *chromatin remodeling* durch die Kofaktoren der fünften Klasse (8).

1.1.2 Modifikation von Transkriptionsfaktoren und Genexpression

Bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren spielen Modifikationen eine entscheidende Rolle. Sie ermöglichen eine zusätzliche Ebene der Kontrolle bei der Steuerung von Induktion und Repression von Genen. Durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung werden die zelluläre Lokalisation, die Halbwertszeit, die Interaktion mit Dimerisierungspartnern und Adaptermolekülen, die DNA-Bindung und die Funktion der Transaktivierungsdomäne (TAD) der Transkriptionsfaktoren reguliert (9-14).

1.1.3 Chromatinstruktur

Im Kern eukaryotischer Zellen liegt die DNA im Komplex mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen in Form von Chromatin vor. Die funktionelle Grundeinheit der Verpackung der DNA im Chromatin ist das Nucleosom, welches aus je zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 besteht (15). Dabei bilden die Histone H3 und H4 ein Tetramer, das auf jeder Seite von einem H2A/H2B Histon-Dimer gebunden wird. Um dieses Oktamer sind 146 bp der DNA in 1,7 Windungen einer linksgängigen Helix gewunden (15). Die Nukleosomen sind durch DNA-*linker*-Einheiten von 50 bis 80 bp miteinander verbunden und werden durch das Histon H1 zu einer 30nm Faser kompaktiert (16). In Abständen von 50-150 kb sind die Chromatin-Schleifen an Strukturen des Zellkerns und an die Grundstruktur der Chromosomen gebunden. Während der Mitose oder Meiose kommt es bei Bildung der Metaphase-Chromosomen zu einer stärkeren Verdichtung des Chromatins (17).

Die Histone sind evolutionär stark konservierte basische Proteine. Sie bestehen aus einer zentralen globulären Domäne und flexiblen amino- und carboxyterminalen Armen, in denen

die beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin besonders häufig vorkommen. Die globuläre Domäne ist für die Dimerisierung der Histone (15) und die Organisation der DNA um das Histon-Oktamer des Nucleosoms verantwortlich. Die 10 bis 40 Aminosäuren langen, evolutionär stark konservierten N-terminalen Schwänze der Histone ragen aus den Nukleosomen heraus, wodurch sie Wechselwirkungen mit DNA und regulatorischen Faktoren sowie mit anderen Nukleosomen eingehen können, was unter anderem für die Entstehung höher geordneter Strukturen von Bedeutung ist (15, 18).

Man unterscheidet transkriptionell aktives, locker gepacktes, Gen-reiches Euchromatin und stärker kondensiertes Gen-armes Heterochromatin, welches in der Interphase kondensiert bleibt, spät im Zellzyklus repliziert, mit repetitiven DNA-Sequenzen angereichert ist und wenig transkriptionelle Aktivität zeigt (19, 20). Generell blockiert die Einbindung der DNA in Nukleosomen und Chromatin die Initiation der Transkription (17, 21). Die Windung der DNA um die Histon-Oktamere behindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren an deren Erkennungssequenzen (22). Um die Expression von Genen zu stimulieren, müssen transkriptionsaktivierende Faktoren die reprimierende Struktur des Chromatins überwinden. Eine Zusammenlagerung von Nukleosomen in höhere Strukturen kann zur transkriptionellen Repression ganzer chromosomaler Abschnitte führen (23). Die Struktur des Chromatins spielt auch eine Schlüssellrolle bei der vererbaren epigenetischen Kontrolle von Entwicklungsregulatoren. Dabei führt die epigenetische Regulation der Transkription zu einer über Zellgenerationen stabilen differentiellen Genexpression (24-27). Demnach wird die epigenetische Markierung an die Zellnachkommen weitergegeben, wodurch sichergestellt wird, daß das entsprechende Genexpressionsmuster und der Zellphänotyp über Generationen erhalten bleiben. Dieser Prozeß wird mit *cellular memory* umschrieben. Eine derartige epigenetische Regulation, die über Veränderungen der Struktur des Chromatins erfolgt, findet man bei der Kontrolle der Expression homöotischer Gene. Homöotische Gene erzeugen die morphologische Vielfalt der Körpersegmente in *Drosophila* und in anderen höheren Eukaryoten (28-30). Die Expression dieser Gene wird durch Faktoren eines konservierten *cellular-memory*-Systems reguliert, die den aktivierten oder inaktivierten Zustand der homöotischen Gene erhalten (Übersicht in (31)).

1.1.4 Modifikation von Chromatin und Genexpression

Die eukaryotische Genexpression wird auf zwei Ebenen reguliert: einerseits auf DNA Ebene, was die sequenzspezifische Bindung von aktivierenden oder reprimierenden Transkriptionsfaktoren an die DNA sowie reprimierend wirkende DNA-Methylierung beinhaltet, andererseits durch die Modulation der Chromatin-Struktur (13, 32). Bei letzterer lassen sich zwei Mechanismen der Strukturveränderung von Chromatin unterscheiden: Durch ATP-abhängiges Chromatin-*remodeling*, indem die Struktur, Stabilität und Position der

Nukleosomen verändert wird (33, 34) und durch kovalente posttranskriptionale Modifikation der N-terminalen Enden der Histone.

Chromatin-remodeling

ATP-abhängige *remodeling*-Komplexe spielen bei der Initiation und der Regulation aller zellulären Prozesse, in denen Interaktionen mit der DNA erforderlich sind (z.B. Replikation, Rekombination, DNA-Reparatur und Transkription) eine wesentliche Rolle (34, 35). Sie können unter Spaltung von ATP die Lage oder Struktur einzelner Nukleosomen direkt im Stromaufwärtsbereich der Gene verändern (36) und so z.B. die Bindung von Transkriptionsfaktoren des basalen Transkriptionsapparates an die DNA im Chromatin ermöglichen oder verhindern. Abhängig von der jeweiligen ATPase-Untereinheit unterscheidet man drei verschiedene Klassen von Chromatin-*remodeling*-Komplexen: die SWI/SNF-, die ISWI- und die Mi-2-Familie. Die hSWI/SNF-Komplexe sind an der Regulation des Zellzyklus durch Interaktion mit einer Reihe regulatorischer Proteine u. a. p105RB, p53, Cyclin E, BRCA1 und β -Catenin beteiligt. Zahlreiche humane Tumorzelllinien weisen Mutationen in einer der Untereinheiten dieser Komplexe auf. Wie die Histonproteine und die Komponenten des basalen Transkriptionsapparates sind die ATP-abhängigen Chromatin-*remodeling*-Komplexe in allen eukaryotischen Zellen hoch konserviert (37). Auch der Einbau bzw. Austausch von Histon-Varianten in Nukleosomen ist bei der transkriptionalen Regulation von Bedeutung. In inaktiven Genen findet sich im Promotor Bereich die zur H2A-Familie gehörende Histon-Variante H2A.Z, welche durch das normale Histon H2A ersetzt wird, wenn diese induziert werden (38-40). Bei dem Austausch von Histon-Varianten im Chromatin sind neben Chromatin-*remodeling*-Komplexen spezifische Histon-Chaperone beteiligt (41).

Histon-Modifikationen

Histone können auf vielfältige Weise posttranslational modifiziert werden (Abb. 1.1). Vor allem die flexiblen aminoterminalen Domänen, die außerhalb des Nukleosomen-Kerns liegen, sind hiervon betroffen (42). Die Möglichkeit posttranslationaler Modifikation umfasst die Acetylierung durch Histon-Acetyl-Transferasen (HAT), die Methylierung durch Histon-Methyltransferasen (HMTs), die Phosphorylierung durch Kinasen, die ADP-Ribosylierung durch ADP-Ribose-Polymerasen und die Ubiquitinierung durch Ubiquitin-Ligasen einzelner Aminosäuren(43). Über diese Modifikationen werden einerseits Histon-Histon-Wechselwirkungen sowie Histon-DNA-Wechselwirkungen und damit die Faltung der Nukleosomenkette beeinflusst, andererseits werden Wechselwirkungen mit Proteinen, die bestimmte Modifikationen erkennen, ermöglicht.

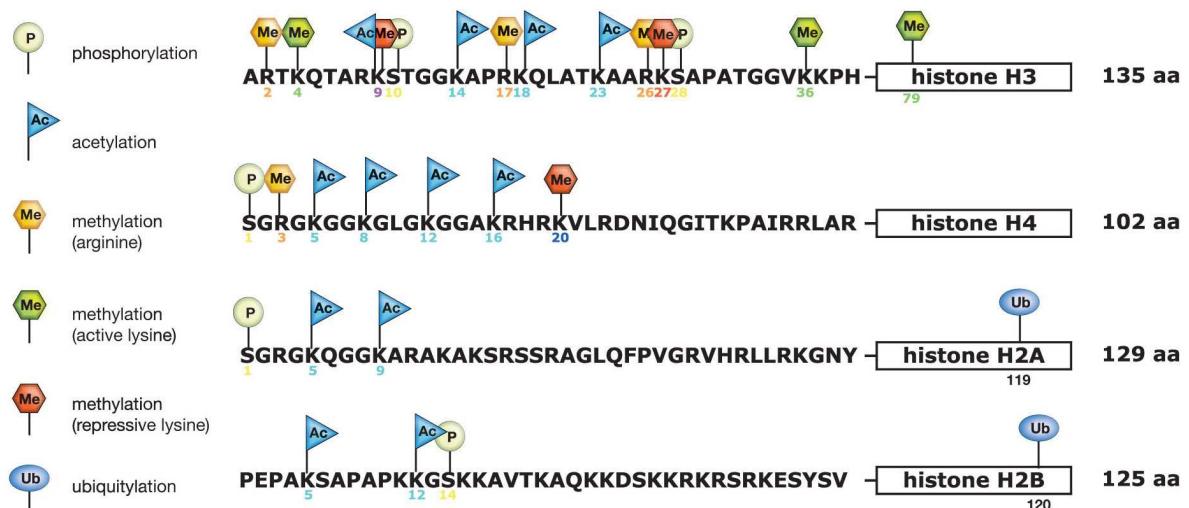


Abb. 1.1: Übersicht der posttranslationalen Histon-Modifikationen.

Die N-terminalen Histon-Arme sind als Aminosäure-Sequenz dargestellt, die globuläre Domäne als Box. Phosphorylierung: grüner Kreis; Acetylierung: blaues Dreieck; aktivierende Methylierung: grünes Sechseck; reprimierende Methylierung: rotes Sechseck; Arginin-Methylierung: gelbes Sechseck; Ubiquitinierung: blaues Oval (aus C.D. Allis, Epigenetics 2006).

Beispiele für letztere sind Proteine mit Bromo- oder Chromo-Domänen, die spezifisch mit acetylierten bzw. methylierten Lysin-Resten interagieren können und ihrerseits chromatinverändernde Funktionen besitzen (44-46). Die Histon-Modifikationen können durch antagonistisch arbeitende Enzyme wie den Deacetylasen, Demethylasen und Phosphatasen wieder entfernt werden, was eine dynamische Regulation zulässt. Da durch die Kombinationsmöglichkeiten von verschiedenen Histon-Modifikationen die Histonstruktur und damit die Zugänglichkeit zur DNA reguliert werden kann, spricht man vom „Histon-Code“, der den funktionellen Zustand eines DNA-Abschnitts definiert (47, 48).

Histon-Acetylierung

Die Histon-Acetylierung von Lysin-Resten in den aminoterminalen flexiblen Histon-Domänen ist die am ausführlichsten untersuchte Histon Modifikation. Die Histone H2B, H3 und H4 können an vier, Histone H2A an zwei Lysin-Resten acetyliert werden, wobei der übertragene Rest vom Acetyl-Donor Acetyl-Koenzym A (Acetyl-Co-A) stammt (49). Die Acetylierung wird durch die Familie der Histon-Acetyl-Transferasen (HAT), die meist in größeren Proteinkomplexen vorliegen, vermittelt. Sie werden auf Grund von Sequenzhomologien in sechs verschiedene Familien eingeteilt. Viele HATs sind transkriptionelle Koaktivatoren, z.B. Gcn5, p300/CBP, PCAF, TAF250 und die p160-Familie der nukleären Rezeptoren (50). Es wird allgemein angenommen, dass durch die Acetylierung die positive Ladung der Histone teilweise neutralisiert wird und damit die Wechselwirkungen mit der DNA sowie die Nukleosom-Nukleosom-Wechselwirkungen geschwächt werden (22, 51). Hierdurch entsteht

eine gelockerte Struktur, die den Zugang für Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, erleichtert und die Histon-Acetylierung dadurch generell mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung bringt (52, 53). Viele der transkriptionellen Kofaktoren erkennen und binden spezifisch acetyliertes Lysin durch Bromo-Domänen (54). Interessanterweise kommt diese Domäne in fast allen Histon-Acetyl-Transferasen vor und beinhaltet somit einen Mechanismus der Selbstrekrutierung. Gegenspieler der Histon-Acetyl-Transferasen sind Histon-Deacetylasen (HDAC), welche die Markierung der Histon-Acetylierung enzymatisch entfernen. Die HDAC werden in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Zu den Klasse I, II und IV gehören klassische Histon-Deacetylasen, zur Klasse III gehören die NAD⁺-abhängigen Sirtuine (siehe dazu auch 1.4). Die meisten HDACs sind im Gegensatz zu den HATs eher unspezifisch, nur die Sirtuine 1-3 scheinen Lysin 16 in H4 als Substrat zu bevorzugen (55, 56).

Für viele der genannten HATs und HDACs wurden bereits Nicht-Histon- und Peptid-Substrate gefunden, so dass man treffenderweise von Protein-Acetylasen und -Deacetylasen sprechen sollte. Unter diesen Substraten befinden sich neben α -Tubulin auch der Tumorsuppressor p53 und das Onkoprotein c-MYC (57). Generell wird die Hypoacetylierung einer Chromatinregion mit einer restriktiveren Struktur und damit mit einer Repression der Transkription in Verbindung gebracht.

Störungen der Funktionen oder Fehlregulationen von HAT und HDAC stehen mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung (58-60). So wurden in epithelialen Tumoren, aber auch in hämatologischen Malignomen, vermehrt Mutationen oder Translokationen der beiden Histon-Acetyl-Transferasen CBP und p300 gefunden (61). Mutationen des *CBP*-Gens führen zu einer Entwicklung des Rubinstein-Taybi-Syndroms (62), wobei diese Patienten ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von malignen Tumoren haben (63, 64). In vielen Tumoren wurde eine Überexpression von Histon-Deacetylasen beobachtet, so sind in Prostata Karzinomen die HDAC1-3 hochreguliert, in Colon Karzinomen dagegen nur HDAC3 (65, 66). Die Reduktion von HDAC3 in diesen Tumorzellen durch RNAi führt zu Wachstumsinhibierung und Apoptose, genau wie die RNAi bedingte Reduktion von HDAC1 in bestimmten Tumorzelllinien (67). Wegen des Zusammenhangs von Histon-Acetylierung und Tumorentwicklung werden HDAC-Inhibitoren bereits in der Krebs-Therapie getestet (57, 68). Auch die Deregulation der Klasse III HDACs spielt bei der Tumorentstehung eine Rolle, so wurden zum Beispiel in Prostata-Karzinomen erhöhte SIRT1-Spiegel beobachtet (69).

Histon-Methylierung

Die Methylierung von Histonen wird durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) vermittelt, die Methylgruppen von S-Adenosyl-L-Methionein (SAM) auf Arginin- oder Lysin-Reste

übertragen. Lange Zeit wurde Methylierung für einen irreversiblen Prozess gehalten, was auf der Beobachtung beruhte, dass die Halbwertszeit der Histone genau so lang wie die Halbwertszeit der Methylierung ist (70). In den letzten Jahren konnten mehrere Enzyme identifiziert werden, die an der Demethylierung von Histonen beteiligt sind und belegen, dass auch diese Modifikationen dynamisch sind (71).

Arginin-Methylierung

Arginin kann mono- oder dimethyliert werden, letzteres in symmetrischer oder asymmetrischer Weise. Die Enzyme, die diese Reaktion ausführen, werden Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) genannt. In Säugern sind sechs PRMTs bekannt (PRMT1-3, PRMT4/CARM1, PRMT5/JBP1, PRMT6) und in *Saccharomyces cerevisiae* eine (Hmt1). Welche Arginin-Methylierung erfolgt, ist abhängig von der Erkennungssequenz des Histons und der jeweiligen Methyltransferase, wobei die meisten bisher beschriebenen PRMTs Arginine mit asymmetrischen Dimethyl-Resten modifizieren (72). Die beiden bestuntersuchten PRMTs CARM1 und PRMT1 sind transkriptionelle Koaktivatoren von nukleären Hormon-Rezeptoren. PRMT1 kann Histon H4 an Arginin 3 (H4-R3) methylieren, was die darauffolgende Acetylierung von Histon H4 durch p300 ermöglicht und die Aktivierung der Genexpression zur Folge hat (73). CARM1 methyliert Histon H3 an verschiedenen Arginin-Resten (74). Bei beiden PRMTs ist die enzymatische Aktivität Voraussetzung für die transkriptionelle Regulation. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zur PRMT 6 zeigten aber, dass Arginin Methylierung auch in der Repression der Transkription eine Rolle spielt. Die Methylierung von Histon H3 am Arginin 2 verhindert die aktivierende Methylierung von Lysin 4 am selben Histon und führt somit zur Repression des betroffenen Gens (75, 76).

Lysin-Methylierung

Die Methylierung von Lysinen erfolgt durch eine Gruppe von HMTs mit SET-Domäne an den Lysin-Resten der Histone H3 und H4. Ausnahme ist Dot1, welches als einzige bisher bekannte lysinspezifische Histon-Methyl-Transferase keine SET-Domäne besitzt. Namensgebend für die SET-Domäne sind die Anfangsbuchstaben der Enzyme, in denen die Domäne zuerst beschrieben wurde, nämlich in Su(var)3-9, im Polycomb-Gruppen-Protein E(Z) (*Enhancer of Zeste*) und im Trithorax-Gruppen-Protein Trithorax (50). Modifiziert werden die Lysin-Reste H3-K4, H3-K9, H3-K27, H3-K36, H3-K79 oder H4-K20 (77). Die Lysine können an ihrer ϵ -Aminogruppe sowohl mono- als auch di- und trimethyliert werden (im folgenden Kme1, Kme2, Kme3 genannt), abhängig von den beteiligten Enzymen, z.B. kann DIM-5 H3-K9 trimethylieren, während SET7/9 H3-K4 nur monomethylieren kann (78). Die Lysin-Methylierung kommt, abhängig von den modifizierten Resten, in einem

aktivierenden (H3-K4, H3-K36, H3-K79) oder reprimierenden (H3-K9, H3-K27, H4-K20) Kontext der Genexpression vor.

Die zuerst beschriebenen Proteine der SU(VAR)3-9-Familie, humanes SUV39H1 und sein murines Homolog (Suv39h1) sowie das Homolog aus *Schizosaccharomyces pombe* (Clr4) methylieren spezifisch Lysin 9 in H3 (H3-K9) (79). Methyliertes H3-K9 wird mit transkriptionsrepressorischen Mechanismen in Verbindung gebracht und gilt als Charakteristikum für Heterochromatin. In Polytänchromosomen von *Drosophila* findet man zum Beispiel H3-K9 Methylierung, sowie alle H3-K27 und H4-K20 Methylierungsstufen, vorwiegend im heterochromatischen Chromozentrum. Der Befund, dass SU(VAR)3-9-Proteine H3-K9 methylieren und wie HP1 mit Heterochromatinstrukturen assoziiert sind, führte zur Identifizierung der spezifischen Interaktion von HP1 mit K9-methylierten H3-Tails. Diese Bindung wird über die Chromo-Domäne von HP1 vermittelt, und führt zu Heterochromatin-*silencing* (80). Dazu interagiert HP1 direkt mit SU(VAR)3-9-Proteinen, was eine Erklärung für die Ausbreitung und Etablierung von Heterochromatinbereichen durch gegenseitiges Rekrutieren sein könnte. Zusätzlich spielt die SU(VAR)3-9-vermittelte Methylierung von H3-K9 eine Rolle bei der euchromatischen Transkriptionsrepression. Der SUV39H/HP1-Komplex wird unter anderem durch den Tumorsuppressor Retinoblastoma (RB) an verschiedene Promotoren wie den des Zellzyklus-regulierenden Gens *Cyclin E* rekrutiert. Durch H3-K9 Methylierung wird HP1 gebunden und reprimiert die Transkription (81-83). Dazu wurde ein H3-K9-HMT-Komplex beschrieben, der E2F- und c-MYC-responsive Gene in G0 Zellen besetzt (84).

In den letzten Jahren fokussierte sich das Interesse vermehrt auf Methylierungen von Lysin-Resten, die mit aktiv transkribierten Genen korrelieren, wie H3-K4, H3-K36 und H3-K79. H3-K4 Methylierung wird in Säugern von der Protein Familie der MLLs (*mixed lineage leukemia*) bestehend aus den Mitgliedern MLL1, MLL2, MLL3, MLL4, SET1A and SET1B katalysiert, welchen eine SET1-Domäne gemeinsam ist. Je nach Enzym und gebundenen Komplexpartnern können sie H3-K4 mono-, di- oder trimethylieren. H3-K4me3 korreliert stark mit aktiver Transkription und Histon-Acetylierung und ist in Promotorregionen konzentriert (77). Dagegen wird H3-K4me2 zwar auch in Regionen aktiver Genexpression gefunden, stellt vermutlich aber eher eine globale epigenetische Markierung für euchromatische Regionen dar, welche die transkriptionelle Repression durch die H3-K9-Methylierung verhindert (85). H3-K4me1 wurde kürzlich als Markierung von Enhancer Bereichen im Menschen beschrieben (86).

Die Lysin-Methylierung wird von Proteinen mit Chromo-Domäne, wie beim zuvor beschriebenen Protein HP1, oder mit PHD Finger erkannt und gebunden. Ein weiteres Beispiel ist CHD1, welches präferentiell di- und trimethyliertes H3-K4 über seine Chromo-

Domäne bindet und ATP-abhängiges Chromatin-remodeling vermittelt (87). Der Transkriptionsfaktor BPTF (*bromodomain PHD finger transcription factor*) bindet spezifisch H3-K4me3 über den PHD Finger und rekrutiert so den NURF-Komplex. Diese Bindung ist beispielsweise für die Regulation der *hox* Gene während der Entwicklung essentiell (88). Auch Proteine der ING-Familie, wie ING2, binden H3-K4me3 über die PHD-Domäne (89).

Um eine schnelle Adaption eines Organismus auf sich ändernde Umwelteinflüsse und die sehr komplexen Veränderungen der Genaktivität während der Embryonalentwicklung zu gewährleisten, ist eine dynamische Regulation der Lysin-Methylierung von Histonen erforderlich. Dazu sind antagonistisch wirkende Enzyme notwendig, welche die Methylierungen wieder entfernen. Mit der lysinspezifischen Demethylase (LSD1) wurde das erste Enzym entdeckt, das diese Reaktion katalysiert (90). Methylierungen an den Lysin-Seitenketten der Histone können durch zwei Klassen von Enzymen entfernt werden. Enzyme vom Typ der Aminoxygenasen katalysieren die Entfernung von mono- und dimethyl-Gruppen während Enzyme der *Jumonji* Familie die Entfernung von di- und trimethyl-Gruppen katalysieren können (71, 91-94). Ebenso wie Methyltransferasen eu- oder heterochromatische Modifikationen etablieren, können auch Demethylasen entweder repressive oder aktive Markierungen entfernen (95). LSD1 kann beispielsweise je nach gebundenem Kofaktor, sowohl die Demethylierung von mono- und dimethyliertem Lysin 4 des Histons H3 (96), als auch die Entfernung einer repressiven H3-K9 Methylierung katalysieren (97).

Histon-Phosphorylierung

Alle Histone, auch Histon H1, können reversibel phosphoryliert werden. Phosphorylierung von H1 und H3 wird mit Chromosomenkondensation und –segregation, sowie mit der Antwort auf Wachstumsfaktorsignale in Zusammenhang gebracht und ist hoch konserviert (98). In Eukaryoten tritt Phosphorylierung von Serin 10 und Serin 28 in H3 während der Mitose auf, wobei die stärkste Phosphorylierung in der Metaphase zu beobachten ist. Dabei sind fast alle H3s phosphoryliert. Diese genomweite Phosphorylierung wird durch die Aurora-B-Typ Kinasen katalysiert (99) und durch die Proteinphosphatase 1 wieder rückgängig gemacht (100).

Histon-Ubiquitinierung

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes Peptid, das normalerweise als Poly-Ubiquitin an die ϵ -Aminogruppen von Lysinen in Proteinen angehängt wird, welche für den Abbau im 26S-Proteasom vorgesehen sind (101). Alle Histone bis auf H4 wurden bisher mit Ubiquitin modifiziert vorgefunden, wobei H2A und H2B bei weitem am häufigsten betroffen sind (102). An den Histonen wurde sowohl Mono- als auch Poly-Ubiquitinierung gefunden, so sind zum

Beispiel H2A und H2B mono-ubiquitinyliert (42). Die Mono-Ubiquitinierung wird mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung gebracht. Histon H1 wird in *Drosophila* von TAFII250 ubiquitiniert, was eine transkriptionsaktivierende Wirkung im Embryo zu haben scheint (103). H2A- und H2B-Mono-Ubiquitinierung kann die Interaktion des H2A/H2B-Dimers mit dem Tetramer aus H3 und H4 abschwächen (104) und scheint also ebenfalls einen strukturellen Effekt auf Chromatin zu haben. Die Ubiquitinierung ist reversibel und daher für Transkriptionsregulation geeignet (105).

Zusammenspiel von Histon-Modifikationen

Histonmodifikationen beeinflussen sich gegenseitig in cis und trans, d.h. sie können auf die Modifikationen desselben Histons oder der benachbarten Histone wirken. Dabei kann man drei Arten unterscheiden: Modifikationen können sich ausschließen, fördernd auf die Folgenden wirken oder Voraussetzung für diese sein. So schliessen sich die aktivierende H3-K4- und die reprimierende H3-K9-Methylierung gegenseitig aus, ebenso die reprimierende H3-R2-Methylierung und die H3-K4-Trimethylierung (75, 77, 88, 106). Weiterhin kann die aktivierende Phosphorylierung an Histon H3 Serin 10 die aktivierende Acetylierung von H3-K14 fördern, inhibiert aber die reprimierende H3-K9-Methylierung, die ihrerseits die H3-S10-Phosphorylierung verhindert (79, 107, 108). In Hefe wurde gefunden, dass eine Mono-Ubiquitinierung von H2B an Lysin 123 durch Rad6 für eine darauffolgende Methylierung von H3-K4 durch den COMPASS-Komplex und für eine Methylierung von H3-K79 durch Dot1 unbedingt notwendig ist (109, 110).

1.2 Das Proto-Onkoprotein c-MYC

1.2.1 Funktion, Expression und Struktur von c-MYC

Das *c-myc* Proto-Onkogen wurde als das zelluläre Homolog des viralen Onkogens v-myc des MC29 Stammes vom Avian Leukemia Virus (ALV) identifiziert, der in Vögeln die leukämische Krankheit Myelozytomatose (engl.: *Myelocytomatosis*) induziert (111). Mit der Entdeckung eines zellulären Homologs war c-myc neben Src eines der ersten Beispiele viraler Onkogene, die ursprünglich als Proto-Onkogen aus der Wirtszelle stammen und deren onkogenes Potenzial erst durch die Transduktion in das Virusgenom aktiviert wird (111). Das c-MYC Protein ist ein sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor, der Einfluss auf Proliferation, Wachstum, Differenzierung, Replikation, Metabolismus und Apoptose hat.

Die Familie der *myc* Gene, die in Säugerzellen neben *c-myc* noch *N-* und *L-myc* umfasst, ist sehr wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden (112, 113). Die Familienmitglieder sind evolutionär hoch-konserviert, werden jedoch zu unterschiedlichen Zeiten in der Entwicklung sowie in unterschiedlichen Kompartimenten, Geweben oder Organen exprimiert (114).

Neben den *myc* Genen in Vertebraten wurden unter anderem auch Homologe in dem Seestern *Asterias vulgaris* und *Drosophila melanogaster* gefunden, jedoch nicht in Hefe (115-117).

Schätzungsweise 70% aller humanen Tumore weisen eine Fehlregulation eines der *myc*-Gene auf, was ihre herausragende Bedeutung unter den humanen Onkogenen aufzeigt (118). Die Expression von c-MYC ist in einer Vielzahl verschiedener Tumoren aufgrund von chromosomalen Translokationen, Genamplifikationen und retroviralen Insertionen erhöht. In 85% aller Burkitt-Lymphomen gerät das *c-myc* Gen durch chromosomale Translokationen unter die Kontrolle eines der Immunglobulin-Loci (119). Genamplifikationen von *N-myc* findet man häufig bei Neuroblastomen, von *L-myc* bei kleinzelligen Lungenkarzinomen (112, 120). Erhöhte Mengen von c-MYC können auch Folge von Mutationen innerhalb der protein-kodierenden Gensequenz sein. c-MYC ist ein relativ instabiles Protein mit einer Halbwertszeit von 20-30 min. Durch die Threonin-Alanin-Substitution an Stelle 58 (T58A) erhöht sich die Proteinstabilität, da phosphoryliertes Threonin 58 als Signal für den proteasomalen Abbau dient (121). Eine Threonin-Alanin-Substitution (T58A) findet man häufig in Burkitt-Lymphomen sowie in onkogen-aktivierten v-myc-Allelen retroviraler Hühnerviren (122-124).

In zellulären Systemen korreliert die Expression von c-MYC mit der Proliferation, bei dessen Regulation es eine Schlüsselrolle spielt. So wird c-MYC als sehr frühe Gen-Antwort auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mitogenen exprimiert und fällt dann in proliferierenden Zellen auf ein basales Niveau ab (125). Diese Induktion kann auch erfolgen, wenn die Proteinbiosynthese inhibiert ist, c-MYC gehört somit zur Gruppe der *immediate early response* Genen (126, 127). In ruhenden Zellen wird c-MYC nicht exprimiert und im Verlauf der Differenzierung von Zellen geht die Expression von c-MYC stark zurück (116, 125, 128). Die Überexpression von c-MYC in ruhenden Zellen induziert den Eintritt in die S-Phase, wogegen die Inhibition von c-MYC zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase führt (129-131). Die beschriebenen Effekte von c-MYC auf Zellen werden durch seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor vermittelt. Beispielsweise sind *cyclin D2*, *cdk4* und *cdc25* transkriptionell aktivierte Zielgene von c-MYC, deren Expression zur Sequestrierung des CDK2-Inhibitors p27 bzw. zur dephosphorylierenden Aktivierung von CDK2 führt. Dadurch werden Cyclin E/CDK2-Komplexe durch c-MYC aktiviert, was zum Eintritt in die S-Phase führt. Ausserdem kann c-MYC direkt Zellzyklus-inhibierende Zielgene reprimieren, z.B. die der CDK-Inhibitoren p21, p15 und p27, und dadurch das Fortschreiten des Zellzyklus' und die Proliferation fördern (132-134). Diese Aktivierung von pro- bzw. die Repression von anti-proliferatorischen Zielgenen begründet unter anderem die Fähigkeit von c-MYC, immortalisierte Nagerzellen zu transformieren. Für die Transformation von primären Nagerzellen benötigt c-MYC die Expression eines zweiten kooperierenden Proto-

Onkoproteins, z.B. Ha-RAS, das als G-Protein Wachstumssignale generiert, die alleinige Expression von c-MYC führt zur Apoptose (135, 136). Es wird davon ausgegangen, dass c-MYC die RAS-vermittelte Seneszens aufhebt, während RAS der c-MYC-abhängigen Apoptose entgegenwirkt. Dafür spricht, dass auch das anti-apoptotische Onkoprotein BCL-2 mit c-MYC in der Maus-Lymphomagenese kooperiert und andere proliferatorisch wirkende Faktoren wie Cyclin D1 und Cyclin E ebenfalls mit Ha-RAS transformieren (137, 138). Wird c-MYC in primären Fibroblasten ohne zweites Onkogen exprimiert, kann dies die Immortalisierung der Zellen durch Aktivierung des Gens *tert*, was für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert und den Schutz der Telomere bewirkt, zur Folge haben.

In Tiermodellen ließen sich die Funktionen von c-MYC bei der Proliferation und Tumorentstehung bestätigen. So ist die Deletion von *c-myc* oder *N-myc* in Mäusen bereits früh in der Embryonalentwicklung letal, wogegen der Verlust von *L-myc* keinen Phänotyp erzeugt (125). Transgene Mäuse, die c-MYC überexprimieren, entwickeln sich normal, bilden aber mit hoher Frequenz Tumore (116). Epitheliale und hämatopoetische Mausmodelle mit konditional überexprimiertem c-MYC zeigen, dass c-MYC allein ausreichend ist, um einen prämaligen Status zu initiieren oder aufrecht zu halten (139-141). Die biologischen Folgen einer verstärkten Expression von c-MYC betreffen zahlreiche Aspekte der Tumorentstehung. Hierzu zählen neben dem erwähnten positiven Effekt auf die Proliferation und die Beteiligung an der Transformation auch die Inhibition der Zelldifferenzierung, die Erhöhung der Zellmasse, die Inhibition der Zelladhäsion, verstärkte Angiogenese, verstärkte Metastasierung sowie genomische Instabilität (142). Bei fehlenden Wachstumsfaktoren induziert c-MYC Expression Apoptose, bzw. es erhöht die Sensitivität gegenüber proapoptotischen Stimuli (143, 144).

1.2.2 Struktur und konservierte Domänen von c-MYC

c-MYC ist ein Transkriptionsfaktor der basischen Region/Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper (bHLH/LZ)-Familie mit einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD). Abb.1.2 zeigt die Domänenstruktur sowie Bindungsbereiche für Interaktionspartner. Die TAD umfasst die zwei hoch-konservierten Elemente c-MYC-Box I (MB1) und c-MYC-Box II (MB2), welche ausschließlich in Mitgliedern der c-MYC-Familie vorkommen (145, 146) und für die biologischen Funktionen wie Zellzyklusprogression, Induktion von Apoptose sowie Zelltransformation essentiell ist. Die TAD wurde in Transaktivierungsexperimenten mit Gal4-Element-Reporter-Gen-Konstrukten identifiziert, bei denen Fusionen von c-MYC-Fragmenten mit der DNA-bindenden Domäne vom Hefe-Gal4 eingesetzt wurden (147). Durch die Verwendung verschiedener Deletions- und Punktmutationen innerhalb der TAD konnte gezeigt werden, dass sich diese Funktionen der TAD teilweise voneinander trennen lassen und somit auf verschiedenen Mechanismen beruhen (148).

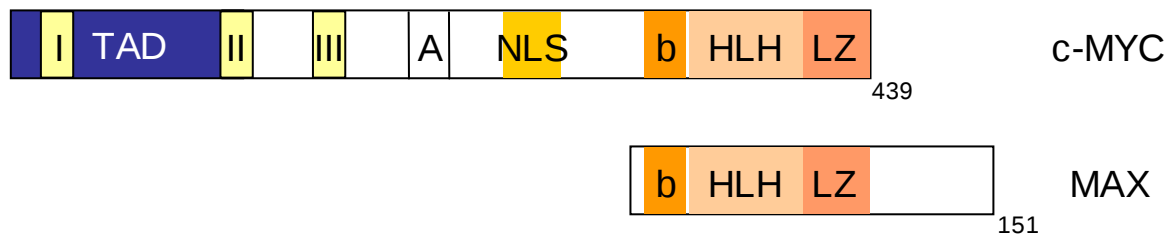


Abb. 1.2: **Schematische Struktur von c-MYC und des obligatorischen Interaktionspartners MAX.**

TAD: Transaktivierungs-Domäne; I: MYC-Box I; II: MYC-Box II; III: MYC-Box III, A: saure Region; NLS: nukleäres Lokalisierungs-Signal b: basische Region; HLH: Helix-Loop-Helix-Region; LZ: Leucin-Zipper.

MB1 umfasst zwei Phosphorylierungsstellen, Threonin58 und Serin62, die den 26S-Proteasomabhängigen Abbau von c-MYC regulieren (149). Eine Aminosäuresubstitution der Phosphorylierungsstelle Threonin 58 findet man häufig in Burkitt-Lymphomen sowie in onkogen-aktivierten *v-myc* Allelen retroviraler Hühnerviren, sie führt zu einer Erhöhung der Proteinstabilität (122, 124). Eine c-MYC-Mutante mit einer Deletion der MB1 zeigt außerdem in transienten Reporter-Gen-Assays eine Verringerung in der Transaktivierung (150).

MB2 ist die Binderegion für mehrere Kofaktoren und Kofaktor-Komplexe. Die Deletion dieser Region führt in transienten Reporter-Gen-Assays bei unveränderter Aktivierbarkeit zu einer Verminderung der Transrepression des ADML (*Adenovirus-2-major late*)-Promotors sowie zu einem Verlust der Kotransformation von REF Zellen mit RAS (151). Bei der Regulation endogener Zielgene zeigte sich bei einem Teil von c-MYC-Zielgenen eine MB2-Abhängigkeit (152).

Ein weiterer hoch-konservierter Bereich, die c-MYC-Box III (MB3), befindet sich in der zentralen Region des Proteins und ist erforderlich für die transkriptionelle Repression und Transformation durch c-MYC (153). In der zentralen Region befinden sich zwei Kernlokalisierungssignale (*nuclear localisation signal*, NLS: Aminosäuren 320-328 und schwächer 364-374), die für die Lokalisation von c-MYC in den Zellkern verantwortlich sind (154). C-Terminal befindet sich die hoch-konservierte bHLH/LZ-Domäne, die für alle bekannten Funktionen von c-MYC essentiell ist. Über die basische Region erfolgt die sequenz-spezifische DNA-Bindung, die HLH/LZ-Domäne vermittelt eine Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein MAX (155-158).

1.2.3 Das c-MYC/MAX/MAD-Netzwerk

Alle Mitglieder der c-MYC-Familie interagieren mit dem obligaten Heterodimerisierungspartner MAX (157, 158). MAX gehört wie c-MYC ebenfalls zur Klasse der

bHLHZip-Proteine und trägt eine DNA-Bindedomäne, verfügt jedoch über keine Transaktivierungs-Domäne. MAX wird konstitutiv und deutlich höher als c-MYC exprimiert. *In vivo* liegt c-MYC ausschließlich als Komplex mit MAX vor. c-MYC/MAX-Komplexe binden an spezifische DNA-Elemente der Sequenz CAC(G/A)TG (Enhancer-Boxen, E-Boxen), rekrutieren Kofaktoren und aktivieren die Transkription des jeweiligen Zielgens (159-161).

Alternativ zu c-MYC interagiert MAX mit Mitgliedern der MAD-Familie (MAD1, MXI1, MAD3, MAD4), welche als Antagonist zu der c-MYC-Familie gilt. MAD-Proteine sind hauptsächlich in nicht-proliferierenden Zellen exprimiert. MAD/MAX-Komplexe binden ebenfalls sequenzspezifisch E-Boxen wie c-MYC/MAX-Komplexe, sind aber in der Lage Transkription zu reprimieren. Dies geschieht durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen über die N-terminale SID-Domäne (Sin3-Interaktions-Domäne), mit der sie mit dem mSin3 Protein interagieren und Histon-Deacetylase-Komplexe rekrutieren können (162-164). Mitglieder der MAD-Familie inhibieren die Expression von Reportergenen, die durch c-MYC aktiviert werden, blockieren c-MYC-vermittelte Apoptose und Proliferation, verhindern die Transformation von Ratten-Fibroblasten und induzieren Differenzierung (116, 165, 166). Aufgrund der gegenläufigen Expression von c-MYC und MAD in proliferierenden bzw. in ruhenden oder differenzierenden Zellen überwiegen Komplexe aus c-MYC und MAX bei der Proliferation und Komplexe aus MAD und MAX bei Differenzierung oder Zellarrest. Die DNA- und MAX-Bindungen sind essentiell für die onkogene, mitogene und die proapoptotische Funktion von c-MYC (116, 157).

1.2.4 Transkriptionelle Regulation durch c-MYC

c-MYC ist ein Transkriptionsfaktor, der zahlreiche Gene aktivieren oder reprimieren kann. Die Zahl potenzieller Zielgene von c-MYC hat sich in den letzten Jahren durch den Einsatz von genomweiten Screens wie Microarray-, SAGE- (*serial analysis of gene expression*) und *ChIP Chip*-Analysen stark erhöht (167-176). Dabei wurden Zielgene aus vielen Bereichen der Zellregulation identifiziert, wie Gene die in Protein-Biosynthese, Ribosomen-Biogenese, Zellzyklus, Zellwachstum, DNA-Metabolismus, Apoptose und Immortalität involviert sind. Häufig sind die Überschneidungen der Ergebnisse aus den unterschiedlichen Analysen jedoch gering, was wahrscheinlich in den unterschiedlichen verwendeten Zelllinien mit differierenden Genexpressions Programmen, sowie den variierenden c-MYC Expressionsmengen in den verschiedenen Versuchssystemen begründet ist. Stark erhöhte c-MYC-Level haben eine Bindung und Regulation von Genen zur Folge, die durch physiologische Mengen nicht reguliert würden. Es wird anhand von Chromatin-Immunpräzipitationen der von c-MYC-gebundenen genomischen Sequenzen mit anschließenden Genom-Microarrays (*ChIP Chip*-Analysen) geschätzt, dass ungefähr 10% aller Gene innerhalb des Genoms von Mensch und Fliege (*Drosophila melanogaster*) direkt

von c-MYC gebunden werden (172, 176). Die Verhältnisse von aktivierten zu reprimierten Genen sind je nach verwendetem System unterschiedlich; typischerweise werden 10-25% aller c-MYC-Zielgene reprimiert (168). Ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung von Zielgenen ist die Unterscheidung von direkter und indirekter Genregulation. Als direktes c-MYC Zielgen werden solche definiert, dessen Expression unmittelbar durch die Bindung von c-MYC an den regulatorischen Sequenzen reguliert wird. Gene, die wiederum durch die von c-MYC-Zielgenen translatierten Proteine bzw. als Konsequenz von c-MYC-induzierten Vorgängen reguliert werden, bezeichnet man als indirekte oder sekundäre Zielgene. Ein stringentes Kriterium für direkte Zielgene ist der Nachweis von c-MYC Bindung an die regulatorischen DNA-Bereiche durch Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (*ChIPs*).

Viele Ergebnisse und die hohe Zahl der Zielgene deuten darauf hin, dass die biologischen Effekte von c-MYC nicht über einen kritischen Effektor, sondern über ein breites Spektrum von Zielgenen vermittelt werden (177). Neben den protein-kodierenden Genen spielen auch rRNA- und tRNA-kodierende Gene eine Rolle. Außerdem kann c-MYC mikroRNAs aktivieren, welche an der Regulation von Zielgenen beteiligt sind. So konnte für das c-MYC-aktivierte Zielgen E2F1 gezeigt werden, dass c-MYC die Translation dieses Gens über die Induktion einer mikroRNA negativ reguliert. Dies lässt eine stringente Kontrolle der E2F1 Expression zu und stellt vermutlich einen Sicherheitsmechanismus gegen zu hohe Mengen dieses stark proliferativ wirkenden Proteins dar (178).

1.2.5 Transaktivierung durch c-MYC

Die Aktivierung der Genexpression durch c-MYC hängt von der DNA-Bindung sowie von der Heterodimerisierung mit dem Partnerprotein MAX ab. c-MYC/MAX-Komplexe binden an E-Boxen der Sequenz CACGTG. Die meisten direkt aktivierten Zielgene weisen E-Boxen in ihren Enhancer oder Promotorregionen auf, umgekehrt werden aber nicht alle im Genom vorhandenen E-Boxen, die statistisch ca. alle 4000bp vorkommen, *in vivo* von c-MYC/MAX-Komplexen besetzt (172, 176). Für die Aktivierung von c-MYC Zielgenen ist seine N-terminale TAD essentiell (179). Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, wie c-MYC Genexpression aktivieren könnte. Über die TAD kann c-MYC direkt auf Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie wirken, denn sie bindet z.B. an TBP (TATA-Box-bindendes Protein) (180). Oder c-MYC rekrutiert Kofaktoren, die ihrerseits entweder das aktivierende Potential von c-MYC steigern können, auf die basale Transkriptionsmaschinerie wirken, oder durch Chromatin-Modifikationen und Chromatin-remodeling die Transkription positiv beeinflussen. Für zahlreiche Kofaktoren ist eine Bindung an c-MYC und die Beteiligung an der Aktivierung dokumentiert worden (Abb. 1.3).

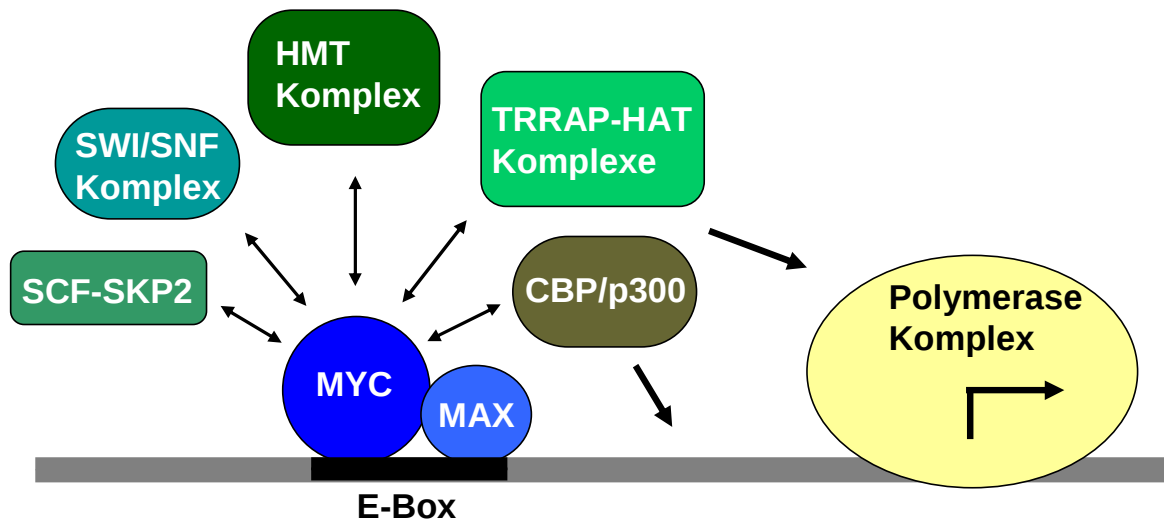


Abb. 1.3: **Transkriptionelle Regulation durch c-MYC** c-MYC/MAX Heterodimere binden an E-Box DNA-Sequenzen und stimulieren die Transkription durch Rekrutierung von Kofaktoren. Erklärungen sind im Text zu finden.

