

Adolf-Butenandt-Institut für Molekularbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. P. B. Becker

**Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des
Proto-Onkogens *c-myc***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Christoph Lux

aus

Bamberg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-G. Klobeck
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Steinlein
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Bartels Priv. Doz. Dr. R. Huss
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. D. Eick
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	13. 10. 2005

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel erarbeitet.

München, Freitag 7. Januar 2005

Christoph Lux

Für meine Eltern

Ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre

1	Einleitung	- 4 -
1.1	Bedeutung von Onkogenen in der Tumorbologie	- 4 -
1.2	Das Onkogen c-myc	- 5 -
1.2.1	Struktur des MYC-Proteins	- 6 -
1.2.2	Myc kodiert für einen Transkriptionsfaktor	- 7 -
1.2.3	Myc und Chromatin-Remodelling	- 8 -
1.3	Einfluss von Myc auf Zellwachstum, Proliferation und Apoptose	- 9 -
1.4	C-myc und Tumorentstehung	- 11 -
1.5	Mechanismen der myc-Aktivierung in Tumoren	- 12 -
1.6	Transkriptionelle Regulation von c-myc	- 13 -
1.6.1	Das RNA-Polymerase II-Holoenzym	- 14 -
1.6.1.1	Die carboxyterminale Domäne der großen Untereinheit (CTD)	- 14 -
1.6.1.2	Die CTD während des Transkriptionszyklus	- 15 -
1.6.2	Genexpression und Chromatin-Remodelling	- 17 -
1.6.3	Regulative Elemente des <i>c-myc</i> -Promotors	- 17 -
1.7	Konditionale Expression von Polymerase-Mutanten	- 18 -
1.8	Fragestellung	- 18 -
2	Material und Methoden	- 19 -
2.1	Materialien	- 19 -
2.1.1	Chemikalien	- 19 -
2.1.2	Geräte	- 19 -
2.1.3	Radioaktive Isotope	- 20 -
2.1.4	Enzyme	- 20 -
2.1.5	Antikörper	- 20 -
2.1.6	Puffer und Lösungen	- 20 -
2.1.7	Kits und Verbrauchsmaterialien	- 22 -
2.1.8	Oligonukleotide	- 23 -
2.1.8.1	Primer des <i>c-myc</i> -Promotors	- 23 -
2.1.8.2	Primer des <i>id3</i> -Promotors (HS15005)	- 23 -
2.1.8.3	Primer des <i>rfa4</i> -Promotors (AC009863)	- 23 -
2.1.8.4	Primer des Insulin-Gens	- 23 -
2.2	Methoden	- 24 -
2.2.1	Zellkultur	- 24 -
2.2.1.1	Zelllinien	- 24 -

2.2.1.2	Kultivierung von Raji-Zellen	- 24 -
2.2.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	- 24 -
2.2.1.4	Aufbewahrung von Zellen	- 25 -
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 25 -
2.2.3	Fällung von Nukleinsäuren	- 25 -
2.2.4	Phenolextraktion	- 26 -
2.2.5	Dephosphorylierung von DNA-Größenstandards	- 26 -
2.2.6	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	- 26 -
2.2.6.1	Markierung nach der „random primed labeling“-Methode	- 26 -
2.2.6.2	Markierung mit der Klenow-Polymerase	- 27 -
2.2.6.3	Radioaktive Endmarkierung von DNA-Größenstandards	- 27 -
2.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Western-Blot)	- 27 -
2.2.8	Immunpräzipitation	- 28 -
2.2.8.1	Lyse	- 28 -
2.2.8.2	Preclearing	- 28 -
2.2.8.3	Immunpräzipitation	- 29 -
2.2.9	Chromatin-Immunpräzipitation (nach Farnham-Lab)	- 29 -
2.2.9.1	Herstellung von Staph.-A-Zellen	- 29 -
2.2.9.2	Crosslink mit Formaldehyd	- 30 -
2.2.9.3	Kernpräparation	- 30 -
2.2.9.4	Sonifizierung	- 30 -
2.2.9.5	Immunpräzipitation (IP)	- 30 -
2.2.9.6	Elution der Proteine und Reversion der Crosslinks	- 31 -
2.2.9.7	Verdau der Proteine und Fällung der DNA	- 31 -
3	Ergebnisse	- 33 -
3.1	Etablierung einer Chromatin-Immunpräzipitation	- 33 -
3.1.1	Übersicht über die Technik der Chromatin-IP	- 33 -
3.1.2	Die Chemie des Crosslinks	- 34 -
3.1.3	Technische Herausforderungen der Chromatin-IP	- 35 -
3.1.3.1	Dauer des Crosslinks und Einfluss auf das Antikörper-Epitop	- 35 -
3.1.3.2	Die Elution der Proteine funktioniert vollständig	- 35 -
3.1.4	Konditionale Expression von CTD-Mutanten	- 37 -
3.1.5	Expression der RNA-Polymerase II-Mutanten	- 39 -
3.2	Immunpräzipitation der rekombinaten RNA-Polymerase II	- 41 -

3.3	Das HA-Epitop ist nach dem X-Link zugänglich	- 43 -
3.4	Chromatin-IP von E2F-1 (“proof of principle”).....	- 45 -
3.5	Raji LS* Δ5 bindet am <i>c-myc</i>-Promotor	- 47 -
3.6	Die präzipitierte DNA zeigt keine Anreicherung des Insulin-Gens.....	- 51 -
4	Diskussion	- 53 -
4.1	Die initiationskompetente RNA-Polymerase II	- 53 -
4.1.1	Die CTD als dynamisch agierende β -Spirale	- 53 -
4.1.2	Rpb4 und Rpb7 als Brücke zwischen CTD und rekrutierten Faktoren..	- 54 -
4.2	Fehlende Phosphorylierung als Ursache für den Transkriptionsblock... - 56 -	
4.2.1	TFIIH und TFIIIE - gestörte Kommunikation mit der Δ -5 Mutante	- 56 -
4.2.2	CTD-Phosphorylierung durch Cdk7 ist nicht mehr möglich	- 57 -
4.2.3	P-TEFb und Cdk9	- 58 -
5	Appendix	- 60 -
5.1	Chromatin-Immünpräzipitation und Microarrays.....	- 60 -
5.2	Der Promotor-Chip von MWG	- 61 -
5.2.1	Testchip für Hybridisierungen.....	- 61 -
5.2.2	Oligonukleotide auf dem Test-Chip	- 62 -
5.2.3	Hybridisierungsprotokoll auf einem „Promotor-Chip“ von MWG™	- 63 -
5.2.3.1	Prähybridisierung	- 63 -
5.2.3.2	Hybridisierung	- 64 -
5.2.3.3	Waschen	- 64 -
5.2.4	DNA-Mengen nach High-Prime Markierung.....	- 64 -
5.3	Etablierung eines Hybridisierungs-Protokolls.....	- 64 -
5.3.1	Hybridisierungen mit PCR-Fragmenten	- 64 -
5.3.2	Welche DNA-Menge wurde eingesetzt?	- 66 -
5.3.3	Mögliche Faltung ohne Einfluss auf Signalstärke.....	- 67 -
5.3.4	Die PCR-Zykluszahl wurde variiert.....	- 67 -
5.4	Aktuelle Publikationen belegen den Wert der neuen Technik.....	- 68 -
6	Zusammenfassung.....	- 70 -
7	Literatur.....	- 71 -
8	Lebenslauf.....	- 86 -
9	Danksagung	- 90 -

1 Einleitung

Die Erkrankung an Krebs spielt in unserem Gesundheitssystem eine bedeutende Rolle. Dabei muss man sich aber bewusst machen, dass es die eigenständige Erkrankung „Krebs“ eigentlich nicht gibt. Dies wird durch die Tatsache deutlich, dass heute davon ausgegangen wird, dass die Krebserkrankung durch die Entartung einer einzigen Zelle entsteht. So wird die Krankheit von dem Zelltyp, der Lokalisation und den Schäden auf molekularer Ebene der betroffenen Zelle maßgeblich beeinflusst. Durch die Fortschritte in der Medizin und der Biotechnologie, sowie der Entschlüsselung des menschlichen Genoms sind heute bessere Therapien als noch vor einigen Jahren möglich. Als Beispiel ist die Subklassifizierung diffus-großzelliger B-Zelllymphome zu nennen. Durch Genexpressionsprofile, die mit Hilfe der DNA-Microarray-Technologie erstellt wurden, konnten neue Untergruppen auf molekularer Basis definiert werden, welche unterschiedlich gut auf derzeitige Therapien ansprechen (Alizadeh et al., 2000). So kann in Zukunft die Therapie durch individuelle Analyse des genetischen Hintergrunds eines Tumors besser angepasst werden.