TRRAP, eine Untereinheit von mindestens zwei verschiedenen Histon-Acetyltransferase-Komplexen, dem GCN5/PCAF-Komplex sowie dem TIP60/Nu4A-Komplex, bindet c-MYC über die MB II (161, 181). Beide Histon-Acetyltransferasen (TIP60 und GCN5) interagieren *in vivo* mit dem c-MYC-Protein (159, 160), Tip60 konnte darüber hinaus zusammen mit weiteren Untereinheiten des TIP60-Komplexes (TRRAP, TIP48, TIP49 und p400) in *ChIP*-Experimenten an genomischen c-MYC-Bindestellen nachgewiesen werden (160). Auch die verwandten Histon-Acetyltransferasen p300 und CBP interagieren mit c-MYC und stimulieren seine transaktivierende Aktivität (182). Ausserdem ist bei einigen Zielgenen nach der Bindung von c-MYC die Acetylierung sowohl an Histon H3 als auch an Histon H4 im Bereich der E-Boxen gezeigt worden, wie z.B. auf dem Cyclin D2-Promotor, die mit der Gen-Aktivierung korreliert, so dass postuliert werden könnte, dass c-MYC durch die Rekrutierung von HAT-Komplexen seine Zielgene aktiviert (183). Die Funktion der c-MYC-bindenden HAT-Komplexe könnte neben der Histon-Acetylierung auch in der Acetylierung des c-MYC-Proteins selber liegen. Tatsächlich wurde die Acetylierung von c-MYC durch p300, CBP, GCN5 und TIP60 beobachtet (171, 182). Die Modifikation hat eine Erhöhung der Proteininstabilität zur Folge, vermutlich weil die Lysinreste durch die Acetylierung nicht mehr ubiquitiniert werden können und dadurch der proteasomale Abbau verhindert wird.

Zusätzlich zu den lokalen Effekten auf die Chromatinstruktur scheint c-MYC auch einen globalen Einfluss auf Histon-Acetylierung auszuüben, möglicherweise über eine transkriptionelle Aktivierung der Histon-Acetyltransferase GCN5 (184). Durch Wu *et al.* konnte beobachtet werden, dass die Reduktion von c-Myc in murinen Knochen-Krebs Zellen zur Seneszens führt, einhergehend mit reduzierter H4 Acetylierung und H3-K4-Trimethylierung aber erhöhter H3-K9 Trimethylierung (185).

Neben der Histon-Acetylierung scheint auch die Histon-Methylierung als positive Modifikation bei der c-MYC abhängigen Transkriptions Aktivierung eine Rolle zu spielen. So konnte eine strenge Korrelation zwischen c-MYC-Bindung und dem Vorhandensein spezifischer Chromatinmodifikationen nachgewiesen werden (186). Bindung von c-MYC an DNA (an E-Boxen und nicht E-Boxen) fand sich in dieser Studie ausschließlich in sogenannten euchromatischen Inseln, die sich neben der Histon H3-Acetylierung durch H3-Methylierung (K4 und K79) auszeichnen. Besonders die H3-K4 Trimethylierung ist mit aktiv transkribierten Genen assoziiert. In einer jüngst veröffentlichten Studie von Zippo *et al.* wurde die Serin/Threonin-Kinase PIM1 als ein weiterer MB2-bindender, jedoch Trrap-unabhängiger Kofaktor von c-MYC beschrieben (187). Pim1 wurde ursprünglich in einen Screen isoliert, der bei Überexpression die Lymphomagenese von E μ -Mäusen, welche konstitutiv ein *myc*-Allel unter dem Enhancer der schweren Immunglobulinkette exprimieren, verstärkt (188). PIM1 wird von c-MYC MB2-abhängig zu E-Boxen rekrutiert, phosphoryliert dort lokal Serin 10 von Histon H3 und bewirkt damit die Aktivierung der Zielgene (187).

Ein weiterer Chromatin modifizierender Komplex, der an c-MYC bindet, ist der SWI/SNF-Komplex. c-MYC interagiert über seine bHLHZip-Domäne mit dem SNF5-Homolog INI1, einem Mitglied des SWI/SNF-Komplexes. Reporter-gen-Assays zeigten, dass dominant-negatives BRG1, die katalytische Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes, die c-MYC-Aktivierung hemmt (189). Es wird also angenommen, dass SWI/SNF-Komplexe an der c-MYC-Transaktivierung beteiligt sind, aber es ist noch unklar, wie INI1, das ein Tumor-Suppressor ist, die Funktion des Proto-Onkoproteins c-MYC aktivieren könnte. Es wird also postuliert, dass c-MYC seine Zielgene durch die Histon-Acetylierung und möglicherweise das *remodeling* von Nukleosomen aktivieren kann.

Auch die Ubiquitinierung von c-MYC beeinflusst dessen Fähigkeit die Trankription zu aktivieren. c-MYC interagiert mit mehreren E3-Ligasen: SKP2, FBW7 und HECTH9. Für SKP2 und HECTH9 konnte ein Einfluss auf die genregulatorischen Eigenschaften von c-MYC gezeigt werden (142, 190). HECTH9 vermittelte Ubiquitinierung von c-MYC ist eine Voraussetzung für die Bindung des Koaktivators p300 (191). SKP2 markiert c-MYC durch die Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau, zugleich wird c-MYC aber hyperaktiviert, was als stringente Kontrolle der Aktivierung verstanden wird.

1.2.6 c-MYC-vermittelte Genrepression

Durch die Überexpression von c-MYC werden zahlreiche Gene reprimiert (128, 192). Darunter finden sich viele Gene, die für Zelladhäsionsproteine (193) und Zellzyklusregulatoren kodieren wie das CCAAT/enhancer-binding protein *alpha* c/EBP α (194, 195), p21CIP1 (CDKN1A, p21) (196), p15INK4b (134) oder c-MYC selber (197). Viele dieser

Gene stehen in Zusammenhang mit zellulärer Transformation, was darauf hindeutet, dass die Fähigkeit zur Repression von Zielgenen einen entscheidenden Anteil an c-MYC vermittelter Transformation hat (192, 198, 199). Der Mechanismus der c-MYC-abhängigen Gen-Repression ist bisher nicht vollständig geklärt. In c-MYC induzierbaren Zellsystemen waren die Zielgene auch bei gleichzeitiger Hemmung der *de novo* Proteinsynthese reprimiert, was auf einen direkten Repressionsmechanismus hinweist (200). Dazu konnte in vielen Fällen die Abhängigkeit der Repression von der MB2 beobachtet werden, die Binderegion für mehrere c-MYC-Kofaktoren ist, was auf eine Beteiligung von Kofaktoren an dem Repressionsprozess hindeutet (151, 201).

Vermutlich ist die Art der c-MYC-Repression Zielgen-abhängig. Zum Beispiel wird *tmeff2*, das für ein Transmembran-Protein und potenziellen Tumor-Suppressor kodiert, durch c-MYC abhängig von den E-Boxen reprimiert, was für eine direkte DNA-Interaktion spricht (202). Auch *p27* wird von c-MYC reprimiert, indem c-MYC/MAX-Heterodimere direkt mit der Transkriptionsstartstelle interagieren (133, 203). Eine weitere Möglichkeit der c-MYC vermittelten Gen-Repression ist durch indirekte Bindung an die DNA. c-MYC reprimiert dabei vermutlich nicht durch einen aktiven Mechanismus, sondern durch Hemmung der Aktivatoren der betreffenden Gene. Ob dabei von c-MYC reprimierende Kofaktoren rekrutiert werden müssen, oder ob durch die Bindung von c-MYC die Rekrutierung von aktivierenden Kofaktoren an die DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren verhindert wird, ist unklar. Viele c-MYC-reprimierte Zielgene haben Initiator (INR)-Elemente, die im Allgemeinen in TATA-Box-freien Genen vorkommen und von TFIID, TFII-I, YY1 und MIZ-1 gebunden werden können. Diese Transkriptionsfaktoren rekrutieren c-MYC über dessen bHLHZip-Region, wodurch ihre aktivierende Wirkung supprimiert wird. Am Besten beschrieben ist der Repressionsmechanismus über die Bindung des Transkriptionsfaktors MIZ-1 (c-MYC-interacting-Zinkfinger 1). Ein Beispiel für die Repression eines MIZ-1-Zielgens durch c-MYC ist die Repression von *p15INK4b* (134). Die Expression von *p15INK4b* wird durch die Bindung von MIZ-1 an das INR-Element aktiviert. c-MYC bindet MIZ-1 und inhibiert so die Aktivierung des Gens. Es konnte beobachtet werden, dass die Bindung von c-MYC an MIZ-1 die Interaktion zwischen MIZ-1 und dessen Kofaktor p300 reduziert (204). Ein weiteres Beispiel ist *p21CIP1*, welches von MIZ-1 in der Differenzierung und in Anwesenheit von DNA-Schäden aktiviert wird, was durch die Bindung von c-MYC inhibiert wird (132, 196). Bei der Repression des Zielgens *p21CIP1* in humanen Zellen wurde gezeigt, dass c-MYC zusammen mit MIZ-1 und der DNA-Methyltransferase DNMT3a einen ternären Komplex bilden, und dass DNMT3a über DNA-Methylierung zur Repression des *p21*-Promotors beiträgt (205).

1.3 Die zellulären Koaktivatoren CBP und p300

CREB Binding Protein (CBP) und das homologe p300 sind ubiquitär exprimierte, nukleäre Phosphoproteine mit einer Größe von 270 kDa. Beide sind als Koaktivatoren der Transkription an vielen physiologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (206). CBP und p300 besitzen Acetyltransferase Aktivität und zahlreiche konservierte Domänen. Hierzu gehören die drei Cystein- und Histidin-reichen Regionen (C/H1, C/H2 und C/H3) sowie eine KIX-Domäne, die wichtige Funktionen bei Protein-Protein-Interaktionen ausüben. Diese Regionen werden von einer Vielzahl zellulärer und viraler Faktoren gebunden (207). Über die Bromo-Domäne, die bei einer großen Anzahl von Acetyltransferasen konserviert ist, können sie acetylierte Lysine erkennen und binden (208). CBP und p300 können mit ihrer intrinsischen Acetyltransferase-Aktivität die Lysinreste von Histonen acetylieren. Der damit verbundene Verlust der positiven Ladung führt zu einer gelockerten Chromatinstruktur, weshalb die DNA besser zugänglich für Transkriptionsfaktoren und die Transkription durch die RNA-Polymerase II wird (209). Durch Bindung weiterer zellulärer Faktoren, wie z.B. p/CAF, SCR1 und ACTR besitzen CBP und p300 auch assoziierte HAT-Aktivität (210, 211). Neben der Acetylierung der Histone, können sie auch Nicht-Histon-Proteine, wie z.B. c-MYC (212), p53 (213), c-Myb (214), E2F-1 (215) und C/EBPb (216) acetylieren und deren Aktivität regulieren. Über die Interaktion mit einer Vielzahl von DNA bindenden Transkriptionsfaktoren werden CBP und p300 an den Promotor rekrutiert. Die Koaktivatorfunktion von CBP und p300 wird auch über posttranslationale Modifikationen, wie Ubiquitinierung und Phosphorylierung reguliert. Für p300 ist dabei eine negative Regulation durch Deacetylierung von zwei Lysinresten durch SIRT1 beschrieben worden (217).

1.4 Histon-Deacetylasen und Sirtuine

Histon-Deacetylasen katalysieren die Entfernung von Acetyl-Gruppen von Proteinen die von der antagonistisch wirkenden Klasse der Histon-Acetyltransferasen acetyliert wurden (Abb. 1.4). Die HDACs werden auf der Grundlage ihrer Homologie zu *Saccharomyces cerevisiae* Deacetylasen in vier verschiedene Klassen eingeteilt. Zu den Klasse I-Histon-Deacetylasen gehören die HDAC1, -2, -3, und -8, die vorwiegend nukleär lokalisiert sind. Klasse II-Deacetylasen werden weiter unterteilt in Enzyme der Klassen IIa (HDAC4, -5, -7 und -9) und IIb (HDAC6 und -10). Zur Klasse III gehören die NAD⁺-abhängigen Sirtuine. Der bislang einzige bekannte Vertreter der Klasse IV ist HDAC11. Die Klasse III-Histon-Deacetylasen der Sirtuine unterscheiden sich in mehreren Punkten von den Klasse I-, II- und IV-HDACs: sie sind nicht Zink-, sondern NAD⁺-abhängig, haben dadurch einen von den klassischen HDACs verschiedenen Katalysemechanismus und sind nicht durch die Hemmstoffe der Klassen I und II-HDACs wie Trichostatin A (TSA) oder Trapoxin hemmbar (218).

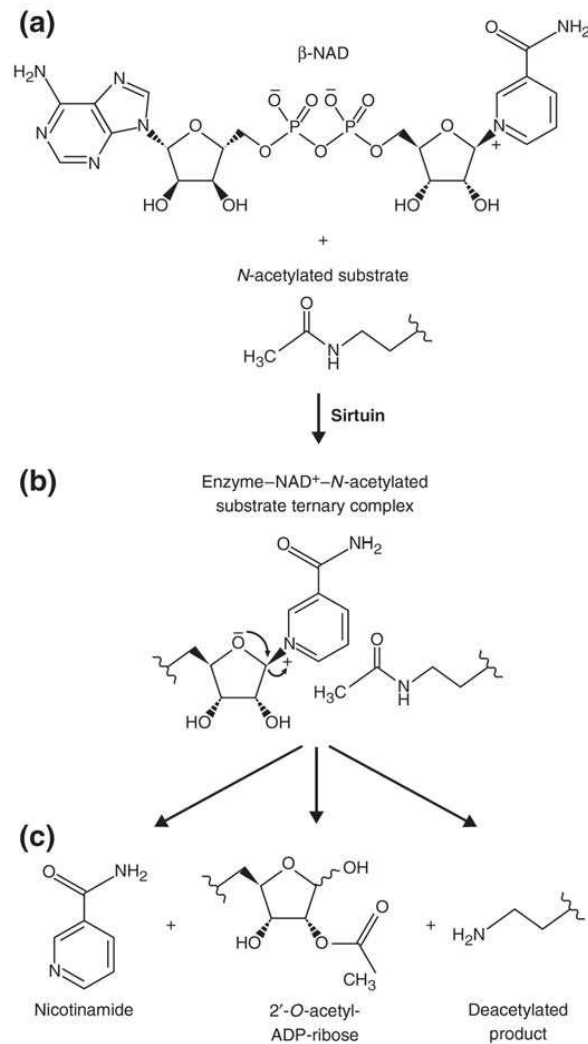


Abb. 1.4: Darstellung der Sirtuin-katalysierten Deacetylierungs-Reaktion.

(a) Die notwendigen Bestandteile für die Sirtuin-vermittelte Deacetylase-Aktivität sind Sirtuin, β -NAD⁺, und der N-Acetyl-Lysinrest eines Substrats. **(b)** Die Bestandteile bilden einen tertiären Komplex. Während der enzymatischen Reaktion wird das am C1-Kohlenstoff gebundene Nicotinamid von dem ADP-Ribose-Rest des NAD abgelöst, um durch einen nukleophilen Angriff des Sauerstoffatoms der Acetyl-Gruppe auf das C1 Kohlenstoff einen oxocarboniumartigen Übergangs-Zustand zu erzeugen. Nach mehreren Intermediaten (nicht gezeigt) werden die Produkte gebildet, **(c)** das deacetylierte Substrat, 2-O-Acetyl-ADP-Ribose und Nicotinamid (nach Denu, 2003).

Strukturell unterscheiden sich die Sirtuine durch eine konservierte, ca. 275 Aminosäuren lange katalytische Domäne, die keinerlei Verwandtschaft zu Histon-Deacetylasen der Klassen I und II zeigt. Man findet die Sir2-ähnlichen Enzyme sowohl in Eukaryoten als auch Bakterien und Archäen. Die Sirtuine sind nach ihrem Hefehomolog Sir2 (*silent information regulator 2*) benannt. SIRT1-7, für die das menschliche Genom kodiert, werden in verschiedenen Zellkompartimenten gefunden. So sind SIRT1, SIRT6 und SIRT7 im Zellkern, SIRT2 im Cytoplasma und zu geringem Teil im Kern und SIRT3, SIRT4 sowie SIRT5 in den Mitochondrien lokalisiert. SIRT4 und SIRT6 zeigen gegenüber ihren Substraten keine Deacetylase-, sondern eine ADP-Ribosylierungs-Aktivität. Die SIRTs werden in allen

Gewebe exprimiert, allerdings mit Unterschieden im Expressionsstatus (219). Die umfangreichsten Untersuchungen liegen bislang zu SIRT1 und SIRT2 vor.

1.5 SIRT1 und Sir2

Das SIRT1-Protein ist das Homolog zu Sir2 aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (220-223). Das Sir2 Protein der Hefe besitzt NAD⁺-abhängige Histon-Deacetylase Aktivität mit Spezifität für Histon H3-K9/14, sowie Histon H4-K16 und wurde in einem Protein-Komplex zusammen mit Sir1, Sir3 und Sir4 gefunden (55, 224, 225). In der Hefe ist Sir2 an vielfältigen Prozessen beteiligt. Der Sir2-enthaltende Protein-Komplex spielt bei der Repression des Paarungstyp-bestimmenden Locus (*engl. mating-type locus*) (226, 227), der telomernahen Bereiche (228) und der rDNA-Loci eine Rolle (229). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Sir2 die rDNA-Rekombination inhibiert und bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen involviert ist (230-233).

Das Interesse an Sir2 gründet vor allem auf Beobachtungen von seinem Einfluss auf die Lebenserwartung der Hefezellen. Eine moderate Überexpression von Sir2 in *Saccharomyces cerevisiae* führt zu einer Verlängerung der Lebensspanne der Hefezelle um etwa 50% (225). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich einerseits auf der Repression der rDNA-Gene, was zu einer reduzierten Biosynthese durch Inhibierung der Translation führt. Andererseits ist die Inhibition der rDNA-Rekombination daran beteiligt, denn die Rekombination der rDNA-*repeats* führt bei der Zellteilung zur Bildung von extrachromosomalen ringförmigen DNA-Elementen (ERC). Die Akkumulation dieser ERCs führt zu einer Fragmentierung des Nucleolus und zur Seneszenz, worauf der Tod der Hefezelle folgt (232, 234, 235). Der Sir2 Kofaktor NAD⁺ spielt eine entscheidende Rolle bei den Prozessen. Dessen intrazelluläre Konzentration hängt von der Ernährungslage der Zelle ab. Ist das Nahrungsangebot begrenzt, liegt das Gleichgewicht zwischen NAD⁺ und NADH auf der Seite von NAD⁺. Diese erhöhte NAD⁺ Konzentration führt zu verstärkter Aktivität von Sir2, was zum gleichen lebensverlängerndem Effekt wie die Überexpression von Sir2 führt. Mutationen in Sir2 haben vorzeitiges Altern und eine verkürzte Lebensspanne zur Folge. Sir2 verknüpft somit das Nahrungsangebot mit der Lebenserwartung (234, 236, 237).

Das humane SIRT1 ist ein 747 Aminosäuren langes Protein und ist im Nukleus lokalisiert (238). SIRT1 deacetyliert *in vitro* und *in vivo* Histone, mit Spezifität für Histon H1-K9/26, Histon H3-K9/14 und Histon H4-K16 sowie eine Reihe anderer regulatorischer Proteine (55, 225, 239-241). SIRT1 ist an zahlreichen Prozessen in der Zelle beteiligt, dabei sind alle Funktionen von seiner enzymatischen Aktivität abhängig.

1.5.1 Einfluss von SIRT1 auf Heterochromatin und Transkription

Durch die oben beschriebene Deacetylierung der Histone ist SIRT1 an der Bildung von Heterochromatin beteiligt (55, 225, 239-241). Die Deacetylierung von Histonen trägt zur Kondensation des Chromatins bei und somit zur Supprimierung der Genexpression, was am Beispiel der Rekrutierung von SIRT1 an die DNA durch den Faktor BCL11A, welcher an der hämatopoetischen Zellentwicklung beteiligt ist, gezeigt wurde (242). Desweiteren konnte die Re-Expression von Genen durch die Inhibierung von SIRT1 beobachtet werden, was mit einer Hyperacetylierung an den betreffenden Promotoren einherging (243). Die repressorische Funktion vermittelt SIRT1 auch unmittelbar über die Regulation von an der Transkription beteiligten Faktoren. So wurde der Transkriptionsfaktor TAFI68, eine Untereinheit des rDNA transkribierenden RNA-Polymerase I-Komplexes, als erstes nicht-Histon Substrat identifiziert (244). Später wurde gezeigt, dass das murine SIRT1 orthologe Protein Sir2 α durch die Deacetylierung von TAFI68 die Initiation der rDNA Transkription *in vitro* inhibiert (245). Auch durch die Deacetylierung des Kofaktors p300 an den Lysinen 1020 und 1024 in der regulatorischen Domäne scheint Transkription negativ beeinflusst zu werden (217). Weitere Transkriptionsfaktoren, die als Substrate von SIRT1 beschrieben wurden, sind der MyoD/PCAF Komplex und MEF2 (MADS box transcription enhancer factor 2). SIRT1 deacetyliert und reprimiert den MyoD/PCAF Komplex, der essentiell für die Myogenese ist (246, 247). Die Deacetylierung an Lysin 424 von MEF2, ein Faktor, der bei der Differenzierung von Muskelzellen unter anderem mit MyoD kooperiert, führt ebenfalls zur Repression seiner Aktivität (248). Experimente mit *knockout*-Mäusen zeigten, dass der Verlust von SIRT1 zu einer gestörten Muskeldifferenzierung führt (249).

1.5.2 Einfluss von SIRT1 auf Apoptose und Zell-Überleben

Die Ergebnisse der letzten Jahre lassen SIRT1 eine immer grössere Rolle in der Regulation von Apoptose zukommen. Das Tumorsuppressorprotein p53 wird von SIRT1 *in vivo* und *in vitro* an mehreren Lysinen (K320, K373, K382) deacetyliert. Dadurch wird seine transkriptionelle Aktivität inhibiert und Apoptose als Antwort bei DNA Schäden und oxidativen Stress supprimiert (221, 222, 250, 251). Das Protein p53 ist ein durch DNA-Schäden und andere Noxen induzierter Transkriptionsfaktor, der als Tetramer an die DNA bindet und die Expression einer großen Anzahl von Genen kontrolliert, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose spielen (252-254). Interessanterweise inhibiert SIRT1 durch Bindung im Komplex mit HIC1 (*hypermethylated in cancer 1*) an den SIRT1 Promotor seine eigene Expression und verstärkt dadurch Apoptose. HIC1 wiederum ist Zielgen von p53, so dass man davon ausgeht, dass es sich um einen Rückkopplungsmechanismus zur Steuerung der Apoptose handelt (255). Allerdings sind die Auswirkungen auf die Funktion von p53 und der Einfluss auf die Apoptose durch die SIRT1-

vermittelte Deacetylierung aufgrund widersprüchlicher Daten nicht unumstritten (253, 256, 257). So kann z.B. in *Sirt1 knockout* Mäusen durch Eliminierung von p53 nicht der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt werden, was darauf deutet, dass p53 nicht das einzig relevante Substrat ist, welches an der Ausprägung des Phänotypes beteiligt ist (256, 258). Darüber hinaus sind p53 und SIRT1 in Promyelocyten Leukemie Körpern (PML-Körper), die subnukleäre Strukturen darstellen, kolokalisiert. Über die Interaktion mit Proteinen der PML-Körper scheint SIRT1 auf die Zellproliferation Einfluss zu nehmen (259). Kürzlich wurde das mit p53 verwandte p73 als Substrat von SIRT1 beschrieben. Auch bei p73 scheint die Deacetylierung durch SIRT1 zur Unterdrückung der p73 Transaktivierung und der vermittelten Apoptose zu führen (260).

SIRT1 deacetyliert *in vitro* und *in vivo* auch die Proteine Ku70 und NF- κ B, die wiederum in der Regulation der Apoptose involviert sind. So hat Ku70 sowohl eine essentielle Funktion bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, als auch bei der BAX-abhängigen Apoptose. Deacetyliertes Ku70 bindet den pro-apoptotischen Faktor BAX und verhindert so den BAX-vermittelten Zelltod (261, 262). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kontrolliert die Expression von Genen, die zelluläre Prozesse wie die Zelladhäsion, die Immunantwort, den Zellzyklus, die Angiogenese und die Apoptose steuern (263-266). Durch die Deacetylierung von NF- κ B wird die transkriptionelle Aktivität inhibiert. Allerdings führt die Deacetylierung von NF- κ B im Gegensatz zu den anderen SIRT1-Substraten, die in der Regulation der Apoptose involviert sind, scheinbar zu einem pro-apoptotischen Effekt (267). Ein weiterer von SIRT1 negativ regulierter Transkriptionsfaktor ist E2F1, ein Regulator von Proliferation und Zellzyklus. E2F1 kann direkt am *sirt1* Promotor binden und dessen Transkription induzieren, durch die Bindung von SIRT1 wird aber die Apoptose-Funktion von E2F1 inhibiert (268). Desweiteren wurden die sog. *forkhead*-Transkriptionsfaktoren FOXO1 (269), FOXO3a (270, 271) und FOXO4 (272, 273) als Substrate von SIRT1 beschrieben. Diese Faktoren werden *in vivo* und *in vitro* von SIRT1 deacetyliert. Die FOXO regulierten Gene kontrollieren unter anderem Zellzyklus, Apoptose, Zellmetabolismus und die Zellantwort auf oxidativen Stress (274, 275). SIRT1 reduziert Apoptose über FOXO3a Deacetylierung und revertiert die durch oxidativen Stress ausgelöste Suppression von FOXO4, was ebenfalls zu einer erhöhten Überlebensrate führt (271-273).

1.5.3 Einfluss von SIRT1 auf Seneszenz

Zum heutigen Zeitpunkt ist die Rolle von SIRT1 in der Seneszenz nicht eindeutig geklärt. Experimente zeigen, dass im Fadenwurm *C. elegans* das Sir2-Ortholog das FOXO-Protein Daf16 deacetyliert und dadurch eine „Dauer“ genannte Seneszenz induziert, die die Lebensspanne des Fadenwurms signifikant steigert (276, 277). Auch in Rattenzellen konnte durch die Überexpression von humanem SIRT1 eine verlängerte Lebensspanne beobachtet

werden (261). Allerdings weisen RNAi Experimente darauf hin, dass die Reduktion von SIRT1 in Krebslinien Seneszenz zur Folge haben kann, SIRT1 also diese normalerweise unterdrückt.

1.5.4 Einfluss von SIRT1 auf Entwicklung

Experimente mit *Sirt1 knockout*-Mäusen lassen Funktionen von *Sirt1* in der Entwicklung vermuten. Die Mäuse zeigen zahlreiche Auffälligkeiten. Sie sind kleiner, entwickeln sich langsamer, haben eine geringe Geburtenrate, wobei die Nachkommen steril sind. Zusätzlich zeigten diese *knockout*-Mäuse erhebliche Entwicklungsstörungen, die insbesondere im Sehapparat, im Herz-Kreislauf-System und während der Muskelentwicklung zu beobachten sind. Bei der gestörten Muskeldifferenzierung spielt das Anfangs erwähnte *MyoD* eine Rolle (249). Dagegen konnte bei keiner der Mäuse ein Defekt im *gene-silencing* beobachtet werden (278, 279).

1.5.5 SIRT1 und Krebs

Eine Rolle von SIRT1 bei der Entstehung von Krebs war durch dessen Beteiligung an den für die Tumorgenese relevanten Prozessen wie Apoptose und Stress-Resistenz nicht überraschend. Tatsächlich wurde in Prostata-Krebs eine erhöhte Expression von SIRT1 beobachtet (280). Vermutlich begünstigt SIRT1 durch Repression der Apoptose und Erhöhung der Resistenz gegen oxidativen Stress die Entstehung von Tumoren. Bestätigt wird dies durch den Befund, dass in Prostata-Krebszellen FHL2 (*four and a half LIM domain protein*) die Deacetylierung von FOXO1 durch SIRT1 verstärkt, was zu einer geringeren Apoptoserate führt (269).

1.6 ASH2

1.6.1 Trx- und Pc-Proteine

Bei der Embryogenese von *Drosophila* sind die Homöobox-Transkriptionsfaktoren (Hox-Proteine) verantwortlich für die Festlegung der Segment-Identität (281). Die Homöobox-Transkriptionsfaktoren werden von hoch konservierten *Homöobox (Hox)*-Genen kodiert und regulieren Zielgene entweder direkt oder über andere Segment- und Gewebe-spezifische Transkriptionsfaktoren, die an der Ausprägung segmentspezifischer Merkmale wie Beine, Flügel und Halteren beteiligt sind (282). Nach der Gastrulation werden die homöotischen Gene von den antagonistisch wirkenden Trithorax- und Polycomb-Proteinen reguliert (283). Diese erhalten das etablierte Expressionsmuster und gewährleisten so die Segmentintegrität. Proteine der Polycomb-Gruppe (PcG) sind dabei für die Aufrechterhaltung des reprimierten Status, Proteine der Trithorax-Gruppe (TrxG) dagegen für die

Aufrechterhaltung des aktivierten Status der homöotischen Gene verantwortlich. Die Kontrolle der Zielgene erfolgt durch den Einfluss auf das Chromatin und bleibt über viele Zellteilungen erhalten. PcG- und TrxG-Proteine bilden untereinander grosse Multi-Protein-Komplexe und binden an DNA-Elemente, sogenannte PREs (*polycomb response elements*) bzw. TREs (*trithorax response elements*). Der Großteil der PcG/TrxG-Proteine zeigt keine sequenzspezifische DNA-Bindung; es wird angenommen, dass die PcG- und TrxG-Proteine meist über ihre Komplexpartner zu den PREs bzw. TREs rekrutiert werden. Die Langzeit-Regulation durch PcG- und TrxG-Komplexe erfolgt vermutlich vor allem über kovalente Histon-Modifikationen sowie Chromatin-remodeling. Zu den TrxG- und PcG-abhängigen Histon-Modifikationen gehören vor allem Acetylierungen bzw. Deacetylierungen und Methylierungen, vermittelt durch Histon-Acetyltransferasen, Histon-Deacetylasen bzw. Histon-Methyltransferasen (HMT). Es wird angenommen, dass aktivierende Histon-Modifikationen wie die Methylierung an Histon H3 Lysin 4 (H3-K4) und die Acetylierung mit TrxG-Komplexen assoziiert sind, reprimierende wie die Methylierung an H3-K9 und H3-K27 und die Deacetylierung mit PcG-Komplexen. Tatsächlich binden TrxG-Proteine an HMTs mit Spezifität für H3-K4 wie im Fall von ASH2, oder sie besitzen selbst H3-K4-HMT-Aktivität, wie z.B. MLL und ASH1, und erhalten das Chromatin dadurch in einem aktiven Zustand. Dagegen binden z.B. die PcG-Komplex-Mitglieder HPC2 und Bmi-1 die H3-K9-HMT SUV39H1 (284). Neben homöotischen Genen regulieren PcG- und TrxG-Proteine eine Vielzahl anderer Gene, unter anderem auch solche, die an der Tumorentstehung beteiligt sind (285).

1.6.2 Das Trithoraxprotein Ash2 in Drosophila

Das *ash2*-Gen wurde in *Drosophila melanogaster* bei einem screen für Lethalität im späten larvalen oder frühen Puppenstadium mit Imaginalscheiben-Abnormalitäten identifiziert (286). Die Bezeichnung *ash* steht für *absent, small or homeotic discs* und bezieht sich auf den Phänotyp von Mutationen im *ash1*- bzw. *ash2*-Gen. Aufgrund genetischer Kriterien wurde *ash2* der Trithorax-Gruppe von Genen zugeordnet (287). Mutationen von *ash2* sind meist letal und führen wie bei anderen TrxG-Genen zu einem breiten Spektrum an homöotischen Transformationen (287). Allerdings unterscheiden sich einige *ash2*-Mutationen in der Ausprägung ihres Phänotyps von denen anderer TrxG-Mutationen, was eine Rolle von Ash2 bei der Regulation von zusätzlichen Genen wahrscheinlich macht. Inzwischen wurden zahlreiche potentielle Zielgene für Ash2 in *Drosophila* identifiziert (285). Die Genprodukte sind z.B. an der Zell-Adhäsion, der Entwicklung des Nervensystems, der Zellzyklus-Progression oder Antwort auf äußere Reize beteiligt. Bisher konnten keine Konsensus-Sequenzen von Ash2-regulierten Genen ermittelt werden, so dass Ash2 vermutlich über DNA-bindende Faktoren zu den Promotoren der Zielgene rekrutiert wird. In *Drosophila* wurde

das Ash2-Protein in den Imaginalscheiben und im Zellkern von Speicheldrüsen- und Fettzellen gefunden (288). Es besitzt einen PHD (*plant homeodomain*)-Finger, der eine doppelte Zink-Finger-Domäne darstellt und häufig in Transkriptionsregulatoren zu finden ist (289), ein zweigeteiltes NLS, eine für kurzlebige Proteine charakteristische PEST-Sequenz und eine SPRY-Domäne, die vermutlich eine Rolle bei RNA-Bindung und/oder Protein-Protein-Interaktionen spielt (288). Als Interaktionspartner von Ash2 wurde in *Drosophila* das nukleäre Enzym SKTL identifiziert, das den Botenstoff Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP 2) bildet (290).

1.6.3 ASH2 im Menschen

Struktur von ASH2

Das humane *Ash2l* (*ash2-like*) Gen kodiert für ein Protein von 628 Aminosäuren und besitzt einen N-terminalen Zink-Finger, eine C-terminale SPRY-Domäne, und ein zweigeteiltes Kernlokalisierungs-Signal (NLS) (291) (Abb. 1.5). Das *Ash2l* Gen ist zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert; *Ash2l* ist zu 93,9% identisch mit seinem Gegenstück in der Maus und zu 45,4% mit *Drosophila-ash2*. Das Protein ASH2L kommt in einer weiteren, kürzeren Isoform vor, welche ASH2L2 genannt wird im Gegensatz zur üblichen längeren ASH2L1 Variante. Die Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen des Primärtranskriptes, zur Funktion von ASH2L2 ist nichts bekannt (292). Da diese Arbeit ausschließlich das ASH2L1-Protein behandelt, wird es im Folgenden weiter als ASH2 bezeichnet.

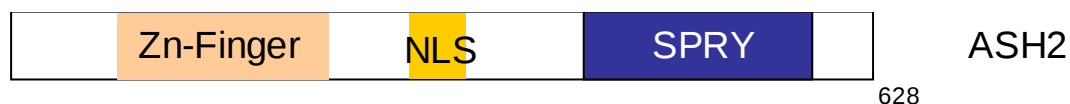


Abb. 1.5: **Schematische Struktur von ASH2L1.**

Zn-Finger: Zink-Finger; NLS: nukleäres Lokalisierungs-Signal; SPRY: SPRY-Domäne.

Im Unterschied zum *Drosophila*-Ortholog, welches einen PHD (*plant homeodomain*)-Finger hat, der als doppelter Zink-Finger aus sieben Cysteinen und einem Histidin in der Anordnung Cys4-His-Cys3 besteht, fehlen dem humanen ASH2 drei Cysteine und ein Histidin für einen vollständigen PHD-Finger. Einzelne oder mehrere PHD-Finger wurden u.a. auch in den TrxG-Proteinen MLL (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia) und Trithorax, sowie im PcG-Protein Polycomb-like, in der HAT CBP (CREB-bindendes Protein), und den Demethylasen der JARID1-Familie gefunden. Eine allgemeingültige Funktion dieses PHD-Fingers ist zwar nicht bekannt, aber es ist wahrscheinlich, dass er als Protein-Protein-Interaktionsdomäne an der Chromatin-abhängigen Transkriptions-Regulation beteiligt ist (289). Für die PHD Proteine ING2, YNG1 and NURF konnte gezeigt werden, dass sie über

dieses Motiv methyliertes H3-K4 erkennen und binden können, die Demethylase JARID1C bindet über den PHD-Finger methyliertes H3-K9 (293-295). Ob der Zink-Finger in ASH2 noch die Funktion eines PHD-Fingers erfüllen kann, ist unklar. SPRY (SP1A und Ryanodin-Rezeptor)-Domänen sind nach ihrem Vorkommen in SP1A und Ryanodin-Rezeptoren benannt. Die allgemeine Funktion der SPRY-Domäne ist zwar bisher unbekannt, doch es wird vermutet, dass sie eine Rolle bei RNA-Bindung oder bei Protein-Protein-Interaktionen spielt. Auch in humanem ASH2 könnte die SPRY-Domäne für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sein, denn sie vermittelt zum Beispiel die Bindung von *Drosophila*-Ash2 an SKTL (290).

ASH2 ist ein Onkogen

Die stabile Überexpression von Onkogenen wie c-MYC, E1A und dominant negativem p53 zusammen mit Ha-RAS (*Harvey-RAS*) führt in primären Rattenembryofibroblasten (REFs) zur Transformation der Zellen. Dieses Ha-RAS ist konstitutiv aktiv durch eine Mutation der Aminosäure 12 von Glycin zu Valin, die bewirkt, dass Ha-RAS GTP nicht mehr hydrolysieren und somit nicht inaktiviert werden kann. Da in dieser Arbeit nur das konstitutiv aktive Ha-RAS (G12V) behandelt wird, wird dieses weiterhin RAS genannt. Bei solchen Transformationsversuchen konnte für ASH2 ebenfalls starkes transformierendes Potential beobachtet werden. Die stabile Überexpression von ASH2 und Ha-RAS resultierte in einer ähnlichen Menge an transformierten REFs wie bei c-MYC (296). Außerdem scheint die c-MYC/Ha-RAS-vermittelte Transformation abhängig vom Ratten Ash2 zu sein, denn die c-MYC/RAS induzierte Transformation ließ sich durch siRNA gegen Ratten Ash2 inhibieren. ASH2/RAS- und c-MYC/RAS-transformierte Zellen unterscheiden sich bezüglich mehrerer Kriterien: ASH2/RAS-transformierte Zellen wachsen etwas langsamer und entwickeln im Gegensatz zu c-MYC/RAS-transformierten Zellen mit zunehmender Passagenzahl in Kultur einen tetraploiden und später aneuploiden Karyotyp (Dissertation Gesa Walsemann). Nach der Injektion von ASH2/RAS transformierten Zellen in syngene Ratten bilden sich wie bei c-MYC/RAS Zellen Tumore. Aus den Tumoren gewonnene Zelllinien weisen bei ASH2/RAS im Gegensatz zu c-MYC/RAS teilweise einen aneuploiden Karyotyp auf (unpublizierte Daten der Abt. Lüscher). ASH2 und c-MYC transformierte Zellen zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster von Zellzyklus-relevanten und anderen Proteinen. In den ASH2/RAS-Linien waren Cyclin D2 und Cyclin E geringer exprimiert, Cyclin D1 und der Cdk-Inhibitor p21Cip1 waren dagegen überexprimiert. p21 ist aber in den ASH2/RAS-transformierten Zellen scheinbar inaktiviert, denn die Cdk2-Kinase-Aktivität und die Cyclin E-assoziierte Kinase-Aktivität waren trotz p21-Überexpression unverändert (Dissertation Gesa Walsemann). Ebenso wie c-MYC/RAS-transformierte Zellen gehen ASH2/RAS transformierte Zellen unter Serummangel in die Apoptose. Wie neuere Untersuchungen

zeigen, ist ASH2 in den meisten Tumoren überexprimiert. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede im Ash2 RNA-Gehalt zwischen Tumor- bzw. Normalgewebe festgestellt werden, was auf eine posttranslationale Regulation schliessen lässt (296).

ASH2-assozierte Histon-Methyltransferase (HMT)-Komplexe

Humanes ASH2 ist Bestandteil mehrerer Histon H3 Lysin 4 HMT-Komplexe, die neben ASH2 weitere identische Untereinheiten enthalten, aber unterschiedliche HMTs, denen die SET-Domäne gemeinsam ist. Diese HMT-Komplexe sind verwandt mit dem zuvor beschriebenen *Saccharomyces cerevisiae* Set1-Methyltransferase-Komplex mit H3-K4-HMT-Aktivität, der das ASH2 Homolog *Bre2* enthält und eine Rolle bei dem Erhalt der Telomer-Längen und der DNA-Reparatur spielt (297-299). Generell scheinen die HMT-Komplexe aus den Untereinheiten WDR5 (*WD repeat domain 5*), RBBP5 (*Retinoblastoma binding protein 5*) und ASH2 als eine Art Kern-Einheit zu bestehen, an die dann verschiedene HMTs und andere Faktoren binden. WDR5 und RBBP5 scheinen für die Komplex-Integrität essentiell. Für WDR5 konnte zudem gezeigt werden, dass es an di- und trimethyliertes Histon H3 binden kann, was den HMT-Komplexen die Möglichkeit gibt, sich durch die enzymatische Aktivität ihre eigenen Bindungsstellen zu generieren (300). ASH2 dagegen ist vermutlich die Komponente, die dem Komplex die H3-K4 Trimethylierung ermöglicht, denn ohne ASH2 können nur maximal zwei Methyl-Reste übertragen werden (301).

Die meisten HMTs der Komplexe stammen aus der MLL-Familie (*mixed lineage leukemia*), die aus den Mitgliedern MLL1, MLL2, ALR-1, ALR-2, HALR (dem Paralog von ARL) bestehen. Verwirrender Weise existieren verschiedene Terminologien für die Mitglieder der MLL-Familie: MLL2 (auch MLL4, TRX2), ALR-1 (auch MLL2, MLL4-1), ALR-2 (auch MLL4-2), HALR (auch MLL3). Prominenter Vertreter ist MLL1 (*mixed lineage leukemia 1*), ein funktionelles Ortholog des *Drosophila*-Trithorax und Proto-Onkoprotein, das in vielen Leukämien mutiert ist (302). MLL1 kann im Allgemeinen die Transkription durch eine H3-K4-spezifische HMT-Aktivität aktivieren, andererseits kann es die Genexpression reprimieren, was von der Interaktion mit dem Korepressor CtBP und den PcG-Proteinen HPC2 und BMI-1 abhängig ist (303). In zwei der unten angeführten HMT Komplexen findet sich Menin, ein ubiquitär exprimierter Tumor-Suppressor, dessen Gen in vielen Tumoren mutiert ist und der die Transkription sowohl aktivieren als auch reprimieren kann (302). Vor kurzem ergab eine Promotor-Analyse in HeLa S3, HepG2 und humanen Bauchspeicheldrüsen Zellen mittels *ChIP-Chip*-Technik (Chomatin-IP mit anschliessendem Gen-Array), dass Menin in den Promotorregionen tausender menschlicher Gene zu finden ist, was nahe legt, dass Menin als genereller Regulator der Transkription wirkt (304). An viele Promotoren bindet Menin gemeinsam mit einem HMT-Komplex, aber Menin kann auch unabhängig von diesem Komplex binden. Die Bindung korreliert generell mit einer erhöhten Genexpression.