Das Onkogen *c-myc* ist einer der stärksten Aktivatoren der Tumorgenese. Seine Rolle in der Tumoriologie genau zu verstehen, würde ein bedeutender Schritt in der Bekämpfung des Krebses darstellen. Das Ziel die molekularen Hintergründe der Krebsentstehung besser zu durchschauen, möchte ich durch die vorgelegte Dissertation unterstützen.

1.1 Bedeutung von Onkogenen in der Tumoriologie

Die Einhaltung der Homöostase erzwingt bei einem vielzelligen Organismus die genaue Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod. Geht diese Balance verloren, resultiert dies in zahlreichen Fehlfunktionen, welche auch die mögliche Entstehung eines Tumors beinhalten. Die Zelle selbst hat hierzu viele Kontrollsysteme entwickelt, um eine solche Entgleisung der Homöostase zu verhindern. Dies wird unter anderem auch dadurch belegt, dass es meist mehrerer „Schäden“ bedarf, bis sich eine Zelle der Wachstumskontrolle entzieht und in eine maligne Tumorzelle verwandelt (Lengauer et al., 1998). Dieses so genannte Mehrschrittkonzept spielt eine zentrale Rolle für das Verständnis der Krebsentstehung. Danach durchläuft eine Zelle eine Reihe von Veränderungen in ihrem Vermögen zur Proliferation und Differenzierung. Grundlage dieser Veränderungen bildet ein zunehmendes Ungleichgewicht in der Kontrolle von wachstumshemmenden- und stimulierenden Signalen innerhalb der Zelle und in der

Wechselwirkung mit ihrer Umgebung. Viele der dabei ablaufenden komplexen und selektiven Prozesse sind noch nicht verstanden. Die Verfügbarkeit neuer molekularbiologischer Techniken führte zu Lokalisation und Isolierung so genannter Krebsgene, die in die Initiation und Progression menschlicher Tumoren involviert sind. An Hand der Lokalisation ihrer Produkte und ihrer Eigenschaften kann man Onkogene in Klassen einteilen: Wachstumsfaktoren (z.B.: *c-sis*), Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, GTP-bindende Proteine (z.B.: *ras*), Proteinkinasen (z.B.: *c-abl*) und Transkriptionsfaktoren (z.B.: *c-myc*) (Oster et al., 2002). Onkogene sind normale Bestandteile des Genoms von Tieren und Menschen können aber durch Mutationen so geschädigt werden, dass sie ständig aktiv sind. Damit begünstigen sie eine unregulierte Proliferation der betroffenen Zelle und wirken tumorinduzierend. Onkogene spielen somit eine wichtige Rolle in der Wachstumskontrolle einer Zelle und bestimmen damit ihr „Schicksal“.

1.2 Das Onkogen *c-myc*

Die meisten Onkogene wurden über spezifische Trägerviren identifiziert. Ihre Bezeichnung leitet sich auch meist hiervon ab: Das *myc* Onkogen wurde erstmals in dem Hühnerretrovirus MC29 beschrieben (Roussel et al., 1979; Vennstrom et al., 1982) und kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Es stellte sich aber bald heraus, dass *myc* nicht nur im Genom von Hühnern vorkommt, sondern im Genom aller Wirbeltiere, einschließlich des Menschen und für ein nukleäres Phosphoprotein kodiert. Später wurde festgestellt, dass *myc* in bestimmten Tumoren aktiviert ist und sowohl Ausbruch als auch Verlauf der Erkrankung beeinflusst. Obwohl neben *myc* mittlerweile mehr als 70 Onkogene identifiziert sind, ist die detaillierte Funktion ihrer Produkte oft noch unklar. Die Untersuchung von Onkogenen wie *myc* und deren Regulation in der Zelle hilft deshalb ein besseres Verständnis für Tumorentstehung zu entwickeln und mögliche Strategien zu etablieren, die auf eine therapeutische Beeinflussung von Krebserkrankungen hinzielen.

1.2.1 Struktur des MYC-Proteins

Der Aufbau des MYC-Proteins ist schematisch in Abbildung 1 A wiedergegeben. In dem Protein finden sich Motive, welche als „basic-Helix-Loop-Helix“-Domäne und als „Leucine-Zipper“ (bHLHZip) bezeichnet werden und charakteristisch sind für Transkriptionsfaktoren. Sie dienen der Bindung an die DNA und der Interaktion mit anderen Proteinen (Oster et al., 2002). Als ein Durchbruch der Erforschung des MYC-Proteins stellte sich die Entdeckung des Dimerisierungspartners MAX heraus (Blackwood and Eisenman, 1991). Auch bei MAX handelt es sich um ein bHLHZip-Protein, das für zahlreiche Funktionen von MYC unentbehrlich ist. So ist seine Anwesenheit für Transformation, Apoptose und transkriptionelle Aktivierung essentiell (Amati et al., 1992) und für eine normale Entwicklung in der Maus unabdingbar (Shen-Li et al., 2000). Das Heterodimer MYC/MAX bindet DNA spezifisch an Stellen mit einer bestimmten Basenfolge, 5'-CACGTG, die als „Enhancer Box“ (E-Box) bezeichnet wird (Dang et al., 1999; Grandori et al., 2000) (Abbildung 1). Im Aminoende des c-MYC-Proteins finden sich gehäuft die Aminosäuren Glutamin und Prolin. Dies ist typisch für Transaktivierungsdomänen (TAD), wie sie auch in anderen Transkriptionsfaktoren wie SP-1 und VP-16 vorkommen (Oster et al., 2002). In diesem Bereich finden sich auch die für die Transaktivierung von Zielgenen wichtigen Bereiche MYCBoxI (MBI) und MYCBoxII (MBII).

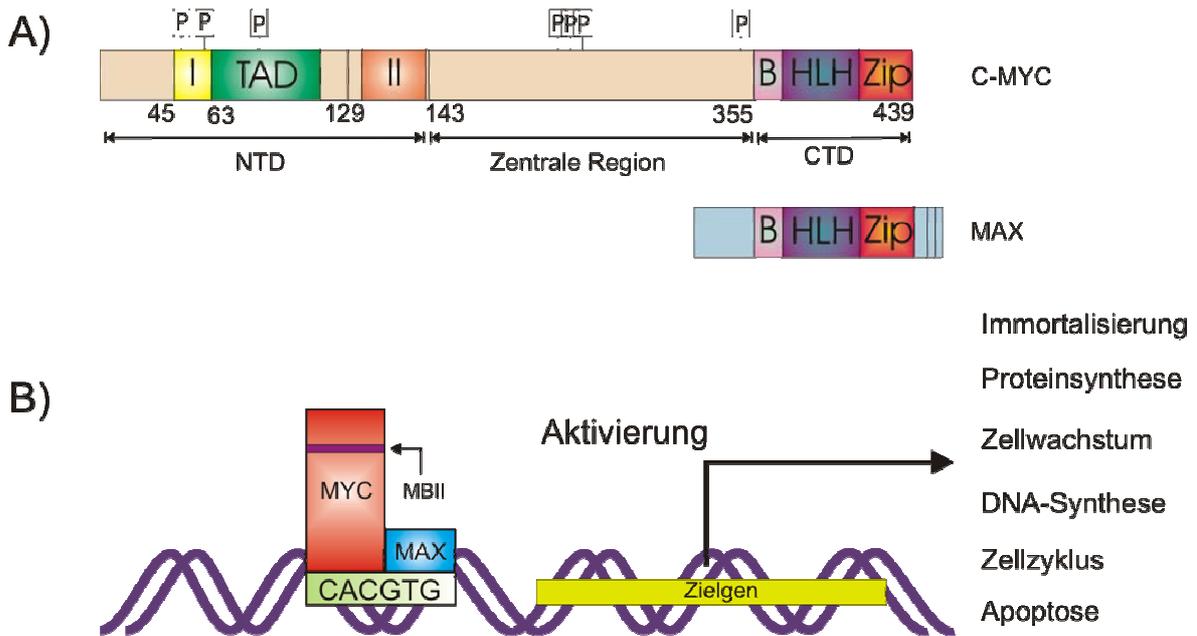


Abbildung 1 Struktur und Funktionsweise von MYC

A) Struktur des MYC-Proteins und seines Partners MAX. In der Abbildung ist ein Schema des MYC-Proteins wiedergegeben. Die Ziffern stehen für die Aminosäureanzahl, P symbolisiert eine Phosphorylierungsstelle. Die funktionelle Domänen tragen folgende Abkürzungen: I, MYC-Box I; II, MYC-Box II; TAD, Transaktivierungsdomäne; BHLHZip, basisches Helix-Loop-Helix-Motiv. **B) Funktionsweise von MYC-MAX.** Die Heterodimere binden an E-Boxen im Promotorbereich von Zielgenen und aktivieren so deren Transkription.

1.2.2 Myc kodiert für einen Transkriptionsfaktor

Wie oben bereits erwähnt kodiert *myc* für einen Transkriptionsfaktor. Deshalb wurde in zahlreichen Arbeiten versucht Gene zu definieren, die von MYC reguliert werden. Anfangs wurde gehofft ein MYC reguliertes Gen zu finden, welches man als das „MYC-Zielgen der MYC-abhängigen Transformation“ hätte bezeichnen können. Es wird nun immer deutlicher, dass ein solches Gen nicht existiert und MYC seine Aufgaben dadurch erfüllt eine sehr große Anzahl von Genen in ihrer Expression zu modulieren (Abbildung 1 B). Bei der Suche nach Zielgenen von Myc hat vor allem die DNA-Microarray-Technologie geholfen, mit der es möglich wurde, den Einfluss von *myc* auf tausende Gene in einem einzigen Versuch zu untersuchen. Mehrere Publikationen haben hierdurch die Kontrolle von MYC über Gene des Zellzyklus, der DNA und Proteinsynthese, des Zellwachstums, der Zelladhäsion, der Immortalisierung und der Apoptose gezeigt (Abbildung 1 B) (Schlosser et al., 2005; Schlosser et al., 2003; Schuhmacher et al., 2001).

1.2.3 MYC und Chromatin-Remodelling

Der Prozess der Regulation von Genen durch MYC und seine Partnerproteine wurde im Detail analysiert und es sind bemerkenswerte Ergebnisse zum Vorschein gekommen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass MYC-MAX-Heterodimere Gene durch Veränderung der promotornahen Chromatinstruktur regulieren (Amati et al., 2001; McMahon et al., 2000). In Abbildung 2 ist ein Schema einer solchen Funktionsweise aufgezeigt. So konnte von McMahon und Kollegen die Assoziation von MYC mit dem Coaktivator TRRAP (transformation/transcription domain-associated protein), einem großen Komplex, der Histon-Acetyltransferase-Aktivität besitzt, demonstriert werden (McMahon et al., 1998; McMahon et al., 2000). MYC rekrutiert TRRAP an den Cyclin-D2-Promotor und induziert so die gezielte Acetylierung von Histon 4 an einzelnen Nukleosomen (Bouchard et al., 2001). Dadurch wird die Chromatinstruktur verändert und die Zugänglichkeit der Promotorregion für Aktivoren des Gens erhöht (Amati et al., 2001) (Abbildung 2 A). Hierbei erfordert die Bindung von TRRAP das Vorhandensein der MYC-Box II (MBII) als Bindungselement. Die Korrelation zwischen H4-Acetylierung und Genaktivierung konnte für einige andere Gene bestätigt werden (Frank et al., 2001). Dennoch sollte auch erwähnt werden, dass für die Gene CAD und TERT diese Form der transkriptionellen Aktivierung nicht nachzuweisen war (Eberhardy et al., 2000). Die oben erwähnten Publikationen machen den enormen Fortschritt deutlich, der in Bezug auf die Wirkungsweise von MYC und seine Verbindungen zum spannenden Thema des Chromatin-Remodellings in den letzten Jahren erreicht wurde.

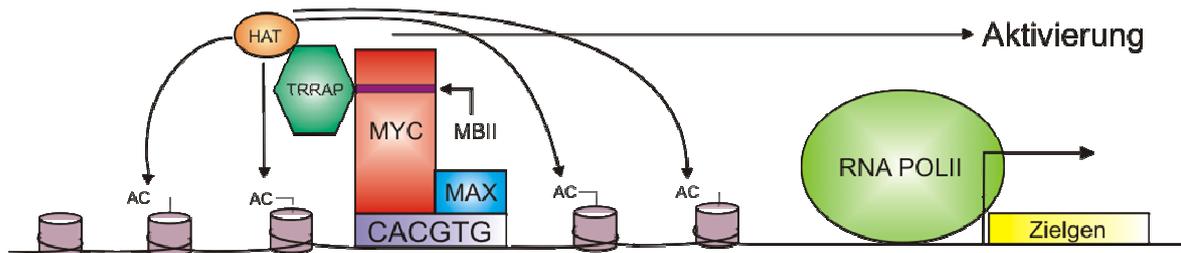


Abbildung 2 Genregulation durch MYC
Myc reguliert Gene durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonsseitenketten.
 Durch Bindung von TRRAP rekrutiert MYC Histon-Acetyltransferasen zu den promotornahen Nukleosomen und aktiviert hierdurch die Transkription. Die Polymerase kann leichter zum Gen vordringen.

1.3 Einfluss von Myc auf Zellwachstum, Proliferation und Apoptose

Eine der Hauptfunktionen von MYC ist es die Zellzyklus-Progression zu fördern (Eilers, 1999; Nesbit et al., 1999). Während in ruhenden Zellen die *myc*-Expression fast nicht nachweisbar ist, bewirken eine Serum- oder Mitogenstimulierung einen raschen Anstieg der *myc*-RNA und Proteinlevel von MYC und einen Eintritt der Zellen in die G1-Phase. Danach fallen die Level wieder ab, bleiben aber in proliferierenden Zellen auf einem nachweisbaren Niveau erhalten (Amati et al., 2001). Wegen dieser äußerst hoch kontrollierten Expression und der schnellen Anpassung an das extrazelluläre Milieu wird MYC auch als der „intrazelluläre Sensor des extrazellulären Milieus“ bezeichnet. Die Funktionen von MYC konnten im Detail in gentechnisch veränderten Tier- bzw. Zellmodellen untersucht werden. So zeigten *myc* ^{-/-} Fibroblasten reduzierte Raten der Zellproliferation und Defekte in der globalen mRNA- und Proteinsynthese (Mateyak et al., 1997). Es stellte sich die Frage wie genau MYC das Wachstum einer Zelle beeinflusst. Eine wachsende Zelle benötigt eine verstärkte Proteinbiosynthese. Genau an diesem Punkt greift MYC ein, indem es die RNA-Polymerase III durch TFIIB, einen Polymerase III-spezifischen generellen Transkriptionsfaktor (GTF) aktiviert. Damit unterstützt MYC die Bildung von t-RNA und 5S ribosomaler DNA und somit die Synthese neuer Proteine, welche für ein Wachstum der Zelle benötigt werden (Gomez-Roman et al., 2003).

Wie nimmt MYC Einfluss auf die Zellzyklusprogression? Dieser Frage ist von entscheidender Bedeutung will man die onkogene Funktion von MYC in der Tumorentwicklung verstehen. Die Hauptfunktion von MYC ist hierbei in der Aktivierung

und Reprimierung von Schlüsselgenen des Zellzyklus zu sehen (Abbildung 3). Ein bedeutender Schritt im Verständnis wurde hierbei durch die Identifizierung von CyclinE-Cdk2 als Zielstrukturen von MYC gemacht, welche als essentielle Elemente in der MYC-induzierten G1-S Progression gelten (Berns et al., 1997; Steiner et al., 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *cdk4* und Cyclin D2 direkt von MYC reguliert werden (Bouchard et al., 1999; Hermeking et al., 2000). Eine Expression von CyclinD2 und Cdk4 hat zu Folge, dass CDK-Inhibitoren wie KIP1 (p27) nicht mehr in der Lage sind an Cyclin E-Cdk 2 Komplexe zu binden (Abbildung 3). Am Abbau des CDK-Inhibitors KIP1 durch das Proteasom sind noch weitere Zielgene von MYC, wie CUL-1 und CKS beteiligt (Berns et al., 1997). Ohne Anwesenheit von Kip1 kann CyclinE-CDK2 von Cyclin-abhängigen Kinasen (CAK) durch Phosphorylierung aktiviert werden. Erhöhte Aktivität von CDK2 und CDK4 führt zu einer Phosphorylierung des Rb-Proteins und damit zur Freisetzung von E2F.