ASH2 ist in folgenden humanen HMT-Komplexen enthalten:

ASCOM und PTIP-Komplex

ASC-2 wurde als Kofaktor vieler nukleärer Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren beschrieben und ist integraler Bestandteil des ASC-2-Komplexes (ASCOM). Dieser besteht neben der namensgebenden Komponente ASC-2 (*activating signal coactivator 2*) aus WDR5, RBBP5, α/β -Tubulinen, ASH2, und einer HMT mit H3-K4 Spezifität. Diese HMT ist entweder ALR-1, ALR-2, oder HALR. Es existieren also drei verschiedene ASCOM-Komplexe, die sich in ihrer katalytischen Einheit unterscheiden (305, 306). ALR-1 und ALR-2 werden vom gleichen Gen kodiert und unterscheiden sich lediglich im N-Terminus. Als Beispiel wurde gezeigt, dass ASC-2 den HMT-Komplex zum RAR (*retinoic acid receptor*) Zielgen RAR- β 2 rekrutiert, was zu H3-K4 Trimethylierung und Aktivierung der Expression führt (305). Kürzlich wurde mit dem Protein PTIP, welches vermutlich eine Rolle bei der Antwort auf DNA-Schäden spielt, ein assoziierter ASC-2-Komplex aufgereinigt, der grosse Ähnlichkeit zum ASCOM-Komplex besitzt. Die einzigen Unterschiede sind das Fehlen von Tubulinen und das Vorhandensein zusätzlicher Komponenten, wie hDPY30, PTIP associated 1, und UTX. (307). UTX ist interessanterweise eine H3-K27-Demethylase, was bedeutet, dass dieser ASC-2-Komplex zwei distinkte enzymatische Aktivitäten beinhaltet, die beide mit transkriptioneller Aktivierung verknüpft sind (308-311)

MLL1/hSET1/HCF-1-Komplex

Das Chromatin-assoziierte Protein HCF-1 (*host cell factor 1*) kann über verschiedene Domänen sowohl mit dem Sin3-HDAC-Komplex, der H4-K16 Histon-Acetyltransferase MOF1, als auch mit einem MLL1- und SET1-HMT-Komplex in humanen Zellen interagieren (302, 312, 313). Sowohl der MLL1- als auch der SET1-HMT-Komplex enthält ASH2 und WDR5. Die Assoziation mit diesen verschiedenen, teils entgegengesetzt wirkenden Chromatin-modifizierenden Komplexen lassen HCF-1 viele mögliche Rollen in der Regulation von Chromatin zukommen. HCF-1 kann scheinbar je nach gebundenem Komplex durch selektive Modulation der Chromatin-Struktur die Transkription positiv oder negativ regulieren. Während der Sin3-Komplex an der Repression der Transkription beteiligt ist, wirkt der MLL und SET1/ASH2-HMT-Komplex wahrscheinlich wie sein Hefe-Pendant aktivierend auf die Transkription. Bestätigt werden konnte bis jetzt beim G1- zu S-Phase Übergang die HCF-1 abhängige Rekrutierung von MLL1- und SET1-HMTs zu E2F-responsiven Promotoren, was mit deren Methylierung und Aktivierung einhergeht (314). Eine weitere Funktion erfüllt HCF-1 bei der HSV (*Herpes simplex Virus*)-Transkription: bei der HSV-Infektion bindet HCF-1 das virale Protein VP16 und kooperiert mit diesem in der Aktivierung der Transkription von IE (*immediate-early*)-Genen. Hierzu konnte eine HCF-1 abhängige

Rekrutierung von MLL1 und SET1 zu IE-Genen und die resultierende H3-K4 Trimethylierung und Aktivierung gezeigt werden (315). Das virale VP16-Protein bindet selektiv an HCF-1, das in Abwesenheit des Sin3-Komplexes mit dem HMT-Komplex assoziiert ist (313).

MLL1/HCF-2/Menin-Komplex

Der MLL1/HCF-2/Menin-Komplex beinhaltet die Komplexpartner ASH2, WDR5, RBBP5, Menin, HCF-2 und MLL1 (302). Bei der Aufreinigung wurden auch geringe Mengen HCF-1 gefunden, aber keine assoziierten HDAC-Komplexe, so dass der HCF-2 Komplex anscheinend neben dem HCF-1 Komplex einen distinkten Komplex darstellt. Die Reduzierung von MLL1 und Menin durch siRNA, aber nicht von ASH2, führt zur reduzierten Expression des *Hox*-Gens *HoxA9*, so dass davon auszugehen ist, dass das Proto-Onkoprotein MLL1 und der Tumor-Suppressor Menin in der MLL1-abhängigen Leukämogenese kooperieren. Auch die Zellzyklus-Inhibitoren p18 und p27 werden durch Menin abhängige Rekrutierung des MLL1-Komplexes reguliert (316)

MLL2/Menin-Komplex

Desweiteren ist ASH2 Teil des MLL2-HMT-Komplexes, der dazu noch Menin, WDR5 und RBBP5 enthält und H3-K4 Aktivität besitzt (317). Menin bindet an das *Hoxc8*-Gen, das die Differenzierung reguliert, und aktiviert es vermutlich durch die Bindung des MLL2-HMT-Komplexes. Es wird postuliert, dass manche Menin-Mutationen die HMT-Bindung verhindern, so dass Differenzierungs-regulierende Gene nicht mehr aktiviert werden können, was zur Tumorbildung führen kann. Vor kurzem wurde gezeigt, dass der hematopoetische Aktivator NF-E2 den MLL2-Komplex zum β -Globin Locus rekrutiert, was mit H3-K4 Trimethylierung und Aktivierung einhergeht (318).

ARL-Komplex

Von Rigen *et al.* wurde ein Komplex beschrieben, der durch den Estrogen Rezeptor α (ER α) rekrutiert wird und aus der HMT ALR, sowie ASH2, RBBP5, und WDR5 besteht (319). Es wurde beobachtet, dass ER α den Komplex über die Interaktion mit ARL bindet und die Transaktivierung von ER α Zielgenen von dieser Bindung abhängt.

c-MYC als Interaktionspartner von ASH2

Durch chromatographische Aufreinigung eines c-MYC-Komplexes aus Jurkat Zellen, einer T-Zell Tumorlinie, wurde ASH2 als neuer Interaktionspartner von c-MYC identifiziert. Diese Interaktion wurde in Jurkat- und U2OS Zellen durch Koimmunpräzipitationen verifiziert. *In vitro* konnte die ASH2-Interaktionsdomäne in c-MYC auf die AS 262-350 eingegrenzt werden (Dissertation Jörg Vervoorts). Bei der Koimmunpräzipitation in Zelllinien interagiert c-MYC

über die AS 294-367 und die AS 367-439 mit ASH2, was auf eine zusätzliche indirekte Bindung, die vermutlich über ein Linker-Protein vermittelt wird, schliessen lässt. In ASH2 sind sowohl *in vitro* als auch bei der Koimmunpräzipitation die AS 156-393 für die Bindung an c-MYC ausreichend (Dissertation Gesa Walsemann). Bestätigt wurde die Interaktion bei der Aufreinigung eines ASH2-Komplexes durch *Tandem-Affinity-Purification* (TAP) (Diplomarbeit Henning Schuchlautz). Die Komponenten des über die TAP-Methode gewonnenen Protein-Komplexes wurden durch Massenspektrometrie analysiert und durch Western-Blot-Analyse verifiziert. Dabei wurden Komponenten des MLL2-Komplexes identifiziert, wie MLL2, RBBP5 und hDPY-30, welches zuvor bereits in einem *yeast-two-hybrid screen* als Interaktionspartner von ASH2 gefunden wurde (Diplomarbeit Karsten Kapelle). Als neue Komponente wurde die Ubiquitin-Ligase EDD nachgewiesen. Menin konnte in der massenspektrometrischen Analyse nicht erkannt, jedoch im Western Blot detektiert werden. Ebenfalls im Western Blot wurde c-MYC als Teil des Komplexes identifiziert. Der TAP aufgereinigte ASH2-Komplex besitzt H3-K4me3 HMT-Aktivität, die mit ASH2 assoziierte HMT ist außerdem in der Lage, ASH2 selbst zu methylieren (Dissertation Gesa Walsemann).

Der Befund der Bindung von c-MYC an ASH2 und die Identifizierung von c-MYC als Teil eines ASH2 assoziierten HMT-Komplexes, sowie die zuvor beschriebene Abhängigkeit der c-MYC vermittelten REF-Transformation von ASH2 lassen einen synergistischen Mechanismus bei der Regulation von Genexpression und bei der Tumorentstehung vermuten. Die Funktion der Interaktion zwischen c-MYC und ASH2 ist aktueller Gegenstand der Forschung in diesem Labor.

1.7 Zielsetzung

c-MYC ist ein zentraler Regulator von Proliferation, Apoptose und Differenzierung, sowie eines der am häufigsten fehlregulierten Gene in humanen Tumoren. Obwohl es schon lange Objekt der Forschung ist, sind die molekularen Mechanismen der c-MYC abhängigen Aktivierung der Transkription und der Transformation von Zellen weitgehend unverstanden. Die Ergebnisse der letzten Jahre zeichnen ein immer komplexeres Bild von der Regulation des c-MYC Proteins und den Ereignissen bei der von ihm vermittelten Aktivierung der Genexpression. Dabei zeigte sich, dass die Rekrutierung von Kofaktoren und Komplexen über den an sich schwachen Transaktivator c-MYC eine grosse Rolle spielt. Diese über c-MYC rekrutierten Faktoren beeinflussen einerseits durch Modifizierung von c-MYC dessen Stabilität und Aktivität, andererseits können sie auf die basale Transkriptionsmaschinerie wirken und die Chromatinstrukturen der c-MYC-gebundenen DNA-Bereiche verändern.

Zu den von c-MYC rekrutierten Kofaktoren gehören Histon-Acetyltransferasen wie CBP und p300, die c-MYC acetylieren, das Protein stabilisieren und die Transkription aktivieren. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Acetylierung von c-MYC durch Enzyme der Klasse der Histon-Deacetylasen wie SIRT1 rückgängig gemacht werden kann und, wenn das der Fall ist, welche funktionellen Auswirkungen dieses zur Folge hat. Dabei sollte ermittelt werden, ob die Rekrutierung einer Deacetylase an c-MYC antagonistisch auf die von den HATs vermittelten Effekte wirkt.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die funktionelle Beziehung von ASH2 und c-MYC. ASH2, ein Trithorax-Gruppen-Protein mit onkogenem Potential, ist integraler Bestandteil von Histon-Methyltransferase-Komplexen (HMTs), welche an die DNA rekrutiert werden und über Histon H3-K4 Methylierung die Chromatinstruktur auflockern. Zuerst sollte die Rolle von ASH2 bei der globalen Trimethylierung von H3-K4 und deren Auswirkung auf das Zellverhalten ermittelt werden. Da zuvor beobachtet wurde, dass c-MYC HMT-Aktivität rekrutiert, an ASH2 bindet und als Teil eines ASH2 assoziierten HMT-Komplexes identifiziert wurde, sollte folgend untersucht werden, ob die von c-MYC gebundene HMT Aktivität H3-K4 spezifisch und von ASH2 abhängig ist.

Da ASH2 wie c-MYC zusammen mit RAS Rattenembryo-Fibroblasten (REFs) transformieren kann und die c-MYC vermittelte REF-Transformation abhängig vom endogenen ASH2 ist, sollten in einer Microarray Analyse Zielgene von c-MYC und ASH2 in c-MYC/RAS- und ASH2/RAS-transformierten Zellen identifiziert werden. Dabei sollte durch die Bildung von Schnittmengen der in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen differentiell exprimierten Gene mögliche gemeinsam regulierte Gene gefunden und durch den Abgleich mit bereits bekannten Array-Daten verifiziert werden, ob es sich um c-MYC Zielgene handelt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham, Amicon, AppliChem, Baker, Biomol, BioRad, Boehringer, Difco, Du Pont, Eurogentech, Falcon, Fermentas, Fluka, Gibco BRL, ICN, Invitrogene, Merck, New England Biolabs, Promega, Riedel-deHaen, Roth, Santa Cruz, Seromed, Serva, Sigma, Stratagene.

Das Verbrauchsmaterial stammte von folgenden Firmen:

Amersham, Beckman, Biozym, Costar, Eppendorf, Falcon, Fuji, Gilson, Greiner, Kodak, Macherey-Nagel, Pharmacia, Qiagen, Sarstedt, Schleicher & Schuell, Whatman.

2.1.2 Reaktionskits

Die verwendeten Enzyme zur Restriktion, Ligation und Amplifikation von DNA wurden von der Firma Fermentas bezogen. Die Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben eingesetzt. Des Weiteren wurden folgende Reaktionskits verwendet:

- Rneasy Mini RNA-Isolations Kit (Qiagen)
- RNase Free DNase Kit (Qiagen)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)
- QuantiFast SYBR Green Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Midi, Maxi Plasmid-Präparations-Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Mini Plasmid-Präparations-Kit (Qiagen)
- Invitrogen Dynal® CD4 Positive Isolation Kit

2.2 Antikörper

- **α -acetyl-lysine:** Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen acetyliertes Lysin (Cell Signaling 94441S).
- **α -Actin (C4):** Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen β -Actin (MP Biomedicals).

- **α -ASH2 (4C5):** Monoklonale Antikörper aus der Ratte gegen GST-hAsh (E. Kremmer).
- **α -BrdU:** Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) (Boehringer Mannheim 1170 376)
- **α -CBP (A22):** Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen CBP (Santa Cruz sc-369).
- **α -CD4:** Monoklonale Maus Antikörper gegen den CD4 Rezeptor. Wurde an Beads gekoppelte als CD4-Beads zur Selektion von transfizierten Zellen verwendet (Invitrogen Dynal® CD4 Positive Isolation Kit).
- **α -c-Myc (N-262):** Affinitätsgereinigtes polyklonales Serum aus dem Kaninchen gegen die Aminosäuren 1 bis 262 von humanem c-Myc (Santa Cruz).
- **α -Flag (M2):** Maus Monoklonale IgG1 Antikörper gegen das synthetische Flag Peptid. Wurde an Beads gekoppelt als Flag-Beads verwendet (Sigma).
- **α -GFP (FL):** Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen GFP (Santa Cruz, sc 8334).
- **α -HA (3F10):** Monoklonale Antikörper aus der Ratte, die die Aminosäuren 98-108 im Hämagglutinin des Influenza-Virus erkennen (E. Kremmer).
- **α -H3:** Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen Histon H3 (Abcam ab1791).
- **α -Histone H3-K4 trimethyl:** Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen trimethyliertes H3-K4 (Abcam 8580-50).
- **α -p300 (C-20):** Polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gegen p300 (Santa Cruz sc-585).
- **α -SIRT1 (2G1/F7):** Monoklonale Maus Antikörper gegen SIRT1 (Upstate 05-707).

2.3 Plasmide

2.3.1 Eukaryotische Expressionsvektoren:

- **pcDNA3:** eukaryotisches Expressionsplasmid unter der Kontrolle des CMV-Promotors; kodiert für Resistenzen gegen Neomycin und Ampicillin, hat einen SV40-Replikationsursprung und einen bakteriellen Replikationsursprung von pBR322. Für *in vitro*-Translationen besitzt der Vektor am 5'-Ende der multiple cloning site einen T7-Promotor (Invitrogen).
- **pcDNA3Flag:** Das Oligo 5'-GGTACCGCCACCATGGACTACAAGGATGATGATGATAAGGGATCC wurde mit Kpn I und BamH I geschnitten und in den Kpn I und BamH I geschnittenen Vektor pcDNA3 ligiert.
- **pCMV-His6-Ubiquitin:** Der Expressionsvektor kodiert unter Kontrolle eines CMV-Promotors für die Expression von His6-Ubiquitin. Der Vektor weist eine Ampicillin-Resistenz auf (M. Treier)
- **pEQ176- β -Gal:** Der frühe (immediate early) Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor exprimiert konstitutiv die β -Galactosidase in eukaryotischen Zellen. Außerdem trägt der Vektor Replikationsursprungs-Sequenzen (origin of replication) für bakterielle (von pBR322) und eukaryotische Zellen (von SV40) und kodiert für

Ampizillinresistenz. (320) Dieser Vektor wurde zur Standardisierung der transienten Transfektion genutzt.

- **pEQ176P2:** Durch Restriktionsverdau von pEQ176 mit Pvu II und Religation des verbliebenen Vektors wurde ein Großteil der β -Galactosidase-cDNA entfernt (320).
- **pEQ176P2-Ash2:** Ein EcoRI/BamHI Fragment aus pCB6+-Ash2 wurde in die HindIII/BglII Schnittstellen von pEQ176P2 kloniert (J. Vervoorts). pEQ176P2-Ash2-HA Ash2 wurde aus pCB6+-Ash2 mit EcoR I und BamH I geschnitten und in das mit Hind III und Bgl II geschnittene Plasmid pEQ176P2 ligiert (J. Lüscher-Firzlaff).
- **pcDNA3Flag-Myc:** Ein BamH I/Bgl II-Fragment aus BJ-Myc3-wt (B. Amati) wurde in die BamH I-Schnittstelle von pcDNA3-Flag kloniert (J. Vervoorts).
- **GWp-HA:** pEV-HA-RF0, Mit den pEV-HA Vektoren können HA-Epitop getaggte cDNAs in eukaryotischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert werden. Das HA-Epitop ist in den drei möglichen Leserastern zu den Restriktionsschnittstellen KpnI, SmaI und XbaI angeordnet. Ansonsten besitzen die drei Vektoren einen SV40 *origin of replication* und beruhen auf der bakteriellen Plasmidsequenz von pSP65. In die SmaI Schnittstelle wurde die Gateway Kassette C.1 kloniert (R. Pandithage).
- **GWp-HA-SIRT1:** Das hSIRT1 aus GWpD-SIRT1 wurde mit einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (R. Pandithage).
- **GWp-HA-SIRT1-H363Y:** Das hSIRT1 aus GWpD-SIRT1-H363Y wurde mit einer LR-Reaktion in den GWp-HA-Vektor rekombiniert (R. Pandithage).
- **pVR1012Gal4:** (321) Ein Hind III / BamH I Fragment, das die Gal4-DNA-Bindungsdomäne (1-147) aus pSG424 enthält, wurde in den Polylinker von pVR1012 kloniert. pVR1012 ist ein auf dem CMV-Promotor basierendes Expressionsplasmid und kodiert für eine Kanamycin-Resistenz.
- **pVR1012Gal4-CBP:** (321) Die murine cDNA von CBP wurde als BamH I Fragment aus pRSV-HA-CBP in die BamH I Schnittstelle von pVR1012Gal4 eingefügt.
- **pVR1012Gal4-p300:** (321) Ein Sal I / Not I Fragment aus pBluescript-p300 wurde in pVR1012Gal4 kloniert. Unter der Kontrolle des CMV-Promotors wird ein Gal4-p300-Fusionsprotein gebildet.
- **pVR1012Gal4-p300 Δ CRD:** (217) Ein Sal I / Not I Fragment aus pBluescriptp-300 wurde in pVR1012Gal4 kloniert. Unter der Kontrolle des CMV-Promotors wird ein Gal4- p300 Δ CRD -Fusionsprotein gebildet.
- **pMACS 4.1:** Der Expressionsvektor kodiert unter Kontrolle eines CMV-Promotors eine deletierte Form des CD4 Rezeptors, dem die intrazelluläre Domäne fehlt und deshalb keine Signale übertragen kann.

2.3.2 Reporterkonstrukte

- **M4mintkluc:** (322) Dieser Vektor enthält vier Kopien eines Oligonukleotids mit einer MYC/MAX Konsensusbindungsstelle (CMD, (323)) vor dem minimalen TK-Promotor.

2.3.3 siRNA-Expressionsvektoren

- **pSuperDuper (R. Lilischkis):** Expressionsvektor für siRNAs. Das PCR-Fragment des Polymerase-III-Promoters von Histon1 wurde über EcoR I / Hind III in pBluescript II KS+ kloniert. Der Vektor enthält eine unspezifische Sequenz von 1,6kb zwischen Bgl II und Hind III, welche entfernt und gegen ein Oligo ersetzt werden kann, um einen siRNA-Expressionsvektor zu erhalten.
- **pSuper-rAsh2m = pSuperAsh(rat)f#5 (J. Lüscher-Firzlaff):** Dieser Vektor entstand durch Klonierung des 64 bp dsOligos ratASH530 in den Bgl II / Hind III geschnittenen pSuperDuper. Aufgrund eines Sequenzfehlers ist die exprimierte siRNA gegen Ratten-Ash2 nicht funktional. Da die Sequenz keine Homologie zu einem menschlichen Gen besitzt, wurde der Vektor in transienten Transfektionen humaner Zellen als Kontroll siRNA-Expressionsvektor (Negativ-Kontrolle) eingesetzt.
- **pSuper-c-Myc #4 (J. Lüscher-Firzlaff):** Dieser Vektor exprimiert eine siRNA gegen humanes Myc. Er wurde durch Klonierung des Oligos hmyc#4 in den Bgl II / Hind III geschnittenen Vektor pSuperDuper konstruiert. hmyc#4: GAT CCC CGC TCG TCT CAG AGA AGC TGT TCA AGA GAC AGC TTC TCT GAG ACG AGC TTT TTG GAA A
- **pSuper-hAsh2L1/1764#9 (J. Lüscher-Firzlaff):** Dieser Vektor exprimiert eine siRNA gegen humanes ASH2L1. Er wurde durch Integration des Oligos hASH1764N in den Bgl II / Hind III geschnittenen pSuperDuper erhalten. hASH1764N: GAT CCC CGG ATC TCA CTT ACC GCC CTT TCA AGA GAA GGG CGG TAA GTG AGA TCC TTT TTG GAA A
- **pSuper-Skp2-NT8 (Judit Garriga):** Dieser Vektor exprimiert eine siRNA gegen humanes SKP2. Er wurde durch Integration des Oligos NT8 in den pSuper Vektor erhalten. NT8: GAGGAGCCCGACAGTGAGA

2.3.4 Bakterielle Expressionsvektoren

- **pMal-Pre:** Der Vektor kodiert für das Maltose-bindende Protein (MBP) gefolgt von Restriktionsschnittstellen zum Einfügen von cDNA. Die Expression der Fusionsproteine kann mittels des synthetischen *lac*-Promotors mit IPTG induziert werden. In pMal-Pre wurde die Faktor Xa Schnittstelle durch die Schnittstelle der PreScission Protease ersetzt.
- **pMal-Pre-c-Myc:** Die c-Myc cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Sal I in pMal-Pre kloniert.

2.4 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Qiagen bezogen. Die Primer kamen, nach Verdünnung mit H₂O auf 10 pmol/μl, in RT-PCR-Reaktionen zum Einsatz.

Rn_Cdc20_1_SG	QT00384244
Mm_Slc35f2_1_SG	QT00109501
Rn_Ggh_1_SG	QT00180460
Rn_Slc16a1_1_SG	QT00179557
Rn_Fosl1_1_SG	QT00180649
Rn_Tgfa_1_SG	QT00183449
Rn_Tgfb2_1_SG	QT00187320
Rn_Prlpf_1_SG	QT00198982

Rn_RGD:628692_1_SG (Impa2)	QT00174720
Rn_C6orf108_1_SG (Rcl)	QT00175700
Rn_Syng1_1_SG	QT01080583
Hs_CCND2_1_SG (CyclinD2)	QT00057575

2.5 si-RNA Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Dharmacon bezogen.

- si-scr-pool1: ATGAACGUGAAUUGCUCAA
UAAGGCUAUGAAGAGAUAC
AUGUAUUGGCCUGUAUUAG
UAGCGACUAAACACAUCAA
- si-ASH2-pool: D-019831-01
D-019831-02
D-019831-03
D-019831-04

2.6 Arbeiten mit DNA und RNA

2.6.1 Agarosegelelektrophorese und Extraktion

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

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

Längenmarker: "Gene Ruler™ 1kb-ladder" (Fermentas)

Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente wurden mit 10xDNA-Ladepuffer versetzt und für analytische oder präparative Zwecke elektrophoretisch in 0,5-2,0% Agarosegelen bei einer Feldstärke von 5 V/cm² aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer durchgeführt. Zur Visualisierung unter UV-Licht wurde der Agarose 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugegeben. Nach der elektrophoretischen Separation der DNA-Fragmente wurden die gewünschten Fragmente mit dem Skalpell unter UV-Licht (312 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus der Agarose wurde das QIAEX II Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.2 Präzipitation von DNA

Ethanol 99% (v/v) 70% (v/v)

Natriumacetat 3M, pH 5,2

TE-Puffer 10mM Tris-HCl,
pH 7,5 1mM EDTA

Längenmarker "Gene Ruler 1kb-ladder" (Fermentas)

DNA-Präzipitation aus wässrigen Lösungen dient zur Reinigung, Konzentrierung oder Umpufferung von DNA. Bei der Ethanolfällung wurde die Probe mit zwei Volumen Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat versetzt. Die DNA wurde 30min bei -80°C bzw. über Nacht bei -20°C präzipitiert. Danach wurde die gefällte DNA in einer Tischzentrifuge bei 13.000rpm und 4°C pelletiert, mit 70%igem Ethanol zweimal gewaschen und erneut zentrifugiert. Um das restliche Ethanol zu beseitigen, wurde die DNA bei Raumtemperatur 20min getrocknet und in TE-Puffer bzw. sterilem Wasser aufgenommen.

2.6.3 Konzentrationsabschätzung von DNA

Die Konzentrationsabschätzung wurde sowohl in einer analytischen Agarosegelelektrophorese als auch photometrisch durchgeführt. Die Abschätzung der DNA-Konzentration in einer analytischen Agarosegelelektrophorese erfolgte im Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der DNA-Banden mit den Banden der Marker-DNA bekannter Konzentration. Photometrisch wurde die DNA-Konzentration über die Messung der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurde die Adsorption bei 260nm einer in TE verdünnten DNA-Lösung in einer Quarzküvette gemessen. Die DNA-Konzentration wurde mit folgender Formel errechnet:

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Aus dem Verhältnis der OD_{260} und OD_{280} wurde der Reinheitsgrad der DNA-Lösung bestimmt, wobei eine proteinfreie Nukleinsäure-Lösung ein Verhältnis von 1,8-2,0 aufweist.

2.6.4 Real Time quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine sensitive Methode um den mRNA-Gehalt von Zellen spezifisch zu bestimmen. Sie erlaubt die direkte Messung der Zunahme an PCR-Produkt in der logarithmischen Phase der PCR-Reaktion von Zyklus zu Zyklus durch den Einbau eines Fluorophors. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert somit mit der Menge an PCR-Produkt. Die Zykluszahl an der die Probe in die logarithmische Phase der PCR-Reaktion Eintritt, korreliert mit der Menge an Primer-spezifischer cDNA in der Probe.

2.6.4.1 Probenvorbereitung

Adhärenente Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert, mit Medium aufgefüllt und in 15ml Falcon-Gefäßen bei 1250 rpm 5 min abzentrifugiert. Zur Entfernung des Mediums und des Trypsins wurde das Pellet erneut mit PBS gewaschen und in der RNA Isolation eingesetzt oder bei -80°C zur späteren Verwendung e eingefroren.

2.6.4.2 RNA-Isolation

Die totale mRNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angabe des Herstellers, unter zusätzlicher Verwendung des RNase Free DNase Kits (Qiagen), isoliert. Die RNA Konzentration wurde mittels UV Spektrometrie am Nanodrop ermittelt.

2.6.4.3 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit dem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche durchgeführt. Dazu wurde 1 µg der totalen RNA und 2µl random hexamer Primer, aufgefüllt auf 13 µl Gesamtvolumen mit RNase freiem Wasser, 10 min bei 65°C zur Anlagerung der Primer inkubiert. Der Ansatz wurde mit 4 µl 5x reverse transcriptase buffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor, 2 µl dNTPMix und 0,5 µl der Reversen Transcriptase auf 20 µl aufgefüllt und 10 min bei RT inkubiert. Die cDNA Synthese erfolgt bei 55°C 30 min im Heizblock. Bei 85°C wird die Reverse Transkriptase 5 min Hitzeinaktiviert. Die cDNA wird in der RT-PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.6.4.4 RT-PCR

Die RT-PCR wird im Roche LightCycler wie folgt durchgeführt:

Pro Ansatz werden gemischt:

10 µl QuantiFast SYBR Green Mix

6 µl PCR Wasser

2 µl template cDNA

2 µl Primermix aus reverse und forward Primer

Programm:

95°C 15min (5min Fast SYBRGreen Kit)

94°C 15 sec

55°C 20 sec X40

72°C 20 sec

Der entscheidende Wert ist die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz über den basalen Wert steigt. Der Unterschied in der Zykluszahl, im Vergleich von Probe zur negativ-Kontrolle beschreibt die Änderung in der Expression. Berechnungen wurden mit dem Programm RelQuant vorgenommen.

2.7 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

2.7.1 Material für die Arbeit mit Bakterien

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton (AppliChem)
0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) NaCl
pH 7,0
100 µg/ml Ampicillin oder
30 µg/ml Kanamycin

Agar-Platten: LB-Medium
1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco)
100 µg/ml Ampicillin oder
30 µg/ml Kanamycin

2.7.2 Bakterienstämme

- **XL-10 gold:** Tet^r D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1, recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]
- **BL21:**(DE3)pLysS B F⁻, dcm omp T, hsdS, (r_{B-m}B⁻), galλ(DE3), pLysS(Cam^r)

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

Lösung 1: 50 mM Glucose
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl, pH 8
bei 4°C gelagert

Lösung 2: 0,2 M NaOH
1 % (w/v) SDS
frisch angesetzt

Lösung 3: 3 M Kaliumacetat, pH 4,8
5 M Eisessig
bei 4°C gelagert

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
1mM EDTA

1 mg/ml RNase

In kleinem Maßstab:

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

In grossem Maßstab:

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

2.7.4 Transformation

In einem 10 ml *snap cap* wurden 50 µl frisch aufgetaute transformationskompetente Bakterien mit 1µl DNA für 20 min auf Eis inkubiert, diese anschließend für 45 sec bei 42°C hitzebehandelt und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium und Inkubation von 1 h bei 37°C auf einem Rotationsgerät, wurden 50–100µl der Bakteriensuspension auf Amp-LB-Agar-Platten (bzw. Kan-LB-Agar-Platten) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.7.5 Aufreinigung von Maltose-bindendes-Protein-Fusionsproteinen

NZC-Medium: 1 % (w/v) NZ-Amin A
 0,5 % (w/v) NaCl
 0,2 % (w/v) MgCl₂ x 6H₂O

C-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4
 200 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 0,2 % (w/v) PMSF
 1 % (v/v) Aprotinin

Amylose-Agarose (NEB)

20 % (v/w) Glukose

BL21-Bakterien wurden mit den entsprechenden pMal-Myc-Konstrukten transformiert. Am nächsten Tag wurde eine 20 ml LB/Ampicillin-Kultur mit 3-5 Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:10 mit NZC-Medium verdünnt, 0,2 % Glukose zugegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Glucose ist notwendig, um

die chromosomalen *E.coli*-Maltose-Gene zu reprimieren, da eine von diesen eine Amylase ist, die die Amylose auf der Affinitäts-Matrix abbauen kann. Anschließend wurde die Kultur für 4 Stunden bei 30°C induziert, sedimentiert und in Puffer-C aufgenommen (10 ml Puffer C pro Gramm Zellen). Schließlich wurden die resuspendierten Zellen über Nacht bei –80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in kaltem Wasser aufgetaut und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden sedimentiert (30 Minuten bei 4°C und 10000xg im JA21-Rotor), der Überstand abgenommen und 1:5 mit C-Puffer verdünnt. Parallel wurde 3 ml Amylose-Agarose in eine Chromatographiesäule (Biorad) gegossen und mit 8 Bettvolumen C-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das verdünnte Zelllysate auf die Säule gegeben und mit 12 Bettvolumen Puffer-C gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 10 mM Maltose in Puffer-C in 1 ml Fraktionen eluiert. Zur Konzentrationsabschätzung wurden Aliquots der Fraktionen zusammen mit einer BSA Verdünnungsreihe auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

2.7.6 Aufreinigung der TEV-Protease

Puffer A:	20 mM HEPES pH 7,5 300 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 0,1% (v/v) NP-40 5 mM Imidazol 14 µg/ml Aprotinin
Puffer B:	20 mM HEPES pH 7,5 200 mM NaCl 10% (v/v) Glycerin 0,1% (v/v) NP-40 10 mM EDTA 10 mM DTT 14 µg/ml Aprotinin
Puffer C:	50 mM Tris pH 8,0 1 M NaCl 10% (v/v) Glycerin 0,5 mM DTT 1 mM EDTA

Eine Vorkultur in LB/Kanamycin-Medium wurde aus einem Glycerolstock von BL21 (DE3) pLysS-pET24b-TEV-H angeimpft und unter Zusatz von 0,4% (w/v) Glukose und 0,5 mM ZnCl_2 auf einem Schüttler bei 37°C ÜN herangezogen. Für die Hauptkultur wurde die Vorkultur 1:20 in LB/Kanamycin-Medium verdünnt und unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Bei einer $\text{OD}_{600} = 0,5-0,7$ wurde die Expression des Konstruktes mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach einer Inkubation bei 37°C für 2-3 Stunden oder bei RT ÜN wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in eiskaltem Puffer A resuspendiert und nach Zugabe von 100

µg/ml Lysozym auf Eis für 30 Minuten lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert. Mit dem Zelllysate wurde über TALON-Beads (BD Biosciences), die zuvor durch mehrmaliges Waschen mit Puffer A äquilibriert worden war, bei 4°C für 30 Minuten eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen in Puffer A wurde im Batch-Verfahren zweifach eluiert durch je 10-minütige Inkubation der Beads in Puffer B. Die Eluate wurden vereinigt, ÜN bei 4°C gegen ein großes Volumen an Puffer C dialysiert und in Aliquots bei -80°C gelagert. Über eine SDS-PAGE mit anschließender Rapid Coomassie-Färbung wurde via BSA-Verdünnungsreihe die Konzentration abgeschätzt. Die im TAP-Assay einzusetzende Menge der TEV-Protease wurde für jede Charge empirisch ermittelt.

2.8 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen (Zellkultur)

2.8.1 Allgemeine Materialien für Zellkultur

DMEM (Gibco) mit 4,5 g/l Glucose

MEM (Gibco) mit 4,5 g/l Glucose

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

Blasticidin S (Invivogen) 10 mg/ml

Doxycyclin (Sigma) 1 mg/ml

Hygromycin B (Roche) 50 mg/ml

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

Pyruvat

Gewebekulturschalen (Falcon) Durchmesser 6, 10, 25 cm

Gewebekulturflaschen (Falcon) Volumen 100, 250, 1000 ml

1 ml Einfriergefäße (Nalgene)

2.8.2 Eukaryotische Zellen

- **HEK293:** Adhärenente epitheliale Zelllinie aus humanen embryonalen Nierenzellen (HEK), die mit Ad5-DNA transformiert wurden. Das Ad5-Insert liegt auf 19q13.2. 293 ist eine hypotriploide Zelllinie mit der modalen Chromosomenzahl $n = 64$, die man in 30% der Zellen findet (ATCC CRL-1573).

- **HEK293-GW-N-TAP-SIRT1:** HEK293-Zelllinie mit stabil integriertem Expressionsvektor N-TAP-SIRT1. Die Zelllinie wurde generiert unter Verwendung des Flp-In T-REx-Systems (Invitrogen), das auf Rekombination des Expressionsvektors in einen transkriptionell aktiven Locus der Flp-In T-REx 293-Zellen beruht. Die Expression steht unter Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors.
- **HeLa:** Die HeLa-Zellen leiten sich von einem menschlichen Cervixkarzinom ab und werden seit 1951 in permanenter Kultur gehalten.
- **HepG2:** humane Hepatoma-Zelllinie (ATCC, HB8065).
- **RECAsh2/ras-925:** mit Ha-RAS(val12) und ASH2 transformierte REFs; REC-Nummer: 310B; Klonnummer: 925; sind Neomycin (G418)-resistent (200 µg G418/ml Kulturmedium)
- **RECMyc/ras-8:** mit Ha-RAS(val12) und c-MYC transformierte REFs; REC-Nummer: o239; Klonnummer: 8; sind Neomycin (G418)-resistent (200 µg G418/ml Kulturmedium)
- **REF:** primäre Rattenfibroblasten, präpariert aus 14,5 Tage alten Embryonen von Fischer-Ratten.
- **U2OS:** Osteosarkoma Zelllinie (ATCC HTB-96).

2.8.3 Kulturbedingungen

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

HEK293, HeLa, RECAsh2/ras-925, RECMyc/ras-8, REF: DMEM mit 10% (v/v) FCS

HepG2: DMEM/F12 mit 10% (v/v) FCS

U2OS: RPMI-1640 mit 10% (v/v) FCS

HEK293-GW-N-TAP-SIRT1: DMEM mit 10% (v/v) FCS
15 µg/ml Blasticidin S
50 µg/ml Hygromycin B.

Stabil transformierte 293-Zelllinien wurden zudem alle 4-6 Wochen für zwei bis drei Passagen in Selektionsmedium kultiviert, dem zusätzlich 15 µg/ml Blasticidin und 50 µg/ml Hygromycin B beigesetzt wurde. Alle Zelllinien wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.8.4 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 flüssigen 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.

2.8.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde vorsichtig unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen in jeweils 4 x 4 Quadraten der Zählkammer wurden gezählt. Aus vier Werten wurde ein Mittelwert gebildet und die Zellzahl/ml nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = m' \cdot v \cdot K$$

wobei: m' = Mittelwert

v = Verdünnungsfaktor

$K = 1 \times 10^4$ = Konstante der Zählkammer

2.8.6 Transiente Transfektion

a) Calcium-Phosphat-Methode

Die transiente Transfektion adhärenter Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode. 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 CaCl₂

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ pro 6 cm bzw. 8×10^5 pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. 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.

b) Transfektion mit ExGen500

Für Hela und U2OS Zellen wurde das Transfektionsreagenz ExGen500 zur transienten Transfektion verwendet (Fermentas). Es handelt sich um ein Polyethylenimin (PEI) mit hoher Transfektionseffizienz. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in der o.g. Zelldichte ausgesät. Zur Transfektion wurden insgesamt 5 µg DNA pro 6 cm Schale in 200 µl 150 mM NaCl-Lösung aufgenommen. Nach kurzem Vortexen und Anzentrifugieren der Lösung wurde 16,45 µl ExGen500 hinzugegeben. Es folgten 10 sec Vortexen und 10 min Inkubation bei RT bevor der Transfektionsansatz ins Kulturmedium gegeben wurde. Nach kurzem Schwenken wurde die Schale in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt. Nach 6-16 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

c) Transfektion mit HiPerFect

Für die Transfection von si-RNA Oligonukleotiden wurde das Transfektionsreagenz HiPerFect von Qiagen verwendet. Dazu wurde 37,5ng des Oligonukleotids in 100 µl DMEM ohne FCS und Antibiotika und 6 µl HiPerFect verdünnt und 10 min inkubiert. Dann wurde das Gemisch auf unmittelbar zuvor ausgesäte Zellen gegeben und die Zellen nach 72h geerntet.

2.8.7 CD4-Selektion von Zellen

Um eine hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurde zusätzlich zu den Expressions-Konstrukten eine Mutante des Transmembran-Proteins CD4 koexprimiert. Diese Mutante kann aufgrund der fehlenden intrazellulären Domäne keine Signale übertragen. Dies erlaubt eine Selektion der transfizierten Zellen über Magnet-Beads mit gekoppelten CD4 spezifischen Antikörpern. Dazu wurden die Zellen durch PBS mit 10 mM EDTA von der Gewebekulturschale gelöst und durch abzentrifugieren bei 200 x g pelletiert. Die Selektion erfolgte nach Protokoll des Invitrogen Dynal® CD4 Positive Isolation Kits.

2.8.8 Proliferations- Assay

Um die Proliferations-Rate von Hela Zellen zu messen, wurde diese 48h nach Transfektion CD4-selektioniert (2.8.7), in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt (2.8.5) und die Zellen zu gleicher Anzahl auf 6 cm Gewebekulturschalen ausgesät. Dann wurden am jeweiligen Messtag die Zellen mit Trypsin von der Gewebekulturschale gelöst und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.9 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.9.1 Präparation von Zell-Lysaten

Frackelton-Puffer (F-Puffer):	10 mM Hepes pH 7,5 50 mM NaCl 30 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 50 mM NaF 5 µM ZnCl ₂ 0,2 % (v/v) Triton X-100 10% (v/v) Glycerin
RIPA-Puffer:	10 mM Hepes pH 7,5 150 mM NaCl 1% NP40 1 % DOC 0,1 % SDS
Protease Inhibitoren:	2,5 µg/ml Leupeptin 0,025 U/ml α ₂ -Macroglobulin (Roche) 2,5 µg/ml Pepstatin A 500 µM Pefa-Bloc (Roche) 14 µg/ml Aprotinin
Phosphatase Inhibitoren:	100 µM Na ₃ VO ₄ 10 mM Natrium-β-glycerophosphat 1 mM NaF
HDAC Inhibitoren:	1mM NAM

In 10 cm / 6 cm Gewebekulturschalen wurden die Zellen bei 4°C mit 500 µl / 200 µl F-Puffer für 10-15 Minuten lysiert, dann abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und weitere 20-30 Minuten auf Eis inkubiert. RIPA-Lysate wurden zusätzlich sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden bei 13.200 rpm (16.100xg) in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Gesamtzelllysat im Überstand wurde sofort weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.9.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3x Probenpuffer:	150 mM Tris-HCl pH 6,8 300 mM DTT 6% SDS (w/v) SDS 0,3 % (w/v) Bromphenolblau 30% (w/v) Glycerol
Protein-Marker:	PageRuler Prestained Protein Ladder, 15 -180 kDa (MBI Fermentas)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe. Hierzu werden die aufzutrennenden Proben mit Probenpuffer versetzt und durch Hitze denaturiert. SDS bindet quantitativ zum Molekulargewicht an die Proteine und erzeugt aufgrund seiner anionischen Eigenschaften eine negative Nettoladung der Proteine. Diese wandern nun im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Eigenladung in Richtung der Anode (Plus-Pol).

Zudem unterbindet SDS als Detergens die erneute Ausbildung nichtkovalenter Bindungen, so dass eine Renaturierung des Proteins verhindert wird. Dieser Prozess wird unterstützt durch das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol, welches der Ausbildung kovalenter Disulfidbrücken entgegenwirkt. Kleine Proteine wandern schneller durch das Netzwerk der Polyacrylamid-Matrix im Gel als große Proteine. Es wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (324) mit 5%-igem Sammelgel und je nach Probe 10-20%-igem Trenngel angewendet.

2.9.3 Anfärben von Proteinen mit Coomassie-Blau

Fixierungs-Lösung:	25 % Isopropanol 10 % Eisessig
Rapid-Coomassie-Färbe-Lösung:	10 % Eisessig 0,006 % Coomassie brilliant blue G-250 (Biorad)

Zur Detektion von Proteinen nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele eine Stunde in Fixierungs-Lösung geschwenkt, danach eine Stunde bis über Nacht mit der Rapid-Coomassie-Färbe-Lösung gefärbt und mit Wasser entfärbt. Dann wurden die Gele auf ein Whatman-Papier überführt, mit Haushalts-Folie bedeckt und für 1,5 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

2.9.4 Western-Blot

10 x Semi-Dry-Puffer:	250 mM Tris-Base 1,92 M Glycine pH 8,3 bis 8,8
1 x Semi-Dry-Puffer:	10 x Semi-Dry-Puffer 20 % Methanol frisch angesetzt
Waschpuffer (PBS-T):	PBS 0,05 % (v/v) Tween-20
Blockpuffer:	PBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Magermilchpulver

0,2 % Ponceau S in 3 % TCA

ECL-Lösungen (Pierce)

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im Western Blot elektrophoretisch auf eine Protein-bindende Membran übertragen. Dabei kann es sich um Nitrocellulose-, PVDF- oder Nylon-Membranen handeln. Im Verlauf des Transfers geht das an die Proteine gebundene SDS verloren. Die Proteine liegen daher nach dem Blotten größtenteils renaturiert vor, Quartärstrukturen werden allerdings nicht ausgebildet. Die Renaturierung erlaubt eine nachfolgende Immunodetektion der Proteine. Im Semidry-Verfahren werden Gel

und Membran in einem „Sandwich“ von puffergetränktem Whatman-Papier umschlossen und zwischen zwei Elektrodenplatten eingebracht. Beim Tank Blot dagegen wird das „Sandwich“ vertikal in eine puffergefüllte Elektrophorese-Kammer eingebracht. In dieser Arbeit wurde im Wesentlichen ein Western Blot nach Towbin durchgeführt (325). Transferiert wurde im Semidry-Verfahren bei 1,5 A pro cm² Gelfläche für 1,5 Stunde. Im Semidry-Verfahren wurden stets Nitrocellulose-Membranen genutzt. Die auf eine Membran geblotteten Proteine können mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Man spricht hierbei von Immunoblot. Dazu werden zunächst die überschüssigen freien Proteinbindungsstellen der Membran blockiert. Dies geschieht entweder über eine nicht fest definierte Mischung an Proteinen wie z.B. Milch oder aber über ein spezifisches Protein, zumeist BSA. Anschließend inkubiert man mit einem spezifischen Erst-Antikörper gegen das zu detektierende Protein. einem Waschschrift, der ungebundene Antikörper entfernt, wird ein HRP-konjugierter Zweit-Antikörper zugegeben, der gegen den konstanten Teil des Erst-Antikörpers gerichtet ist. Nach einem erneuten Waschschrift wird eine ECL-Lösung zugeben, die ein Substrat enthält, welches die Peroxidase via Chemolumineszenz, also unter Freisetzung eines Lichtquants, umsetzt. Dieses Signal wird über einen sensitiven Film oder ein computergestütztes Kamerasystem nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach dem Western Blot die Membran für 1 Stunde bei RT geblockt, dann für 2 Stunden bei RT oder ÜN bei 4°C mit Erst-Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach 30-minütigem Waschen in PBS-T wurde für 45-60 Minuten bei RT mit in Blockpuffer oder PBS-T verdünntem Zweit-Antikörper inkubiert. Es folgte ein 15-minütiger PBS-T-Waschschrift, die Zugabe der ECL-Lösungen und die direkte Detektion über ein computergestütztes Kamerasystem (LAS-3000, Fuji).

2.9.5 Strippen und Rehybridisieren von Western Blots

Stripping-Puffer:	62,5mM Tris 2% (v/v)
	SDS 0,514% (v/v)
	β-Mercaptoethanol

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

Für eine Zweitdetektion von Zielproteinen auf einer Nitrocellulose-Membran war es erforderlich, die alten gebunden Antikörper zu entfernen. Hierfür wurde die Nitrocellulose-Membran mit Stripping-Puffer überschichtet und 30min bei 55°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran mehrmals zur Entfernung von β-Mercaptoethanolresten mit PBS-T gewaschen. Nach erneutem Blocken mit Blockpuffer konnten nun der neue primäre und sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben werden. Dies erfolgte, wie in der Western-Blot-Methode beschrieben

2.9.6 Nachweis von Proteinen in der Immunofluoreszenz

4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS

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

20 % Pferde-Serum in PBS

Moviol 4-88 (Hoechst) mit Isopropylgallat

1 mg/ml Hoechst 33258 in PBS

Um Proteine über Immunfluoreszenz nachzuweisen, wurden am Boden von Zellkulturschalen runde Deckgläser mit 12 oder 18 mm Durchmesser platziert, die zuvor durch Einlegen in Ethanol entfettet und anschließend hitzesterilisiert worden waren. Dann wurden Zellen ausgesät, die entweder wie üblich transfiziert oder am nächsten Tag direkt behandelt wurden. Die Deckgläser wurden je in ein *well* einer 12-*well*-Platte überführt, einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit Paraformaldehyd zur Fixierung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläsern dreimal mit PBS gewaschen und dann 5 Minuten mit Triton X-100 permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen. Die Antikörper wurden mit Pferde-Serum verdünnt zu einem finalen Volumen von 30 µl (für 12 mm-Deckgläser) bzw. 60 µl (für 18 mm-Deckgläser). Auf den Deckel der 12-*well*-Platte wurde Parafilm festgedrückt, darauf die Antikörper-Lösung pipettiert und darauf die Deckgläser mit den Zellen nach unten gelegt. Dies wurde in eine verschliessbare Plastikdose, die mit feuchten Papier-Tüchern ausgelegt war, überführt, und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Deckgläser mit den Zellen nach oben wieder in die 12-*well*-Platte überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Die zweiten Antikörper wurden ebenfalls in Pferde-Serum verdünnt, auf Parafilm pipettiert und mit den Deckgläsern nach unten bedeckt. Dies wurde in der feuchten Dose für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, die Deckgläser wurden dreimal gewaschen und mit Hoechst 33258, das mit PBS 1:1000 verdünnt wurde, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Auf Objektträger wurden 3 µl (12 mm) bzw. 6 µl (18 mm) Moviol pipettiert und darauf die Deckgläser mit den Zellen nach unten gelegt. Das Betrachten und Fotografieren erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX50 und der Software AnalySIS oder mit dem Zeiss Axiovert LSM510.

2.9.7 Immunpräzipitation (IP)

Protein A- oder G-Sepharose „4 fast flow“ (Amersham Pharmacia) (auch Beads genannt) wurden in PBS gequollen, mehrfach mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,1% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert. Die Protein A-Sepharose wurde für die IP mit polyklonalen Antikörpern, die Protein G-Sepharose für monoklonale Antikörper eingesetzt. Die spezifischen Antikörper, 10-20 µl Sepharose und das Zelllysate wurden 1 Stunde bei 4°C in

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

2.9.8 Reinigung von Baculovirus HIS-CBP

H-Puffer	10 mM Tris pH 8,0 0,5 M NaCl 15 mM Imidazol 0,1% NP-40 10% Glycerin 2 mM β -Mercaptoethanol 1 mM PMSF 2,5 U/ml Leupeptin 2,5 U/ml Pepstatin
W-Puffer	H-Puffer 0,3 M NaCl 5 mM Imidazol
E-Puffer	H-Puffer 250 mM Imidazol 0,2 M NaCl

Talon-Agarose (Clontech)

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

2.9.9 Reinigung von TAP-SIRT1

TAP-Lysepuffer:	50 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10% (v/v) Glycerol 1% (v/v) NP-40 1 mM DTT 100 μ M Natriumvanadat 14 μ g/ml Aprotinin 4 μ M Leupeptin 0,5 mM PMSF
TEV-Puffer:	50 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl

	0,5 mM EDTA 1 mM DTT
CaM-Bindungspuffer:	10 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl 0,2% (v/v) NP-40 1 mM Magnesiumacetat 2 mM Calciumchlorid 1 mM Imidazol 10 mM β -Mercaptoethanol
CaM-Waschpuffer:	50 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,0 75 mM NaCl 1 mM Magnesiumacetat 1 mM Imidazol 2 mM Calciumchlorid
CaM-Elutionspuffer:	50 mM Ammoniumbicarbonat pH8.0 25 mM EGTA

IgG-Beads: IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences)

CaM-Beads: Calmodulin Sepharose 4B (Amersham Biosciences)

Die *tandem affinity purification* (TAP) dient der spezifischen Aufreinigung von Proteinen unter möglichst nativen Bedingungen. Hierfür führt man zwei Aufreinigungen hintereinander durch: zuerst präzipitiert man die aufzureinigenden Proteine über die Bindung vom Protein-A-Tag mit IgG-Beads, von denen die Proteine durch Schneiden des Protein-A-Tags mittels der spezifischen TEV-Protease eluiert werden. Dann erfolgt eine Affinitätsreinigung mit Calmodulin-Sepharose-Beads, woran die Proteine mit dem verbleibenden Calmodulin-Peptid binden und von denen sie mittels EGTA eluiert werden.

Die Expression des TAP-Konstruktes wurde ÜN mit 1 μ g Doxycyclin pro ml Medium induziert. Alle Schritte von der Lyse an wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Alle Zentrifugationen mit Beads fanden bei 4°C und 200xg statt.

Die Zellen wurden durch abzentrifugieren bei 200xg geerntet, mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut pelletiert. Dann wurde in TAP-Lysepuffer lysiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und weitere 20-30 Minuten unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden bei 20,000xg pelletiert. Je 800 μ l Gesamt-Zelllysate wurden 10 μ l IgG-Beads zweimal mit 50-100 Vol. TAP-Lysepuffer gewaschen, das geklärte Gesamt-Zelllysate wurde zugegeben, und auf einem Überkopfschüttler wurde für 1 Stunde inkubiert. Die Beads wurden durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgenommen und die Beads zweimal mit 30-50 Vol. TEV-Puffer gewaschen. Je 10 μ l IgG-Beads inkubierte man unter Schütteln zusammen mit 200-500 ng TEV-Protease in TEV-Puffer für 2 Stunden. Im Anschluss wurden die Beads abzentrifugiert und der Überstand – das TEV-Eluat – in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die IgG-Beads wurden mit einem – bezogen auf das TEV-Eluat – dreifachen Vol.

an CaM-Bindungspuffer gewaschen, der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wurde mit dem TEV-Eluat vereinigt. Zur Entfernung eventueller Reste an IgG-Beads wurde die Lösung erneut zentrifugiert und der Überstand zu einer zu den IgG-Beads äquivalenten Menge an CaM-Beads gegeben, die zuvor zweimal mit 50-100 Vol. CaM-Bindungspuffer gewaschen wurden. Im Anschluss wurde unter Schütteln für 90 Minuten inkubiert. Die Beads wurden dann abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads zweimal mit 30-50 Vol. CaM-Waschpuffer gewaschen. Darauf resuspendierte man die Beads in 2 Vol. CaM-Elutionspuffer und eluierte unter Schütteln für 20 Minuten. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand stellt das CaM-Eluat dar, das das Protein von Interesse enthält. Das CaM-Eluat wurde standardmäßig via Western Blot und HDAC-Assay analysiert.

2.9.10 Reporter-Gen-Assay

Es wurden verschiedene Reporter-Gen-Konstrukte mit spezifischen Promotorfragmenten vor dem Luziferase-Reporter-Gen genutzt. Eine erhöhte Luziferase-Expression in den transfizierten Zellen korreliert mit einer erhöhten Luziferase-Aktivität im Zelllysat (326). Da die Transfektionseffizienz innerhalb einer Transfektionsserie stark variieren kann, wurde immer 0,05 µg des β -Galactosidase-Expressionsvektors pEQ176- β -Gal pro *well* einer 6-*well*-Platte kotransfiziert. Die β -Galactosidase-Aktivität war damit ein Maß für die Transfektionseffizienz und wurde zur Standardisierung der Luziferase-Aktivität benutzt. Da die Transfektionseffizienz auch von der Menge an transfizierter DNA abhängt, wurde in jedem Transfektionsansatz die Menge an transfizierter DNA konstant gehalten.

5 x Extraktionspuffer:	25 mM Tris pH 8 (mit H ₃ PO ₄) 2 mM EDTA 10% (v/v) Glycerin 1% (v/v) Triton X-100 10 mM DTT (frisch zugeben)
Messpuffer:	25 mM Glycylglycin 15 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O 5 mM ATP, pH 7 (frisch zugeben)
Luciferin-Lösung:	25 mM Luciferin 25 mM NaOH bei -20°C gelagert, vor Licht schützen
Z-Puffer:	60 mM Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 40 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 50 mM β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)
1 M Na ₂ CO ₃	
4 mg/ml ONPG in Z-Puffer	

Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit PBS gewaschen und 10 min mit 200 µl Extraktionspuffer (pro well einer 6-well-Platte) auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (15 min, 13.000 rpm, 4°C) und der Überstand für die Luziferase- und β -Galactosidase-Messung verwendet. Zur Messung der Luziferase-Aktivität wurde in einer 96-well-Platte 20 µl Lysat mit 100 µl Messpuffer gemischt und die Platte in einen ELISA-Reader (Victor2) gestellt. Das Gerät injiziert automatisch 35 µl Luciferin-Lösung und bestimmt die Anzahl an Photonen, die innerhalb von 5 sec emittiert werden. Zur Messung der β -Galactosidase wurde in einer 96-well-Platte 100 µl Z-Puffer mit 20 µl Lysat und 25 µl ONPG-Lösung gemischt und die Platte für 2-40 min bei 37°C inkubiert. Sobald eine deutliche Gelbfärbung vorhanden war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 60 µl 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Der Färbungsgrad wurde photometrisch bei 405 nm im ELISA-Reader (Viktor2) bestimmt. Aus dem Quotienten der Luziferasemessung und der β -Galactosidasemessung wurde die relative Luziferase-Aktivität errechnet. Für die Angabe der Aktivierung eines Promotors wurde die relative Luziferase-Aktivität des Reporterkonstrukts ohne koexprimierte Transkriptionsfaktoren gleich eins gesetzt. Bei jedem Assay wurden Duplikate gemessen.

2.9.11 BrdU-Markierung von replizierender DNA

Die DNA-Synthese wurde durch die Inkorporation des Pyrimidinanalogons Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) in die neusynthetisierte DNA gemessen. In proliferierenden Zellen wird bei fehlendem Thymidin und Zugabe von BrdU dieses anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Das inkorporierte BrdU kann mittels spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dazu wurde bei auf Deckgläschen angezüchteten Zellen zum gewünschten Zeitpunkt das Medium entzogen, mit 200 µM BrdU (Boehringer, Stock: 20 mM) supplementiertem DMEM ersetzt und für weitere 50 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und durch DNase-I-Verdau (Roche) für 60 min bei 30°C die BrdU-Epitope durch DNA-Denaturierung zugänglich gemacht. Mit BrdU-spezifischen Antikörpern wurde in der Immunfluoreszenz (2.9.6) die Zahl der BrdU-positiven Zellen bestimmt.

2.9.12 Acetyltransferase- Assay

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

Als Substrat für den Acetyltransferase-Assay wurde Flag-c-MYC mittels IP (2.8.10) aus HEK293 Zellen mit Flag-Beads präzipitiert. Für den Assay wurden 5 µl gereinigtes Baculovirus His-CBP (2.8.2) mit 10 µl Flag-c-MYC an Beads gekoppelt in 20 µl HAT-Puffer zusammen mit [^{14}C]-Acetyl-CoA für 60 min bei 30°C inkubiert. Die Beads wurden anschliessend mit 3x HDAC-Reaktionspuffer (2.9.13) gewaschen und in den Histon-Deacetylase-Assay (2.9.13) eingesetzt.

2.9.13 Histon-Deacetylase-Assay (HDAC-Assay)

3x HDAC-Reaktionspuffer:	150mM HEPES pH 7,5 30mM MgCl_2 75 µM M ATP 3mM M Na_3VO_4 30mM NaF 30mM β -Glycerophosphat
Co-Enzym:	β -NAD (100mM)
Protease-Inhibitoren:	2,5 µg/ml Pepstatin A 500 µM Pefa-Bloc (Roche)
Stop-Puffer:	HCl 100 mM Essigsäure 160 mM 1 N NaOH Ethylacetat

[^3H]-acetylierte Hühnchen-Retikulozyten-core-Histone (327).

Pipettierschema:

3x HDAC-Reaktionspuffer	17 µl
TAP-SIRT1	x µl (0,5-2 µg) (Batch-abhängig)
β -NAD(100 mM)	0,5 µl (1 mM)
DTT (100 mM)	0,5 µl (1 mM)
Pepstatin A	1µl
Pefabloc	1µl

Substrat:

A) [^3H]- core-Histone	2 µl (~14000 cpm)
B) acetyliertes Flag-c-MYC	
an Beads gekoppelt aus der IP	10 µl
C) C^{14} -acetyliertes Flag-c-MYC	
an Beads gekoppelt aus der IP	10 µl
H $_2\text{O}$	ad 50 µl

Der HDAC-Assay (328) wurde entweder mit [3H]- core-Histonen oder mit immunpräzipitiertem Flag-c-MYC welches durch Koexpression mit CBP bzw. *in vitro* durch rekombinantes His-CBP (2.9.12) acetyliert wurde, durchgeführt. Bei der Verwendung von Immunpräzipitaten als Substrat wurden die Immunokomplexe zuvor zweimal mit 3xHDAC-Reaktionspuffer gewaschen. Als Negativkontrollen wurde entweder NAM zugesetzt oder NAD weggelassen. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden alle Bestandteile der HDAC-Reaktion bis auf das Enzym in verschraubbaren 1,5 ml Reaktionsgefäßen gemischt. Die HDAC-Reaktion wurde mit der Zugabe des Enzyms gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C unter Schütteln. Nach einer Inkubation von 45 min - 2h wurde 12 µl 1 N NaOH zu den Ansätzen hinzugefügt, gemischt und die Probe 20 min bei 25°C inkubiert. Dies ist nötig, da die Acetyl-Gruppe, die auf den ADP-Ribose Anteil des NAD transferiert wird, bei einem pH-Wert unter 9,5 nicht mit Ethylacetat extrahiert werden kann. Bei einem pH-Wert über 9,5 wird die Acetyl-Gruppe der ADP-Ribose hydrolysiert und kann bei anschließender Absenkung des pH-Werts auf 1-2 (Stop-Puffer) mit Ethylacetat extrahiert werden. Anschließend wurden je 250 µl Stop-Puffer und 700 µl Ethylacetat zu den Ansätzen hinzupipettiert oder im Fall von Substrat B die Flag-Beads abzentrifugiert und in der SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot mit Acetyl-Lysin spezifischen Antikörpern analysiert. Die Proben von Substrat A und C wurden bei 25°C für 30 min und unter starkem Schütteln (1400rpm) inkubiert, so dass die Acetyl-Gruppen in die lipophile Phase überführt werden konnten. Die Phasentrennung erfolgte in einer Tischzentrifuge (25°C/5 min/14.000 rpm). Von der oberen Phase wurde ein Aliquot von 600 µl abgenommen und in 3 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen.

2.9.14 HMT-Assay

Flag-Peptid Elutions-Puffer: 100 mg/ml Flag-Peptide M2 (Sigma-Aldrich) in HMT-Reaktionspuffer

HMT-Reaktionspuffer: 50 mM Tris pH 8,5
5 mM MgCl₂
4 mM DTT

S-Adenosyl-Methionin

rekombinantes H3 (von Becker zur Verfügung gestellt)

Im HMT-Assay werden Methyl-Gruppen unter Verwendung des Kofaktors S-Adenosyl-Methionin durch eine HMT auf ein Substrat übertragen. Für den Assay wurde Flag-c-MYC mittels IP (2.9.7) aus ca. 3×10^7 transient transfizierter HEK293 Zellen mit Flag-Beads präzipitiert. Die verwendeten Beads wurden gewaschen und mit dem 3-fachen Beads-Volumen des Flag-Peptids an Elutions-Puffer das gebundene Flag-c-MYC eluiert. Es wurden 20 µl Elution zusammen mit 100µM S-Adenosyl-Methionin und 2-3 µg Substrat mit HMT-

Reaktionspuffer auf 30 µl aufgefüllt und für 1 Stunde bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Der Assay wurde durch Zugabe von 20 µl 4x Probenpuffer gestoppt. Nach Auftrennung in einer SDS-PAGE erfolgte die Analyse mit H3-K4me3 spezifischen Antikörpern im Western-Blot.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur funktionellen Interaktion von c-MYC und SIRT1

In dieser Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass c-MYC mit dem Kofaktor CBP interagiert und von diesem acetyliert wird. Die Rekrutierung von CBP an Promotoren mit c-MYC Bindungssequenzen hat eine gesteigerte Transaktivierung und dadurch eine verstärkte Transkription der c-MYC Zielgene zur Folge. Die Interaktion von CBP mit c-MYC führt ausserdem zu einer Erhöhung der Protein-Stabilität von c-MYC. (Dissertation von Dr. Vervoorts und (182)).

In der hier vorliegenden Dissertation sollte untersucht werden, ob der positiven Regulation von c-MYC durch Acetylierung eine gegenläufige Regulation durch spezifische Deacetylierung gegenübersteht. Aus den drei HDAC-Klassen wurde SIRT1 als potentieller Kandidat ausgewählt, da dieses Enzym andere wichtige Transkriptionsfaktoren zu seinen Substraten zählt.

3.1.1 Interaktion von SIRT1 und c-MYC

Zunächst wurde die Interaktion von überexprimierten Proteinen in transient transfizierten HEK293 Zellen untersucht. SIRT1 mit einem HA-Epitop und c-Myc mit einem Flag-Epitop wurde in HEK293 Zellen transient exprimiert. Aus den Zellextrakten erfolgte die Immunpräzipitation (IP) von Flag-c-MYC mit an Agarose-Beads gekoppelten Flag-spezifischen Antikörpern. Danach wurden die IP und die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Durch koimmunpräzipitiertes HA-SIRT konnte die Interaktion zwischen c-Myc und SIRT im Western-Blot nachgewiesen werden. In der Kontrolle ohne Flag-c-MYC war nur eine sehr schwache SIRT1-Bande zu detektieren, die vermutlich das Resultat unspezifischer Bindung an die Beads durch die grosse Menge an überexprimiertem SIRT1 Proteins war (Abb. 3.1 A). Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob auch endogenes c-MYC mit überexprimiertem HA-SIRT1 koimmunpräzipitiert. Hierzu wurde HA-SIRT1 in HEK293 Zellen transient exprimiert und mit HA-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Im Western-Blot wurde mit c-MYC und SIRT1-spezifischen Antikörpern endogenes c-MYC und HA-SIRT1 detektiert.

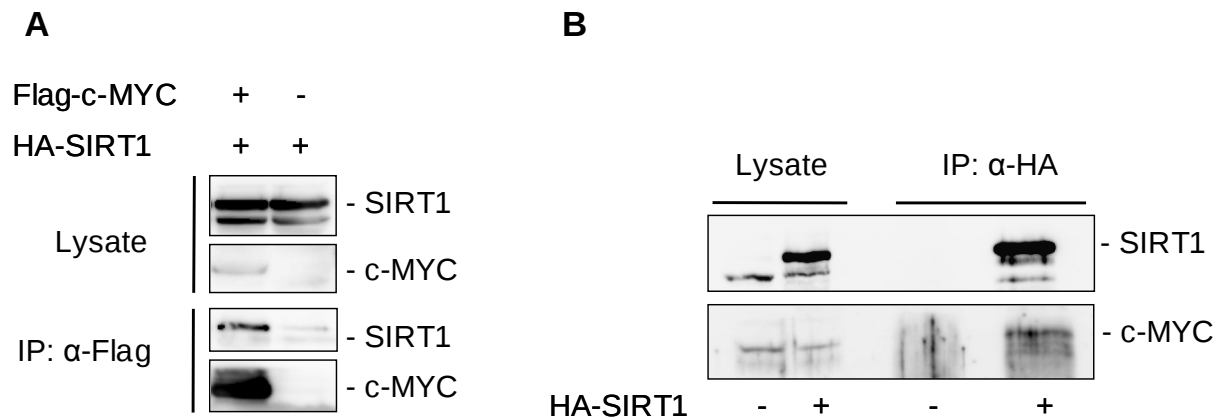


Abb. 3.1: **SIRT1 interagiert mit c-MYC.**

A: HEK-293 Zellen wurden mit den Plasmiden GW-pHA-SIRT1 und pcDNA3-Flag-c-MYC transfiziert und im F-Puffer lysiert. Anschließend wurde Flag-c-MYC mit an Agarose gekoppelten α-Flag Antikörper immunpräzipitiert. Die präzipitierten Komplexe und die Gesamt-Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit α-SIRT1 und α-c-MYC N262-Antikörpern nachgewiesen.

B: HEK-293 Zellen wurden mit dem Plasmid GW-pHA-SIRT1 transfiziert und im F-Puffer lysiert. Anschließend wurde HA-SIRT1 mit HA Antikörpern immunpräzipitiert. Die präzipitierten Komplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit α-SIRT1 und α-c-MYC N262-Antikörpern nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden jeweils in mindestens zwei unabhängigen Experimenten bestätigt.

Es war zu beobachten, dass endogenes c-MYC mit HA-SIRT1 kopräzipitiert und folglich in der Zelle an dieses bindet. Diese Interaktion konnte in mehreren unabhängigen Experimenten in HEK293 Zellen reproduziert werden. Es war nicht möglich, die Bindung von c-MYC an endogenes SIRT1 zu zeigen, wahrscheinlich aufgrund der meist sehr transienten Enzym-Substrat Interaktionen.

3.1.2 c-MYC ist ein direktes Substrat von SIRT1

Da der vorangegangene Versuch zeigte, dass SIRT1 mit c-MYC interagiert wurde anschließend untersucht, ob SIRT1 aufgrund seiner beschriebenen enzymatischen Aktivität in der Lage ist, c-MYC als Substrat zu deacetylieren. Um Sekundäreffekte zu umgehen und zu eruieren, ob c-MYC ein direktes Substrat ist, wurden zwei verschiedene *in vitro* Ansätze gewählt. Im ersten Experiment wurde bakteriell aufgereinigtes MBP-c-MYC durch baculoviral exprimiertes His-CBP mit $[C^{14}]$ -Acetyl-CoA *in vitro* acetyliert. Für die Messung wurde im Scintillations-Zähler die Menge an freigesetzter Acetyl-ADP-Ribose im Überstand ermittelt. Um die Spezifität der Reaktion zu bestätigen und auszuschließen, dass bakterielle Kontaminationen mit Deacetylaseaktivität das Ergebnis beeinflussten, wurde in einem Ansatz Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) weggelassen, welches SIRT1 für die Deacetylierung als Akzeptor für die Acetyl-Gruppe benötigt.

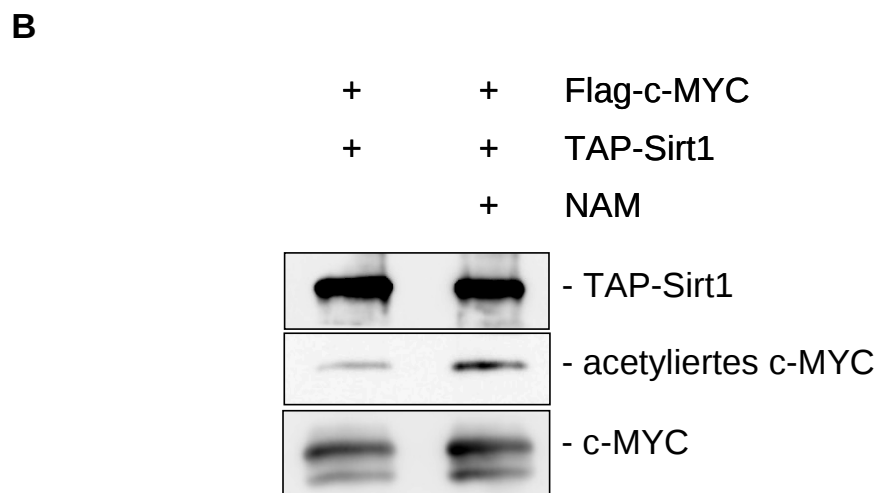
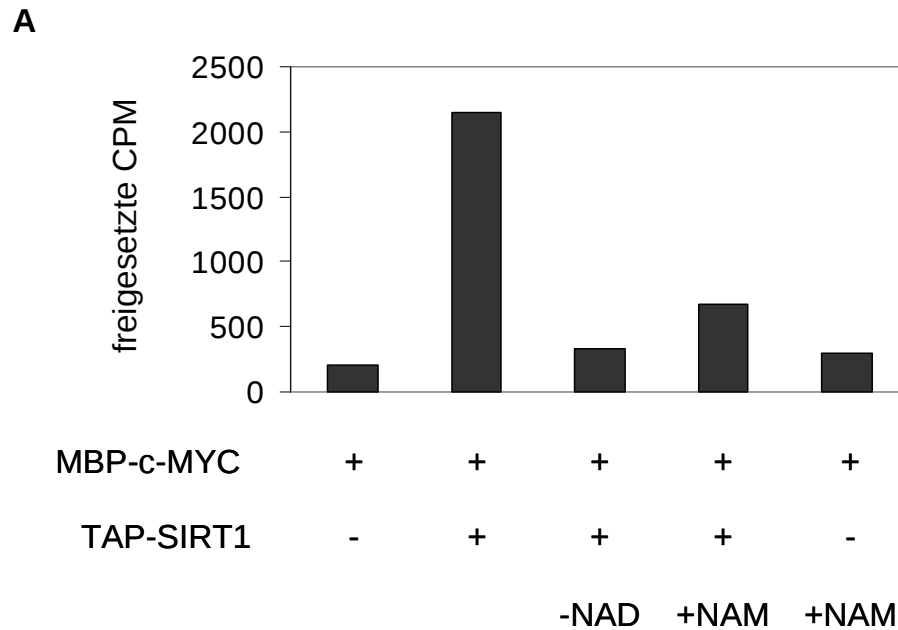


Abb. 3.2: **c-MYC ist ein direktes Substrat von SIRT1.**

A: Rekombinantes MBP-c-MYC (3 µg) wurde zusammen mit rekombinatem, baculoviral exprimiertem His-CBP (50ng) und [C14]-Acetyl-CoA inkubiert. Nach Zugabe von aus HEK293 Zellen aufgereinigtem TAP-SIRT1 wurde im Scintillation-Zähler die Menge an freigesetzter acetyl-ADP-Ribose im Überstand gemessen. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) oder mit zugesetztem Nicotinamide (NAM). Das Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

B: 293 Zellen wurden mit pcDNA3-Flag-Myc (2 µg), p1012-Gal4p300 (6 µg) transfiziert und in F-Puffer lysiert. Flag-c-MYC wurde mit Flag-Beads präzipitiert und mit aus HEK293 Zellen aufgereinigtem TAP-SIRT1 inkubiert. Dann wurden die Ansätze in der SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine wurden nach einem Western-Blot mit Antikörpern gegen SIRT1, acetyliertes Lysin (acetyl-lysine, cell signaling) und, nach Strippen der acetyl-Lysin Antikörper, gegen c-MYC (N262) detektiert.

In einem weiteren Ansatz wurde der SIRT-Inhibitor Nicotinamid (NAM) zugesetzt. Das radioaktiv markierte, acetylierte c-MYC konnte mit TAP-SIRT1, welches aus HEK293 Zellen

aufgereinigt wurde, deacetyliert werden (Abb. 3.2). Bei Inkubation von SIRT1 mit dem acetylierten c-MYC wurde eine grosse Menge Acetyl-ADP-Ribose freigesetzt. Wie erwartet, war in den Kontrollansätzen nur wenig Aktivität zu detektieren, wobei NAM die Reaktion nicht komplett auf das Hintergrundniveau reduzierte, wie es fehlendes NAD^+ tat. Um zu untersuchen, ob SIRT1 auch in Zellen acetyliertes c-MYC deacetylieren kann, wurde in HEK293 Zellen Flag-c-MYC und p300 koexprimiert und Flag-c-MYC aus den Lysaten mit Flag-Beads präzipitiert. Diese Beads wurden wie im Experiment zuvor beschrieben im HDAC-Assay mit TAP-SIRT1 eingesetzt. Anschliessend wurde der Ansatz durch Zugabe von Probenpuffer denaturiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen SIRT1, c-MYC und acetyliertes Lysin analysiert. Als Kontrolle wurde eine Hälfte der Beads im HDAC-Assay zusammen mit NAM inkubiert. Im Ansatz ohne NAM war eine deutlich schwächere Acetylierung von Flag-c-MYC zu detektieren als in der Negativ-Kontrolle, was auf eine SIRT1-abhängige Deacetylierung von Flag-c-MYC schliessen lässt. Die Messdaten zeigen, dass sowohl *in vitro* acetyliertes c-MYC als auch in HEK293 Zellen acetyliertes c-MYC direkte Substrate von SIRT1 sind.

3.1.3 c-MYC ist ein Substrat von SIRT1 in HEK293 Zellen

Dem Befund, dass c-MYC ein Substrat von SIRT1 *in vitro* ist folgte die Frage, ob dieses auch unter physiologischen Bedingungen in der Zelle gilt. Dazu wurde in HEK293 Zellen Flag-c-MYC, Gal-CBP und HA-SIRT1 koexprimiert. Als Kontrolle wurden eine nicht aktive Mutante von SIRT1 (HA-SIRT1-H363Y) mit c-MYC und Gal-CBP koexprimiert. Flag-c-MYC wurde aus den Lysaten mit Flag-Beads präzipitiert. Die IP und die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen CBP (A22), HA (zur Detektion von HA-SIRT1) und acetyliertes Lysin analysiert. Die Antikörper gegen acetyliertes Lysin wurden durch Inkubation mit β -Mercaptoethanol-haltigem Puffer von der Membran des IP-Western Blots entfernt, damit anschliessend c-MYC mit dem Antikörper c-MYC (N262) nachgewiesen werden konnte. Acetylierung von c-MYC konnte in Proben mit koexprimiertem CBP deutlich detektiert werden (Abb. 3.3 A, Spur 2), während allein exprimiertes Flag-c-MYC keine Acetylierung aufwies (Abb. 3.3 A, Spur 1). Die Anwesenheit von HA-SIRT1 ließ die Acetylierung vollständig verschwinden, wogegen sie bei der inaktiven Mutante HA-SIRT1-H363Y sichtbar war, aber schwächer als bei der Koexpression von c-MYC und CBP. Dies könnte durch Unterschiede der CBP-Expression verursacht sein, die bei Koexpression von CBP und SIRT1 bzw. SIRT1-H363Y auftraten. Die Resultate bestätigen eine von der enzymatischen Aktivität von SIRT1 abhängige Deacetylierung von c-MYC.

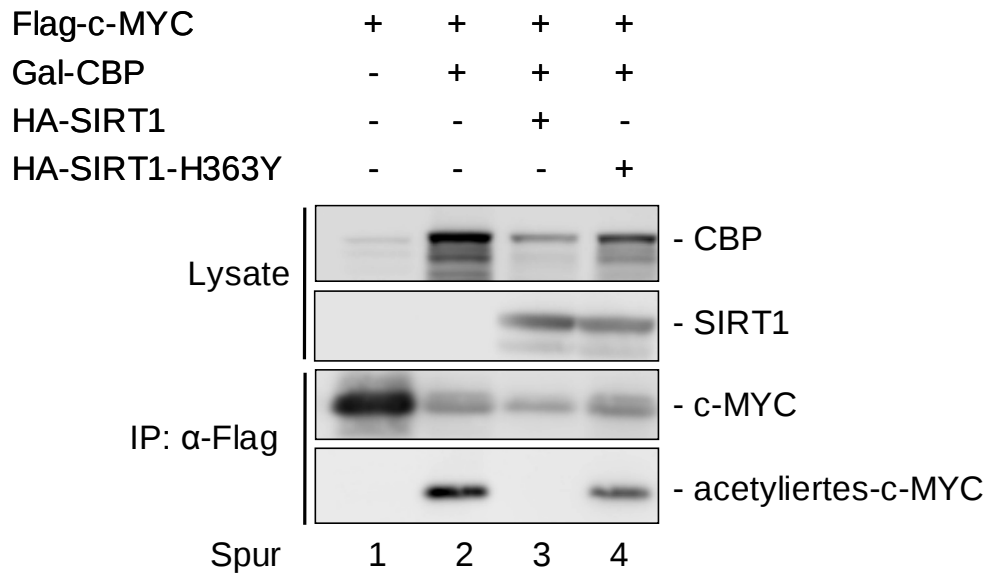
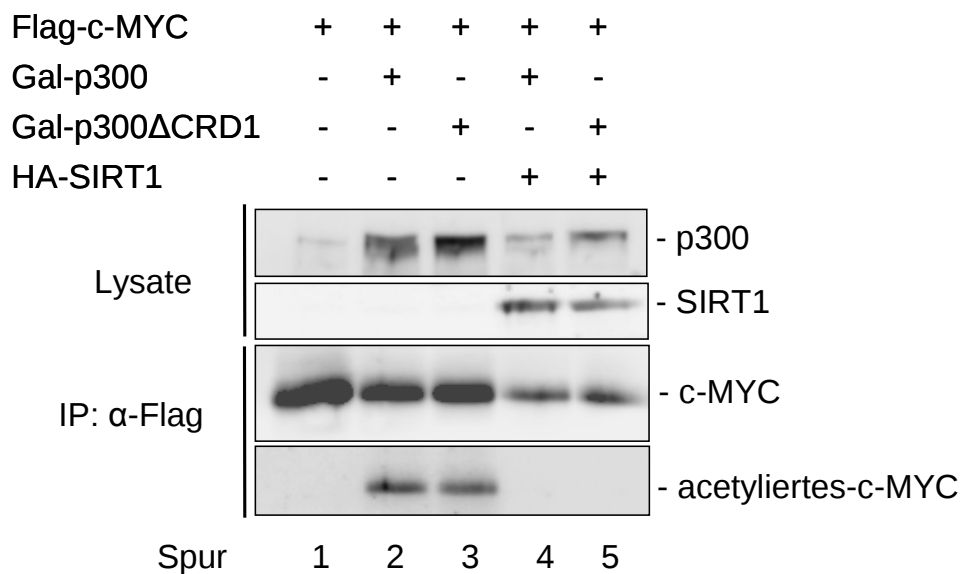
A**B**

Abb. 3.3: SIRT1 deacetyliert c-Myc in 293 Zellen.

A: 293 Zellen wurden mit pcDNA3-Flag-Myc (2 µg), p1012-Gal4CBP (6 µg), GW-pHA-SIRT1 (4 µg) und GW-pHA-SIRT1-H363Y (4 µg) wie angegeben transfiziert. Flag-c-MYC wurde mit Flag-Beads präzipitiert. IP und Lysate wurden in der SDS PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden nach einem Western-Blot mit Antikörpern gegen CBP (A22), HA-SIRT1 (HA), acetyliertes Lysin (acetyl-lysine, cell signaling) und, nach Strippen der acetyl-Lysin Antikörper, gegen c-MYC (N262) detektiert.

B: 293 Zellen wurden mit pcDNA3-Flag-Myc (2 µg), p1012-Gal4p300 (6 µg), p1012-Gal4p300ΔCRD (6 µg) und GW-pHA-SIRT1 (4 µg) wie angegebenen transfiziert und in F-Puffer lysiert. Flag-c-MYC wurde mit Flag-Beads präzipitiert und mit den Lysaten in der SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Western-Blot wurde mit Antikörpern gegen CBP (A22), HA-SIRT1 (HA), acetyliertes Lysin (acetyl-lysine, cell signaling) und, nach Strippen der acetyl-Lysin Antikörper, gegen c-MYC (N262) detektiert. Das Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

In der Publikation von T. Bouras *et al.* wird beschrieben, dass SIRT1 in der Lage ist p300, das grosse Homologie zu CBP aufweist, negativ zu regulieren (217). Obwohl in Abb. 3.2 gezeigt wurde, dass c-MYC *in vitro* ein direktes Substrat von SIRT1 ist musste die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass SIRT1 über Inhibierung von CBP indirekt die c-MYC Acetylierung in der Zelle reguliert. Für die negative Regulation von p300 durch SIRT1 ist die Deacetylierung der Lysine 1020 und 1024 in der *cell cycle regulatory domain 1*-Domäne (CRD1) von p300 notwendig. Um zu analysieren, ob bei der c-MYC Deacetylierung SIRT1 die HAT-Aktivität von p300 beeinflusst, wurde Wildtyp p300 mit einer p300-Mutante, in der die CRD1 Domäne deletiert war (p300 Δ CRD1), verglichen. Diese Deletionsmutante sollte nicht mehr durch SIRT1 regulierbar sein. Der Versuchsaufbau entsprach dem oben für CBP beschriebenen. p300 und p300 Δ CRD1 waren wie CBP dazu in der Lage, c-MYC zu acetylieren, die Anwesenheit von SIRT1 ließ das Signal jeweils komplett verschwinden (Abb. 3.3 B, Spur 4,5). Eine Regulation der c-MYC Acetylierung durch eine SIRT1-abhängige Inhibition von p300 und CBP erscheint daher unwahrscheinlich. Dieses Kontrollexperiment bestätigt die direkte Deacetylierung von c-MYC durch SIRT1. In beiden Experimenten fielen ähnliche Expressionsmuster von c-MYC auf. So war die Expression von c-MYC in Anwesenheit von CBP und p300 in unerwarteter Weise schwächer (Abb. 3.3 A: Spur 2; Abb. 3.3 B: Spur 2,3; siehe dazu auch Absatz 3.1.), was sich durch SIRT1 Koexpression verstärkte und abhängig von der enzymatischen Aktivität von SIRT1 war (Abb. 3.3 A: Spur 3,4; Abb. 3.3 B: Spur 4,5). Auch die CBP und p300 Level gingen durch Koexpression von SIRT1 in beiden Ansätzen etwas zurück, dessen Ursache unklar ist. Dieser Effekt war auch bei der inaktiven Mutante von SIRT1 zu beobachten.

3.1.4 Der Acetylierungsstatus von c-MYC wird durch Deacetylierung reguliert

Die fehlende Acetylierung von c-MYC ohne zusätzliche Koexpression von CBP wirft die Frage nach dem tatsächlichen Acetylierungsstatus von c-MYC und dessen Regulation in der Zelle auf. Wenn in der Zelle die Acetylierung von c-MYC dynamisch durch SIRT1 oder möglicherweise weitere HDACs reguliert wird, sollte durch Inhibierung der SIRT1 spezifischen Deacetylierung acetyliertes c-MYC angereichert werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der SIRT spezifische kompetitive Inhibitor Nicotinamid (NAM) und, zum Vergleich, der Klasse I und II HDAC- Inhibitor Trichostatin A (TSA) eingesetzt. Dazu wurden HEK293 Zellen mit Flag-c-MYC transfiziert und mit NAM und TSA inkubiert oder im Kontrollansatz nicht behandelt. Flag-c-MYC wurde mit Flag-Beads präzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen acetyliertes Lysin detektiert. Danach wurden die Antikörper durch Inkubation mit β -Mercaptoethanolhaltigem Puffer von der Membran entfernt und c-MYC mit einem spezifischen Antikörper (N262) analysiert. Bei gleichen Mengen von präzipitiertem c-MYC war nur bei den NAM-

behandelten Zellen eine deutliche Acetylierung zu detektieren (Abb. 3.4). Durch die Unterdrückung der Deacetylierung wird demnach acetyliertes c-MYC generiert. Dies lässt auf eine fundamentale Rolle von SIRT1 bei der Deacetylierung von c-MYC schließen. Der Status der Acetylierung von c-MYC wird also dynamisch durch SIRT1 reguliert, wobei sich nicht sagen lässt, ob CBP für den Hauptteil der Acetylierung verantwortlich ist. Falls andere Histon-Acetyltransferasen die beobachtete Acetylierung mitgenerieren sollten, so ist SIRT1 in der Lage diese zu entfernen.

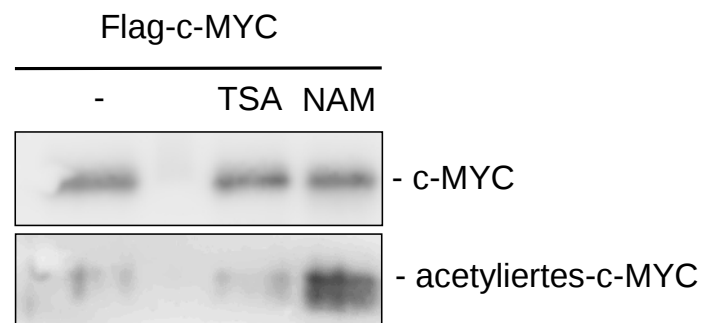


Abb. 3.4: Inhibierung der SIRT1 abhängigen Deacetylierung generiert acetyliertes c-MYC.

293 Zellen wurden mit Flag-c-MYC transfiziert und mit 1 μ M Trichostatin A (TSA) oder mit 1mM Nicotinamide (NAM) für 12h behandelt oder nicht behandelt. c-MYC wurde mit Flag-Beads präzipitiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western-Blot mit Antikörpern gegen acetyliertes Lysin und c-MYC (N262) nachgewiesen. Das Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

3.1.5 SIRT1 reprimiert die CBP abhängige Transaktivierung von c-MYC

Da bereits gezeigt wurde, dass CBP als Kofaktor von c-MYC dessen transkriptionelle Aktivität steigert (182), erschien durch die bisherigen Ergebnisse eine Rolle von SIRT1 hierbei wahrscheinlich. In einem Reporter-gen-Assay sollte der Einfluss von SIRT1 bei der CBP abhängigen Aktivierung der Transkription von c-MYC analysiert werden. Dafür wurde das Reporter-gen-plasmid M4-min-tk-luc (322) benutzt. Es enthält vier E-Boxen vor dem minimalen Thymidinkinase-Promotor und das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* als Reporter-gen. Das Genprodukt setzt das Substrat Luciferin unter Verwendung von ATP enzymatisch zu Licht um. Dabei ist die Lichtproduktion proportional zur Luciferasemenge, so dass die Transaktivierung quantifiziert werden kann. Die Luciferase-Aktivität wurde mit der β -Galaktosidase-Aktivität normalisiert, um Unterschiede in der Transfektionseffizienz auszugleichen. Im Versuch wurden HEK293 Zellen mit Plasmiden für M4-min-tk-luc, β -Galaktosidase, Flag-c-MYC, Gal-CBP, HA-SIRT1 und HA-SIRT1-H363Y transient transfiziert und die Luciferase-Aktivität in den Zellextrakten ermittelt. Es zeigte sich, dass c-MYC alleine kein starker Aktivator ist, die Koexpression von CBP erhöhte die Transaktivierung um den Faktor 2 (Abb. 3.5).

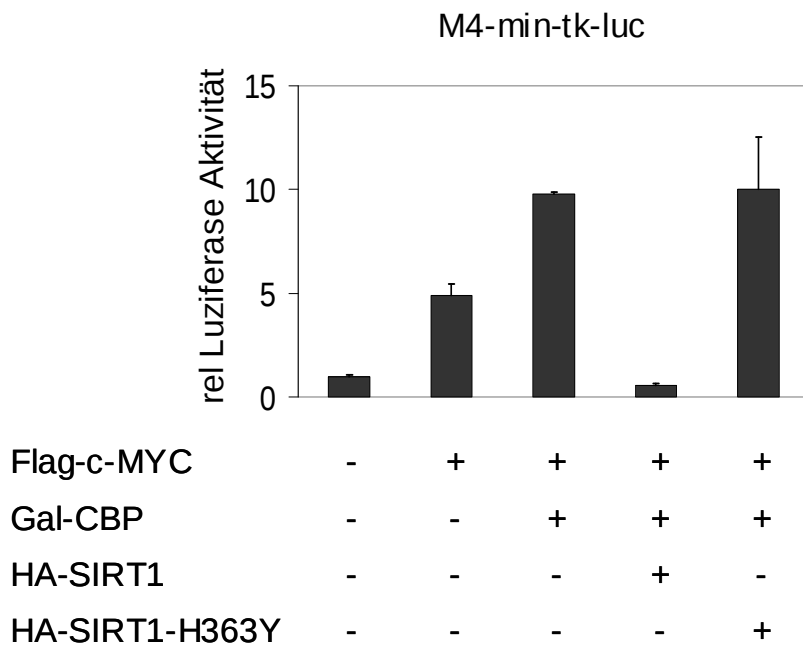


Abb. 3.5: **SIRT1 reprimiert die CBP abhängige Transaktivierung von c-MYC.**

In HEK293 Zellen wurde das *Luciferase*-Reporterplasmid pM4-min-tk-luc (0,5 µg) zusammen mit den Plasmiden pEQ176pβGal (0,05 µg), pcDNA3-Flag-Myc (0,6 µg), p1012Gal4-CBP (1,4 µg), GW-pHA-SIRT1 (0,8 µg), GW-pHA-SIRT1-H363Y (0,8 µg) wie angegebenen kotransfiziert und die Luciferase-Aktivität ermittelt. Die Luciferase-Aktivität wurde mit der β-Galaktosidase-Aktivität normalisiert und die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von Flag-c-Myc, Gal-CBP, HA-SIRT1, HA-SIRT1-H363Y wurde gleich eins gesetzt. Das Experiment wurde in Triplets durchgeführt, der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. Das Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Bei Anwesenheit von SIRT1 war eine komplette Repression der Aktivität bis auf Hintergrund-Niveau zu beobachten, bei Koexpression der inaktiven Mutante von SIRT1 blieb die Aktivierung unverändert. Auch in diesem Versuch sollte die Möglichkeit einer indirekten Regulation der c-MYC Transaktivierung durch die unter Punkt 3.1.3 beschriebene SIRT1 abhängige Inhibierung des CBP Homologs p300 ausgeschlossen werden. Dazu wurde im Reporter-Gen-Assay Wildtyp p300 mit der nicht mehr durch SIRT1 regulierbaren p300 Deletionsmutante (p300ΔCRD1) in der c-MYC Transaktivierung verglichen. Der Versuchsaufbau entsprach dem für CBP, wie oben beschrieben. In diesem Experiment waren keine Unterschiede bezüglich der Transaktivierung zwischen beiden p300 Konstrukten zu erkennen (Abb. 3-6). Beide steigerten die c-MYC Transaktivierung um den gleichen Faktor und die Koexpression von SIRT1 reprimierte beide Ansätze ähnlich stark. Daraus lässt sich schließen, dass die Unterdrückung der CBP/p300 abhängigen Transaktivierung durch SIRT1 nicht durch Inhibierung von CBP/p300 begründet ist, sondern durch die Deacetylierung von c-MYC. Zusammengefasst zeigen die Resultate, dass das transaktivierende Potential von c-MYC mit dessen Acetylierungsstatus korreliert und dieser von der enzymatischen Aktivität von SIRT1 reguliert wird.