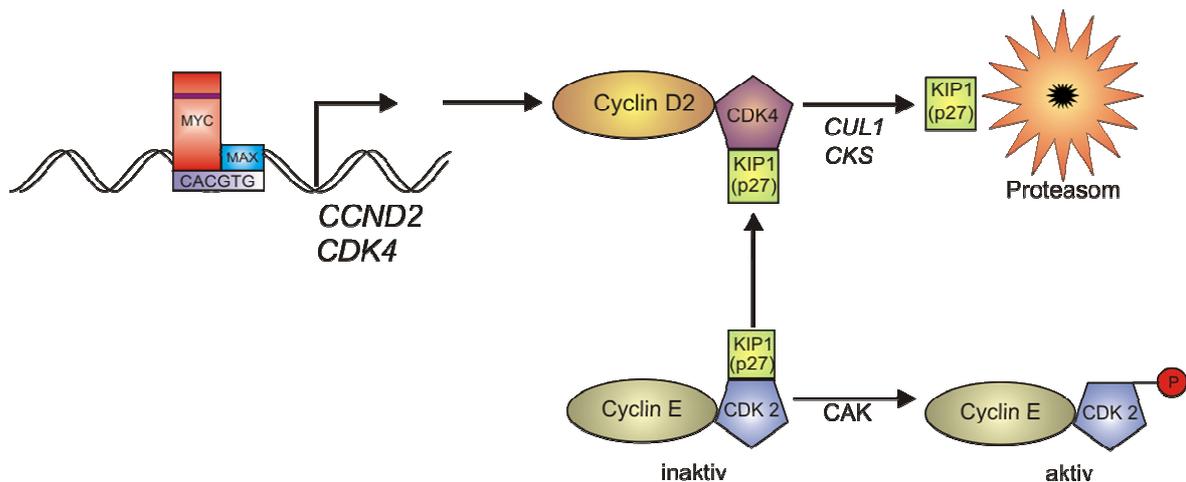


Abbildung 3 Myc steuert die Zellzyklusprogression durch die Aktivierung von Genen. Myc reguliert die Transkription der Zellzyklusproteine CyclinE-CDK2. Durch Aktivierung der Gene CyclinD2-CDK4 bewirkt MYC den Abbau des Inhibitors KIP1 (P27) des CyclinE-CDK2-Komplexes. Die ebenfalls von MYC regulierten Gene *Cull* und *CKS* führen zu einem verstärkten Abbau von KIP1 (P27) durch das Proteasom.

Eine weitere Eigenschaft von MYC ist die Fähigkeit Apoptose zu stimulieren; eine Beobachtung, welche bei einem Onkogen nicht erwartet wurde (Evan et al., 1992; Prendergast, 1999). Mittlerweile wird diese Funktion als eine Art Schutzmechanismus vor dem starken Potential angesehen, mit welchem MYC Zellen zur Proliferation treibt. Dies

wird durch die Tatsache gestützt, dass viele Tumorzellen mit erhöhtem MYC-Level Schäden in den Signalwegen der Apoptose haben. So konnte in einer klinischen Studie bei einem Drittel von unbehandelten Patienten mit Burkitt-Lymphom Mutationen des Tumorsuppressor p53 nachgewiesen werden (Gaidano et al., 1991; Ichikawa et al., 1993; Nomdedeu et al., 1997). Schließlich wurde gezeigt, dass MYC die Fähigkeit hat, das Wachstum einer Zelle unabhängig vom Zellzyklus zu stimulieren (Schuhmacher et al., 1999).

1.4 C-myc und Tumorentstehung

Ein Charakteristikum von Tumorzellen ist es unabhängig von Wachstumsfaktoren zu sein. Sie proliferieren auch wenn keine Signale aus der Umgebung diesen Vorgang fördern. Durch konstitutive Überexpression von *c-myc* in Rattenfibroblasten konnten diese immortalisiert werden (Mougueau et al., 1984). Es konnte auch gezeigt werden, dass für eine komplette zelluläre Transformation zusätzliche onkogene Läsionen notwendig sind (Fanidi et al., 1992; Land et al., 1983). Da viele Tumoren bei der Entdeckung schon weit fortgeschritten sind und auf molekularer Basis multiple onkogene Läsionen haben, ist es schwer nachzuvollziehen in welchem Stadium der Tumorentstehung eine Aktivierung von *myc* einsetzt. Genau diese Frage wäre wichtig zu beantworten, will man in der Zukunft Myc als therapeutisches Ziel in der Krebstherapie einsetzen.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von *myc* und eine Inaktivierung des Tumorsuppressors *p53* im Sinne einer Tumorentstehung synergistisch wirken. Wird in Mäusen, welche kein *p53* mehr exprimieren können (*p53* $-/-$) *myc* aktiviert, führt dies zu einer schnelleren Entstehung von Tumoren als wenn die Schäden nur jeweils ein Gen (*myc* oder *p53*) betreffen würden (Blyth et al., 1995). Um die Auswirkungen einer Aktivierung von *myc* in erwachsenen Mäusen und verschiedenen Geweben zu studieren, wurde ein konditionales Expressionssystem (MycER^{TAM}) entwickelt. Dabei wurden sehr interessante Beobachtungen zur *myc*-induzierten Tumorentstehung gemacht (Pelengaris et al., 2002). So führte eine *myc*-Aktivierung in der Epidermis zu einer Induktion des Zellzyklus, verhinderte die Differenzierung der Zellen und bewirkte eine Entwicklung derselben zu einer prä-malignen Läsion (Pelengaris et al., 1999). Dies ist besonders interessant, da eine *myc*-Aktivierung in Zellen der gleichen Maus *in vitro* zur Apoptose der Zellen führte. Die Entscheidung zwischen *myc*-induzierter Proliferation und *myc*-induzierter Apoptose wird also maßgeblich durch den Zellverband bzw. das Umfeld einer Zelle bestimmt. Viele der konditionalen Systeme wurden benutzt,

um der Frage nachzugehen, ob eine bestimmte onkogene Läsion für den Erhalt von Krebseigenschaften einer Zelle notwendig ist. In anderen Worten: Ist es möglich einen Tumor durch Ausschalten eines aktivierten Onkogens zu bekämpfen? Diese Frage würde auch in Hinblick auf zukünftige Therapien eine wichtige Rolle spielen. Es sei hier die Arbeit von Felsher und Kollegen erwähnt, welche die Regression von *myc*-induzierten T-Zell-Lymphomen und AML in einem Tetracyclin-reguliertem System untersucht haben. Eine *MYC*-Deaktivierung führte zu einer Regression der Tumoren in einem sehr hohen Anteil der Mäuse (Felsher and Bishop, 1999). Bei den übrigen 10% wurde angenommen, dass zusätzliche genetische Läsionen die Abhängigkeit von *MYC* umgehen und so für eine Tumorprogression ohne *MYC* verantwortlich sind. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass eine kurzfristige Inaktivierung von *myc* ausreichend ist für die volle Umkehr eines, durch *MYC* induzierten malignen Osteosarkoms in transgenen Mäusen. Überraschender Weise führte eine nochmalige Expression in denselben Zellen nicht zu einer Wiederherstellung des malignen Phänotyps sondern zur Apoptose (Jain et al., 2002). Würde diese Beobachtung sich in anderen Tumormodellen bestätigen, könnte sich daraus ein viel versprechender Ansatz für eine neuartige Krebstherapie bei verminderter Toxizität für den Organismus ergeben.

1.5 Mechanismen der *myc*-Aktivierung in Tumoren

Bei der Aktivierung von Proto-Onkogenen spielen strukturelle und funktionelle Veränderungen wie Punktmutationen, chromosomale Verschiebungen und Genervielfältigung eine Rolle. So ist das *c-myc* Gen in Burkitt-Lymphomen von Chromosom 8q24 transloziert und kommt in die Nähe des Immunglobulinlokus, wo es unter dem Einfluss eines transkriptionell aktiven Gens steht (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982). In analoger Weise kommen Translokationen zwischen dem *myc* tragenden langen Arm des Chromosom 8 und den leichten Ketten des κ - oder λ -Typs kodierenden Chromosom 2 resp. 22 vor (Adams et al., 1985; Marcu et al., 1983). Ebenfalls ist das *n-myc* Gen in Neuroblastomen und Medulloblastomen amplifiziert (Herms et al., 2000; Mathew et al., 2001). Eine Amplifikation von *myc* findet sich in den vielen menschlichen Tumoren wie z.B. im Bronchialkarzinom (Little et al., 1983), Mammakarzinom (Berns et al., 1996), Ovarialkarzinom (Wang et al., 1999), Zervixkarzinom (Pinion et al., 1991) und Prostatakarzinom (Jenkins et al., 1997). Kürzlich wurde auch entdeckt, dass die Deregulation von *myc* in Tumoren wesentlich häufiger vorkommt als man vermutet hatte (El Gedaily et al., 2001; Latil et al., 2000). So lässt sich

im Medulloblastom in durchschnittlich 8 % der Fälle eine *myc*-Amplifikation nachweisen. Nach neueren Untersuchungen stellte sich in 42% der Tumoren eine Erhöhung der *myc*-mRNA heraus (Gilhuis et al., 2000; Herms et al., 2000).