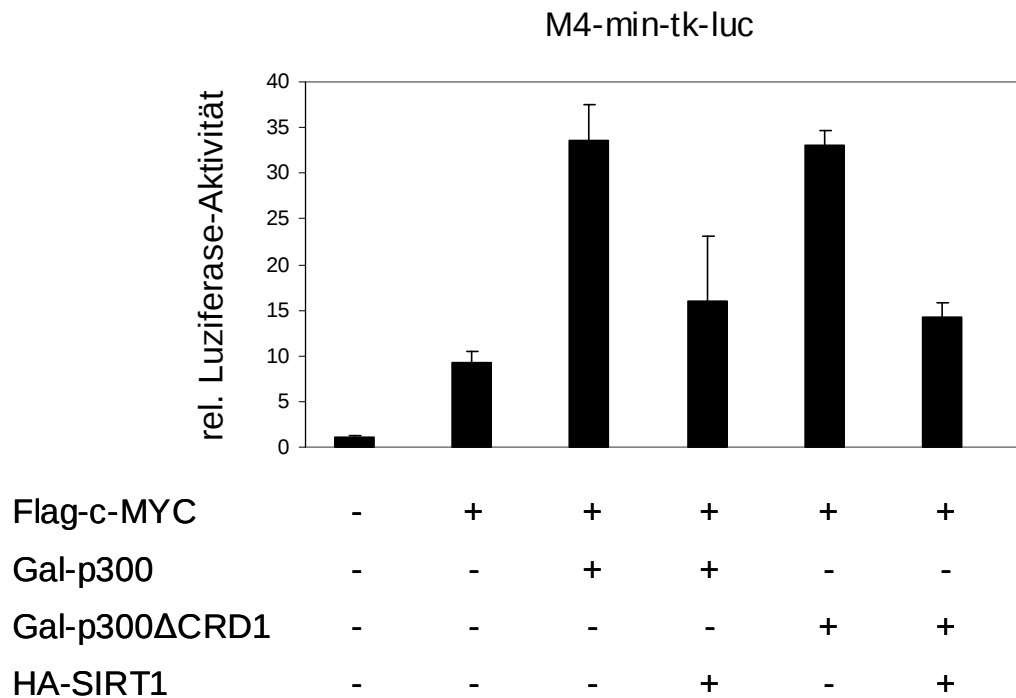


Abb. 3.6: **SIRT1 reprimiert die p300 abhängige Transaktivierung von c-MYC durch dessen Deacetylierung und nicht über Inhibierung der p300 Aktivität.**

In 293 Zellen wurde das *Luciferase*-Reporterplasmid M4-min-tk-luc (0,5 µg) zusammen mit den Plasmiden pEQ176pβGal (0,05 µg), pcDNA3-Flag-Myc (0,6 µg), p1012-Gal4p300 (1,4 µg), p1012-Gal4p300ΔCRD (1,4 µg), GW-pHA-SIRT1 (0,8 µg wie angegebenen kotransfiziert und die Luciferase-Aktivität ermittelt. Die Luciferase-Aktivität wurde mit der β-Galaktosidase-Aktivität normalisiert und die Aktivität des Reporters in Abwesenheit von Flag-c-Myc, Gal-p300, p1012-Gal4p300ΔCRD und HA-SIRT1 wurde gleich eins gesetzt. Das Experiment wurde in Triplets durchgeführt, der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei Experimenten.

3.1.6 c-MYC wird als Folge der SIRT1 abhängigen Deacetylierung verstärkt ubiquitiniert

c-MYC ist ein stringent regulierter Transkriptionsfaktor, der eine kurze Halbwertszeit besitzt und proteasomal degradiert wird. Proteine, die für den Abbau über diesen Weg bestimmt sind, werden durch Verknüpfung von Ubiquitin-Polymeren an Lysinen markiert, worauf sie von den 19S-Komplexen des Proteasoms erkannt, entfaltet und dann von der 20S-Untereinheit proteolytisch gespalten werden. Da die Acetyl-Reste ebenfalls an Lysine geknüpft werden und die Acetylierung eines Lysins somit die Ubiquitinierung desselben verhindert, führt die Acetylierung von c-MYC durch die Histon-Acetyltransferasen CBP, GCN5 und TIP60 zur Stabilisierung des Proteins (171). Die resultierende acetylierungsabhängige Reduktion der Ubiquitinierung konnte am Beispiel von CBP gezeigt werden (182).

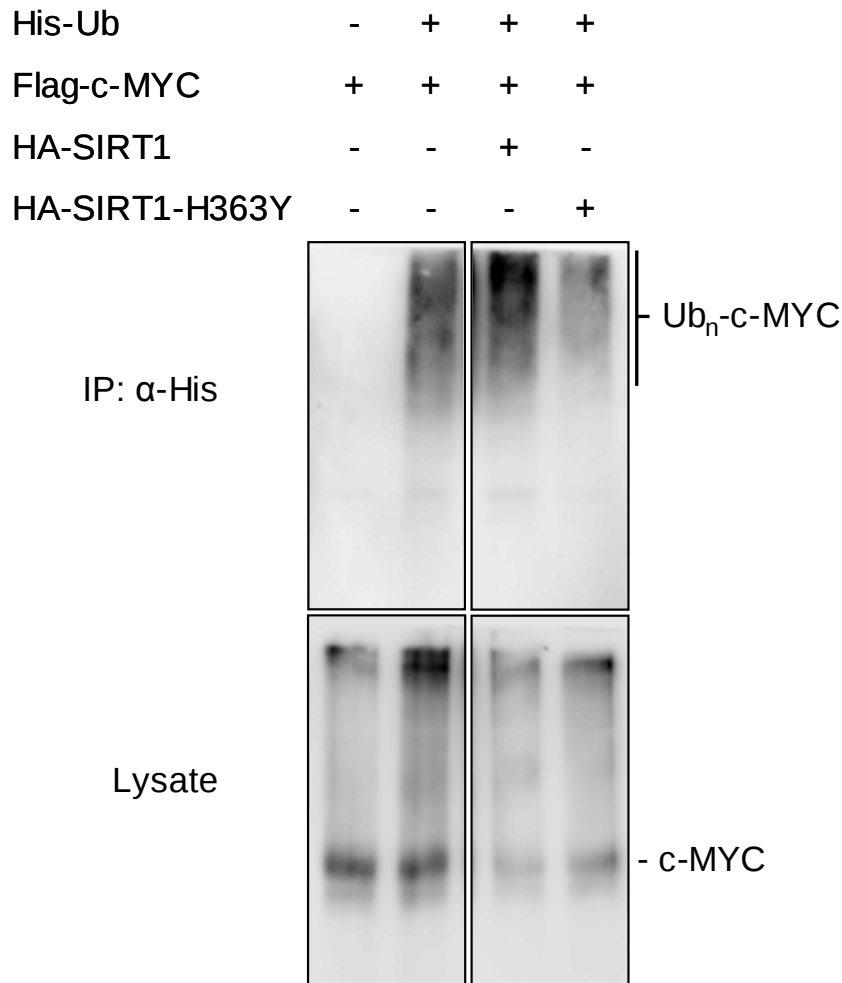


Abb. 3.7: Die SIRT1 abhängige Deacetylierung von c-MYC führt zu erhöhter Ubiquitinierung von c-MYC.

Die Plasmide pcDNA3-Flag-Myc (2 μ g), GW-pHA-SIRT1 (5 μ g), GW-pHA-SIRT1-H363Y (5 μ g), pCMV-His6-Ub (8 μ g) wurden wie angegebenen in HEK293 Zellen kotransfiziert und His-Ubiquitin modifizierte Proteine nach Lyse in Urea-Puffer über Talon Beads präzipitiert. c-MYC wurde nach SDS-PAGE im Western-Blot mit den c-MYC spezifischen Antikörpern N262 detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei Experimenten.

Basierend auf dieser Tatsache sollte untersucht werden, ob durch die SIRT1-abhängige Deacetylierung von c-MYC dessen Ubiquitinierung zunimmt. Hierfür wurden in HEK293 Zellen Flag-c-MYC, HA-SIRT1 und HA-SIRT1-H363Y zusammen mit His-Ubiquitin exprimiert und modifizierte Proteine nach Lyse in Urea-Puffer über Talon Beads präzipitiert. Die Verwendung des stark denaturierenden Urea-Puffers ist wegen der sehr hohen Aktivität von Ubiquitinhydrolasen notwendig. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde mit dem c-MYC spezifischen Antikörper N262 detektiert. Durch Ubiquitin modifizierte Proteine haben ein höheres Molekulargewicht und laufen im Gel durch die unterschiedliche Länge der angehängten Polymere nicht als distinkte Bande, sondern als Schmier. Ubiquitiniertes c-MYC ist im Vergleich zur Kontrolle ohne überexprimiertes His-Ubiquitin deutlich zu detektieren. Durch Anwesenheit von SIRT1 konnte die Ubiquitinierung von c-MYC gesteigert

werden, die inaktive Mutante HA-SIRT1-H363Y dagegen reduzierte den Grad der Ubiquitinierung von c-MYC. Die Deacetylierung schafft also freie unmodifizierte Lysinreste, die dann für die Ubiquitinkonjugation zur Verfügung stehen. Als Konsequenz dieser verstärkten Ubiquitinierung ist eine verstärkte Degradation von c-MYC zu erwarten, was von Per Hydbring mittels CHX-Chase bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt) und SIRT1 zusätzlich eine Rolle bei der Regulation des c-MYC Umsatzes in der Zelle zukommen lässt.

3.2 Untersuchungen zum Onkoprotein ASH2

3.2.1 Der Einfluss von ASH2 auf die Proliferation von Tumorzellen

Onkoproteine mit transformierendem Potential greifen in Schlüsselregulationsmechanismen der Zelle ein und wirken durch die Inhibierung der Apoptose, der Steigerung der Proliferation oder der Verhinderung der Seneszens. Viele dieser Proteine sind Transkriptionsfaktoren, wie c-MYC und p53. Die Beobachtung der onkogenen Eigenschaften von ASH2 warf die Frage nach dessen Mechanismus in der Transformation und der Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes auf. ASH2 wurde zuvor als Mitglied mehrerer Histon-Methylierungskomplexe beschrieben, die durch die spezifische Methylierung von Histon H3 am Lysin 4 die Aktivierung der Transkription durch Auflockerung der Chromatinstruktur ermöglichen. Um die Rolle von ASH2 in der Zelle zu untersuchen wurde ASH2 überexprimiert oder in *knockdown* Experimenten RNA-Interferenz (RNAi) Plasmide eingesetzt. Zunächst sollte in einem Proliferations-Assay analysiert werden, ob eine Reduktion der ASH2 Menge Auswirkungen auf das Zellwachstum hat.

Dafür wurden Hela Zellen mit den siRNA-Plasmiden pSuper-ASH2, pSuper-c-MYC und dem Kontrollplasmid pSuper-rAsh2m transfiziert. In pSuper-rAsh2m sind Mutationen in der Sequenz eingefügt, die gegen Ratten ASH2 gerichtet ist. Dadurch werden die RNA-Interferenzprozesse aktiviert, aber kein Zielgen unterdrückt. Parallel zu dem *knockdown* von ASH2 wurde in einem Ansatz ASH2 überexprimiert, um den Effekt von überhöhten ASH2 Proteinmengen zu untersuchen. Als Kontrolle hierfür dienten Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden. Um die Effizienz der Transfektion zu steigern, wurde zusätzlich zu den RNAi-Konstrukten in allen Ansätzen eine Mutante des Transmembran-Proteins CD4 exprimiert. Diese Mutante kann aufgrund der fehlenden intrazellulären Domäne keine Signale übertragen. Dies erlaubte eine Selektion der transfizierten Zellen über Magnet-Beads mit gekoppelten CD4 spezifischen Antikörpern. Nach der Selektion wurden die Zellen von den Beads gelöst und zu gleichen Mengen ausplattiert. An 4 aufeinander folgenden Tagen wurden die Zellen durch Trypsin gelöst und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Funktionalität der eingesetzten RNAi-Konstrukte wurde zuvor in diesem Labor bestätigt.

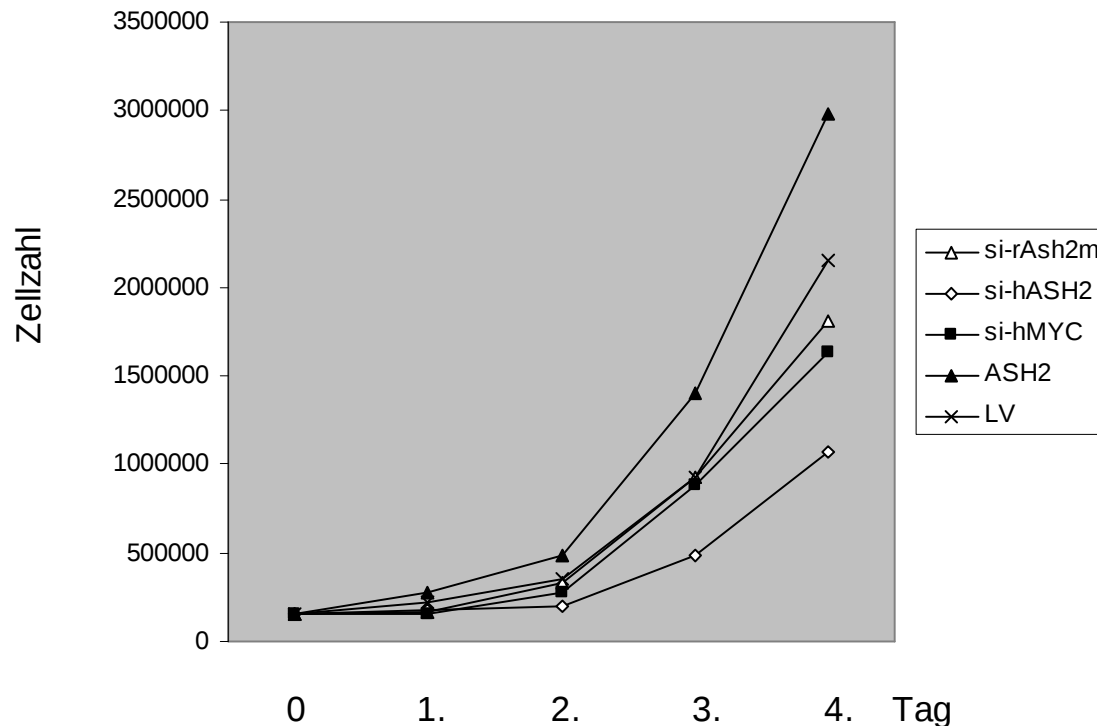


Abb. 3.8: **Proliferation ist ASH2 abhängig.**

Hela Zellen wurden mit 1,2 µg p-MACS4.1CD4 und zusätzlich mit 18 µg der p-Super-RNAi-Konstrukte bzw. mit 10 µg pcDNA3 HA-ASH2 oder Leervektor wie angegebenen kotransfiziert und nach 48h über Dyna-Beads selektioniert. Dann wurden gleiche Zellmengen ausgesät und nach 1-4 Tagen in der Neubauer Kammer gezählt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei Experimenten.

Durch die Reduktion des ASH2 Proteinlevels wurde die Proliferationsrate auf annähernd die Hälfte im Vergleich zu der Kontrolle verringert (Abb. 3.8). Die Reduktion von c-MYC zeigte dagegen keine Wirkung. Die Überexpression von ASH2 beschleunigte die Proliferation.

3.2.2 ASH2 ist für die S-Phase essentiell

Die Rolle von ASH2 bei der Proliferation sollte in einem BrdU-Assay genauer untersucht werden, wobei der Assay spezifisch die S-Phase erfasst. Der Zellzyklus umfasst 4 Phasen: Gap1 (G1), Synthese (S), Gap2 (G2) und Mitose-Phase (M). In jeder dieser Phasen kann Proliferation durch Deregulation von Schlüssel-Proteinen gehemmt werden. Die Zellteilung ist ein komplexer Vorgang, der einer stringenten Überwachung durch Zellzyklus Kontrollpunkte unterliegt. Diese ermöglichen den Eintritt in die nächste Phase erst nach fehlerfreiem Abschluss der Vorigen. Neuralgische Punkte sind dabei der Übergang von der G1 in die S-Phase, von der G2 in die M-Phase sowie der Austritt aus der M-Phase. Das Zellzyklus-Kontrollsystem verhindert unter anderem die Anreicherung von Mutationen durch DNA-Schäden und entscheidet diese zu reparieren, oder es leitet die Apoptose ein, falls die Schäden zu groß sind.

Im BrdU-Assay wird die DNA-Synthese mittels Inkorporation des Thymidinanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU) erfasst. Dadurch wird ermittelt, wie viele Zellen einer Population sich während des Zeitraums der Inkubation mit BrdU in der S-Phase befanden. Für den Assay wurden Hela Zellen mit den siRNA-Plasmiden pSuper-ASH2, pSuper-SKP2 und dem Kontrollplasmid pSuper-rAsh2m transfiziert. Zusätzlich wurde in allen Ansätzen pEGFP-C1 in 10 fach geringerer Konzentration kotransfiziert, so dass davon auszugehen war, dass jede GFP-positive Zelle ebenfalls die RNAi Konstrukte aufgenommen hatte. Nach 72h wurden die Zellen für 50min mit dem Thymidinanalogon BrdU inkubiert, welches bei der DNA-Synthese an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Dann wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und nach DNase Verdau, der die BrdU Epitope durch DNA-Denaturierung zugänglich macht, mit einem BrdU spezifischen Antikörper inkubiert. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen unter den transfizierten GFP-positiven Zellen wurde im Mikroskop ermittelt.

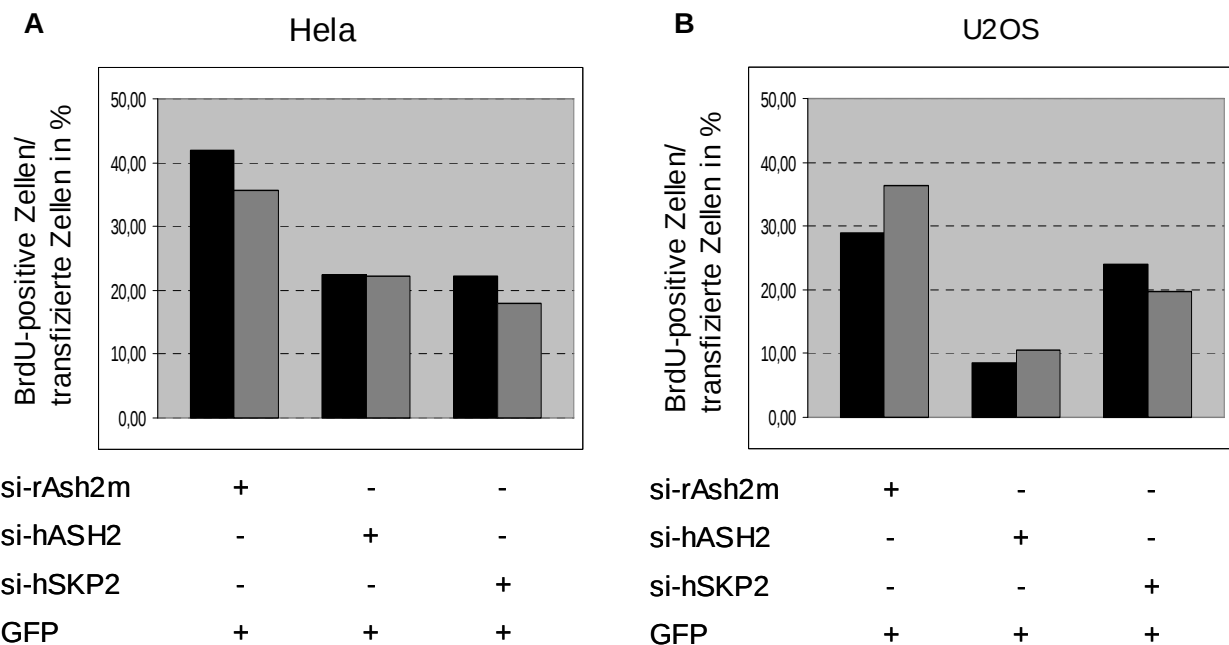


Abb. 3.9: **ASH2 ist für die S-Phase essentiell.**

Hela und U2OS Zellen wurden mit den angegebenen pSuper-RNAi-Plasmiden transfiziert und nach 72h für 50min mit dem Thymidinanalogon BrdU inkubiert. Dann wurden die Zellen fixiert und nach DNase-Verdau mit einem BrdU-spezifischen Antikörper mittels Immunfluoreszenz detektiert. Die Anzahl der BrdU-positiven Zellen unter den transfizierten GFP-positiven Zellen wurde im Mikroskop ermittelt. Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente (Unterschieden durch schwarze bzw. graue Balken)

Die Abb. 3.9 zeigt für beide Zelllinien zwei unabhängige Experimente, die Zugehörigkeit wird jeweils durch schwarze und graue Balken dargestellt. Der *knockdown* der E3 Ubiquitinligase SKP2 diente in dem Experiment als positiv-Kontrolle, da beschrieben wurde, dass dieses Enzym essentiell für die S-Phase ist. Die Reduktion der SKP2 Expression führte in beiden

Zelllinien zu einer deutlichen Verringerung der DNA Synthese (Abb. 3.9 A, B). Wenn die ASH2 Protein Expression reduziert wurde, war die DNA Synthese ebenfalls stark reduziert, in Hela Zellen etwa auf das gleiche Niveau wie bei der Reprimierung von SKP2 (Abb. 3.9 A), in den U2OS Zellen sogar auf unter ein Drittel der negativ Kontrolle (Abb. 3.9 B). In der Dissertation von J.Vervoorts konnte eine Interaktion zwischen ASH2 und c-MYC nachgewiesen werden, die Bindung wurde sowohl in Zelllinien als auch *in vitro* in weiteren Arbeiten in diesem Labor bestätigt. (Dissertation von G.Walsemann). Zusätzlich wurde in einem Transformations-Assay mit primären embryonalen Rattenfibroblasten beobachtet, dass humanes c-MYC bei gleichzeitiger Repression von Ratten Ash2 nur noch ein schwaches transformierendes Potential hat (296).

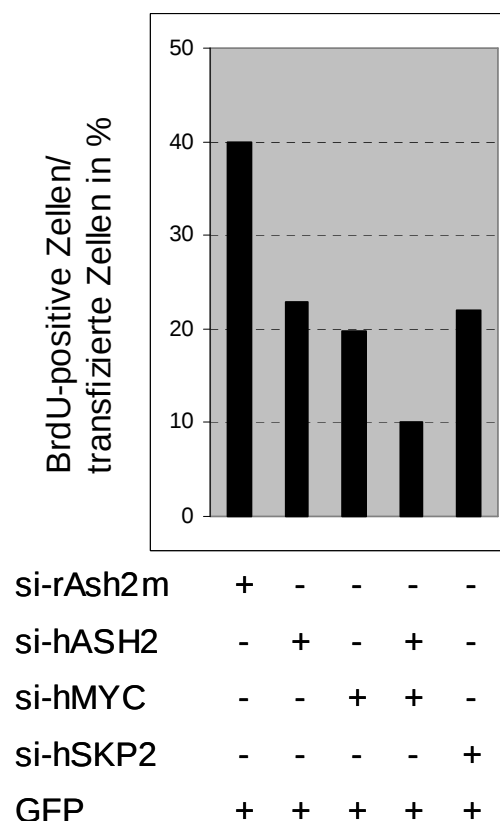


Abb. 3.10: **Die simultane Reduktion von c-MYC und ASH2 blockiert die S-Phase stärker als der knockdown der einzelnen Proteine.**

Hela Zellen wurden zu gleichen Teilen entweder mit den angegebenen RNAi Plasmiden und der Kontroll-RNAi transfiziert oder mit den beiden RNAi-Plasmiden gegen ASH2 und c-MYC. Nach 72h wurde für 50min mit dem Thymidinanalogs BrdU inkubiert, die Zellen fixiert und nach DNase-Verdau mit einem BrdU-spezifischen Antikörper mittels Immunfluoreszenz detektiert. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen unter den transfizierten GFP-positiven Zellen wurde im Mikroskop ermittelt. Die Daten sind das Ergebnis eines einmalig durchgeführten Experiments.

Diese Ergebnisse wiesen auf eine funktionelle Beziehung zwischen beiden Proteinen hin. c-MYC ist ein für die Proliferation und für den Start der DNA-Synthese essentieller Faktor. Da dieses, wie oben gezeigt, auch für ASH2 gilt, sollte untersucht werden, ob die simultane

Reduktion der ASH2 und c-MYC Protein Mengen die DNA-Synthese stärker beeinträchtigt, als der jeweilige *knockdown* alleine. Dazu wurden in dem zuvor beschriebenen BrdU-Assay Hela Zellen mit siRNA-Plasmiden pSuper-ASH2, pSuper-c-MYC, sowie den Kontrollplasmiden pSuper-SKP2 und pSuper-rAsh2m und zusätzlich mit pEGFP-C1 transfiziert. Bei den beiden Einzel-*knockdown* Ansätzen gegen ASH2 und c-MYC wurde die Hälfte der Transfektion mit pSuper-rAsh2m aufgefüllt, um die Vergleichbarkeit zur simultanen ASH2/c-MYC und zu den Kontrollen zu gewährleisten. Wie Abb. 3.10 zeigt, wurde die DNA Synthese durch Reduktion von ASH2 im gleichen Maß wie im Versuch zuvor gehemmt. Beim *knockdown* von c-MYC wurde die Synthese Rate ähnlich deutlich reduziert wie bei ASH2, bei gleichzeitiger Reduktion von ASH2 und c-MYC wurde die DNA Synthese Rate halbiert im Vergleich zu den Einzelansätzen. Dieser synergistische Effekt deutet auf eine funktionelle Interaktion von ASH2 und c-MYC hin.

3.2.3 ASH2 ist für die Histon H3 Lysin4 Methylierung der Zelle essentiell

Die Ursache für die Abhängigkeit der Proliferation von ASH2 könnte in dessen Rolle bei der Histon-Modifizierung begründet sein. ASH2 wurde in *Saccharomyces cerevisiae* und im Menschen als Teil mehrerer Histon H3 Lysin 4 (H3-K4) Histon-Methyltransferase Komplexe beschrieben, die ähnliche Komplexpartner, aber unterschiedliche HMTs enthalten. Für Komplexe, die MLL als HMT enthalten, konnte gezeigt werden, dass diese durch ASH2 die Fähigkeit erhalten, drei Methyl-Reste auf das Lysin 4 vom Histon H3 zu übertragen (301). Diese Markierung ist mit aktiver Transkription assoziiert. Ohne ASH2 werden maximal zwei Methyl-Reste übertragen. In der Immunfluoreszenz sollte der Einfluss von reduzierten ASH2 Proteinmengen auf den globalen H3-K4 Methylierungsstatus überprüft werden. Dafür wurden Hela Zellen wie im Versuch zuvor mit pSuper-hASH2 oder dem Kontrollplasmid pSuper-rAsh2m transfiziert, auf Deckgläsern ausgesät und nach 72h mit Paraformaldehyd fixiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen ASH2 (4C5) und gegen trimethyliertes Histone H3-K4 (Histone H3-K4 trimethyl Abcam). Als Sekundärantikörper wurde für ASH2 anti-Ratte-Cy3 und für H3-K4me3 anti-Kaninchen-Cy2 eingesetzt. In den Zellen, die durch das ASH2-RNAi-Konstrukt reduzierte ASH2-Proteinmengen aufwiesen, war auch hier nur schwach trimethyliertes H3-K4 zu detektieren (Abb. 3.11 A). Im Western Blot konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Dafür wurden Hela Zellen mit den siRNA-Plasmiden pSuper-ASH2 oder dem Kontrollplasmid pSuper-rAsh2m transfiziert. Die Zellen wurden nach 72h in Ripa-Puffer lysiert, sonifiziert und die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt.

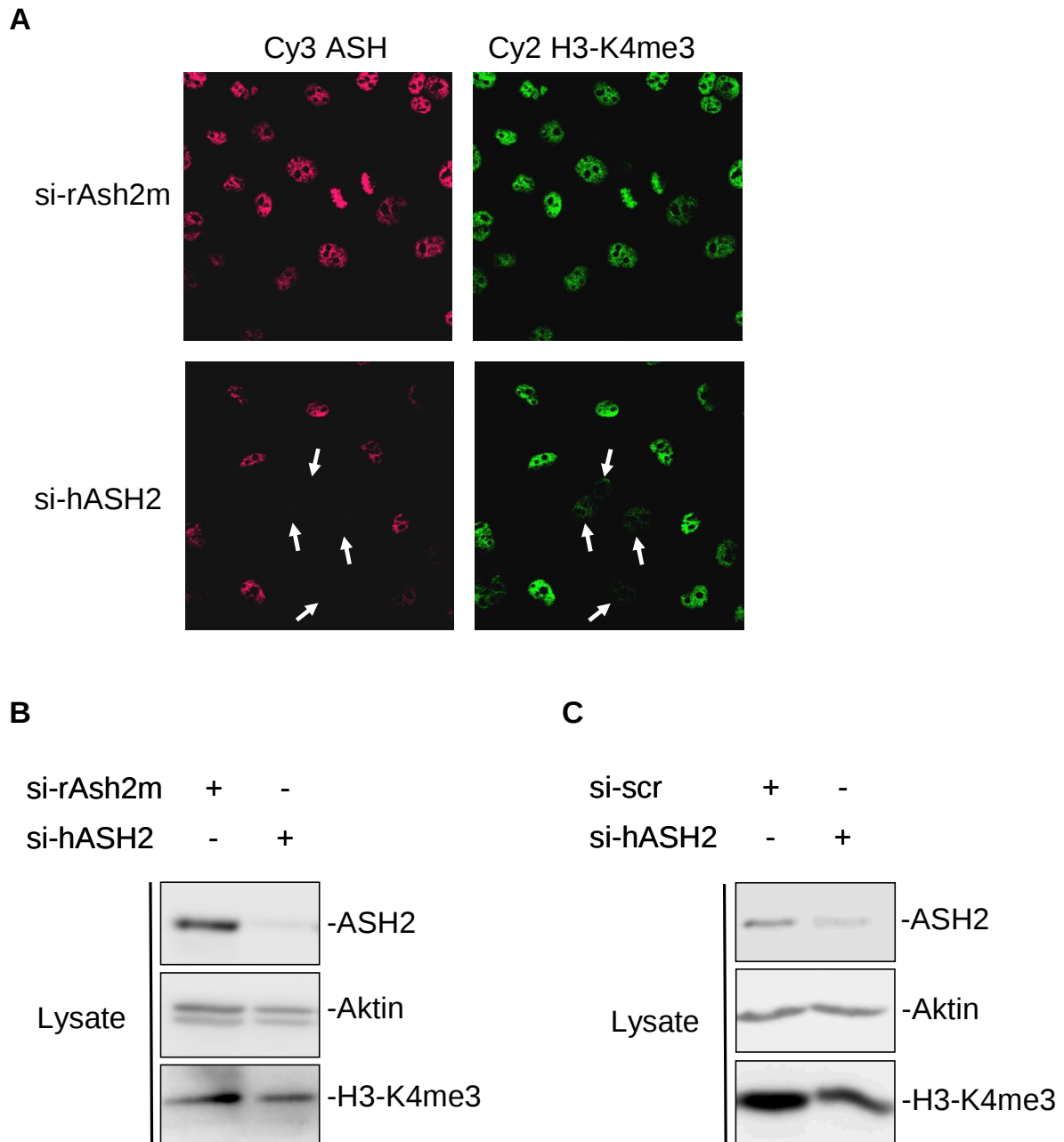


Abb. 3.11: **Der knockdown von ASH2 führt zu reduzierter H3-K4me3.**

A: HeLa Zellen wurden mit 18 µg pSuper-rAsh2m oder pSuper-ASH2 kotransfiziert, nach 72h fixiert und durch indirekte Immunfluoreszenz mit anti-ASH2-spezifischen (4C5) bzw. anti-H3-K4me3 spezifischen Antikörpern und den jeweiligen sekundären Antikörpern, α-Ratte Cy3-gekoppelt bzw. α-Kaninchen Cy2-gekoppelt, gefärbt.

B: HeLa Zellen wurden mit 1,2 µg p-MACS4.1CD4 und mit 18 µg pSuper-rAsh2m oder pSuper-ASH2 kotransfiziert und nach 72h über Dyna-Beads selektioniert. Dann mit Ripa-Puffer lysiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit anti-ASH2 (4C5) und anti-H3-K4me3 Antikörpern detektiert.

C: HepG2 Zellen wurden mit den si-Oligonukleotiden si-scr oder si-hASH2 transfiziert, mit Ripa-Puffer lysiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit anti-ASH2 (4C5) und anti-H3-K4me3 Antikörpern detektiert. Die Ergebnisse konnten in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Danach folgte die Analyse im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen ASH2 (4C5) und gegen trimethyliertes Histone H3-K4 (Histone H3-K4 trimethyl Abcam). Das Ergebnis in Abb. 3.11 B zeigt, dass die Menge an ASH2 Protein mit der Trimethylierung von Histon H3 am Lysin 4 korreliert. Um die Ergebnisse zu validieren, sowie unspezifische Effekte der Plasmid-basierten si-RNA auszuschliessen und zu untersuchen, ob die Abhängigkeit des H3-K4 Trimethylierungsniveaus von ASH2 Zelltyp-abhängig ist, wurde die ASH2 Expression in der Hepatoma-Zelllinie HepG2 durch si-Oligonukleotide reprimiert. Dafür wurden HepG2 Zellen mit dem si-Oligonukleotid-Pool gegen ASH2 (si-hASH2) oder dem *nonsense* si-Oligonukleotid si-scrambel (si-scr) transfiziert. Die Zellen wurden wie im Versuch zuvor zuvor nach 72h in Ripa-Puffer lysiert, sonifiziert und die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Danach wurde im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen ASH2 (4C5) und gegen trimethyliertes Histone H3-K4 (Histone H3-K4 trimethyl Abcam) detektiert. Auch in den HepG2 Zellen korreliert die Menge an ASH2 mit der Trimethylierung von Histon H3 -K4. In HEK293 Zellen konnte ebenfalls die Korrelation der Menge an ASH2 Protein mit der H3-K4me3 beobachtet werden (Abb. 3.13 vergl. Spur 4 und 5)

3.2.4 ASH2/RAS- und c-MYC/RAS-transformierte Rattenfibroblasten haben erhöhte H3-K4 trimethylierungs-Level

Die stabile Überexpression von Onkogenen wie c-MYC und ASH2 zusammen mit konstitutiv aktivem Ha-RAS führt in primären Rattenembryofibroblasten zur Transformation der Zellen. Die vorangegangenen Experimente zeigen eine Abhängigkeit des Trimethylierungs-Status in Tumorzellen von ASH2.

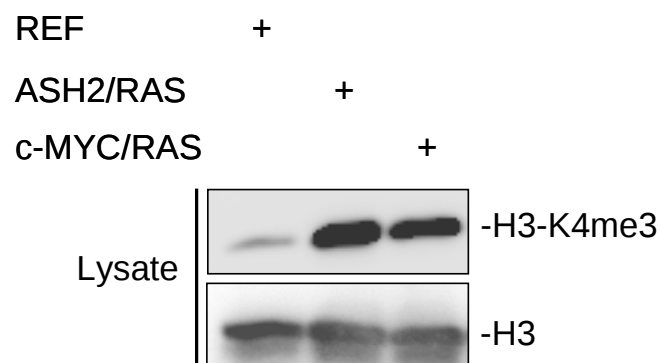


Abb. 3.12: Die H3-K4 trimethylierungs-Level sind in ASH2/RAS- und c-MYC/RAS-transformierten Rattenfibroblasten erhöht.

Primäre REFs, ASH2/RAS- und c-MYC/RAS-transformierte Rattenfibroblasten wurden mit Ripa-Puffer lysiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit anti-H3-K4me3 (Histone H3-K4 trimethyl, Abcam) oder anti-H3 (C-16) Antikörpern detektiert. Das Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Diese Abhängigkeit konnte von Wu *et al.* auch für c-MYC in murinen Knochen-Krebs Zellen beobachtet werden (329). Da die bisherigen Daten nur die Korrelation von H3-K4me3 mit ASH2 oder c-MYC in Folge der Reduktion der Proteine zeigen, sollte untersucht werden, ob die Transformation von primären Zellen durch ASH2/RAS- und c-MYC/RAS zu einer Veränderung des H3-K4 Trimethylierungsniveaus führt. Dafür wurden primäre REFs und ASH2/RAS- und c-MYC/RAS-transformierte REFs in Ripa-Puffer lysiert, sonifiziert und die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt. Danach folgte die Analyse im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen H3 und gegen trimethyliertes Histone H3-K4 (Histone H3-K4 trimethyl Abcam). Die Abb. 3.12 zeigt, dass sowohl die ASH2/RAS- als auch die c-MYC/RAS-transformierten REFs im Vergleich zu den primären Ausgangszellen eine deutlich erhöhte H3-K4 Trimethylierung aufweisen.

3.2.5 c-MYC rekrutiert ASH2-abhängig H3-K4 Trimethyltransferase Aktivität

Durch die Interaktion von c-MYC mit ASH2 und die Identifizierung von c-MYC als Teil eines ASH2 assoziierten HMT-Komplexes lag die Annahme nahe, dass c-MYC HMT-Aktivität rekrutieren könnte, was in der Dissertation von G. Walsemann bestätigt wurde. Allerdings konnte durch die verwendete Methode mit radioaktiv markiertem S-Adenosyl-Methionin (SAM) weder zweifelsfrei die Zielaminosäuren, noch die Anzahl der übertragenen Methyl-Gruppen ermittelt werden. Deshalb sollte im folgenden Experiment geklärt werden, ob die von c-MYC gebundene HMT-Aktivität in der Lage ist, H3-K4 zu trimethylieren und ob die rekrutierte HMT-Aktivität ASH2 abhängig ist. Für den Versuch wurden Hela Zellen und HEK293 Zellen mit Plasmiden, die für Flag-c-MYC kodieren sowie mit den siRNA-Plasmiden pSuper-hASH2 und dem Kontrollplasmid pSuper-rAsh2m transient transfiziert. Nach Lyse in F-Puffer wurde Flag-c-MYC mit Flag-Beads präzipitiert. Nach dreimaligem waschen mit F-Puffer wurden die an die Beads gebundenen Flag-c-MYC Komplexe mit Flag-Peptiden eluiert und mit rekombinanten Histon H3 und SAM in einem HMT-Assay inkubiert. Die IP und die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen c-MYC (N262), ASH2 (4C5) und gegen trimethyliertes Histone H3-K4 (Histone H3-K4 trimethyl Abcam) analysiert. Zuvor wurde die Membran mit Ponceau gefärbt, um die Menge von den geladenen Proteinen zu überprüfen. In Abb. 3.13 ist im Western-Blot eine deutliche Reduktion von ASH2 durch die Kotransfektion von siASH2 Plasmiden sichtbar, die ASH2 Menge der Negativkontrolle ist nicht signifikant verändert. Im Gesamt-Zelllysate der HEK293 Zellen korrelierte die ASH2 Protein Menge mit der Histon H3-K4 Trimethylierung (Abb. 3-13, Spur 5). Bei den Hela Zellen konnte keine Histon H3-K4 Trimethylierung detektiert werden, da vermutlich aufgrund der anderen Zell-Beschaffenheit der Hela Zellen bei den niedrig-stringenten Lyse Bedingungen keine Histone aus den Zellen extrahiert werden konnten. In der Immunpräzipitation jedoch war bei gleich eingesetzter

Menge an rekombinantem Histon H3 eine deutliche Abnahme der Histone H3-K4 Trimethylierung zu erkennen, wenn die ASH2 Protein Menge durch RNAi ASH2 reduziert war (Abb. 3-13, Spur 2). Die etwas schwächere Reduktion der Trimethylierung auf dem Histon H3 bei dem HEK293 IP-Ansatz ist vermutlich auf die etwas größere Menge an präzipitiertem c-MYC zurückzuführen (Spur 5 im Vergleich zu Spur 4) oder auf das höhere residuale Level an Ash2. Das Ergebnis zeigt, dass in beiden Zelllinien c-MYC HMT-Aktivität rekrutiert, die ASH2 abhängig die Trimethylierung vom Histon H3 an Lysin 4 katalysierte.

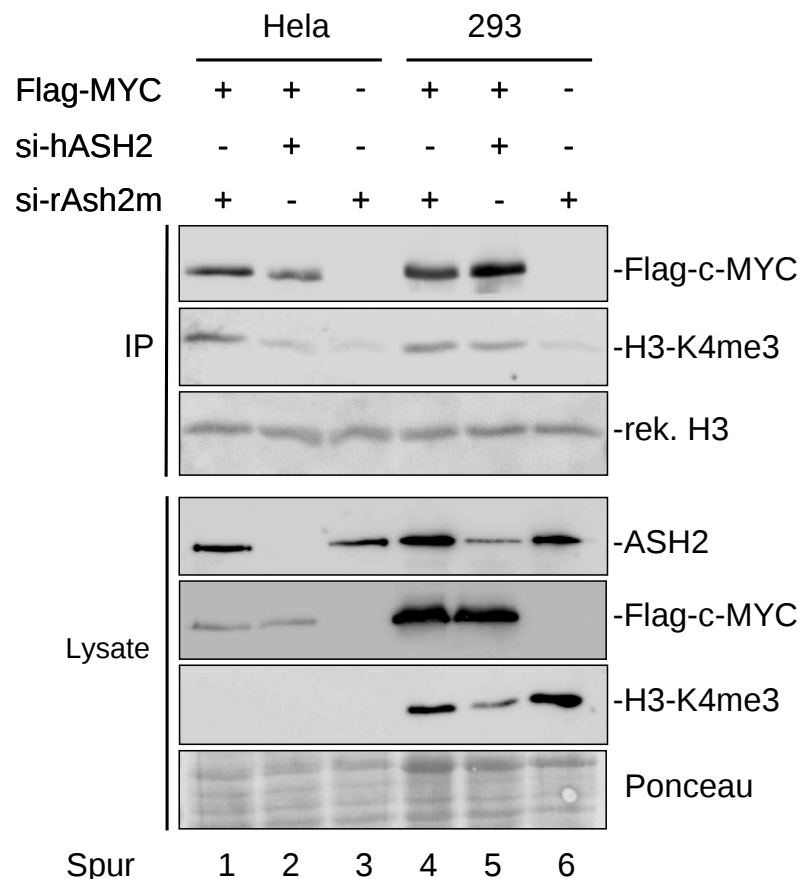


Abb. 3.13: c-MYC rekrutiert ASH2-abhängig H3-K4me3-spezifische HMT-Aktivität in Hela- und HEK293 Zellen.

Hela und HEK293 wurden mit 2 µg pcDNA3-Flag-MYC und 16 µg pSuper-rAsh2m oder pSuper-hASH2 kotransfiziert und nach 72h in F-Puffer lysiert. Flag-c-MYC wurde anschliessend mit Flag-Beads präzipitiert und nach dreimaligem waschen mit F-Puffer wurden die an die Beads gebundenen Flag-c-MYC Komplexe mit Flag-Peptiden eluiert und mit rekombinantem Histon H3 und SAM in einem HMT-Assay inkubiert. Die IP und die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot, nach Färbung der Membran mit Ponceau, mit spezifischen Antikörpern gegen c-MYC (N262), ASH2 (4C5) und gegen trimethyliertes Histone H3-K4 (Histone H3-K4 trimethyl, Abcam) analysiert. Das Resultat konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

3.2.6 Microarray Analyse von ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten embryonalen Rattenfibroblasten

Die vorangegangenen Arbeiten (Dissertation von G. Walsemann) zeigten, dass ASH2 hohes onkogenes Potential besitzt und wie c-MYC in der Lage ist, embryonale Rattenfibroblasten (REFs) in Kooperation mit RAS zu transformieren. Die zuvor beschriebene Interaktion von c-MYC mit ASH2, sowie seine Abhängigkeit von ASH2 bei der Transformation und die Rekrutierung von HMT-Aktivität deuten auf eine funktionelle Verbindung beider Proteine hin. Zusätzlich zeigte c-MYC in einer globalen CHIP Array Analyse eine Präferenz für die Bindung an Promotoren, die eine Histon H3-K4 Trimethylierung aufweisen (76). Auch dabei könnte ASH2 als Mitglied mehrerer Histon-Methyltransferase Komplexe eine Rolle spielen. Um die Mechanismen von ASH2 und c-MYC bei der Transformation von Zellen zu untersuchen, wurde eine Microarray Expressionsanalyse durchgeführt. Diese sollte Aufschluss über Zielgene von ASH2 und c-MYC geben, außerdem sollten gemeinsame Zielgene und Expressionsmuster durch die Bildung von Schnittmengen der regulierten Gene eruiert werden. Der Vorteil von Microarray-Genchips gegenüber anderen Methoden wie z.B. RT-PCR oder Northern-Blot-Analyse ist, dass eine sehr große Anzahl von Genen gleichzeitig bezüglich ihrer Expressionshöhe untersucht werden kann. Die Methode basiert auf der Eigenschaft von einzelsträngiger DNA mit komplementären Einzelsträngen zu hybridisieren. Für eine Microarray Expressionsanalyse wird zuerst die RNA der zu untersuchenden Zellen isoliert. Die Poly-A⁺-RNA wird mit reverser Transkriptase in cDNA transkribiert und mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Diese markierte cDNA wird mit den auf dem *Chip* immobilisierten Oligonukleotiden hybridisiert.

Eine Hybridisierung erfolgt nur zwischen exakt komplementären Nukleinsäuremolekülen. Nach Entfernung nicht gebundener cDNA-Moleküle ist die Intensität des gemessenen Signals zur Menge an hybridisierter Probe proportional. Da jede Position einer Sonde einem bestimmten Gen oder Genabschnitt entspricht, liefert die an dieser Position gemessene Signalintensität ein Maß für das relative Expressionsniveau dieses Gens. In dieser Arbeit wurden Ratten Oligonukleotid-Genchips der Firma Nimblegen verwendet. Die Zahl der Sequenzen von Genen bzw. *expressed sequence tags* (ESTs) in Form von Oligonukleotiden auf jedem *Chip* betrug 21205, wobei nahezu das gesamte Transkriptom der Ratte abgedeckt wurde. Für jede Sequenz wurden 2 Blöcke mit je mindestens 10 Oligonukleotiden gemessen und deren Signalintensität gemittelt. Um die erhaltenen Rohdaten der einzelnen *Chips* untereinander vergleichen zu können, wurden sie mit dem *Robust Multichip Algorithm* (RMA) Algorithmus normalisiert. Durch die Verrechnung der Expressionswerte der Experiment-Proben mit der Kontroll-Probe erhält man die Veränderung der Expression der Gene als Faktor. Die p-Werte wurden mittels t-test berechnet. Die cDNA-Synthese und Hybridisierung,

sowie die Normalisierung wurden von Nimblegen und dem RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung) ausgeführt.

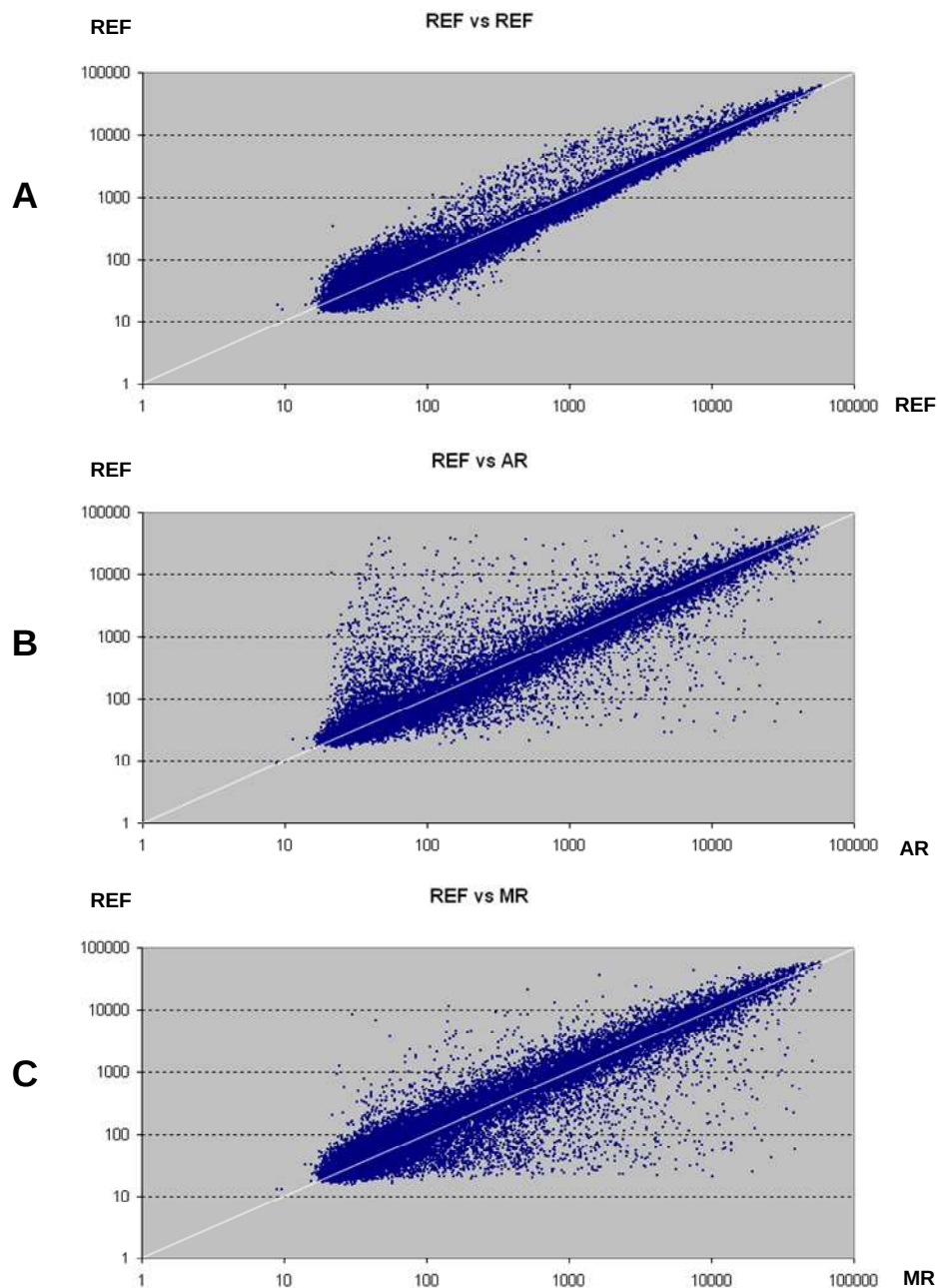


Abb. 3.14: **Scatter-Analyse in P493-6 Zellen.**

Die Signal-Intensitäts-Werte der einzelnen Gene aus einer Kontrolle (y-Achse) werden in einem Koordinatensystem gegen die Werte einer anderen Kontrolle bzw. eines Experiments (x-Achse) aufgetragen. **A:** Liegt die Datenwolke relativ eng auf einer Geraden mit der Steigung 1, dann korrelieren die beiden Datensätze sehr gut miteinander, d.h. die durchgeführten Kontrollen sind reproduzierbar. **B, C:** Der Scatter-Plot von Kontrolle und Experiment zeigt eine sehr viel breitere Streuung der Datenwolke. Je weiter ein Punkt von der Steigungs-Geraden entfernt liegt, desto stärker ist das betreffende Gen reguliert. REF = primäre embryonale Rattenfibroblasten; AR = ASH2/RAS Zellen; MR = c-MYC/RAS Zellen

In der Microarray Analyse wurden primäre embryonale Rattenfibroblasten mit den stabil transfizierten, transformierten Zelllinien ASH2/RAS (AR) und c-MYC/RAS (MR) verglichen. Diese Zelllinien entstanden durch Transfektion der primären embryonalen Rattenfibroblasten mit humanem ASH2 oder c-MYC zusammen mit Ha-RAS und einem Resistenzplasmid gegen das Antibiotikum G418 (Neomycin). Anschließend wurden die Zellen mit dem Antibiotikum G418 selektioniert. Die stabile Überexpression vieler Onkogene zusammen mit konstitutiv aktivem Ha-RAS (Harvey-RAS) in Rattenembryo-Fibroblasten führt zur Transformation dieser Zellen. Für den Microarray wurde die gesamte RNA aus zwei unabhängigen REF *Batches*, aus zwei ASH2/RAS Klonen (AR 925/932) und drei c-MYC/RAS Klonen (MR 2/8/15) isoliert und die Qualität mit dem Agilent Bioanalysator geprüft. Die jeweiligen RNA Proben jeder Zelllinie wurden untereinander gemischt und auf 2 Proben aufgeteilt. Für jeden Ansatz wurde aus den beiden RNA Proben die markierte cDNA hergestellt und auf den *Chip* hybridisiert. Die „Signal“-Werte jedes einzelnen Gens der beiden Kontroll-*Chips* (REF) wurden mit den beiden Werten der 2 Experiment-*Chips* (ASH2/RAS und c-MYC/RAS) verglichen. Folgende Kriterien wurden in der Vergleichsanalyse angewandt, um induzierte bzw. reprimierte Gene zu definieren: Der p-Wert musste unter 0,05 liegen und die Gene mussten mindestens um den Faktor 3 reguliert sein. Diese Kriterien waren für eine Eingrenzung der Datenmenge notwendig, entsprechen aber nicht zwangsläufig der biologischen Relevanz. Das bedeutet, dass Gene, die z.B. 2,9 Fach reguliert waren ebenso wie solche mit starker Regulation aber einem p-Wert von unter 0,05 echte Zielgene sein könnten, aber nicht erfasst wurden. Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Datensätze jedes *Chips* wurde durch eine so genannte Scatter-Analyse überprüft. Dabei wurden alle „Signal“-Werte eines *Chips* (z.B. eines Kontroll-*Chips*) gegen die entsprechenden „Signal“-Werte eines Replikats aufgetragen (Abb. 3.14). Je enger die Korrelation dieser Punkte auf einer Geraden ist, desto besser ist die Reproduzierbarkeit der Daten. Zum Vergleich sind die Scatter-Plots von Kontroll-*Chips* und den beiden Experiment-*Chips* ASH2/RAS und c-MYC/RAS gezeigt. Hier beschreibt die Streuung der Datenwolke die unterschiedlich exprimierten Gene.

Für die Genexpressionsanalyse erfolgte die Auswertung der Daten mit dem Programm MEV (Multi Experiment Viewer). Dieses ermöglicht die Darstellung und Analyse von Microarray Expressionswerten. Um die unterschiedlich regulierten Gene von den transformierten Linien zu erhalten wurden zunächst die Expressionswerte nach den zuvor beschriebenen Kriterien ($P \leq 0,05$ und 3-fache Regulation) aus den Listen extrahiert. Diese Daten wurden zur Basis 2 logarithmiert in das MEV Programm geladen, was eine grafische Darstellung als *Heatmap* in Form eines hierarchischen Clusters zulässt. In der *Heatmap* ist die Expression nach der Stärke farblich gestuft, von grün für niedrige, über schwarz für mittlere, bis rot für hohe Werte. Als Cluster bezeichnet man eine nach Merkmalen geordnete Gruppe von Werten.

Dann wurden die Expressionswerte mittels „Quality Cluster Algorithm“ (QTC) in induzierte und reprimierte Gene aufgeteilt. Die Darstellung in *Heatmap*-Form dient der Übersicht und hat den Vorteil, dass man die absolute Veränderung der Expression von Genen nachvollziehen, bewerten und zu Gruppen ordnen kann (z.B. ob ein Gen von hoher auf sehr hohe Expression induziert wird). Dies ist bei bloßer Betrachtung des jeweiligen Faktors, um das sich ein Gen in der Expression verändert hat, nicht möglich.

3.2.7 Regulierte Gene in ASH2/RAS transformierten Zellen

Der Vergleich der ASH2/RAS transformierten Zelllinien mit den embryonalen Rattenfibroblasten ergibt, dass 1020 Gene in den ASH2/RAS Zellen nach den definierten Bedingungen differentiell reguliert sind, d.h. sie haben einen p-Wert $\leq 0,05$ und unterscheiden sich zur Kontrolle mindestens um den Faktor 3. Die *Heatmap* in Abb. 3.15 zeigt, dass die Replikate der Kontrolle und der ASH2/RAS Zellen wie erwartet untereinander fast identische Werte haben, was an den gleichen Farbstärken zu erkennen ist. Auffällig ist eine hohe Anzahl an stark regulierten Genen im Vergleich der REFs zu den ASH2/RAS Zellen. Dies ist an der Vielzahl der Bereiche, bei denen die Farbe von grün nach rot bei induzierten, oder umgekehrt bei reprimierten Genen wechselt, zu erkennen. Da die Skalierung logarithmisch zur Basis 2 ist, sind diese Gene bei linearer Darstellung sehr stark reguliert. Nach QTC Clustern mit Pearson Korrelation ergibt sich eine Verteilung von 412 induzierten und 608 reprimierten Genen, dargestellt im linken und rechten Cluster der Abb. 3.15 A und in den entsprechenden Liniendiagrammen (Abb. 3.15 B). Die in den ASH2/RAS transformierten Zellen regulierten Gene sind in der Tabelle A und B im Anhang gelistet, sortiert nach Induktions- bzw. Repression-Faktor. Das Genexpressionsmuster der mit ASH2 und RAS transformierten REFs unterscheidet sich also erheblich von dem der primären Ausgangslinien. Um die regulierten Gene zu klassifizieren, wurden ihre Transkript-Identitäts-Nummern in das Gen Klassifizierungs-Programm Panther (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships, www.pantherdb.org) geladen und nach biologischen Prozessen analysiert. Das Programm greift dabei auf die Datenbank von NCBI (National Center for Biotechnology Information) zu. 272 Transkript-Identitäts-Nummern wurden vom Programm nicht erkannt. Zufällige Stichproben dieser Nummern wurden manuell annotiert mit dem Ergebnis, dass diese Gene nicht beschrieben sind oder wieder aus den Gendatenbanken entfernt wurden. 9 Gene waren doppelt vertreten und für die weitere Analyse entfernt. Das Kuchen-Diagramm in Abb. 3.16 zeigt den Anteil der nach biologischen Prozessen unterteilten regulierten Gene an deren Gesamtheit. In der Tabelle der Abb 3.16 sind die Anzahl der Gene jeder funktionellen Gruppe, deren Prozentwert an der Gesamtzahl, und wie viele Gene der Gruppe induziert oder reprimiert sind, aufgelistet. Der größte Anteil mit 220 Genen bzw. 29,9% ist die Gruppe der Signal Transduktion, gefolgt von Entwicklungsgenen

(141 Gene/19,2%) und Genen, deren Transkript-Identitäts-Nummern das Programm nicht zuordnen konnte, da noch keine Informationen zu deren Funktion existieren (139 Gene/18,9%).

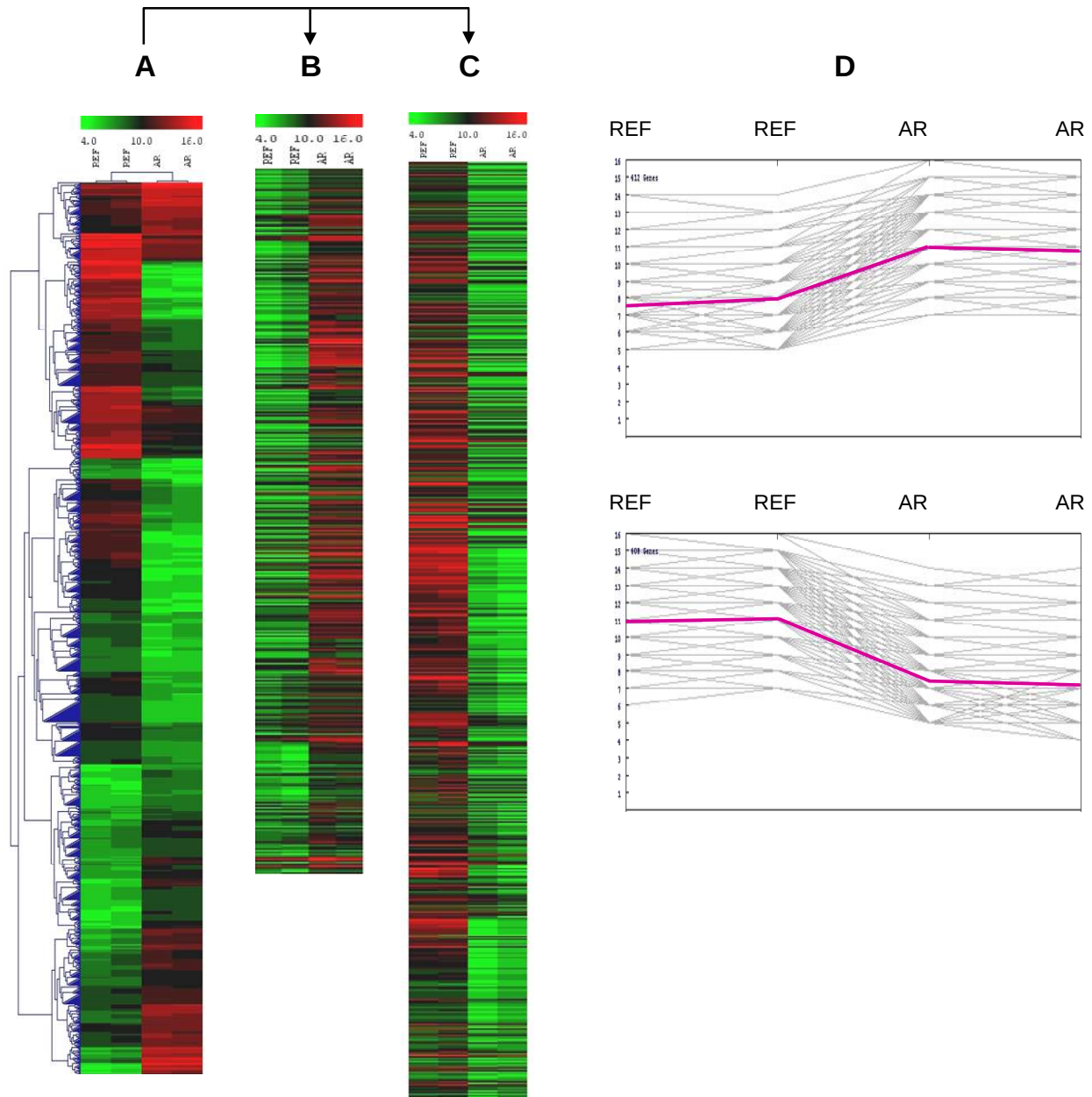


Abb. 3.15: **Cluster-Analyse von Expressionsprofilen in ASH2/RAS transformierten Zellen**

Die beiden linken Spalten der *Heatmaps* geben jeweils die log2 Expressionswerte der REFs an, die beiden rechten Spalten die der ASH2/RAS transformierten Zellen (AR), jede Reihe steht für ein Gen. Die Darstellung ist aufgrund ihrer Größe stark komprimiert. Rot beschreibt hohe Gen-Expressionswerte, Schwarz mittlere und Grün beschreibt niedrige Gen-Expressionswerte. **A:** Gene, die differentiell reguliert sind, wurden in einem hierarchischen Cluster aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression zusammen gruppiert. **B, C:** Aufteilung durch QTC in induzierte (**B**) und reprimierte (**C**) Gen-Gruppen. **D:** Darstellung der Expressionsmuster als Liniendiagramm. Jede Linie gibt den Wert für eine Gengruppe an, die violette Linie zeigt den Mittelwert aller Expressionswerte an. Das obere Diagramm zeigt induzierte Gene, das Untere reprimierte Gene.

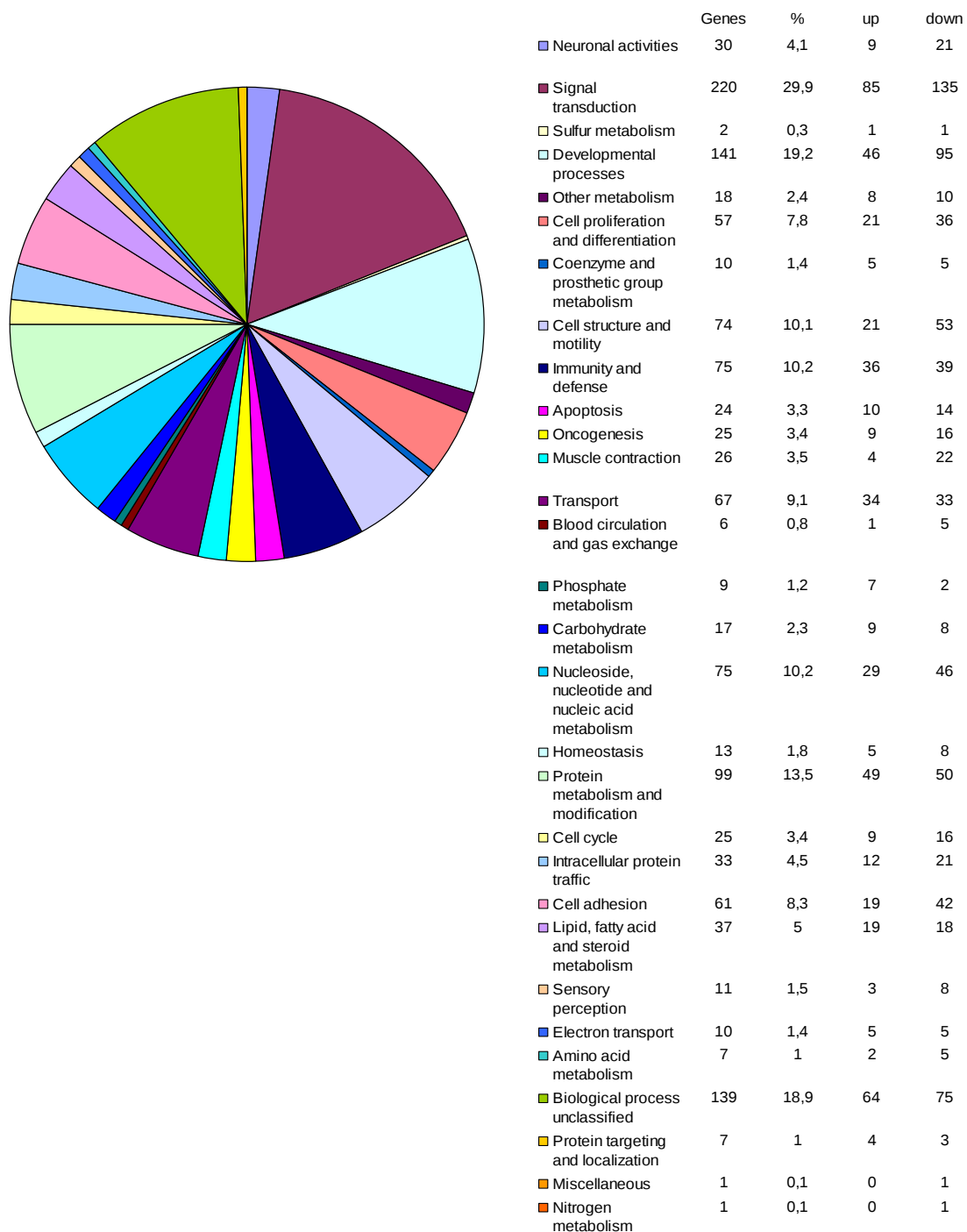


Abb. 3.16: Klassifizierung von in ASH2/RAS transformierten Zellen regulierten Genen nach biologischen Prozessen.

Das Kuchen-Diagramm zeigt den Anteil der nach biologischen Prozessen unterteilten in ASH2/RAS Zellen regulierten Gene an deren Gesamtheit. In der Tabelle sind die Anzahl der Gene des jeweiligen biologischen Prozesses, deren Prozentwert an der Gesamtzahl der regulierten Gene, sowie die Anzahl der Gene jeder Gruppe, die induziert (up) oder reprimiert (down) sind, aufgelistet.

Nimmt man die Gruppen der Gene, die in Metabolismus involviert sind zusammen (Sulfur-, Anderer-, Koenzym/prosthetische Gruppen-, Phosphat-, Kohlenhydrat-, Nukleinsäure-, Protein-, Lipid/Fettsäure-, Aminosäure- und Stickstoff-Metabolismus), ergibt sich ein Anteil von 37,5%. Somit wäre diese Gruppe von Genen am stärksten vertreten, was bei der

grundlegenden Änderung des Zellverhaltens, wie der stark erhöhten Proliferationsrate der transformierten Zellen zu erwarten war. Die Klassifizierung kann allerdings nur dem Überblick dienen. Es ist keine Aussage darüber möglich, ob es sich um primäre Zielgene von ASH2 oder RAS handelt, noch gibt die Anzahl der Gene einer Gruppe Auskunft darüber, ob es sich um die Schlüsselgene des Prozesses der Transformation oder dessen Aufrechterhaltung handelt. Für weitere Untersuchungen interessant sind eher Gene der weniger prominent vertretenen Gruppen, wie die der Onkogenese, Zellzyklus, Zellproliferation und Apoptose. Auffallend ist, dass in den Gruppen häufig ähnlich viele Gene induziert wie reprimiert werden. Die zu den biologischen Prozessen zugeordneten regulierten Gene sind in der Tabelle C im Anhang zu finden. Diese enthält zusätzlich Informationen über Molekulare Funktion und Zugehörigkeit zu Signalwegen der entsprechenden Gene.

3.2.8 Regulierte Gene in c-MYC/RAS transformierten Zellen

Die Expressionsanalyse der c-MYC/RAS transformierten Zellen erfolgte wie im vorigen Abschnitt für die ASH2/RAS Zellen beschrieben. Es wurde wiederum die transformierte Zelllinie mit den primären REFs verglichen und dieselben Parameter und Ausschlusskriterien verwendet. Die Analyse ergab 824 regulierte Gene, die sich durch Clustern mit dem Pearson Algorithmus vom QTC Programm in 275 induzierte und 549 reprimierte Gene aufteilen, in Abb.3.17 als linker und rechter Cluster (B, C) und in den dazugehörigen Liniendiagrammen (D) dargestellt. Auch in den c-MYC/RAS Zellen zeigt die *Heatmap*-Darstellung eine hohe Anzahl an stark regulierten Genen, was durch den Farbgradient zu erkennen ist. Die regulierten Gene der c-MYC/RAS transformierten Zellen sind in Tabelle D und E im Anhang gelistet, sortiert nach Induktions- bzw. Repression-Faktor. Wiederum wurden die regulierten Gene mittel Panther-Software nach biologischen Prozessen klassifiziert und als Kuchen-Diagramm in Abb. 3.17 visualisiert. 232 Transkript-Identitäts-Nummern wurden vom Programm nicht erkannt. Stärkste Gruppen nach Klassifizierung waren die Signal Transduktion (162 Gene/27,9%) und Entwicklungs Prozesse (123 Gene/21,2%) sowie die Gruppe der nicht zugeordneten Genen (113 Gene/19,5%). Auch hier ergibt die Summe der Metabolismus-Gruppen mit 38,6% den größten Anteil an der Gesamtheit der regulierten Gene. Auffallend ist die hohe Anzahl reprimierter Gene, was bei der Transformation mit einem vorrangig transkriptionellen Aktivator wie c-MYC unerwartet ist. Vergleicht man die Klassifizierungsergebnisse von den ASH2/RAS mit den c-MYC/RAS Zellen, fällt die große Ähnlichkeit der Gruppenanteile der jeweiligen biologischen Prozesse auf. Das kann durch Regulation von unterschiedlichen Genen derselben biologischen Funktion entstehen oder durch Regulation von identischen Genen. Die zu den biologischen Prozessen zugeordneten regulierten Gene und zusätzliche Informationen zu den Genen sind im Anhang in der Tabelle F zu finden.

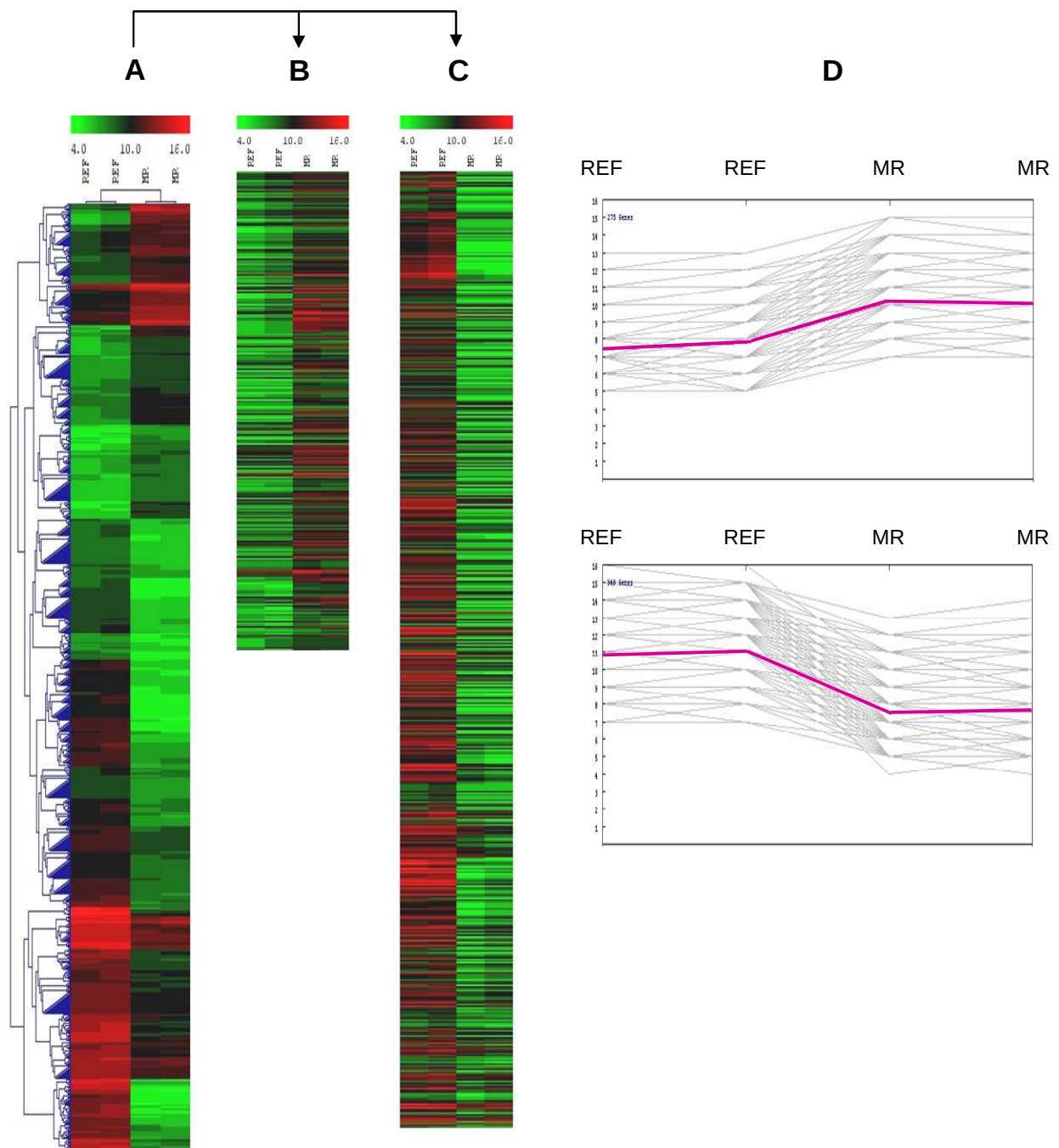


Abb. 3.17: **Cluster-Analyse von Expressionsprofilen in c-MYC/RAS transformierten Zellen**

Die beiden linken Spalten der *heatmaps* geben jeweils die log₂ Expressionswerte der REFs an, die beiden rechten Spalten die der c-MYC/RAS transformierten Zellen (MR), jede Reihe steht für ein Gen. Die Darstellung ist aufgrund ihrer Größe stark komprimiert. Rot beschreibt hohe Gen-Expressionswerte, Schwarz mittlere und Grün beschreibt niedrige Gen-Expressionswerte. **A:** Gene, die differentiell reguliert sind, wurden in einem hierarchischen Cluster aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression zusammen gruppiert. **B, C:** Aufteilung durch QTC in induzierte (**B**) und reprimierte (**C**) Gen-Gruppen. **D:** Darstellung der Expressionsmuster als Liniendiagramm. Jede Linie gibt den Wert für eine Gengruppe an, die violette Linie zeigt den Mittelwert aller Expressionswerte an. Das obere Diagramm zeigt induzierte Gene, das Untere reprimierte Gene.

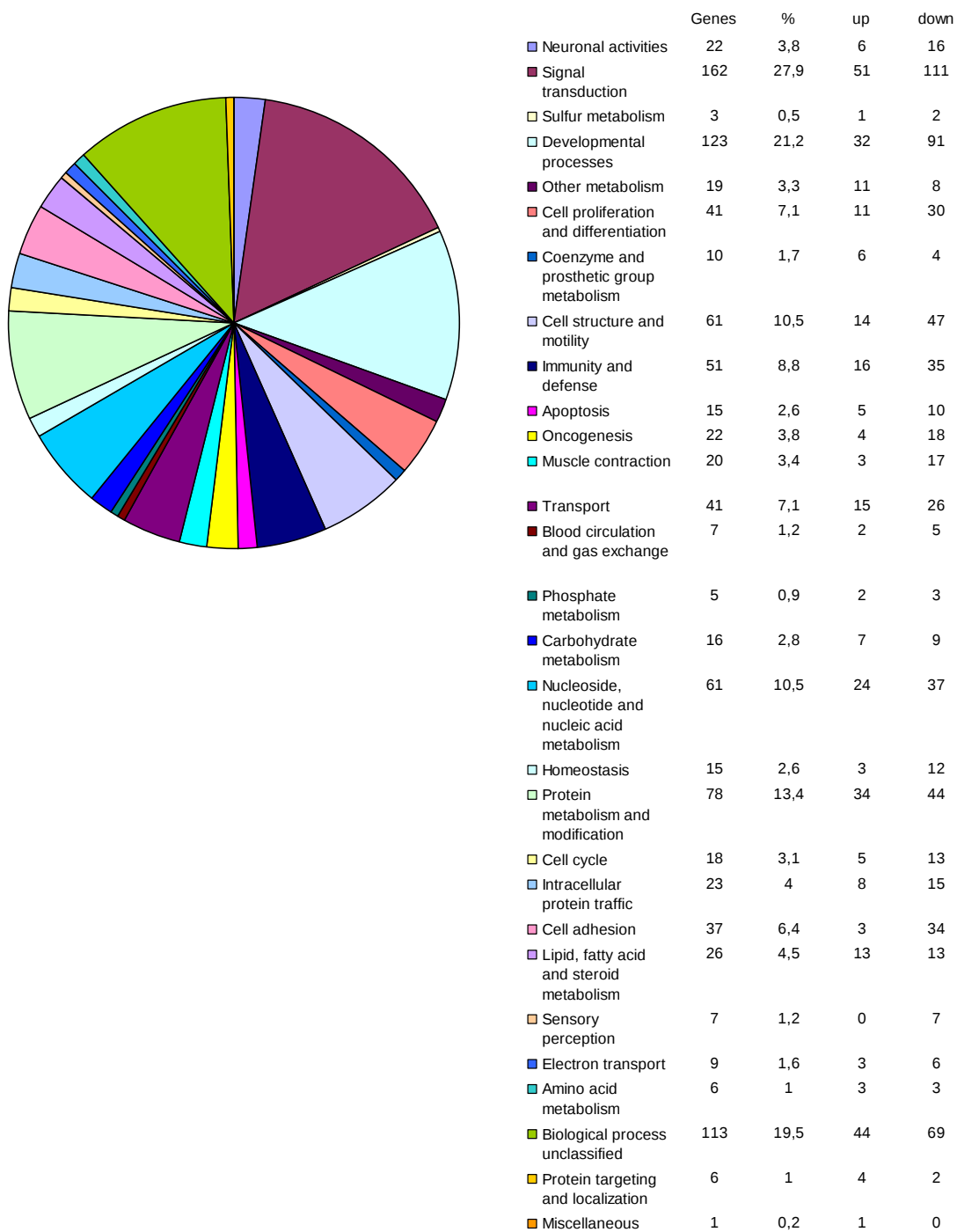


Abb. 3.18: Klassifizierung von in c-MYC/RAS transformierten Zellen regulierten Genen nach biologischen Prozessen

Das Kuchen-Diagramm zeigt den Anteil der nach biologischen Prozessen unterteilten in c-MYC/RAS Zellen regulierten Gene an deren Gesamtheit. In der Tabelle sind die Anzahl der Gene des jeweiligen biologischen Prozesses, deren Prozentwert an der Gesamtzahl der regulierten Gene, sowie die Anzahl der Gene jeder Gruppe, die induziert (up) oder reprimiert (down) sind, aufgelistet

3.2.9 Regulierte Gene in ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten Zellen

Um potentielle gemeinsame Zielgene von ASH2 und c-MYC zu identifizieren wurden die Gene, die sowohl in den ASH2/RAS als auch in den c-MYC/RAS Zelllinien reguliert waren, ermittelt.

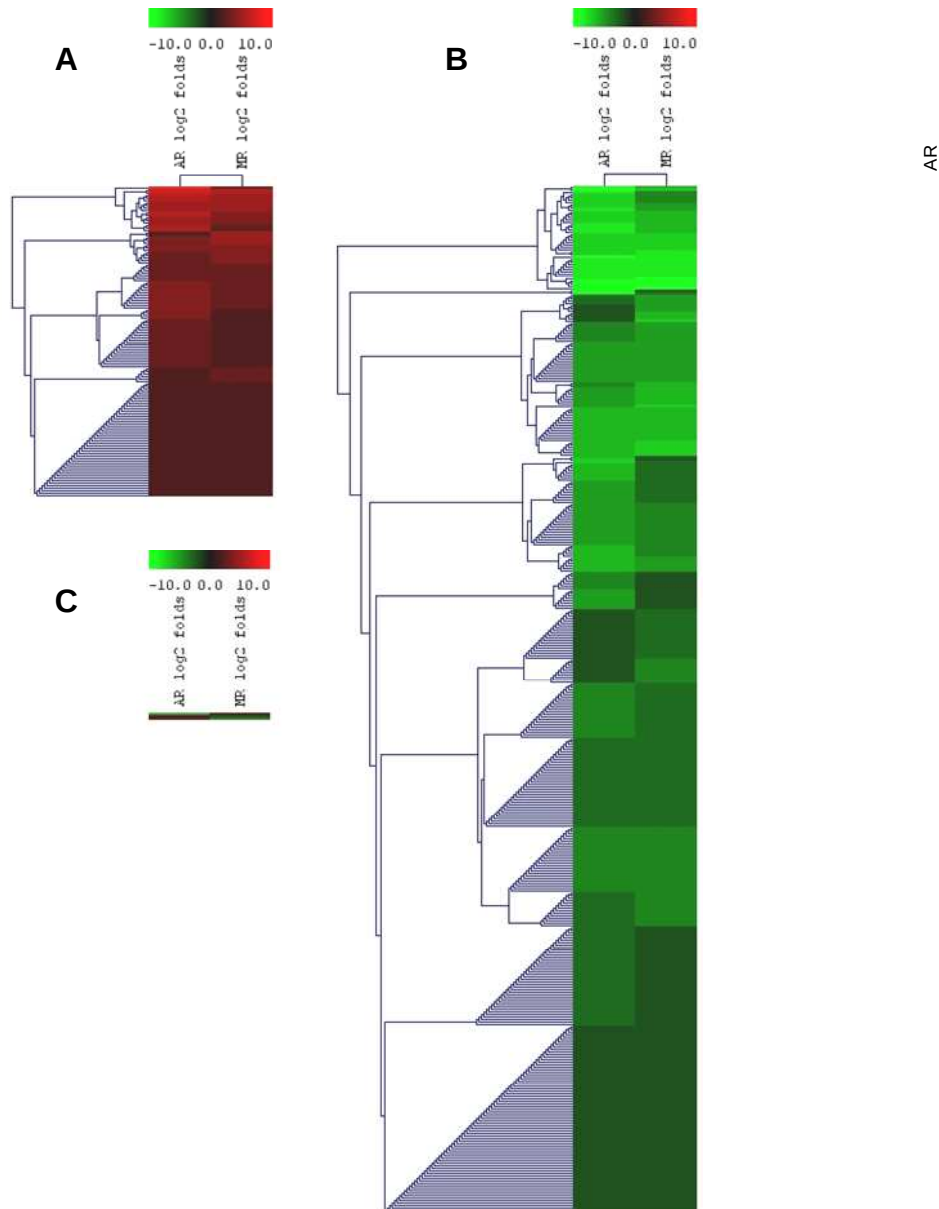


Abb. 3.19: Darstellung der in ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten Zellen regulierten Gene als hierarchische Cluster.

Die Induktions- und Repressions-Faktoren der Gene, die sowohl in ASH2/RAS als auch in c-MYC/RAS transformierten Zellen reguliert sind, wurden zuerst nach gleicher Art der Regulation gruppiert, dann zur Basis 2 logarithmiert und mittels HCL (Hierarchical Clustering) als *Heatmap* dargestellt. Die beiden linken Spalten der *Heatmaps* geben jeweils die log₂ Regulations-Faktoren der ASH2/RAS Zellen (AR) an, die beiden rechten Spalten die der c-MYC/RAS (MR), jede Reihe steht für ein Gen. Die Darstellung ist aufgrund ihrer Größe stark komprimiert. Rot beschreibt Gen-Induktion, Schwarz geringe Regulation und Grün beschreibt Gen-Repression. **A:** Gene, die in ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen induziert sind **B:** Gene, die in ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen reprimiert sind. **C:** entgegengesetzt regulierte Gene.

Dies erfolgte über den Abgleich der Transkript-Identitäts-Nummern der in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen regulierten Gene mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel sowie einem für diesen Zweck selbst geschriebenen Skript. Dann wurden die Induktions- und Repressions-Faktoren der Gene zur Basis 2 logarithmiert in das MEV Programm geladen, mit dem QTC Tool in Cluster aufgeteilt und die Daten als HCL (Hierarchical Clustering) *Heatmaps* dargestellt (Abb. 3.19).

Von den 1020 in ASH2/RAS und 824 in c-MYC/RAS regulierten Genen sind 543 identisch. Davon sind 125 in beiden induziert (Cluster A), 415 in beiden reprimiert (Cluster B) und 3 entgegengesetzt (Cluster C) reguliert. Die Gene der Cluster sind im Anhang in den Tabellen G/H/I aufgelistet. Die ähnlichen Farbwerte der ASH2/RAS und c-MYC/RAS Reihen in den *Heatmaps* zeigen, dass die meisten Gene fast gleich stark induziert oder reprimiert wurden, was sich bei dem Vergleich von den Expressions-Faktoren in der Tabelle bestätigt. Der hohe Anteil an reprimierten Genen ist bei der Transformation von Zellen mit Faktoren wie ASH2 und c-MYC, die überwiegend positiv auf die Transkription wirken sollten, unerwartet. Die große Schnittmenge an identischen exprimierten Genen erklärt die Ähnlichkeit der Gruppenanteile bei der Klassifizierung nach biologischen Prozessen im Vergleich von ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen.

3.2.10 Vergleich der in ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen regulierten Gene mit bekannten c-MYC Zielgenen

Die durch den Expressionsabgleich von ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen erhaltenen Gene sollten mit bekannten Zielgenen verglichen werden, um mögliche gemeinsame Zielgene von ASH2 und c-MYC identifizieren. Hierfür wurden die Transkript-Identitäts-Nummern der gemeinsam regulierten Gene mit Hilfe der Panther Software in Gen Symbole konvertiert. Dieses war notwendig, da keine dem Autor bekannten c-MYC Zielgen-Daten aus Rattenarrays existieren und deshalb der Abgleich von Identitäts Nummern jeglicher Art bei Vergleichen mit humanen Zielgenen entfiel. Die Gen-Symbole hingegen sind Spezies-übergreifend identisch, das ermöglichte den Vergleich der Gene mit humanen c-MYC Zielgenen aus 4 unterschiedlichen publizierten Arrays (167, 176, 330, 331). Der Abgleich der Gen Symbole der verschiedenen Listen erfolgte mit einem selbst geschriebenen Skript. Es wurden alle regulierten Gene der ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen und deren Schnittmenge von identischen Genen mit denen aus den veröffentlichten Arrays verglichen. Zusätzlich wurden übereinstimmende Transkripte der in dieser Arbeit erhaltenen regulierten Gene mit denen der Internet-Datenbank c-MYC *Cancer Gene* (www.myccancergene.org) ermittelt und ergänzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst, dazu ist das Vorhandensein von E-Boxen in den entsprechenden Promotoren vermerkt.

c-MYC Zielgene

reguliert in ASH2/RAS		reguliert in c-MYC/RAS		reguliert in ASH2/RAS und c-MYC/RAS	
induziert		induziert		induziert	
ABHD2	E-Box	TNFRSF21	E-Box	SLC16A1	E-Box
ALOX12		ABHD2	E-Box	ABHD2	E-Box
APBB1IP		ACE		BHLHB3	
BARD1		ATP8A1		FOSL1	
BHLHB3		BHLHB3		GATA2	
CASP8	E-Box	CAPN5		GCHFR	
DCBLD2		FOSL1		GGH	
FOSL1		GATA2		NR3C1	
FXYD2		GCHFR		P2RY2	E-Box
GATA2		GGH		PTK2B	
GCHFR		GLDC		PYGL	
GGH		IMPA2	E-Box	RIPK2	
GM2A		LARS2		SEMA3B	
GPR132		LIPT1		SLC35F2	
HSPA4L		LRP16	E-Box	GCNT1	
IRF5	E-Box	MTHFD1L	E-Box		
ITGA2		NR3C1			
NR3C1		P2RY2	E-Box		
P2RY2	E-Box	PRPS2			
PBEF1		PTGER2	E-Box		
PBEF1		PTK2B			
PTER		PYGL			
PTK2B		RIPK2			
PYGL		SEMA3B			
RBKS		SEMA6A	E-Box		
RIPK2		SLC16A1	E-Box		
SEMA3B		SLC35F2			
SLC16A1	E-box	TFRC	E-Box		
SLC35F2		SYNGR1			
STC2		GCNT1			
THRB					
TRIM2					
GCNT1					

reguliert in ASH2/RAS	reguliert in c-MYC/RAS	reguliert in ASH2/RAS und c-MYC/RAS
reprimiert	reprimiert	reprimiert
ASS	ALCAM	ATP8B1
ATP8B1	ATP8B1	BASP1
BASP1	BASP1	BMP4 E-Box
BMP4 E-box	BMP4 E-Box	BTG2
BTG2	BTG2	COL12A1
COL12A1	CALD1	CTSC
CTSC	COL12A1	CYBA
CYBA	CTSC	CYR61
CYR61	CYBA	FBN1
ENTPD1 E-box	CYR61	FSTL3
EVL	DAF E-Box	FZD1
FBN1	DPYSL3	GOLPH2
FGFR1	FBN1	GPR
FSTL3 E-box	FSTL3	HSPA1B
FZD1	FZD1	ICAM1
GDA E-box	GOLPH2	LEPRE1
GOLPH2	GPR E-Box	LSP1
HES1 E-box	HSPA1B	NES
HIP1	ICAM1	PLA2G4A E-Box
HSPA1B	LEPRE1	RGS2 E-Box
ICAM1	LSP1	SERPINE1 E-Box
LEPRE1	NES	SLC43A1
LSP1	PIK3R3	TAGLN
MMP11	PLA2G4A E-Box	TGFB2 E-Box
NES	RGS2 E-Box	TGFB3 E-Box
PLA2G4A E-box	RNASE4	UCHL1
PLK2	SERPINE1 E-Box	
PNOC	SLC43A1	
PTPRG	TAGLN	
PTPRG E-box	TGFB2 E-Box	
RGS2 E-box	TGFB3 E-Box	
SERPINB8	UCHL1	
SERPINE1 E-box		
SERPINF1 E-box		
SLC43A1		
SLC9A3R2 E-box		
SOX4		
TAGLN		
TGFB2 E-box		
TGFB3 E-box		
TMOD2		
UCHL1		

Tabelle 3-1: Ergebnis des Abgleichs von in ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten Zellen regulierten Genen mit c-MYC Zielgenen

Die regulierten Gene der ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen wurden mit humanen c-MYC-Zielgenen aus 4 unterschiedlichen publizierten Arrays (167, 176, 330, 331) und mit der Internet-Datenbank c-MYC Cancer Gene (www.mycancergene.org) verglichen. Gene, die E-Boxen enthalten, sind mit dem Zusatz E-Box versehen. c-MYC-Zielgene, die auch von RAS reguliert werden (siehe Abschnitt 3.2.11) sind orange unterlegt.