In seiner onkogenen Form ist *myc* konstitutiv exprimiert, wobei die Levels zwischen moderat und extrem hoch liegen können und eine Entkopplung von externen Signalen aufweisen. Mutationen in *myc* sind keine zwingende Voraussetzung für die Aktivierung, obwohl sie für das aktivierte *myc*-Allel im Burkitt-Lymphom beschrieben wurden (Albert et al., 1994). Interessanter Weise haben im Neuroblastom, in welchem die Amplifikation von N-*myc* ein Anzeichen für eine aggressive Form ist, Untersuchungen gezeigt, dass offenbar keine Punktmutationen in der kodierenden Sequenz vorliegen (Hogarty and Brodeur, 1999).

Eine Aktivierung von *myc* kann auch durch Störung einer der vielen regulativen Mechanismen entstehen, die in normalen Zellen die kontrollierte Expression von *myc* gewährleisten (Oster et al., 2002). Zum Beispiel kann eine Aktivierung durch eine Stabilisierung der mRNA von *myc* oder durch eine verstärkte Initiation der Translation auf Grund einer Mutation im nicht-translatierten Teil der *c-myc*-RNA stattfinden. Weiterhin ist eine *myc*-Aktivierung als indirekte Konsequenz einer aktivierten vorgeschalteten Signalkaskade möglich (Bowman et al., 2001; Chiariello et al., 2001).

Neben der Überexpression von *myc* kann auch eine Proteinstabilisierung für eine Aktivierung ursächlich sein. In diesem Fall wird das Protein durch eine Mutation nicht mehr in der normalen Weise über den Ubiquitin/26S Proteasomen-Weg abgebaut. Schon früh wurde herausgefunden, dass im Myc-Protein Mutationen in der Nähe der Stelle T58 vorkommen können, welche die Phosphorylierung an dieser Stelle verhindern (Albert et al., 1994; Gregory and Hann, 2000). Diese Mutationen wurden besonders häufig in den Zellen von Burkitt-Lymphomen gefunden. Mittlerweile konnten mehrere Gruppen zeigen, dass eine Mutation an Position T58 zu einer ineffizienten Ubiquitinilierung und somit zu einer Stabilisierung des Proteins führt (Niklinski et al., 2000; Sears et al., 2000).

1.6 Transkriptionelle Regulation von *c-myc*

Das Beispiel der Translokation von *c-myc*, welche für die Entstehung des Burkitt-Lymphoms ursächlich ist, macht die Bedeutung der Transkription für die Regulation von Onkogenen im Allgemeinen und im Besonderen für *c-myc* deutlich.

1.6.1 Das RNA-Polymerase II–Holoenzym

Die RNA-Polymerase II (Pol II) kann als das Herzstück der Transkription bezeichnet werden. Durch Synthese der mRNA reguliert sie die Expression der ca. 30000 bis 40000 Genen in allen Zellen des menschlichen Körpers. Diese enorme Aufgabe spiegelt sich auch in ihrer Struktur wider. Die RNA-Polymerase II besteht aus 12 Untereinheiten mit einem Gesamtgewicht von mehr als 0,5 MD (Cramer et al., 2000). Die am besten untersuchte Form dieses Enzyms ist die RNA-Polymerase II der Hefe *Saccharomyces cerevesiae*. Ein großer Schritt in der Untersuchung des Transkriptionsvorganges gelang durch die Röntgenstrukturanalyse eines Polymerase-Enzyms in einer Auflösung von 2,8 Å (Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001). Die beiden großen Untereinheiten RPB1 (ca. 220 kD) und RPB2 (ca. 140 kD) beherbergen das katalytische Zentrum in welchem die Bildung der mRNA aus Ribonukleotiden stattfindet. Die Hauptstruktur des Enzyms ist zwischen verschiedenen Organismen hoch konserviert. So finden sich in den Sequenzen für die Untereinheiten zwischen Hefe und Mensch prozentuale Übereinstimmungen bis 73% (Cramer et al., 2000). Zehn, der für die menschliche Polymerase kodierenden Gene können mit den Gegenstücken in der Hefe ausgetauscht werden (Conaway and Conaway, 1997). Auch zwischen den drei eukaryontischen RNA-Polymerasen gibt es Übereinstimmungen. So sind in der RNA-Polymerase II 5 Untereinheiten vorhanden, die sich auch in den RNA-Polymerasen I und III finden (Bushnell et al., 2002).

1.6.1.1 Die carboxyterminale Domäne der großen Untereinheit (CTD)

In einem Punkt unterscheidet sich die große Untereinheit (RPB1) der RNA-Polymerase II von den anderen eukaryontischen Polymerasen I und III. Sie besitzt eine einzigartige c-terminale Wiederholungsdomäne (CTD, carboxyterminal domain) bestehend aus einer Serie von Heptapeptidwiederholungen mit der Consensus-Sequenz Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (Young, 1991). Dabei scheint die Anzahl der Wiederholungen mit der Entwicklungsstufe eines Organismus anzusteigen. So zählt man beispielsweise bei *Plasmodium* 16, bei *Saccharomyces* 26 oder 27, bei *Drosophila* \approx 45 und bei Maus sowie Mensch 52 Wiederholungen (Allison et al., 1988; Stiller and Hall, 2002). Die CTD hat eine wichtige Rolle für die Funktion des gesamten Enzyms. So führen Deletionen von mehr als der Hälfte der Heptapeptidwiederholungen in Hefe oder Mäusen zum Zelltod. Gentechnisch veränderte Mäuse mit einer CTD von nur 13 Wiederholungen haben eine höhere neonatale Sterblichkeit und sind kleiner als normale Mäuse. Daher scheint die Wachstumsregulation bei Mammaliern während der Entwicklungsphase mit einer

funktionstüchtigen CTD verknüpft zu sein (Litingtung et al., 1999). In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der CTD keinen Einfluss auf die basale Transkription der Pol II bei Untersuchungen *in vitro* hat, aber die verstärkte Transkription durch manche Enhancer verhindert. Eine wichtige Rolle kommt der CTD bei der korrekten Prozessierung des primären Transkripts zu: RNA-5'-end-capping, Spleißprozess und 3'-Polyadenylierung sind mit der CTD eng verknüpft (Gerber et al., 1995; McCracken et al., 1997).

1.6.1.2 Die CTD während des Transkriptionszyklus

Während des Transkriptionszyklusses durchläuft die CTD der RNA-Polymerase II eine festgelegte Abfolge von Veränderungen in ihrem Phosphorylierungszustand (siehe Abbildung 4). Vereinfacht gesagt ist eine „freie“ Polymerase II hypophosphoryliert, eine transkribierende Pol II dagegen hyperphosphoryliert. Diese einfache Unterteilung wurde in den letzten Jahren durch die Verfügbarkeit neuer Antikörper deutlich präzisiert. Bevor sich die „freie“ RNA-Polymerase II an die DNA bindet ist die CTD nicht phosphoryliert (Cadena and Dahmus, 1987; Chesnut et al., 1992; Payne et al., 1989). In diesem Zustand kann sich die Pol II mit Coaktivatoren wie z.B. dem Mediator-Komplex verbinden und das Holoenzym bilden. Hierbei kann die Untereinheit Srb10 (CDK8) des Mediator-Komplexes die CTD frühzeitig phosphorylieren und so eine Rekrutierung der Pol II zum Promotor verhindern (Hengartner et al., 1998; Liao et al., 1995) (Abbildung 4, (A)). In einer eleganten Studie konnte die Phosphorylierung von Serin 5, vermutlich durch CDK7, während der Initiationsphase gezeigt werden (Abbildung 4, (B)). Durch Veränderungen in der CTD ist auch der Vorgang der Transkription mit der RNA-Prozessierung verknüpft. Durch die phosphorylierte CTD werden Teile der Prozessierungsmaschinerie rekrutiert (Carty and Greenleaf, 2002). Die Phosphorylierung von Serin 5 in der CTD durch CDK7 stimuliert Enzyme welche für das „5'-Capping“ notwendig sind (Schroeder et al., 2000) (Abbildung 4, (C)). Daher könnte die Rekrutierung von Capping-Enzymen eine Art Checkpoint darstellen, in dem sichergestellt wird, dass nur mit 5'-Kappe prozessierte Transkripte effizient synthetisiert werden. Am Übergang von Initiation zu Elongation wird die CTD durch CDK9, einer Untereinheit des positiven Transkription-Elongationsfaktors (P-TEF-b), am Serin Position 2 phosphoryliert (Kim et al., 2002). Durch Chromatin-Immunpräzipitationen wurden die Veränderungen der CTD während der Transkription eines Gens „kartographiert“ (Abbildung 4, (D)). Gegen Ende der Transkription stellt die CTD eine Verbindung zu den Enzymen des Spleißapparates her (Greenleaf, 1993;

Patturajan et al., 1998). Die transkribierte RNA wird am 3'-Ende polyadenyliert, wobei auch dieser Prozess durch die phosphorylierte CTD unterstützt bzw. gesteuert wird (McCracken et al., 1997) (Abbildung 4, (E)). Nachdem sich die RNA-Polymerase von der DNA gelöst hat, wird die CTD durch das Enzym FCP1 dephosphoryliert (Licciardo et al., 2001; Schroeder et al., 2000). Durch dieses „Recycling“ steht die RNA-Polymerase für eine erneute Transkription zu Verfügung (Abbildung 4, (F)). Die zahlreichen Beispiele machen deutlich, dass die transkriptionsabhängigen Veränderungen im Phosphorylierungszustand der CTD ein bedeutendes Steuerelement für den gesamten Prozess der Transkription sind.