Von den differentiell exprimierten Genen der ASH2/RAS Zellen sind 75 c-MYC Zielgene, von denen 33 induziert und 42 reprimiert wurden. In den c-MYC/RAS Zellen finden sich unter den regulierten Genen 62 c-MYC Zielgene, davon wurden 30 induziert und 32 reprimiert. Von den sowohl in den ASH2/RAS als auch in den c-MYC/RAS Zellen erhaltenen differentiell exprimierten Genen sind 41 c-MYC Zielgene, aufgeteilt in 15 induzierte und 26 reprimierte. Auffallend ist die höhere Anzahl von c-MYC Zielgenen in den ASH2/RAS als in den c-MYC/RAS Zellen. Für weitere Untersuchungen sind vor allem diejenigen c-MYC Zielgene interessant, die in den ASH2/RAS oder c-MYC/RAS Zellen oder in beiden hochreguliert wurden, da eine positive synergistische Interaktion von ASH2 und c-MYC angenommen wird. Die Ergebnisse der Microarray Analyse sind im Schnittmengen-Diagramm in Abb.3.20 zusammengefasst.

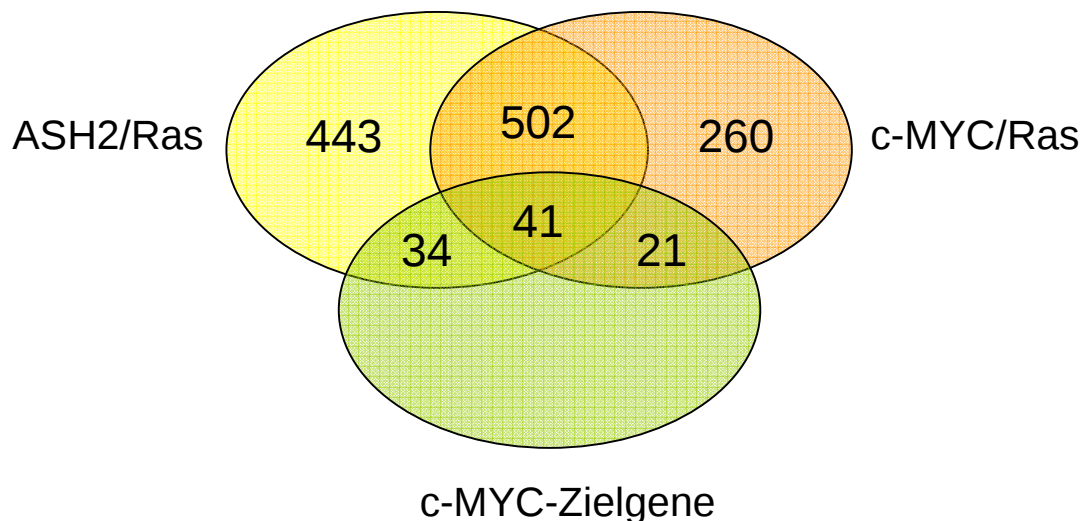


Abb. 3.20: Zusammenfassung der Ergebnisse der Microarray Expressions-Analyse

Dargestellt ist die Anzahl der Gene von den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen, welche explizit oder in beiden transformierten Zellen reguliert waren. Dazu ist der Anteil an c-MYC Zielgenen gezeigt.

3.2.11 Vergleich der in ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen regulierten Gene mit bekannten RAS Zielgenen

Da die embryonalen Rattenfibroblasten (REFs) mit ASH2 und c-MYC jeweils in Kooperation mit RAS transformiert wurden, sollten die ermittelten regulierten Gene beider Zelllinien mit bekannten RAS Zielgenen abgeglichen werden. Dadurch kann man durch RAS regulierte Gene von den weiteren Untersuchungen der ASH2 und c-MYC Zielgenen ausschliessen. Als Vergleichsdaten dienten die durch RAS-Transformation von immortalen REFs differentiell exprimierten Gene aus der Publikation von Zuber *et al.* (332) Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Von den 1020 regulierten Genen der ASH2/RAS Zellen sind 25 RAS

Zielgene, bei den c-MYC/RAS Zellen sind es von 824 regulierten Genen 20. 16 dieser RAS abhängigen Gene sind in beiden Zelllinien identisch. Diese Daten wurden wiederum mit den Genen aus der Tabelle verglichen, die sowohl in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen differentiell exprimiert waren, als auch als c-MYC Zielgene beschrieben wurden. Dabei wurden 4 Gene identifiziert, welche in der Tabelle 3.1 orange markiert sind. Bei diesen Genen ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die beobachteten Unterschiede in der Expression durch das Vorhandensein von RAS verursacht wurden und nicht durch ASH2 oder c-MYC. Nahezu alle ermittelten RAS abhängigen Gene, die in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen differentiell exprimiert waren, stimmen in der Richtung der Regulation mit den publizierten Daten überein.

ASH2/RAS reguliert durch RAS:			c-MYC/RAS reguliert durch RAS:			in ASH2/RAS und c-MYC/RAS:		
sort1	-	+	sort1	-	+	sort1		
tead2	-	-	slc16a1	+	+	slc16a1		
snk	-	-	sepp1	-	-	sepp1		
slc16a1	+	+	sdcd2	-	-	sdcd2		
sh3bp5	-	-	pik3cb	+	-	nid		
sepp1	-	-	nid	-	-	mmp10		
sdcd2	-	-	mmp10	+	+	lsp1		
ogn	-	-	lsp1	-	+	lox		
nid	-	-	lox	-	-	gas6		
mmp10	+	+	gp38	-	-	fstl		
lsp1	-	+	gas6	-	-	fosl1		
lox12	-	-	fstl	-	-	fh12		
lox	-	-	fosl1	+	+	fhn1		
gas6	-	-	fh12	-	+	efna1		
fstl	-	-	fhn1	-	-	dusp5		
fosl1	+	+	efna1	+	+	cdh11		
fn1	-	-	dusp5	+	+			
fh12	-	+	dpysl3	-	-			
fhn1	-	-	cdh11	-	-			
efna1	+	+	cald1	-	-			
dusp5	+	+						
clu	-	-						
cdh11	-	-						
cacnb3	-	-						
bard1	+	+						

Tabelle 3-2: Ergebnis des Abgleichs von in ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten Zellen regulierten Genen mit RAS regulierten Genen

Die regulierten Gene der ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen wurden mit differentiell exprimierten Genen von RAS-transformierten immortalen REFs verglichen. Dabei gibt die zweite Spalte jeweils an, ob die RAS regulierten Gene in den ASH2/RAS bzw. c-MYC/RAS Zellen induziert (+) oder reprimiert (-) waren. Die Spalte daneben zeigt die Art der Regulation durch RAS in den Vergleichsdaten der RAS-transformierten REFs. Rechts sind die RAS regulierten Gene aufgelistet, die in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen reguliert waren.

3.2.12 Validierung der Expressionsergebnisse aus der Microarray Analyse in der RT-PCR

Mittels RT-PCR sollte anhand ausgewählter Gene überprüft werden, ob die Expressionswerte aus dem Array und die tatsächlichen RNA-Transkript Level in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen korrelieren. Dazu wurde mit den RNA Lysaten, die für den Microarray verwendet wurden, eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Das erfolgte durch Juliane Lüscher-Firzlaff. Die RT-PCR wurde allerdings nicht mit den gemischten RNA Lysaten durchgeführt, sondern die RNA der Klone der transformierten Zellen (AR932/AR925 und MR8/MR2) wurden getrennt eingesetzt. Dadurch konnten Unterschiede in der Expression zwischen den Klonen überprüft werden. Die Auswahl der dafür verwendeten Primer deckt c-MYC Zielgene, die in beiden Linien induziert wurden, besonders stark induzierte oder reprimierte Gene, sowie RAS Zielgene ab. Auch potentielle c-MYC abhängige Gene, die in beiden reguliert waren, aber die Kriterien von 3-facher Regulation oder den p-Wert von 0,05 überschritten sind eingeschlossen. Die Ergebnisse in Abb.3.21 zeigen, dass die Expressionswerte bis auf TGFalpha, CyclinD2 und PRLPF im c-MYC/RAS Klon 8 gut korrelieren und die Array Resultate die tatsächlichen RNA-Transkript Mengen der jeweiligen Gene widerspiegeln.

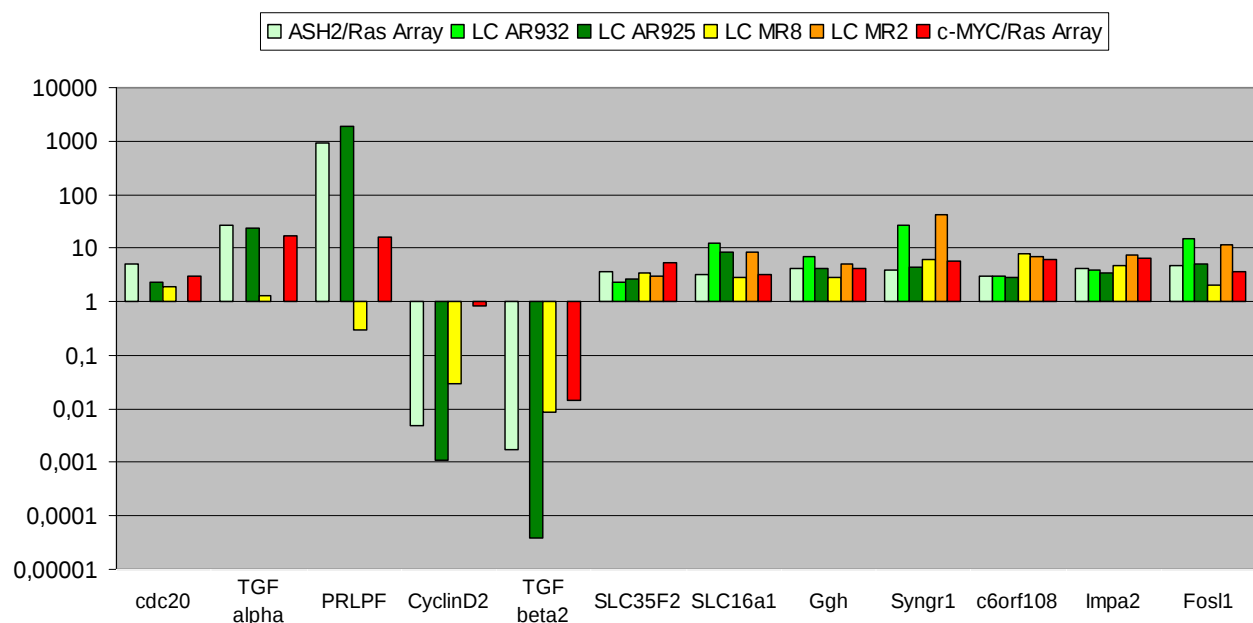


Abb. 3.21: RT-PCR-Analyse von regulierten Genen aus dem Microarray

Bei einer Auswahl von regulierten Genen der ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen wurden mit RT-PCR die RNA-Transkript Level in den in der Legende angegebenen Klone der transformierten Zellen ermittelt. Die RNA-Menge der Zellen ist logarithmisch dargestellt, alle Werte kleiner als Eins zeigen reprimierte Expression. Die Faktoren der Regulation aus der Microarray-Analyse sind zum Vergleich für die Gene mit aufgetragen (in der Legende: ASH2/RAS Array bzw. c-MYC/RAS Array). Bei fehlenden Balken wurde der betreffende Klon nicht im Versuch berücksichtigt.

4 DISKUSSION

Der Zugriff auf die genetische Information ist für die Zellen bei allen Aspekten des Zellverhaltens von fundamentaler Bedeutung. Grundlegende Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose verlangen eine komplexe und differentiell gesteuerte Expression der beteiligten Gene, Fehlregulationen können Krankheiten wie Krebs verursachen. In den letzten Jahren zeigte sich, dass die Regulation der Expression auf vielen Ebenen und durch verschiedene molekulare Mechanismen ausgeführt wird. Dabei spielt die Rekrutierung von Kofaktoren und Multiprotein-Komplexen mit enzymatischer Aktivität durch sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren eine grosse Rolle. Diese rekrutierten Faktoren können direkt auf Komponenten der basalen Transkriptions-Maschinerie wirken, die Aktivität der Transkriptionsfaktoren durch Modifikationen der Aminosäure-Reste beeinflussen und die Chromatinstruktur verändern. Dies geschieht entweder durch ATP-abhängiges Chromatin *remodeling* oder durch Histon-Modifikationen, welche durch weitere regulatorische Proteine mit Bindungs-Domänen spezifisch gebunden werden. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit zwei Modifikations-abhängigen Aspekten der Genregulation, die zum Verständnis der molekularen Ereignisse der Genexpression beitragen sollten.

Im ersten Teil wurde die Acetylierungs-abhängige Regulation des Transkriptionsfaktors c-MYC durch die Interaktion mit dem Kofaktor SIRT1 behandelt.

Der zweite Teil beschäftigte sich mit ASH2, einem potentiellen Onkogen und Teil vieler HMT-Komplexe, sowie dessen funktioneller Interaktion mit c-MYC.

4.1 Regulation von c-MYC durch SIRT1

In mehreren Publikationen wurde beschrieben, dass c-MYC mit den Histon-Acetyltransferasen GCN5, TIP60, CBP und p300 an der DNA interagiert, was zu verstärkter Acetylierung der Histone in der Promotor-Region und zur Stimulation der Transkription von c-MYC-Zielgenen führt (142, 160, 182, 183, 333). Zudem wurde gezeigt, dass c-MYC nicht nur als Bindungs-Plattform für die HATs fungiert, sondern auch selbst Substrat der HATs ist, wobei die Acetylierung von c-MYC dessen Proteinstabilität erhöht (171, 182). Welchen Anteil die Acetylierung von c-MYC an der Transaktivierung hat, oder ob darüber Interaktionen mit anderen Faktoren vermittelt werden, die über Bromo-Domänen binden könnten, wurde

bisher nicht geklärt. Unklar war auch, ob und durch welche HDAC c-MYC deacetyliert werden könnte. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die HAT-abhängige Acetylierung von c-MYC durch antagonistisch wirkende HDACs rückgängig gemacht werden kann und welche funktionellen Auswirkungen dies hat. Aufgrund seiner Rolle bei der Acetylierungs-abhängigen Regulation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und p53, wurde SIRT1 als potentieller Kandidat ausgesucht. In dieser Arbeit wurde erstmals die Interaktion von c-MYC mit der Klasse III-HDAC SIRT1 gezeigt. Die Bindung von SIRT1 und c-MYC konnte durch Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden (Abb. 3.1). Dabei präzipitierte sowohl HA-SIRT1 mit Flag-c-MYC, als auch endogenes c-MYC mit HA-SIRT1. Folgend konnte in einem *in vitro*-Assay mit radioaktiv markiertem Acetyl-CoA gezeigt werden, dass aus HEK293 Zellen aufgereinigtes SIRT1 in der Lage ist, durch baculovirales CBP acetyliertes rekombinantes c-MYC zu deacetylieren (Abb. 3.2 A). Die Kontrollen ohne NAD⁺ oder mit dem Sirtuin-Inhibitor Nicotinamid bestätigten die Spezifität der Reaktion. Auch durch die Koexpression von p300 in HEK293 Zellen acetyliertes c-MYC konnte durch aufgereinigtes SIRT1 *in vitro* deacetyliert werden (Abb. 3.2 B). Damit konnte gezeigt werden, dass c-MYC ein direktes Substrat von SIRT1 ist. In weiteren Untersuchungen wurde der Acetylierungsstatus von c-MYC in Abhängigkeit von SIRT1 in HEK293 Zellen analysiert. Dabei konnte durch die Expression von SIRT1 die CBP-abhängige Acetylierung von c-MYC komplett verhindert werden, was auf der katalytischen Aktivität von SIRT1 beruht (Abb. 3.3 A). In der Publikation von T.Bouras *et al.* wurde beschrieben, dass SIRT1 das CBP-Homolog p300 negativ regulieren kann. Obwohl im Versuch zuvor c-MYC als direktes Substrat von SIRT1 identifiziert wurde, musste eine Regulation der c-MYC-Acetylierung durch Inhibierung der HAT-Aktivität von CBP ausgeschlossen werden. Es konnte durch Verwendung einer nicht mehr von SIRT1 regulierbaren Deletionsmutante von p300 gezeigt werden, dass die Reduktion der c-MYC-Acetylierung nicht auf der Inhibition der katalytischen Aktivität von p300 basiert. Dementsprechend ist auch in Zellen eine direkte Deacetylierung von c-MYC durch SIRT1 wahrscheinlich. Generell waren bei der Koexpression der Plasmide konsistente Schwankungen in der Protein-Menge zu beobachten, deren Ursache unklar ist. Da das CBP- bzw. p300-abhängige Acetylierungs-Signal bei der Kotransfektion von SIRT1 komplett verschwand und die Mengen an CBP und p300 zwar geringer waren als bei deren Einzel-Expression, aber über dem endogenen Niveau lagen, ist von einer auf der katalytischen Aktivität von SIRT1 beruhenden Deacetylierung auszugehen.

Um die physiologische Relevanz der bisherigen Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Einfluss der SIRT1 Inhibierung auf den Acetylierungs-Status von c-MYC untersucht. Der Sirtuin-Inhibitor Nicotinamid, nicht aber Trichostatin A, welches die HDAC-Klassen I und II inhibiert, resultierte in der Anreicherung von acetyliertem c-MYC in HEK293 Zellen. NAM hemmt alle Enzyme der Sirtuin-Familie, aber nur SIRT1 ist als einziges Mitglied mit

Deacetylase-Aktivität wie c-MYC permanent nukleär lokalisiert. SIRT2 kann über einen Shuttle-Mechanismus in den Kern gelangen, aber der überwiegende Teil ist cytoplasmatisch lokalisiert. So kommen die anderen Sirtuine als c-MYC-Deacetylasen wahrscheinlich nicht in Frage. SIRT1 scheint also den Acetylierungs-Zustand von c-MYC in der Zelle negativ zu kontrollieren. Es stellte sich dabei die Frage nach der Funktion der Acetylierung von c-MYC. Die Rekrutierung von HATs über c-MYC an dessen Zielgene führt zu verstärkter Aktivierung der Transkription (182, 333). Am Beispiel von CBP und p300 konnte gezeigt werden, dass die HAT-abhängige Aktivierung durch SIRT1 reprimiert wird, was auf dessen enzymatischer Aktivität beruhte (Abb. 3.5) und nicht über die Inhibition der HAT-Aktivität reguliert wurde (Abb. 3.6). Ob die Acetylierung die transaktivierenden Eigenschaften von c-MYC selber verstärkt, oder ob möglicherweise über die acetylierten Lysine andere Koaktivatoren über ihre Bromo-Domänen gebunden wurden, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Vermutlich wird die SIRT1-abhängige Repression der Transaktivierung an endogenen Promotoren auch über die Deacetylierung von Histonen, wie etwa die für SIRT1 beschriebenen Substrate Histon H3-K9/14 und H4-K16, vermittelt. Bei dem im Versuch eingesetzten Reportergen-Konstrukt spielte dieser Effekt wahrscheinlich keine Rolle, da die Plasmid-DNA nicht in einer mit dem Chromatin vergleichbaren Nukleosomen-Struktur vorliegt. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche c-MYC-Zielgene in der Zelle von SIRT1 reprimiert werden und in welchen Situationen dies der Fall ist. Neue Daten lassen auf einen Rückkopplungs-Mechanismus von c-MYC und SIRT1 schließen, da *Sirt1* als c-MYC-Zielgen identifiziert wurde und c-MYC durch Induktion von Schlüsselenzymen der Glykolyse die Verschiebung des NAD^+/NADH Gleichgewichts in Richtung des NAD^+ bewirkt, wodurch die Aktivität von SIRT1 erhöht wird (Antje Menssen, persönliche Kommunikation). Auf diesem Weg würden die Folgen von zu hoher c-MYC-Expression über dessen Repression durch SIRT1 kompensiert werden. Dazu passt die Beobachtung, dass SIRT1 abhängig von seiner enzymatischen Aktivität die Ubiquitinierung von c-MYC verstärkt (Abb. 3.7). Erwartungsgemäss resultiert diese verstärkte Ubiquitinierung von c-MYC in einer geringeren Proteinstabilität durch proteasomale Degradierung, was von Per Hydbring gezeigt werden konnte (persönliche Kommunikation). Interessanterweise wurde beobachtet, dass SIRT1 durch D-Typ-Cyclin/CDK-Komplexe phosphoryliert und dadurch aktiviert wird (Dissertation R. Pandithage). Dies ist vermutlich Teil des Rückkopplungs-Mechanismus, da c-MYC wiederum die Cycline D2 und D3 in der G1-Phase als Antwort auf mitogene Signale induziert, die über die Aktivierung von SIRT1 schließlich die Repression von c-MYC bewirken könnten (183, 334)

SIRT1 kann in vielen von c-MYC kontrollierten Vorgängen in der Zelle durch Modulation von dessen Transaktivierung eine Rolle spielen, c-MYC wiederum kann über die Induktion und die Aktivierung von SIRT1 das Zellverhalten beeinflussen. Diese Vernetzung wird durch die

Vielzahl der Prozesse, an deren Regulation beide Proteine beteiligt sind, wie Apoptose, Seneszenz und Tumorgenese, offensichtlich. So verstärkt der *knockdown* von SIRT1 die c-MYC induzierte Apoptose, was zum einen über die verstärkte Acetylierung und Aktivität von p53 bzw. FoxO3 und FoxO4 bedingt sein kann, aber auch Folge von erhöhter Expression von proapoptotischen c-MYC-Zielgenen sein könnte (335); (Antje Menssen, persönliche Kommunikation). Die Rolle von p53 bei der durch Reduktion von SIRT1 ausgelösten Apoptose ist umstritten und Zelltyp-abhängig (336). Der Schutz vor durch c-MYC induzierter Apoptose könnte auch bei der Tumorgenese eine Rolle spielen, da in Tumorzelllinien und Tumoren häufig erhöhte Mengen an SIRT1 zu beobachten sind (280, 337). Andererseits könnte die SIRT1 Überexpression in Tumor Zellen auch die Folge der Aktivierung durch c-MYC sein, welches in der Mehrheit von Tumoren verstärkt exprimiert wird. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu klären, ob in Tumorzellen die negative Regulation von c-MYC durch SIRT1 gestört ist.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Funktion von SIRT1 als negativ wirkender Kofaktor des Transkriptionsfaktors c-MYC hin, der die Aktivität und Stabilität über dessen Acetylierungs-Status reguliert.

Ausblick:

Die vorliegende Arbeit wirft einige interessante Fragen bezüglich der acetylierungs-abhängigen Regulation von c-Myc auf. Generell gestaltet es sich schwierig, die Effekte der Acetylierung bzw. der Deacetylierung von denen der ausführenden Enzyme zu trennen. Hier wäre der Einsatz von nicht mehr acetylierbaren Punktmutanten von c-MYC sinnvoll, was aber aufgrund der Vielzahl möglicher Ziel-Lysine aufwändig ist. Dazu besteht die Gefahr, dass bei Austausch vieler Lysine auch andere Eigenschaften von c-MYC verändert oder nicht acetylierungs-abhängige Interaktionen beeinflusst werden. Beispielsweise wäre eine verlängerte Halbwertszeit der c-MYC-Mutante zu erwarten, da die Lysine auch Ziel der Ubiquitinierung sind. Alternativ könnte versucht werden, die Ziel-Lysine mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren, um dann gezielt die relevanten Lysine zu mutieren. Mit der gleichen Technik wäre es möglich, potentielle andere Bindungspartner von acetyliertem c-MYC im Vergleich zu einer Lysin-Mutante zu identifizieren. Zusätzlich liesse sich in der Massenspektrometrie klären, ob GCN5, TIPP60, CBP und p300 die gleichen Lysine acetylieren und ob SIRT1 eine Lysin-Spezifität bei der Deacetylierung besitzt. Interessant ist die Fragestellung, unter welchen Umständen c-MYC welche HATs rekrutiert und welche Zielgene von c-MYC von der SIRT1-Regulation betroffen sind. Dafür könnte in c-MYC induzierbaren Zellen mittels Chromatin-Immunpräzipitations-Experimenten Zielgene von c-MYC auf die Rekrutierung von HATs bzw. SIRT1 untersucht werden. Durch RT-PCR wäre parallel dazu der transkriptionelle Zustand der jeweiligen Gene zu ermitteln. Zugleich

liesse sich in der *ChIP* klären, in wie weit die Acetylierung der Histone in Umgebung der E-Boxen mit den rekrutierten Enzymen korreliert. Eine weitere interessante Frage ist, ob die Acetylierung von c-MYC Zell-Zyklus-abhängig reguliert wird. Um dies zu beantworten, könnte man Zellen in den einzelnen Zell-Zyklus Phasen arretieren bzw. mit induzierbaren c-MYC Zellen synchrone Zell-Zyklus Phasen erzeugen und den Acetylierungs-Status von c-MYC analysieren.

4.2 Untersuchungen zum Onkoprotein ASH2

Onkoproteine können durch verschiedene Strategien die Transformation von primären Zellen bewirken, wobei für die Transformation die Expression von mindestens zwei Onkogenen bei Nagern, bzw. fünf Onkogenen beim Menschen erforderlich sind. Generell scheint Tumorgenese aus der Kombination von unreguliert exprimierten Faktoren, die proliferatorisch wirken mit Faktoren, die durch die Inhibierung der Apoptose und Unterdrückung der Seneszens die Sicherheits-Systeme der Zelle ausschalten, zu resultieren.

ASH2 ist Mitglied mehrerer Histon-Methylierungskomplexe, die durch die spezifische Methylierung von Histon H3 am Lysin 4 Bindungsstellen für Regulatoren der Chromatinstruktur generieren und so die Aktivierung der Transkription durch Auflockerung der Chromatinstruktur ermöglichen. In dieser Arbeitsgruppe wurde entdeckt, dass ASH2 onkogene Eigenschaften besitzt. ASH2 ist in der überwiegenden Zahl der Tumorzellen und Tumorzelllinien überexprimiert und kooperiert mit Ha-RAS in der Transformation von primären Nagerzellen (296). Dies warf Fragen nach der Rolle von ASH2 bei der Transformation und der Aufrechterhaltung des transformierten Zustandes auf. Um die Funktion von ASH2 in Zellen zu untersuchen, wurde in Tumorzelllinien die ASH2 Protein-Menge durch RNAi reduziert oder durch Überexpression erhöht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von Hela Zellen ASH2-abhängig ist (Abb. 3.8). Reduzierte ASH2-Level verringerten die Proliferationsrate deutlich, wogegen die Überexpression zu einer leichten Steigerung der Proliferation führte. Die Reduktion von c-MYC zeigte in diesem Experiment unerwarteterweise keinen Effekt. In der folgenden Analyse konnte in BrdU-Experimenten gezeigt werden, dass ASH2 für die S-Phase essentiell ist (Abb. 3.9). Der *knockdown* von ASH2 führte zu reduzierter DNA-Synthese in den Tumorzelllinien Hela und U2OS. Der Feststellung, dass die Proliferation von Tumorzelllinien abhängig von deren ASH2-Menge ist, folgt die Frage nach der Funktion von ASH2 in diesen Zellen. Für ASH2 wurde in MLL-enthaltenen HMT-Komplexen eine essentielle Rolle bei der Trimethylierung von Histon H3-K4 beschrieben (301). Diese Modifikation ist eng mit aktiver Transkription assoziiert. Durch den *knockdown* von ASH2 in Hela Zellen konnte im Western-Blot und in der

Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass die globale H3-K4 Trimethylierung stark mit der Menge an ASH2 in den Zellen korreliert, was in HepG2 und HEK293 Zellen bestätigt wurde. Das führt zu dem Schluss, dass Tumorzellen auf hohe ASH2-Mengen für die Modifikation von H3-K4me3 angewiesen sind, wahrscheinlich um eine erhöhte Transkriptionsrate zu gewährleisten. Tumorzellen zeichnen sich durch deutlich höhere Proliferationsraten als nicht transformierte Zellen aus. Diese hohe Wachstumsgeschwindigkeit erfordert eine Anpassung vieler Prozesse, wie z.B. des Stoffwechsels. Damit verbunden ist eine verstärkte Transkription von allen an diesen Prozessen beteiligten Faktoren. Vermutlich führt die Reduktion der H3-K4 Trimethylierung beim *knockdown* von ASH2 zur Repression von Genen, die für die Proliferation essentiell sind. Bezüglich der Ergebnisse stellte sich die Frage, ob auch durch die Transformation mit ASH2 in Kooperation mit Ha-RAS in den embryonalen Rattenfibroblasten erhöhte H3-K4me3-Level zu beobachten waren. Das konnte im Vergleich zu den primären Ausgangslinien bestätigt werden, wobei nicht nur die ASH2/RAS Linie eine deutlich stärkere globale Trimethylierung an Histon H3-K4 aufwies, sondern auch die c-MYC/RAS-transformierten Zellen (Abb. 3.12). Es wurde bereits beschrieben, dass sowohl das Vorhandensein von c-MYC als auch von murinem N-Myc mit globaler H3-K4-Trimethylierung korrelieren (184, 185).

Interessanterweise konnte c-MYC mit Ha-RAS im Transformations-Assay in den Rattenfibroblasten bei gleichzeitigem *knockdown* von Ratten Ash2 nicht mehr transformieren, bei anderen Oncogenen wie E1A hatte der *knockdown* von rAsh2 keine Auswirkung auf die Transformationseffizienz (296). Diese Ash2-Abhängigkeit der Transformation durch c-MYC lässt auf eine funktionelle Interaktion von c-MYC und ASH2 bei der Aktivierung von c-MYC Zielgenen schließen. Tatsächlich wurde eine Bindung von ASH2 an c-MYC in Zellen und *in vitro* beobachtet und c-MYC konnte bei der Aufreinigung eines ASH2-Komplexes neben Komponenten des MLL2 Komplexes identifiziert werden (Dissertation G. Walsemann und Diplomarbeit H. Schuchlautz). Einen weiteren Hinweis auf eine Verbindung zwischen ASH2 und c-MYC zeigte ein BrdU-Experiment, bei dem der gleichzeitige *knockdown* von ASH2 und c-MYC die DNA-Syntheserate im Vergleich zum Einzel-*knockdown* von ASH2 oder c-MYC halbierte (Abb. 3.10). Zusammen betrachtet lassen diese Daten vermuten, dass c-MYC über ASH2 einen HMT-Komplex rekrutiert. Durch eine IP von c-MYC mit anschließendem HMT-Assay konnte bestätigt werden, dass c-Myc H3-K4me3-Aktivität rekrutiert und dass diese ASH2 abhängig ist (Abb. 3.13). Dazu passt der Befund, dass die Bindung von c-MYC an DNA ausschließlich in sogenannten euchromatischen Inseln gefunden wurde, die sich neben Histon H3-Acetylierung durch Methylierung an H3-K4 und H3-K79 auszeichnen (186).

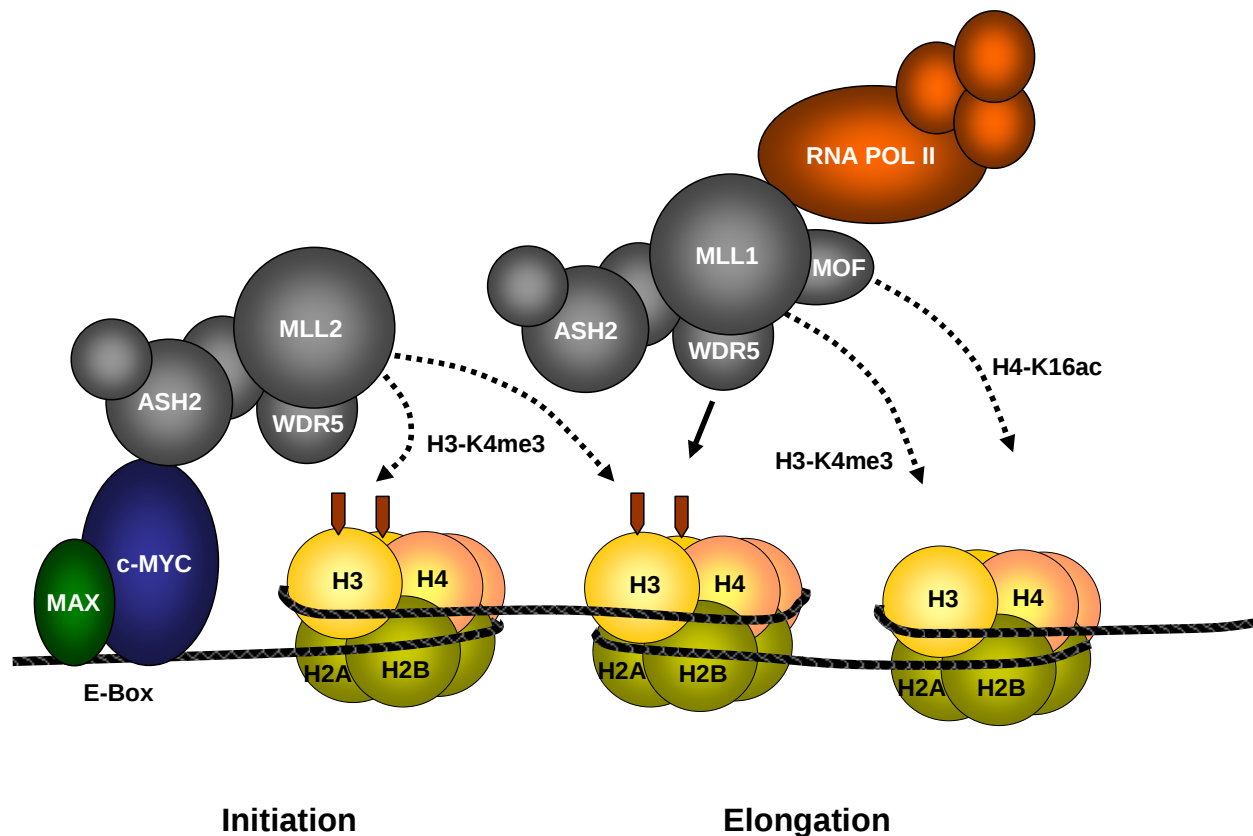


Abb. 4.1: **Modell der c-MYC-abhängigen Rekrutierung von HMT-Komplexen.**

c-MYC rekrutiert über ASH2 vermutlich den MLL2-Komplex an den Promotor, der in der Umgebung Histon H3-K4 trimethyliert. Daran bindet der MLL1-Komplex über die Chromo-Domäne von WDR5 und methyliert weitere H3-K4, sowie acetyliert H4-K16 durch die HAT MOF. So wird die Chromatin-Struktur gelockert und es werden erneut Bindungsstellen für HMT-Komplexe generiert, so dass sich die Modifikationen sich über das Gen ausbreiten. Über die Rekrutierung des RNA-Polymerase II-Komplexes an den MLL1-Komplex erfolgt der Beginn der Transkription.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit und den publizierten Daten lässt sich ein Modell postulieren, in dem c-MYC über ASH2 einen HMT-Komplex (vermutlich den MLL2-Komplex) an die Promotoren seiner Zielgene rekrutiert, welcher in der Umgebung die Histone H3 an Lysin 4 trimethyliert. Über die H3-K4me3 werden dann Faktoren mit Chromo-Domäne oder PHD-Finger gebunden, die durch weitere Histon-Modifikationen oder Chromatin *remodeling* die Chromatinstruktur auflockern, die Bindung weiterer Faktoren ermöglicht und für die adäquaten Start-Bedingungen der Transkription sorgen. Auch WDR5, eine Kern-Komponente der HMT-Komplexe erkennt und bindet H3-K4me3 über seine Chromo-Domäne. Somit könnte die c-MYC rekrutierte HMT eine Art Initiator Modifizierung der Histone am Promotor darstellen, von wo aus sich die aktivierenden Histon-Markierungen durch eine Kettenreaktion über das Gen verbreiten und dadurch auch die Elongation der RNA Pol II ermöglichen. Für den MLL1-Komplex, der auch WDR5 enthält, ist eine Rolle bei der Elongation beschrieben worden (316, 338). Dazu konnte eine Bindung von TFIID über den PHD-Finger von TAF3 an H3-K4me3 gezeigt werden, was zusätzlich eine unmittelbare

Rekrutierungsmöglichkeit des RNA Pol II-Komplexes darstellt und die Rolle von H3-K4me3 bei der Aktivierung der Genexpression unterstreicht (339). Somit ist die H3-K4me3 an c-MYC regulierten Genen vermutlich nicht die Voraussetzung für die Bindung von c-MYC, sondern die Folge von dessen Bindung und der Rekrutierung von HMT-Komplexen.

Dennoch bleiben wichtige Fragen zur c-MYC-ASH2 Interaktion und zum Mechanismus der Transformation durch ASH2 offen. So ist zu klären, ob die Transformation von Zellen durch ASH2 oder c-MYC über die Aktivierung der gleichen Zielgene vermittelt wird. Nach dem Modell wäre es denkbar, dass im Transformations-Assay in den REFs das überexprimierte ASH2 über endogenes c-Myc dessen Zielgene aktiviert. Demnach sollten die ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten Zellen ein ähnliches Expressionsmuster besitzen, vorausgesetzt, es handelt sich um einen generellen Mechanismus, der die Mehrheit der c-MYC Zielgene tangiert. Auch wenn viele Hinweise, wie die ASH2-Abhängigkeit der Transformation durch c-MYC, auf eine funktionelle Interaktion von c-MYC und ASH2 deuten, ist nicht auszuschliessen, dass ASH2 in der Transformation c-MYC-unabhängige Funktionen erfüllt. Daher ist es von besonderem Interesse die Zielgene der c-MYC- und ASH2-abhängigen Transformation zu identifizieren.

4.3 Microarray Analyse von ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten embryonalen Rattenfibroblasten

Um die Zielgene von ASH2 und c-MYC in der Transformation von embryonalen Rattenfibroblasten zu identifizieren wurden Microarray Expressionsanalysen durchgeführt. Ziel war es neben den ASH2- und c-MYC-spezifischen regulierten Genen durch die Bildung von Schnittmengen gemeinsamer Zielgene und Expressionsmuster zu finden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Aus den regulierten Genen aus dem Vergleich der ASH2/RAS bzw. c-MYC/RAS Linien mit den primären REFs wurden diejenigen aussortiert, die nicht den gewählten Kriterien (Mindestens drei-fach reguliert und p-Wert <0,05) entsprachen, um als differentiell reguliert zu gelten. Diese Listen wurden in induzierte und reprimierte Gene unterteilt. Dann wurden aus den differentiell regulierten Genen der ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen Schnittmengen gebildet, die Gene enthalten, die in beiden Linien induziert, in beiden reprimiert oder entgegengesetzt reguliert waren. Anschliessend wurden die Listen der Gene, die sowohl in den ASH2/RAS als auch in den c-MYC/RAS Zellen reguliert waren mit bekannten c-MYC Zielgenen abgeglichen. Dafür wurden die Daten aus vier publizierten c-MYC Arrays (Microarray/*ChIP-Chip*-Array) und aus der online-Datenbank von c-MYC *Cancer Gene* benutzt. Um von den erhaltenen potentiellen Zielgenen solche auszuschliessen, die von RAS reguliert sein könnten, wurden sie mit differentiell exprimierten Genen von mit RAS transformierten immortalen REFs abgeglichen (332). Abschliessend wurden die Expressionswerte aus dem Array mit den tatsächlichen RNA-Transkript Mengen

in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen mittels RT-PCR anhand ausgewählter Gene verglichen.

Bei den Ergebnissen überrascht die hohe Anzahl von reprimierten Genen in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen. Da c-MYC überwiegend als Aktivator der Genexpression beschrieben wurde und für ASH2 keine Hinweise auf eine Rolle bei der Repression von Genen existieren, ist davon auszugehen, dass die reprimierten Gene nicht unmittelbare Ziele von c-MYC oder ASH2 vermittelter Regulation darstellen. Ordnet man die regulierten Gene nach biologischen Prozessen und vergleicht die Anzahl von induzierten und reprimierten Genen, so fällt auf, dass innerhalb der meisten biologischen Prozesse sich eine ähnliche Anzahl an induzierten und reprimierten Genen gegenüber stehen. Dies wird in der Abb. A im Anhang am Beispiel von in ASH/RAS regulierten Genen gezeigt. Das deutet auf eine komplexe Regulation von für die Transformation und deren Aufrechterhaltung relevanter Prozesse hin. Vergleicht man alle nach biologischen Prozessen geordneten differentiell exprimierten Gene der ASH2/RAS Zellen mit denen der c-MYC/RAS Zellen, ergibt sich eine erstaunlich hohe Übereinstimmung in der Anzahl der Genen der jeweiligen Klassen (Anhang, Abb. B). Diese Übereinstimmung ist höher als es die Zahl der Gene in der Schnittmenge erwarten liess. Dieser Befund zeigt, dass dieselben biologischen Prozesse in der Transformation von ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen reguliert werden, dieses aber durch die Regulation unterschiedlicher Gene innerhalb eines biologischen Prozesses geschehen kann.

Aus der weniger differenziert unterteilten Übersicht in Abb. 3.16 und 3.18 ist ersichtlich, dass die höchste Zahl an regulierten Genen in den Gruppen der Signal-Transduktion, der Entwicklung und des Metabolismus zu finden sind, was für beide transformierte Linien gilt. Das hängt zum einen vermutlich mit der Grösse dieser Gen-Gruppen zusammen, zum anderen sind in Tumorzellen Dysregulationen in der Signal- Transduktion, zumal RAS als Effektor zahlreicher Signal Wege bekannt ist, sowie im Metabolismus als Folge schnellen Wachstums zu erwarten. Dazu passt, dass c-MYC viele Gene des Metabolismus regulieren kann, während ASH2 eine Rolle bei der Regulation von Entwicklungsgenen spielt. Betrachtet man die Gene, die in beiden Linien differentiell exprimiert sind, so ist eine sehr hohe Zahl zu erkennen, die in die gleiche Richtung reguliert sind (Abb. 3.19). So sind von den 543 Genen der Schnittmenge nur 3 entgegengesetzt exprimiert (Anhang Tabelle I). Die Schnittmenge umfasst vermutlich direkte Zielgene von c-MYC und ASH2 sowie von dessen Genprodukten sekundär regulierte Gene. Dazu werden auch über RAS gesteuerte Gene enthalten sein. Durch den Vergleich mit bekannten c-MYC Zielgenen konnten 41 identifiziert werden, die in ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen reguliert wurden. Auffallend ist, dass weniger als die Hälfte der Gene eine E-Box besitzen. Von den gemeinsamen potentiellen c-MYC Zielgenen

sind 3 Gene auch als RAS-reguliert beschrieben worden, und deshalb für weitere Analysen wahrscheinlich nicht relevant (332). Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob die identifizierten Gene tatsächlich gemeinsam von c-MYC und ASH2 reguliert werden.

Zusammenfassung und Ausblick:

Generell fällt die hohe Zahl regulierter Gene in den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen und die grosse Überschneidung bei den Zielgenen auf. Dies kann mehrere Ursachen haben: Die regulierten Gene könnten echte Zielgene von ASH2 oder c-MYC sein, bzw. von beiden gemeinsam regulierte, welche in der Schnittmenge zu finden wären. Desweiteren können die differentiell exprimierten Gene sekundär regulierte Gene sein, was bedeutet, dass diese von den Genprodukten der echten Zielgene gesteuert werden. Oder es sind durch RAS regulierte Gene, was vor allem die Gene der Schnittmenge betreffen würde, da in beiden Linien RAS koexprimiert ist. Durch den Abgleich mit RAS transformierten Zellen sollten diese Gene ausgeschlossen werden, allerdings wurden im Array von Zuber *et al.* immortale mit transformierten REFs verglichen, und nicht primäre mit transformierten REFs wie in der vorliegenden Arbeit. Daraus könnten sich Unterschiede im Expressionsmuster ergeben. Es war leider nicht möglich RAS-Linien aus den REF Zellen als Referenz zu den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Zellen zu generieren, da die Überexpression von RAS in primären Zellen in Seneszenz resultiert. Eine Möglichkeit wäre eine dritte REF-Linie im Microarray zu analysieren, die ebenfalls durch Koexpression eines Onkogens mit RAS transformiert wurde, z.B. E1A/RAS oder p53dn/RAS. Das würde es ermöglichen, RAS-regulierte Gene durch den Abgleich mit den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Linien zu identifizieren. Eine zusätzliche Ursache für differentiell exprimierte Gene können Mutationen in regulatorischen Genen nach der Transformation sein, welche beim passagieren der Zellen auftreten und die durch Fehlregulation von Sicherheitsmechanismen zu Subpopulationen von veränderten Zellen führen können. Da diese spontan und nicht gerichtet auftreten, würden sich solche Gene wahrscheinlich bei den nicht gemeinsam regulierten Genen von den ASH2/RAS und c-MYC/RAS Linien finden.

In der vorliegenden Analyse des Microarrays von ASH2/RAS und c-MYC/RAS transformierten Zellen konnten durch ASH2 und c-MYC gemeinsam regulierte potentielle Zielgene identifiziert werden. In weiteren Untersuchungen müssen diese als echte Zielgene bestätigt werden. Momentan wird in dieser Arbeitsgruppe mittels *ChIP Chip* Experimenten versucht Zielgene zu finden, die durch ASH2 und c-MYC gebunden und reguliert werden. Durch Analysen der Regulations-Mechanismen dieser Gene könnten viele Fragestellungen bezüglich der Rolle von ASH2 in der Transkriptions-Aktivierung und der Transformation angegangen werden, die noch offen sind.

Wichtige Fragen sind z.B.

- Welche ASH2-Komplexe werden durch c-MYC rekrutiert und unter welchen Bedingungen geschieht dies?
- Gibt es spezifische ASH2-HMT-Komplexe für Transkriptions-Initiation und -Elongation?
- Spielen weitere c-MYC rekrutierte Faktoren bei der ASH2-abhängigen Aktivierung eine Rolle bzw. weitere Modifikationen?
- Ist die ASH2-Rekrutierung ein universeller Mechanismus der Aktivierung durch c-MYC oder Zielgen-abhängig?
- Über welche Zielgene wird ASH2-abhängige Transformation vermittelt?
- Welche ASH2 Zielgene sind c-MYC unabhängig?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten Zellsysteme genutzt werden, welche die c-MYC Induktion bei gleichzeitigem ASH2 *knockdown* ermöglichen. Gefundene Zielgene können durch weitere *ChIP*-Analysen auf die gebundenen Faktoren und den Status der Modifikationen in Promotornähe und im Gen untersucht werden. Die Klärung dieser Fragen kann zum Verständnis der molekularen Ereignisse der Genexpression und der c-MYC-abhängigen Transformation beitragen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Jones PA, B. S. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*:683.
2. Roeder, R. G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21:327.
3. McKenna, N. J., and B. W. O'Malley. 2002. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108:465.
4. Lefstin, J. A., and K. R. Yamamoto. 1998. Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392:885.
5. Lemon, B., and R. Tjian. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 14:2551.
6. Kim, Y. J., S. Bjorklund, Y. Li, M. H. Sayre, and R. D. Kornberg. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77:599.
7. Thompson CM, K. A., Chao DM, Young RA. 1993. A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73:1361.
8. Fischle W, W. Y., Allis CD. 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15:172.
9. Hill, C. S., and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199.
10. Karin, M., and T. Hunter. 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 5:747.
11. Kouzarides, T. 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* 19:1176.
12. McBride, A. E., and P. A. Silver. 2001. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 106:5.
13. Orphanides, G., and D. Reinberg. 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* 108:439.
14. Rytinki, M. M., and J. J. Palvimo. 2008. SUMOylation Modulates the Transcription Repressor Function of RIP140 *J. Biol. Chem.* 283:11586.
15. Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251.
16. Wolffe, A. P., and D. Guschin. 2000. Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol* 129:102.
17. Kornberg, R. D., and Y. Lorch. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285.
18. Widom, J. 1997. Chromatin: the nucleosome unwrapped. *Curr Biol* 7:R653.
19. Miklos GL, J. B. 1979. Heterochromatin and satellite DNA in man: properties and prospects. *Am J Hum Genet.* 31:264.

20. Pimpinelli S, R. P. 1986. Nonrandom segregation of centromeres following mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:3900.
21. Kuras, L., and K. Struhl. 1999. Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399:609.
22. Workman, J. L., and R. E. Kingston. 1998. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67:545.
23. Ramakrishnan, V. 1997. Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26:83.
24. Weiler, K. S., and B. T. Wakimoto. 1995. Heterochromatin and Gene Expression in *Drosophila* *Annual Review of Genetics* 29:577.
25. Pirrotta, V. 1998. Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell*. 93:333.
26. Lyko F, P. R. 1999. Chromosomal elements conferring epigenetic inheritance. *Bioessays* 21:824.
27. Wolffe AP, M. M. 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286:481.
28. McGinnis W, K. R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68:283.
29. Lewis, E. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565.
30. Duncan, I. 1987. The bithorax complex. *Annu Rev Genet* 21:285.
31. Mahmoudi, T., and C. P. Verrijzer. 2001. Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene* 20:3055.
32. Narlikar, G. J., H. Y. Fan, and R. E. Kingston. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475.
33. Vignali, M., A. H. Hassan, K. E. Neely, and J. L. Workman. 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20:1899.
34. Varga-Weisz, P. 2001. ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene* 20:3076.
35. Fry, C. J., and C. L. Peterson. 2001. Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* 11:R185.
36. Saha A, W. J., Cairns BR. 2006. Mechanisms for nucleosome movement by ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Results Probl Cell Differ* 41:127.
37. Fyodorov DV, K. J. 2001. The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription. *Cell* 106:523.
38. Zhang H, R. D., Cairns BR. 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123:219.
39. Vicent GP, N. A., Smith CL, Peterson CL, Dimitrov S, Beato M. 2004. DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter. *Mol Cell* 16:439.
40. Larochelle M, G. L. 2003. H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *EMBO J* 22:4512.
41. Henikoff S, A. K. 2005. Assembly of variant histones into chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:133.
42. Vaquero A, L. A., Reinberg D. 2003. The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ* 14.
43. Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693.

44. Owen DJ, O. P., Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P, Travers AA. 2000. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* 19:6141.
45. Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal, and M. M. Zhou. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399:491.
46. Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire, and T. Kouzarides. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120.
47. Jenuwein T, A. C. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074.
48. Jenuwein, T., and C. D. Allis. 2001. Translating the Histone Code. *Science* 293:1074.
49. Sterner, D. E., and S. L. Berger. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:435.
50. Zhang Y, R. D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15:2434.
51. Fletcher, T. M., N. Xiao, G. Mautino, C. T. Baumann, R. Wolford, B. S. Warren, and G. L. Hager. 2002. ATP-Dependent Mobilization of the Glucocorticoid Receptor during Chromatin Remodeling. *Mol. Cell. Biol.* 22:3255.
52. Lee, D. Y., J. J. Hayes, D. Pruss, and A. P. Wolffe. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72:73.
53. Roth, S. Y., J. M. Denu, and C. D. Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70:81.
54. Berger, S. L. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12:142.
55. Imai S, A. C., Kaeberlein M, Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795.
56. Vaquero A, S. R., Reinberg D. 2007. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* 26:5505.
57. Marks P, R. R., Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 1:194.
58. Urnov FD, Y. J., Sachs L, Collingwood TN, Bauer A, Beug H, Shi YB, Wolffe AP. 2000. Targeting of N-CoR and histone deacetylase 3 by the oncoprotein v-erbA yields a chromatin infrastructure-dependent transcriptional repression pathway. *EMBO J* 19:4074.
59. Timmermann S, L. H., Polesskaya A, Harel-Bellan A. 2001. Histone acetylation and disease. *Cell Mol Life Sci.* 58:728.
60. Mhlknecht U, H. D. 2000. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med* 6:623.
61. Giles RH, P. D., Breuning MH. 1998. Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet.* 14:178.
62. Petrij F, G. R., Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, et al. 1995. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376:348.
63. Miller RW, R. J. 1995. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* 56:112.

64. Murata T, K. R., Krones A, Tatsumi K, Ishii M, Taki T, Masuno M, Ohashi H, Yanagisawa M, Rosenfeld MG, Glass CK, Hayashi Y. 2001. Defect of histone acetyltransferase activity of the nuclear transcriptional coactivator CBP in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet* 10:1071.
65. Weichert W, R. A., Niesporek S, Noske A, Buckendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C. 2008. Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 14:1669.
66. Wilson AJ, B. D., Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM. 2006. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 281:13548.
67. Senese S, Z. K., Minardi S, Muradore I, Ronzoni S, Passafaro A, Bernard L, Draetta GF, Alcalay M, Seiser C, Chiocca S. 2007. Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol* 27:4784.
68. Pan LN, L. J., Huang B. 2007. HDAC inhibitors: a potential new category of anti-tumor agents. *Cell Mol Immunol* 4:337.
69. Huffman DM, G. W., Bamman MM, Kim JS, Eltoum IA, Elgavish A, Nagy TR. 2007. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res* 67:6612.
70. Byvoet, P. 1972. In vivo turnover and distribution of radio-N-methyl in arginine-rich histones from rat tissues. *Arch Biochem Biophys* 152:887.
71. Klose RJ, K. E., Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7:715.
72. McBride AE, S. P. 2001. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 106:5.
73. Wang H, C. R., Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y. 2001. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* 8:1207.
74. Chen D, M. H., Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284:2174.
75. Hyllus D, S. C., Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, Hsieh J, Bauer UM. 2007. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev* 21:3369.
76. Guccione E, B. C., Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Lüscher B, Amati B. 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* 449:933.
77. Sims RJ 3rd, N. K., Reinberg D. 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 19:629.
78. Dutnall, R. 2003. Cracking the histone code: one, two, three methyls, you're out! *Mol Cell* 12:3.
79. Rea S, E. F., O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593.
80. Lachner M, O. C. D., Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410:116.
81. Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12:198.

82. Grewal SI, E. S. 2002. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* 12:178.
83. Richards EJ, E. S. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 108:489.
84. Ogawa H, I. K., Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296:1132.
85. Santos-Rosa H, S. R., Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419:407.
86. Heintzman ND, S. R., Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39:311.
87. Ruthenburg AJ, A. C., Wysocka J. 2007. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25:15.
88. Wysocka J, S. T., Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* 442:86.
89. Shi X, H. T., Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O. 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442:96.
90. Shi Y, L. F., Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941.
91. Tsukada Y, F. J., Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439:811.
92. Yamane K, T. C., Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. 2006. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125:483.
93. Whetstine JR, N. A., Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y. 2006. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* 125:467.
94. Fodor BD, K. S., Yonezawa M, O'Sullivan RJ, Sengupta R, Perez-Burgos L, Opravil S, Mechtler K, Schotta G, Jenuwein T. 2006. Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev* 20:1557.
95. Bannister AJ, K. T. 2005. Reversing histone methylation. *Nature*:1103.
96. Shi YJ, M. C., Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. 2005. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* 19:857.
97. Metzger E, W. M., Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437:436.
98. Guo XW, T. n. J., Swank RA, Anderson HJ, Tudan C, Bradbury EM, Roberge M. 1995. Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *EMBO J* 14:976.

99. Hsu JY, S. Z., Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102:279.
100. Francisco, L., Wang, W. und Chan, C.S. 1994. Type 1 protein phosphatase acts in opposition to Ipl1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol. Cell Biol* 14:4731.
101. Pickart CM, C. R. 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:177.
102. Belz T, P. A., Beisel C, Anders N, Bogin J, Kwozynski S, Sauer F. 2002. In vitro assays to study protein ubiquitination in transcription. *Methods* 26:233.
103. Pham AD, S. F. 2000. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 289:2357.
104. Li W, N. S., Delcuve GP, Hendzel MJ, Davie JR. 1993. Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J* 296:737.
105. Henry KW, W. A., Lo WS, Duggan LJ, Emre NC, Kao CF, Pillus L, Shilatifard A, Osley MA, Berger SL. 2003. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17:2648.
106. Nishioka K, C. S., Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D. 2002. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16:479.
107. Lo WS, T. R., Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* 5.
108. Cheung P, A. C., Sassone-Corsi P. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103:263.
109. Sun ZW, A. C. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* 418:104.
110. Briggs SD, X. T., Sun ZW, Caldwell JA, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD, Strahl BD. 2002. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* 418:498.
111. Sheiness D, F. L., Bishop JM. 1978. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol* 28:600.
112. Nau, M. M., B. J. Brooks, J. Battey, E. Sausville, A. F. Gazdar, I. R. Kirsch, O. W. McBride, V. Bertness, G. F. Hollis, and J. D. Minna. 1985. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318:69.
113. Kohl, N. E., N. Kanda, R. R. Schreck, G. Bruns, S. A. Latt, F. Gilbert, and F. W. Alt. 1983. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35:359.
114. Bull JJ, M.-R. S., Patel SV, Chronnell CM, McKay IA, Philpott MP. 2001. Contrasting localization of c-Myc with other Myc superfamily transcription factors in the human hair follicle and during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol* 116:617.
115. Schreiber-Agus, N., D. Stein, K. Chen, J. S. Goltz, L. Stevens, and R. A. DePinho. 1997. *Drosophila* Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1235.
116. Henriksson, M., and B. Luscher. 1996. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68:109.

117. Gallant, P., Y. Shiio, P. F. Cheng, S. M. Parkhurst, and R. N. Eisenman. 1996. Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* 274:1523.
118. Nilsson JA, C. J. 2003. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*:9007.
119. Gerbitz A, M. J., Geltinger C, Hörtnagel K, Christoph B, Asenbauer H, Klobeck G, Polack A, Bornkamm GW. 1999. Deregulation of the proto-oncogene c-myc through t(8;22) translocation in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 18:1745.
120. Nesbit, C. E., J. M. Tersak, and E. V. Prochownik. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18:3004.
121. Yeh E, C. M., Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn WC, Stukenberg PT, Shenolikar S, Uchida T, Counter CM, Nevins JR, Means AR, Sears R. 2004. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* 6:308.
122. Yano, T., C. A. Sander, H. M. Clark, M. V. Dolezal, E. S. Jaffe, and M. Raffeld. 1993. Clustered mutations in the second exon of the *myc* gene in sporadic Burkitt's lymphomas. *Oncogene* 8:2741.
123. Symonds G, H. A., Kennewell A, O'Mara MA, Bruskin A, Bishop JM. 1989. Transformation of murine myelomonocytic cells by *myc*: point mutations in v-*myc* contribute synergistically to transforming potential. *Oncogene* 4:285.
124. Bhatia, K., K. Huppi, G. Spangler, D. Siwarski, R. Iyer, and I. Magrath. 1993. Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphomas and mouse plasmacytomas. *Nature genetics* 5:56.
125. Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James, and R. N. Eisenman. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:653.
126. Kelly K, C. B., Stiles CD, Leder P. 1983. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35:603.
127. Almendral JM, S. D., Macdonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. 1988. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 8:2140.
128. Facchini, L. M., and L. Z. Penn. 1998. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* 12:633.
129. Barone, M. V., and S. A. Courtneidge. 1995. Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase- inactive Src. *Nature* 378:509.
130. Eilers, M., S. Schirm, and J. M. Bishop. 1991. The Myc protein activates transcription of the α -prothymosin gene. *EMBO J.* 10:133.
131. Roussel, M. F., J. L. Cleveland, S. A. Shurtleff, and C. J. Sherr. 1991. Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling. *Nature* 353:361.
132. Wu S, C. C., Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG. 2003. Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene.* 22:351.
133. Yang W, S. J., Wu M, Arsura M, FitzGerald M, Suldan Z, Kim DW, Hofmann CS, Pianetti S, Romieu-Mourez R, Freedman LP, Sonenshein GE. 2001. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 20:1688.
134. Staller, P., K. Peukert, A. Kiermaier, J. Seoane, J. Lukas, H. Karsunky, T. Moroy, J. Bartek, J. Massague, F. Hanel, and M. Eilers. 2001. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3:392.

-
135. Stone, J., T. de Lange, G. Ramsay, E. Jakobovits, J. M. Bishop, H. Varmus, and W. Lee. 1987. Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* 7:1697.
 136. Land H, P. L., Weinberg RA. 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304:596.
 137. Haas K, J. C., Geisen C, Schmidt T, Karsunky H, Blass-Kampmann S, Obe G, Mööröy T. 1997. Malignant transformation by cyclin E and Ha-Ras correlates with lower sensitivity towards induction of cell death but requires functional Myc and CDK4. *Oncogene* 15:2615.
 138. Vaux DL, C. S., Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440.
 139. Pelengaris, S., B. Rudolph, and T. Littlewood. 2000. Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:100.
 140. Pelengaris, S., T. Littlewood, M. Khan, G. Elia, and G. Evan. 1999. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3:565.
 141. Felsher, D. W., and J. M. Bishop. 1999. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3940.
 142. Adhikary S, E. M. 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:635.
 143. Prendergast, G. C. 1999. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18:2967.
 144. Zindy F, E. C., Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12:2424.
 145. Barrett J, B. M., Kato GJ, Dosaka-Akita H, Dang CV. 1992. Activation domains of L-Myc and c-Myc determine their transforming potencies in rat embryo cells. *Mol Cell Biol* 12:3130.
 146. Bar-Ner M, M. L., Cultraro CM, Birrer MJ, Segal S. 1992. Regions within the c-Myc protein that are necessary for transformation are also required for inhibition of differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cell Growth Differ* 3:183.
 147. Kato, G. J., J. Barrett, M. Villa-Garcia, and C. V. Dang. 1990. An amino-terminal c-Myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol. Cell. Biol.* 10:5914.
 148. Oster SK, M. D., Kennedy J, Penn LZ. 2003. Functional analysis of the N-terminal domain of the Myc oncoprotein. *Oncogene* 22:1998.
 149. Sears, R., F. Nuckolls, E. Haura, Y. Taya, K. Tamai, and J. R. Nevins. 2000. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14:2501.
 150. Amin C, W. A., Hay N. 1993. Sequence-specific transcriptional activation by Myc and repression by Max. *Mol Cell Biol.* 1993 Jan;13(1):383-90 13:383.
 151. Li LH, N. C., Prendergast G, MacGregor D, Ziff EB. 1994. c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J* 13:4070.
 152. Nikiforov MA, C. S., Park J, Kotenko I, Matheos D, Johnsson A, McMahon SB, Cole MD. 2002. Free in PMC
- TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol Cell Biol* 22:5054.

153. Herbst A, H. M., Tworkowski KA, Salghetti SE, Lowe SW, Tansey WP. 2005. A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* 6.
154. Dang CV, L. W. 1988. Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 8:4048.
155. Littlewood TD, A. B., Land H, Evan GI. 1992. Max and c-Myc/Max DNA-binding activities in cell extracts. *Oncogene* 7:1783.
156. Blackwood, E. M., and R. N. Eisenman. 1991. Max: A helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251:1211.
157. Amati, B., M. W. Brooks, N. Levy, T. D. Littlewood, G. I. Evan, and H. Land. 1993a. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72:233.
158. Amati, B., T. D. Littlewood, G. I. Evan, and H. Land. 1993b. The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J.* 12:5083.
159. McMahon, S. B., M. A. Wood, and M. D. Cole. 2000. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* 20:556.
160. Frank SR, P. T., Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B. 2003. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 4:575.
161. Amati, B., S. R. Frank, D. Donjerkovic, and S. Taubert. 2001. Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1471:M135.
162. Sommer, A., S. Hilfenhaus, A. Menkel, E. Kremmer, C. Seiser, P. Loidl, and B. Luscher. 1997. Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase activity. *Curr Biol* 7:357.
163. Laherty, C. D., W. M. Yang, J. M. Sun, J. R. Davie, E. Seto, and R. N. Eisenman. 1997. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89:349.
164. Hassig, C. A., T. C. Fleischer, A. N. Billin, S. L. Schreiber, and D. E. Ayer. 1997. Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 89:341.
165. Lahoz EG, X. L., Schreiber-Agus N, DePinho RA. 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.
166. 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.
167. Zeller KI, Z. X., Lee CW, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, Ooi HS, Orlov YL, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Kuznetsov VA, Sung WK, Ruan Y, Dang CV, Wei CL. 2006. Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17834.
168. Zeller KI, J. A., Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV. 2003. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol* 4:R69.
169. Watson JD, O. S., Shago M, Khosravi F, Penn LZ. 2002. Identifying genes regulated in a Myc-dependent manner. *J Biol Chem* 277:36921.

-
170. Schuldiner O, B. N. 2001. A DNA microarray screen for genes involved in c-MYC and N-MYC oncogenesis in human tumors. *Oncogene* 20:4984.
 171. Patel JH, L. A., Showe MK, Showe LC, McMahon SB. 2004. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 4:562.
 172. Orian A, v. S. B., Delrow J, Bussemaker HJ, Li L, Sawado T, Williams E, Loo LW, Cowley SM, Yost C, Pierce S, Edgar BA, Parkhurst SM, Eisenman RN. 2003. Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev* 17:1101.
 173. O'Connell BC, C. A., Simkevich CP, Tam W, Ren X, Mateyak MK, Sedivy JM. 2003. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* 278:12563.
 174. Menssen A, H. 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.
 175. Mao DY, W. J., Yan PS, Barsyte-Lovejoy D, Khosravi F, Wong WW, Farnham PJ, Huang TH, Penn LZ. 2003. Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* 13:882.
 176. Fernandez PC, F. S., Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B. 2003. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17:1115.
 177. Bernard S, E. M. 2006. Control of cell proliferation and growth by Myc proteins. *Results Probl Cell Differ* 42:329.
 178. O'Donnell KA, W. E., Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435:839.
 179. Oster SK, H. C., Soucie EL, Penn LZ. 2002. The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv Cancer Res* 84:81.
 180. Hateboer G, T. H., Rustgi AK, Billaud M, van 't Veer LJ, Bernards R. 1993. TATA-binding protein and the retinoblastoma gene product bind to overlapping epitopes on c-Myc and adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8489.
 181. McMahon, S. B., H. A. Van Buskirk, K. A. Dugan, T. D. Copeland, and M. D. Cole. 1998. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94:363.
 182. Vervoorts J, L.-F. J., Rottmann S, Lilischkis R, Walsemann G, Dohmann K, Austen M, Lüscher B. 2003. Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4:484.
 183. Bouchard, C., O. Dittrich, A. Kiermaier, K. Dohmann, A. Menkel, M. Eilers, and B. Luscher. 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.
 184. Knoepfler PS, Z. X., Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN. 2006. Myc influences global chromatin structure. *EMBO J* 25:2723.
 185. Wu CH, v. R. J., Yetil A, Fan AC, Bachireddy P, Felsher DW. 2007. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13028.
 186. Guccione E, M. F., Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, Zardo G, Nervi C, Bernard L, Amati B. 2006. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 8.

187. Zippo A, D. R. A., Serafini R, Oliviero S. 2007. PIM1-dependent phosphorylation of histone H3 at serine 10 is required for MYC-dependent transcriptional activation and oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 9:932.
188. van Lohuizen M, V. S., Scheijen B, Wientjens E, van der Gulden H, Berns A. 1992. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65:737.
189. Cheng, S. W. G., K. P. Davies, E. Yung, R. J. Beltran, J. Yu, and G. V. Kalpana. 1999. c-Myc interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for activation function. *Nat Genet* 22:102.
190. von der Lehr N, J. S., Wu S, Bahram F, Castell A, Cetinkaya C, Hydbring P, Weidung I, Nakayama K, Nakayama KI, Söderberg O, Kerppola TK, Larsson LG. 2003. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* 11:1189.
191. Adhikary S, M. F., Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M. 2005. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123:409.
192. Claassen, G. F., and S. R. Hann. 1999. Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene* 18:2925.
193. Judware R, C. L. 1995. Over-expression of transfected N-myc oncogene in human SKNSH neuroblastoma cells down-regulates expression of beta 1 integrin subunit. *Oncogene* 11:2599.
194. Freytag SO, G. T. 1992. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* 256:379.
195. Antonson P, P. M., Jacobsson A, Xanthopoulos KG. 1995. Myc inhibits CCAAT/enhancer-binding protein alpha-gene expression in H1B-1B hibernoma cells through interactions with the core promoter region. *Eur J Biochem* 232:397.
196. Herold S, W. M., Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaioja J, Saluz HP, Haenel F, Eilers M. 2002. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* 10:509.
197. Penn LJ, B. M., Laufer EM, Land H. 1990. Negative autoregulation of c-myc transcription. *EMBO J* 9:1113.
198. Marhin WW, H. Y., Chen S, Jiang Z, Gallie BL, Phillips RA, Penn LZ. 1996. Loss of Rb and Myc activation co-operate to suppress cyclin D1 and contribute to transformation. *Oncogene* 12:43.
199. Lee LA, D. C., Barrett J, Wu CS, Dang CV. 1996. A link between c-Myc-mediated transcriptional repression and neoplastic transformation. *J Clin Invest* 97:1687.
200. Collier, H. A., C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E. S. Lander, R. N. Eisenman, and T. R. Golub. 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.
201. Marhin WW, C. S., Facchini LM, Fornace AJ Jr, Penn LZ. 1997. Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene* 14:2825.
202. Gery S, K. H. 2003. Repression of the TMEFF2 promoter by c-Myc. *J Mol Biol* 328:977.
203. Wanzel M, H. S., Eilers M. 2003. Transcriptional repression by Myc. *Trends Cell Biol* 14:146.

-
204. Peukert, K., P. Staller, A. Schneider, G. Carmichael, F. Hänel, and M. Eilers. 1997. An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J.* 16:5672.
205. Brenner C, D. R., Didelot C, Lorient A, Viré E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L, Fuks F. 2005. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* 24:336.
206. Goodman, R. H., and S. Smolik. 2000. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14:1553.
207. Chan, H. M., and N. B. La Thangue. 2001. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* 114:2363.
208. Zeng L, Z. M. 2002. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513:124.
209. Nightingale KP, W. R., Sogo JM, Becker PB. 1998. Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila* hsp26 gene in chromatin. *EMBO J* 17:2865.
210. Chen H, L. R., Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90:569.
211. Yao TP, K. G., Zhou N, Scully R, Livingston DM. 1996. The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10626.
212. Zhang K, F. F., Martinez E. 2005. Six lysine residues on c-Myc are direct substrates for acetylation by p300. *Biochem Biophys Res Commun* 336:274.
213. Fu M, W. C., Zhang X, Pestell RG. 2004. Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 68:1199.
214. Tomita A, T. M., Tsuzuki S, Hayakawa F, Kosugi H, Tamai K, Miyazaki T, Kinoshita T, Saito H. 2000. c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene* 19:444.
215. Martínez-Balbás MA, B. U., Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 19:662.
216. Ceseña TI, C. J., Kwok R, Schwartz J. 2007. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription. *J Biol Chem* 282:956.
217. Bouras T, F. M., Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, Hay RT, Gu W, Pestell RG. 2005. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem* 280:10264.
218. Grozinger CM, S. S. 2002. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 9:3.
219. Michishita E, P. J., Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. 2005. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16:4623.
220. Frye, R. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 273:793.
221. Luo J, N. A., Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107:137.
222. Vaziri H, D. S., Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107:149.

-
223. Afshar G, M. J. 1999. Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae* SIR2. *Genes Dev* 234:161.
224. Shore D, S. M., Nasmyth KA. 1984. Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J* 3:2817.
225. Kaerberlein M, M. M., Guarente L. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13:2570.
226. Rine J, H. I. 1987. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116:9.
227. Ivy JM, K. A., Hicks JB. 1986. Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6:688.
228. Palladino F, L. T., Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM. 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* 75:543.
229. Smith JS, B. J. 1997. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev* 11:241.
230. Shore, D. The Sir2 protein family: A novel deacetylase for gene silencing and more. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14030.
231. Mills KD, S. D., Guarente L. 1999. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 97:609.
232. Reid RJ, R. R. 2004. Stay close to your sister. *Mol Cell* 14:418.
233. Bitterman KJ, A. R., Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. 2002. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 277:45099.
234. Sinclair DA, L. S., Guarente L. 2006. Life-span extension in yeast. *Science* 312:195.
235. Bitterman KJ, M. O., Sinclair DA. 2003. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:376.
236. Lin SJ, K. M., Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, Fink GR, Guarente L. 2002. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418:344.
237. Guarente, L. 2001. SIR2 and aging--the exception that proves the rule. *Trends Genet.* 17:391.
238. Dryden SC, N. F., Nowak JE, Goustin AS, Tainsky MA. 2003. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:3173.
239. Vaquero A, S. M., Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. 2004. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 16:93.
240. Frye, R. 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 260:273.
241. Blander G, G. L. 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73:417.
242. Senawong T, P. V., Leid M. 2005. BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch Biochem Biophys* 434:316.

-
243. Pruitt K, Z. R., Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. 2006. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2:e40.
244. Ranallo RT, S. K., Stargell LA. 1999. A TATA-binding protein mutant defective for TFIIID complex formation in vivo. *Mol Cell Biol* 19:3951.
245. Muth V, N. S., Grummt I, Voit R. 2001. Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *EMBO J* 20:1353.
246. McKinsey TA, Z. C., Olson EN. 2001. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* 11:497.
247. Fulco M, S. R., Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V. 2003. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* 12:51.
248. Zhao X, S. T., Bolger TA, Evans RM, Yao TP. 2005. Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol* 25:8456.
249. Sartorelli V, P. P. 2001. The link between chromatin structure, protein acetylation and cellular differentiation. *Front Biosci* 6:D1024.
250. Smith, J. 2002. Human Sir2 and the 'silencing' of p53 activity. *Trends Cell Biol* 12:404.
251. Langley E, P. M., Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21:2383.
252. Lombard DB, C. K., Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW. 2005. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120:497.
253. Bode AM, D. Z. 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4:793.
254. Brooks CL, G. W. 2003. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 15:164.
255. Chen WY, W. D., Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. 2005. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123:437.
256. Solomon JM, P. R., Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, Huber LJ. 2006. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol* 26:28.
257. Prives C, M. J. 2001. Why is p53 acetylated? *Cell* 107:815.
258. Kamel C, A. M., Jardine K, He X, McBurney MW. 2006. SirT1 fails to affect p53-mediated biological functions. *Aging Cell* 5:81.
259. Langley E, P. M., Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21:2383.
260. Dai JM, W. Z., Sun DC, Lin RX, Wang SQ. 210. SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J Cell Physiol* 210:161.
261. Cohen HY, M. C., Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R, Sinclair DA. 2004. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305:390.

262. Cohen HY, L. S., Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA. 2004. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 13:627.
263. Yamamoto Y, G. R. 2004. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 29:72.
264. Mayo MW, N. J., Baldwin AS. 2001. Ras regulation of NF-kappa B and apoptosis. *Methods Enzymol* 333:73.
265. Karin M, L. A. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221.
266. Ghosh S, K. M. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109.
267. Yeung F, H. J., Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23:2369.
268. Wang C, C. L., Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y, Nemoto S, Finkel T, Gu W, Cress WD, Chen J. 2006. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 8:1025.
269. Yang Y, H. H., Haller EM, Nicosia SV, Bai W. 2005. Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *Embo J* 24:1021.
270. Nemoto S, F. M., Finkel T. 2004. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* 306:2105.
271. Brunet A, S. L., Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303:2011.
272. van der Horst A, T. L., de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM. 2004. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem* 279:28873.
273. Kobayashi Y, F.-H. Y., Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N. 2005. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* 16:237.
274. Greer EL, B. A. 2005. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24:7410.
275. Burgering BM, K. G., Abstract, C. c. a. d. c. I. I. Forkheads., and T. B. S. Jul;27(7):352-60. 2002. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* 27:352.
276. Morris, B. 2005. A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. *J Hypertens* 23:1285.
277. Tissenbaum HA, G. L. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410:227.
278. Cheng HL, M. R., Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF. 2003. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10794.
279. McBurney MW, Y. X., Jardine K, Bieman M, Th'ng J, Lemieux M. 2003. The absence of SIR2alpha protein has no effect on global gene silencing in mouse embryonic stem cells. *Mol Cancer Res* 1:402.

-
280. Huffman DM, G. W., Bamman MM, Kim JS, Eltoum IA, Elgavish A, Nagy TR. 2007. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res* 67:6612.
281. Caldas C, A. S. 1999. Cell memory and cancer--the story of the trithorax and Polycomb group genes. *Cancer Metastasis Rev* 18:313.
282. Mannervik, M. 1999. Target genes of homeodomain proteins. *Bioessays* 21:267.
283. Grimaud C, N. N., Cavalli G. 2006. From genetics to epigenetics: the tale of Polycomb group and trithorax group genes. *Chromosome Res* 14:363.
284. Sewalt RG, L. M., Vargas M, Hamer KM, den Blaauwen JL, Hendrix T, Melcher M, Schweizer D, Jenuwein T, Otte AP. 2002. Selective interactions between vertebrate polycomb homologs and the SUV39H1 histone lysine methyltransferase suggest that histone H3-K9 methylation contributes to chromosomal targeting of Polycomb group proteins. *Mol Cell Biol* 22:5539.
285. Beltran S, B. E., Serras F, Pérez-Villamil B, Guigó R, Artavanis-Tsakonas S, Corominas M. 2003. Transcriptional network controlled by the trithorax-group gene ash2 in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3293.
286. Shearn, A., T. Rice, A. Garen, and W. Gehring. 1971. Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:2594.
287. LaJeunesse D, S. A. 1995. Trans-regulation of thoracic homeotic selector genes of the Antennapedia and bithorax complexes by the trithorax group genes: absent, small, and homeotic discs 1 and 2. *Mech Dev* 53:123.
288. Adamson, A. L., and A. Shearn. 1996. Molecular genetic analysis of *Drosophila ash2*, a member of the trithorax group required for imaginal disc pattern formation. *Genetics* 144:621.
289. Aasland, R., T. J. Gibson, and A. F. Stewart. 1995. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 20:56.
290. Cheng MK, S. A. 2004. The direct interaction between ASH2, a *Drosophila* trithorax group protein, and SKTL, a nuclear phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, implies a role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in maintaining transcriptionally active chromatin. *Genetics* 167:1213.
291. Ikegawa, S., M. Isomura, Y. Koshizuka, and Y. Nakamura. 1999. Cloning and characterization of ASH2L and Ash2l, human and mouse homologs of the *Drosophila ash2* gene. *Cytogenet Cell Genet* 84:167.
292. Wang, J., Y. Zhou, B. Yin, G. Du, X. Huang, G. Li, Y. Shen, J. Yuan, and B. Qiang. 2001b. ASH2L: alternative splicing and downregulation during induced megakaryocytic differentiation of multipotential leukemia cell lines. *J Mol Med* 79:399.
293. Li H, I. S., Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442:91.
294. Peña PV, D. F., Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG. 2006. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* 442:100.
295. Iwase S, L. F., Bayliss P, de la Torre-Ubieta L, Huarte M, Qi HH, Whetstine JR, Bonni A, Roberts TM, Shi Y. 2007. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell* 128:1077.
296. Lüscher-Firzlaff J, G. I., Vervoorts J, Kapelle K, Braunschweig T, Walsemann G, Rodgarkia-Schamberger C, Schuchlantz H, Dreschers S, Kremmer E, Lilischkis R,

- Cerni C, Wellmann A, Lüscher B. 2008. The human trithorax protein hASH2 functions as an oncoprotein. *Cancer Res* 68:749.
297. Nislow, C., E. Ray, and L. Pillus. 1997. SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Mol Biol Cell* 8:2421.
298. Roguev, A., D. Schaft, A. Shevchenko, W. W. Pijnappel, M. Wilm, R. Aasland, and A. F. Stewart. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *Embo J* 20:7137.
299. Nagy PL, G. J., Kornberg RD, Cleary ML. 2002. A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:90.
300. Wysocka J, M. T., Allis CD. 2005. Taking LSD 1 to a new high. *Cell* 122:654.
301. Steward MM, L. J., O'Donovan A, Wyatt M, Bernstein BE, Shilatifard A. 2006. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13:852.
302. Yokoyama A, W. Z., Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML. 2004. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 24:5639.
303. Xia ZB, A. M., Diaz MO, Zeleznik-Le NJ. 2003. MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8342.
304. Scacheri PC, D. S., Odom DT, Crawford GE, Perkins S, Halawi MJ, Agarwal SK, Marx SJ, Spiegel AM, Meltzer PS, Collins FS. 2006. Genome-wide analysis of menin binding provides insights into MEN1 tumorigenesis. *PLoS Genet* 2:e51.
305. Lee S, L. D., Dou Y, Lee J, Lee B, Kwak E, Kong YY, Lee SK, Roeder RG, Lee JW. 2006. Coactivator as a target gene specificity determinant for histone H3 lysine 4 methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15392.
306. Lee S, L. J., Lee SK, Lee JW. 2008. ASC-2 IS AN ESSENTIAL ADAPTOR TO RECRUIT HISTONE H3 LYSINE 4 METHYLTRANSFERASES MLL3 AND MLL4 TO THE LIVER X RECEPTORS. *Mol Endocrinol Epub ahead of print*.
307. Cho YW, H. T., Hong S, Guo H, Yu H, Kim D, Guszczynski T, Dressler GR, Copeland TD, Kalkum M, Ge K. 2007. PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J Biol Chem* 282:20395.
308. Hong S, C. Y., Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. 2007. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18439.
309. Agger K, C. P., Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K. 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449:731.
310. Lan F, B. P., Rinn JL, Whetstine JR, Wang JK, Chen S, Iwase S, Alpatov R, Issaeva I, Canaani E, Roberts TM, Chang HY, Shi Y. 2007. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* 449:689.
311. Lee MG, V. R., Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhata R. 2007. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* 318:447.

312. Dou Y, M. T., Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J, Allis CD, Chait BT, Hess JL, Roeder RG. 2005. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* 121:873.
313. Wysocka J, M. M., Laherty CD, Eisenman RN, Herr W. 2003. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev.* 17:896.
314. Tyagi S, C. A., Wysocka J, Herr W. 2007. E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* 27:107.
315. Narayanan A, R. W., Kristie TM. 2007. The coactivator host cell factor-1 mediates Set1 and MLL1 H3K4 trimethylation at herpesvirus immediate early promoters for initiation of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10835.
316. Milne TA, H. C., Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepf RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D, Hua X, Roeder RG, Meyerson M, Hess JL. 2005. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:749.
317. Hughes CM, R.-R. O., Milne TA, Copeland TD, Levine SS, Lee JC, Hayes DN, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Biondi CA, Kay GF, Hayward NK, Hess JL, Meyerson M. 2004. Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* 13:587.
318. Demers C, C. C., Ranish JA, Juban G, Lai P, Morle F, Aebersold R, Dilworth FJ, Groudine M, Brand M. 2007. Activator-mediated recruitment of the MLL2 methyltransferase complex to the beta-globin locus. *Mol Cell.* 27:573.
319. Mo R, R. S., Zhu YJ. 2006. Identification of the MLL2 complex as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 281:15714.
320. Firzlauff JM, L. B., Eisenman RN. 1991. Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5187.
321. Snowden AW, A. L., Webster GA, Perkins ND. 2000. A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol* 20:2676.
322. Henriksson M, B. A., Klein G, Lüscher B. 1993. Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. *Oncogene* 8:3199.
323. Blackwell TK, H. J., Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN, Weintraub H. 1993. Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* 13:5216.
324. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
325. Towbin H, S. T., Gordon J. 1989. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27:495.
326. Nordeen, S. 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques.* 6:454.
327. Loidl P, G. P. 1987. Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle: a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements. *Nucleic Acids Res* 15:8351.
328. Borra MT, D. J. 2004. Quantitative assays for characterization of the Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Methods Enzymol* 376:171.

-
329. Wu J, W. S., Potter D, Liu JC, Smith LT, Wu YZ, Huang TH, Plass C. 2007. Diverse histone modifications on histone 3 lysine 9 and their relation to DNA methylation in specifying gene silencing. *BMC Genomics* 8:131.
330. Li Z, V. C. S., Qu C, Cavenee WK, Zhang MQ, Ren B. 2003. A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8164.
331. Kim J, L. J., Iyer VR. 2008. Global identification of Myc target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo. *PLoS ONE* 3:e1798.
332. Zuber J, T. O., Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schäfer R. 2000. A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 24:144.
333. Liu X, T. J., Evrard YA, Dent SY, Martinez E. 2003. c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J Biol Chem* 278:20405.
334. Schuhmacher M, K. F., Hölzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH, Eick D. 2001. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29:397.
335. Chen CH, S. J., Lee WJ, Chow SN. 2005. Overexpression of cyclin D1 and c-Myc gene products in human primary epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 15:878.
336. Ford J, J. M., Milner J. 2005. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res* 65:10457.
337. Stünkel W, P. B., Tan YC, Nayagam VM, Wang X, Salto-Tellez M, Ni B, Entzeroth M, Wood J. 2007. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J* 2:1360.
338. Slany, R. 2005. Chromatin control of gene expression: mixed-lineage leukemia methyltransferase SETs the stage for transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14481.
339. Vermeulen M, M. K., Denissov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M, Timmers HT. 2007. Selective anchoring of TFIIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131:58.

6 ANHANG

6.1 Informationen zu den Tabellen und Abbildungen auf der beigelegten CD:

Auf der CD finden sich Tabellen oder Abbildungen, deren Format zu gross für die schriftliche Ausfertigung sind. Im Text wird auf diese als Anhang verwiesen.

Inhalt der CD: Tabellen A-I; Abb. A , Abb. B

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AB	<i>Antibody</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammonium Persulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BrdU	Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBP	CREB bindendes Protein
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Chip	Microarray
CMV	Cytomegalie-Virus
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modifies Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethlendiamintetraacetat
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GI	<i>Genbank Number</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
Hebs	<i>Hepes Buffered Saline</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N`-2-Ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
HMT	Histon-Methyltransferase
HS	Hochsalz
HS	<i>Horse Serum</i>
IE	<i>immediate early</i>
Ig	Immunglobulin
INR	Initiator-Element
IPTG	b-D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LZ	Leucin- <i>Zipper</i>
MB	Myc-Box
MBP	Maltose-bindendes Protein
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
mRNA	Boten-RNA
NAM	Nikotinamid

NCBI	National Center of Biotechnology Information
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenylgalactopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RZPD	Resource Center/ Primary Database
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SID	Sin3-Interaktionsdomäne
SV40	Simian Virus 40
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBP	TATA-Box bindendes Protein
Tet	Tetrazyklin
TK	Thymidinkinase
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A
v/v	Volumen pro Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht pro Volumen-Verhältnis
wt	Wildtyp
ZK	Zellkultur

6.3 Veröffentlichungen

Publikationen in wissenschaftlichen Journalen:

Lüscher-Firzlaff, J., Gawlista, I., Vervoorts, J., Kapelle, K., Braunschweig, T., Walsemann, G., Rodgarkia-Schamberger, C., Schuchlantz, H., Dreschers, S., Kremmer, E., Lilischkis, R., Cerni, C., Wellmann, A., and Lüscher B. (2008). The human trithorax protein hASH2 functions as an oncoprotein. *Cancer Res* 68(3): 749-58.

Antje Menssen, Karsten Kapelle, Joachim Diebold, Per Hydbring, Walter Pretsch, Georg W. Bornkamm, Lars-Gunnar Larsson, Bernhard Lüscher and Heiko Hermeking. Functional and physical interactions between c-MYC and SIRT1. (In Vorbereitung)

6.4 Lebenslauf

Name, Vorname: Kapelle, Karsten
Geburtsdatum: 08.06.1971
Geburtsort: Berlin
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung und Studium

1977-1981 Besuch der Erich-Kästner Grundschule Grevenbroich
1981-1990 Besuch des Pascal-Gymnasiums Grevenbroich
1991-2003 Studium der Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
2002-2003 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

(Prof. Dr. B. Lüscher)

Thema: Identifizierung und Charakterisierung von hAsh2-interagierenden Faktoren

2004-2008 Promotion am Institut für Biochemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (Prof. Dr. B. Lüscher)

6.5 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 verwendethabe. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Karsten Kapelle

Aachen, den 22.5.2008

6.6 Danksagung

Ich möchte allen danken, die auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

In besonderer Weise bin ich Prof. Bernhard Lüscher zu Dank verpflichtet, der mir dieses interessante Projekt übertragen hat und der mich stets in seiner positiven und begeisternden Art motiviert hat. Dr. Christoph Peterhänsel danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Für die gute Atmosphäre beim Arbeiten, wissenschaftlichen Austausch und vieles mehr bedanke ich mich bei den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Lüscher: Dr. Poornima Basavarajaiah, Kathrin Borggrebe, Anne Braczynski, Stefan Brüning, Elena Buerova, Heike Chauvistre, Christian Cornelissen, Dr. Stefan Dreschers, Isabella Gawlista, Andrea Graf, Nadine Hein, Britta Jedamzik, Dr. Kan Jiang, Angelina Kriescher, Dr. Richard Lilischkis, Ulrike Linzen, Dr. Juliane Lüscher-Firzlaff, Gabriele Lützeler, Larissa Milke, Elke Meyer, Katrin Montzka, Alexandra Neuss, Dr. Ruwin Pandithage, Krischen Ray, Marcel Robbertz, Jens Schirmacher, Anne Schröder, Vera Schumacher, Mikola Seeliger, Jürgen Stahl, Angelika Szameit, Susanne Waibel, Dr. Gesa Walsemann, Alexandra Wolf, Dr. Jörg Vervoorts-Weber, Dr. Mei Yu.

und ein extra Danke an Steffi!!

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während der Studienzeit in vielerlei Hinsicht unterstützt haben, meinen Freunden und den Jungs vom Fuppes. Besonderer Dank gilt Oliver Specht, der bei der Programmierung der Skripte eine grosse Hilfe war.

....und einen riesen Kuss für Ulli!!!