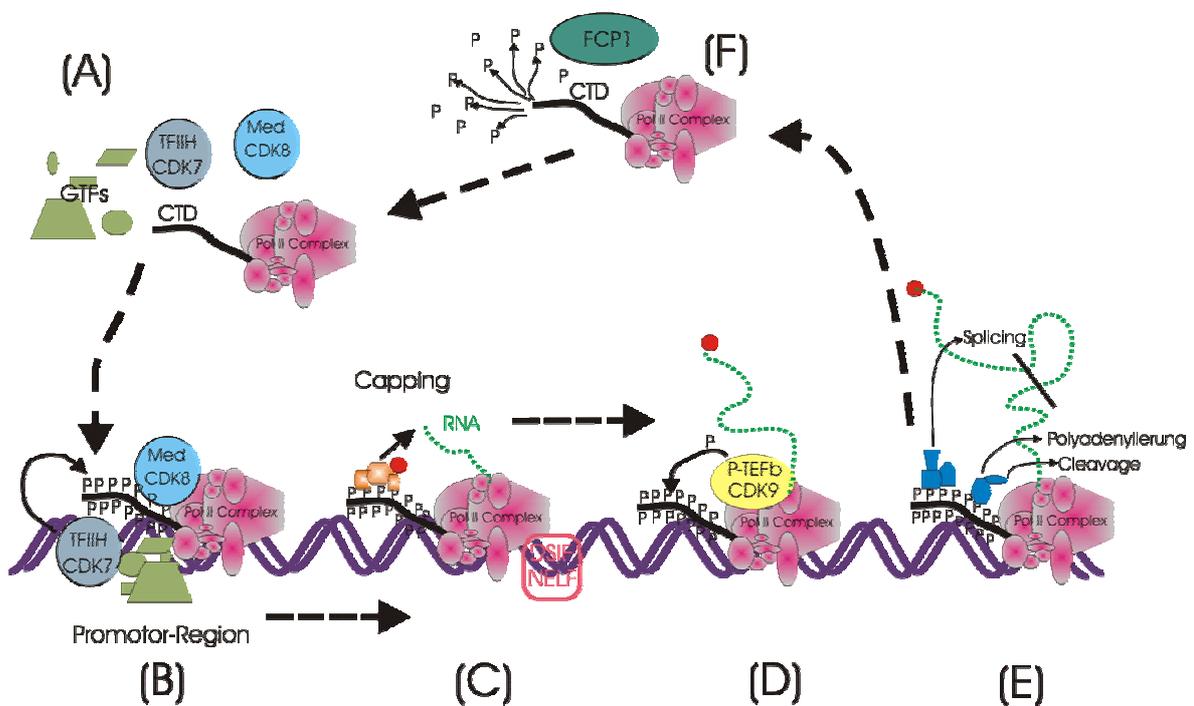


Abbildung 4 Die CTD ändert ihren Phosphorylierungszustand während des Transkriptionszyklus
(A) An der „freien“ RNA-Polymerase II (pol II complex) ist die carboxyterminale Domäne (CTD) nicht phosphoryliert. Sie kann sich in diesem Zustand mit anderen Coaktivatoren der Transkription, wie z.B. dem Mediator-Komplex verbinden, um so das Holoenzym zu bilden.
(B) Präinitiation. Die unphosphorylierte RNA-Polymerase II oder das gesamte Holoenzym ordnen sich zusammen mit den generellen Transkriptionsfaktoren (TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIF) am Promotorbereich an und bilden so den Präinitiationskomplex. Durch CDK7, eine Untereinheit von TFIIF, wird die CTD phosphoryliert (P).
(C) Initiation. Beginnt die Transkription, werden durch die phosphorylierte CTD die „Capping-Enzyme“ rekrutiert, welche die entstehende RNA am 5'-Ende mit einer 7-Methylguanin-Kappe versehen.
(D) Elongation. Die CTD wird an den Serinen an Position 2 durch die Untereinheit CDK9 des positiven Elongationsfaktors (P-TEF-b) phosphoryliert.
(E) Ende der Transkription und Prozessierung der RNA. Die zum Spleißen der RNA benötigten Enzyme werden durch die phosphorylierte CTD rekrutiert.
(F) Recycling. Nachdem die RNA Pol II sich von der DNA gelöst hat, wird die CTD für eine neue Transkriptionsrunde durch den Faktor FCP1 dephosphoryliert.

1.6.2 Genexpression und Chromatin-Remodelling

Im vorherigen Abschnitt wurde über den Einfluss der carboxyterminalen Wiederholungsdomäne auf die Transkription berichtet. Nicht nur die Polymerase selbst, sondern auch die Gegebenheiten am Transkriptionsort nehmen auf diesen Prozess Einfluss. Die Struktur eines Promotors auf nukleosomaler Ebene enthält essentielle regulatorische Elemente für die eukaryontische Genexpression. Genaktivierung ist hierbei mit Veränderungen der nukleosomalen Struktur, wie z.B. Remodelierung und Acetylierung verknüpft (Kingston and Narlikar, 1999; Peterson, 2000; Peterson and Workman, 2000). Als einer der ersten Schritte wird die Befreiung der Promotorregion von repressiven Einflüssen durch Histone angesehen. Der Transkriptionskomplex kann erst zu einem Promotor vordringen, wenn die räumlichen „Voraussetzungen“ durch eine Veränderung der Chromatinstruktur geschaffen wurden (Bazett-Jones et al., 1999; Peterson, 2000; Peterson and Workman, 2000).

1.6.3 Regulative Elemente des *c-myc*-Promotors

Das hier untersuchte Gen *c-myc* wird von einem dualen Promotor P1 und P2 transkribiert, wobei P1 und P2 160 Basenpaare voneinander entfernt sind (Strobl and Eick, 1992; Strobl et al., 1993). Im Promotorbereich von *c-myc* wurden noch zwei weitere Elemente gefunden, die zu Aktivität des Promotors P2 beitragen. Zum einen befindet sich an Position -58, relativ zum Transkriptionsstartpunkt, eine E2F-Bindungsstelle, zum anderen an Position -40 eine ME1a1-Bindungsstelle (Albert et al., 2001).

In HL-60 Zellen - einer Promyelozyten-Leukämie-Zelllinie - konnte gezeigt werden, dass *c-myc* fast ausschließlich vom P2-Promotor transkribiert wird. Durch Run-On-Experimente wurde eine pausierende Pol II unmittelbar unterhalb des P2-Promotors gefunden. Wurden die HL-60 Zellen zur Differenzierung gebracht, lassen sich alle Polymerase-Komplexe an dieser Pausierungsstelle nachweisen. Durch diese Versuche wurde das Pausieren der Pol II als Mechanismus für die Herunterregulierung von *c-myc* belegt (Strobl and Eick, 1992). Wird dagegen die Regulation in Burkitt-Lymphom-Zelllinien, mit der bekannten *c-myc*-Translokation untersucht, ergibt sich ein anderes Bild: Hier findet die Expression von *c-myc* durch Transkription vom P1-Promotor statt und es lässt sich keine pausierende Pol II mehr unterhalb des P2-Promotors nachweisen. Der Regulationsprozess durch die Pausierung wird also durch die Translokation aufgehoben (Strobl et al., 1993).

1.7 Konditionale Expression von Polymerase-Mutanten

Der Einfluss der pausierenden Polymerase und die Bedeutung der CTD wurden bereits im Ansatz untersucht. Durch Aufbau eines Zellsystems, in dem eine große Untereinheit der murinen RNA-Polymerase II konditional exprimiert wird, konnte die Funktion der CTD während der Transkription im chromosomalen Kontext beurteilt werden (Meininghaus et al., 2000; Meininghaus and Eick, 1999). Die Einbringung einer Punktmutation, welche eine Resistenz gegenüber dem Inhibitor α -Amanitin vermittelt, gibt einem die Möglichkeit die Funktion der exogenen Pol II ohne den Hintergrund der endogenen Pol II zu untersuchen. Wird eine α -Amanitin-resistente große Untereinheit der RNA-Polymerase II (LS*) mit fast komplett deletierter CTD (LS* Δ 5) in B-Zellen exprimiert, kommt man zu folgenden Ergebnissen: Die Zellen haben einen globalen Defekt in der Transkription, der nahezu alle zellulären Gene betrifft. Weiterhin kann die trunkierte Pol II nicht bis zu promotorproximalen Pausierungsstelle transkribieren, wie es für das *hsp70A* und das *c-fos* Gen gezeigt wurde (Meininghaus et al., 2000). Die Frage welchen Beitrag die CTD für das Pausieren leistet konnte in diesem Versuchsaufbau nicht weiter untersucht werden, da die Pol II ohne CTD (Δ 5) nicht mehr an der Pausierungsstelle nachweisbar war (Meininghaus et al., 2000). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die CTD für einen Schritt während der Transkription zuständig ist, der vor der Pausierung der RNA-Polymerase II stattfindet. Es könnte aber auch die Möglichkeit bestehen, dass eine RNA-Polymerase II mit einer verkürzten CTD (LS* Δ 5) gar nicht mehr in der Lage ist an DNA zu binden. Diese Theorie gilt es im Rahmen meiner Doktorarbeit zu untersuchen.

1.8 Fragestellung

In der Einleitung wurde die Bedeutung von Onkogenen für die Entstehung menschlicher Tumoren deutlich gemacht. Weiterhin wurde beschrieben, dass das Onkogen *c-myc* an der Tumorgenese beteiligt ist. Auf die Transkription als wichtiger Steuermechanismus von *c-myc* und die Bedeutung der RNA-Polymerase II wurde hierbei hingewiesen. Deshalb ist es wichtig die Transkription als einen besonderen Regulationsprozess des Onkogens *c-myc* genauer zu untersuchen.

Bei der Regulation des Onkogens *c-myc* habe ich folgende Fragestellung untersucht:

Ist eine RNA-Polymerase II mit einer auf 5 Heptapeptidwiederholungen verkürzten CTD (Δ 5) noch in der Lage im Promotorbereich des *c-myc*-Gens zu binden?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle weiteren Substanzen wurden von *Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen* in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe bezogen.

Magermilchpulver für die Molekularbiologie	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
Acrylamid	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
α - Amanitin	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Fixed, Killed Staphylococcus aureus Protein A-positive cells	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Complete [®] EDTA-free; Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Tabletten)	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Glycerin	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
dNTPs	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Prestained SDS-Page Standards, High Range	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Prestained SDS-Page Standards, Low Range	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
rProtein A Sepharose Fast Flow	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg</i>
Protein G Sepharose	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg</i>
Sephadex-G50, DNA grade	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg</i>
Agarose ultra pure	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
RMPI 1640 Medium	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
DNA Größenstandards	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
L-Glutamine 200mM (100x)	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
Neomycin (G418)	<i>Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein</i>
Hygromycin B	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Ethidium-Bromid	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
Fötales Kälberserum	<i>bioser "dynacyte", Buenos Aires, Argentinien</i>

2.1.2 Geräte

Megafuge 2.0	<i>Heraeus Sepatech GmbH, Osterode</i>
Biofuge 13	<i>Heraeus Sepatech GmbH, Osterode</i>
Hybridisierungsöfen	<i>MWG Biotech, Erbersberg</i>
2K15 Kühlzentrifuge	<i>Sigma Laborzentrifugen GmbH, Taufkirchen</i>
Eppendorf Thermomixer 5436	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Zentrifuge Sorval RC5C und Rotoren GS3, HS4 und SS34	<i>DuPont GmbH, Bad Homburg</i>
PCR-Gerät	<i>Thermo-Hybaid GmbH</i>
-80°C-Schrank UF80-450S	<i>Colora Messtechnik GmbH, Lorch</i>
Backofen	<i>Heraeus Sepatech GmbH, Osterode</i>
Bechtop Radioisotop Counter QC-4000	<i>Bioscan Inc., Washington, D.C., USA</i>
Eismaschine	<i>Ziegler GmbH, Isernhagen</i>
Expositionskassetten mit Verstärkerfolie Lanex fast screen	<i>Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA</i>
Flow-Hood-Werkbank	<i>Bio-Flow Technik, Meckenheim</i>

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	<i>GLW Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg</i>
Gelelektrophoresekammer Mini Sub DNA Cell und Wide Mini Sub DNA Cell	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Heiz- und Schüttelblock Thermomixer 5436	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Lichtmikroskop Axiovert 135	<i>Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen</i>
Milli-Q Reinstwasser-Aufbereitungssystem	<i>Millipore GmbH, Eschborn</i>
pH-Meter Multi-Calimatic 763	<i>Millipore GmbH, Eschborn</i>
Slot-Blot-Apparatur SRC 072/0 Minifold II	<i>Schleicher & Schuell GmbH, Dassel</i>
Stromgerät Power Pac 300	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250	<i>Heinemann, Schwäbisch Gmünd</i>
Vortexer Vortex Genie 2	<i>Bender & Hobein GmbH, Ismaning</i>
Western-Blot-Apparatur TE22 Mighty Small Transfer Unit	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>

2.1.3 Radioaktive Isotope

Die radioaktiv markierten Chemikalien wurden vor Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000Ci/mmol, 10mCi/ml)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3000Ci/mmol, 10mCi/ml)	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>

2.1.4 Enzyme

DNase I, RNase frei (10 U/ μl)	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Klenow-Polymerase	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
RNase A (50 U/ml)	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Proteinase K; from <i>Tritirachium album</i> in solution	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
T4-Polynukleotid-Kinase	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Red – Taq DNA Polymerase	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>

Die Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.1.5 Antikörper

α -HA; (3F10), monoklonal Ratte, Isotyp: IgG ₁	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
Anti – HA;12CA5, Maus- IgG	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
α -E2F-1 (KH 95), monoklonal Maus, Isotyp: Maus IgG _{2a}	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA</i>
Anti Ratte IgG, HRP cuppled	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA</i>
Anti Maus IgG, HRP cuppled	<i>Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA</i>
AffiniPure Rabbit Anti-Rat IgG(H + L)	<i>Jackson ImmunoResearch Laboratoires, Bar Harbor, Maine, USA</i>
Monoclonal Antibody against RNA Polymerase II; Clone H5, Mouse IgM	<i>Covance, Princeton, New Jersey, USA</i>
Monoclonal Antibody against RNA Polymerase II; Clone 8WG16, Mouse IgG _{2a} /k	<i>Babco, Richmond, Kalifornien, USA</i>

2.1.6 Puffer und Lösungen

DNA - Ladepuffer (10x)	30% (w/v) Glycerol 0,25% (w/v) Bromphenolblau
------------------------	--

Material und Methoden

Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 192mM Glycin 0,1% (w/v) SDS,
Laemmli-Probenpuffer (2x)	100 mM Tris/HCl pH 6,8 200 mM Dithiothreitol (DTT) 20% (w/v) Glycerin 4% (w/v) SDS 0,02% (w/v) Bromphenolblau
PBS	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ · 6H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄
Western-Strip-Puffer	100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7
TAE-Puffer (DNA-Gelelektrophorese)	40 mM Tris/Essigsäure pH 7,8 10 mM Natriumacetat 1 mM Na-EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM Na-EDTA
SSC 20X pH7.0	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat
Schindler Zellextrakt Puffer	0,5% NP-40 50 mM Tris/Cl pH 8,0 10%Glycerol 0,1 mM EDTA pH 8,0 150 mM - 300mM NaCl 100 μM Na ₃ VO ₄ 1 mM DTT 100 μM PMSF 25 mM NaF 5mM Na-Pyrophosphat
RIPA-Puffer	150 mM NaCl 1% NP40 0,5% Sodiumdeoxycholate 0,1% SDS 50 mM Tris pH 8,0 Direkt vor Gebrauch: 1 mM PMSF Complete [®] EDTA-free
Church-Puffer	0,4 M Na ₂ HPO ₄ 0,1 M Na ₂ H ₂ PO ₄ 1 mM EDTA 7% SDS pH 7,0
Zell-Lyse-Puffer	5 mM PIPES pH 8,0 85 mM KCl 0,1% NP40 direkt vor Gebrauch: Complete [®] EDTA-free

Material und Methoden

Kern-Lyse-Puffer	50 mM Tris-Cl pH 8,1 10 mM EDTA 1% SDS direkt vor Gebrauch: Complete® EDTA-free
IP-Verdünnungs-Puffer	0,01% SDS 1,1% Triton X 100 1,2 mM EDTA 16,7 mM Tris-Cl, pH 8,1 167 mM NaCl direkt vor Gebrauch: Complete® EDTA-free
1X Dialyse-Puffer	2 mM EDTA 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 0,2% Sarkosyl (nicht bei monoklonalen Antikörpern)
IP Wash buffer	100 mM Tris-Cl pH 9,0 (pH 8,0 bei monoklonalen Antikörpern) 500 mM LiCl 1% NP40 1% Desoxycholsäure
Elutions-Puffer	50 mM NaHCO ₃ 1% SDS
5X PK Puffer	50 mM Tris-Cl pH 7,5 25 mM EDTA 1,25% SDS
Transferpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris 20 mM Glycin 20% (w/v) Methanol

2.1.7 Kits und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht genannten Bedarfsartikel wurden von K&K Laborbedarf bezogen.

Generelle Laborartikel	<i>GLW GmbH, Frickenhausen</i>
Blottingpapier, Sorte GB 003, Format 100x100 mm	<i>Schleicher & Schuell, Dassel</i>
High Prime	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
LightCycler-FastStart DNA Master SYBR GreenI	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
LightCycler capillaries	<i>Roche Molecular Biochemicals, Mannheim</i>
BioRad Protein Assay Kit	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Pipettenspitzen gestopft Art 1000	<i>Molecular Bio-Products, inc. San Diego, California</i>
Pipettenspitzen gestopft Art 200	<i>Molecular Bio-Products, inc. San Diego, California</i>
Pipettenspitzen gestopft Art 20	<i>Molecular Bio-Products, inc. San Diego, California</i>
Pipettenspitzen gestopft Art 10	<i>Molecular Bio-Products, inc. San Diego, California</i>
Gel Extraction Kit, Quiaquick	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
PCR Purification Kit	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
Parafilm	<i>Dynatech, Denkendorf</i>
Röntgenfilm X-Omat AR	<i>Kodak, Stuttgart</i>
Glass beads (212-300 microns)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Frameseal Slide Chambers 25, Kammer 25 µl	<i>BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf</i>
Frameseal Slide Chambers 65, Kammer für 65 µl	<i>BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf</i>
Gewebekulturflaschen	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>
Hybond-ECL; nitrocellulose membrane	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
NAP 5 Sephadex G-25 Säulen	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
ECL Kit	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg</i>
Einfrierampullen Cryotubes 1,5 ml	<i>Nunc GmbH, Wiesbaden</i>

Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml
Sterilfilter 0,22 Micrometer; 0,45
Immobilon-P PVDF-Membran

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Millipore GmbH, Eschborn
Millipore GmbH, Eschborn

2.1.8 Oligonukleotide

Alle Sequenzen sind in Standardrichtung 5'-3' aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden von Metabion GmbH, Martinsried angefertigt.

2.1.8.1 *Primer des c-myc-Promotors*

Die Zahlen in Klammer beziehen sich auf die „Gazin“-Sequenz von *c-myc* (Gazin et al., 1984).

Dirkmyc1 (1801-1824)	5'-TCT ACA CTA ACA TCC CAC GCT CTG-3'
Dirkmyc2 (2001-2024)	5'-GCG CTG AGT TAA TTC ATG CGG CTC-3'
Dirkmyc3 (2311-2334)	5'-GGT CTG GAC GGC TGA GGA CCC CCG-3'
Dirkmyc4 (2493-2515)	5'-CTC TCG CTG GAA TTA CTA CAG CG-3'
Dirkmyc5 (2600-2577)	5'-GGA TCT CCC TTC CCA GGA GCG CCG-3'
Dirkmyc6 (2800-2823)	5'-CAG AGA AGC GGG TCC TGG CAG CGG-3'
Luxmyc1 (2170)	5'-CTG AGT CTC CTC CCC ACC TT-3'
Luxmyc2 (2501)	5'-TCT GCC TCT CGC TGG AAT TA-3'
Luxmyc3 (2298)	5'-TTT ATA ATG CGA GGG TCT GGA-3'
Luxmyc4 (2702)	5'-GCT GCT ATG GGC AAA GTT TC-3'

2.1.8.2 *Primer des id3-Promotors (HS15005)*

ID3 (#8) (109295-109318)	5'-GAG CCT GCC TGG AAG GCA CGC CTC-3'
ID3 (#10) (109745-109768)	5'-GCC AGT GAG TCT GGA GGT CAG ACG-3'

Produktlänge: 467 bp

2.1.8.3 *Primer des rfc4-Promotors (AC009863)*

RFC4 (#12) (17928-17952)	5'-GGA GCT AAG GCC TAT TCC ACA GGA C-3'
RFC4 (#13) (18515-18538)	5'-CAC CGG AAG TGA CGC GTT ACG TGC-3'

Produktlänge: 612 bp

2.1.8.4 *Primer des Insulin-Gens*

c-DNA #: BC005255; genomische DNA #: AC006408

Luxinsulin 1	5'-GCT GGT AGA GGG AGC AGA TG-3'
Luxinsulin 2	5'-CCC TGA CTG TGT CCT CCZ GT-3'

Länge des Produktes: 201 bp

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

Ausgangszelllinie: Raji

Eine menschliche EBV-positive Burkitt-Lymphom Zelllinie (endemisches Burkitt-Lymphom), welche eine t(8;14) Translokation enthält (Pulvertaft, 1964).

Raji LS* mock stabil transfiziert mit Leervektor mock

Raji LS* wt stabil transfiziert mit einem Vektor, der die große Untereinheit der RNA-Polymerase II (RPB1) mit der normalen Länge der carboxy-terminalen Wiederholungsdomäne konditional exprimiert.

Raji LS* Δ 5 stabil transfiziert mit einem Vektor, der die große Untereinheit der RNA-Polymerase II (RPB1) mit einer verkürzten CTD konditional exprimiert. Die CTD besitzt nur 5 Wiederholungen und die letzten 17 Aminosäuren der wt CTD.

2.2.1.2 Kultivierung von Raji-Zellen

Raji-Zellen wurden in Suspensionskultur gehalten. Die Kultur erfolgte in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂-Partialdruck in einem wasserdampfgesättigten Inkubator. Die Zellen wurden alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:3 mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

Bei einigen Experimenten wurden folgende Zusätze verwendet:

α -Amanitin: Stock: 1 mg α -Amanitin/ml H₂O; steril-filtriert. Endkonzentration: 2 μ g/ml

Tetracyclin: Endkonzentration: 0,1 μ g/ml

2.2.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Viabilität einer Zellkultur erfolgte durch Auszählen der Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Hierzu wurde ein Aliquot der Kultur mit dem gleichen Volumen einer 0,5 % (w/v in PBS) Trypanblau-Lösung versetzt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff durch ihre poröse Plasmamembran auf und lassen sich im Lichtmikroskop von den ungefärbten, lebenden Zellen unterscheiden.

2.2.1.4 Aufbewahrung von Zellen

Die Lagerung von Zellen erfolgte in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 U/min, 7 min, RT) und in kaltem Einfriermedium resuspendiert. 1,5 ml Aliquots mit einer Zellzahl von ca. 1×10^7 Zellen wurden in Einfrier-Ampullen überführt, schrittweise auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Um eingelagerte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Ampullen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, die Zellen einmal in vorgewärmtem Zellkulturmedium gewaschen und dann in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in Zellkulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum aufgenommen.

Einfriermedium: 90% FKS; 10% DMSO

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die „Standard“-PCR wurde mit der RedTaq-DNA-Polymerase und dem beigefügten 10x PCR-Reaktionspuffer in 100 μl , 50 μl und 20 μl Reaktionen durchgeführt (Mullis et al., 1986). Für einen 100 μl Ansatz wurden 10 μl 10x PCR-Puffer, je 40 pMol eines Plus-Strang Primers und eines Minus-Strang Primers, je 0,1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 5 μl des Enzyms eingesetzt. In einem DNA-Thermo-Cycler wurden zwischen 10 und 37 Zyklen gefahren. Das Programm beinhaltete 3 min Denaturierung bei 95°C , 30 sek Annealing und 1 min Synthesephase bei 72°C . Den letzten Zyklus schloss eine Synthesephase (10 min) bei 72°C ab, um eine hohe Kompletierungsrate zu erreichen.

Sollte das Produkt während der Amplifikation radioaktiv markiert werden, wurden in einen Reaktionsansatz (30 μl) 0,1 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP gegeben. Durch die Zugabe des radioaktiven Nukleotids konnte die Sensitivität des PCR gesteigert werden und bei Durchführung einer quantitativen PCR eine geringere Zyklenzahl gefahren werden. Die radioaktiv markierten Produkte wurden auf einem Polyacrylamidgel (6%) elektrophoretisch aufgetrennt, getrocknet und anschließend durch Autoradiographie visualisiert.

2.2.3 Fällung von Nukleinsäuren

Um DNA anzureichern wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Die Probe wurde mit dem zweieinhalbfachen Volumen Ethanol (100%) versetzt und NaAcetat in einer finalen Konzentration von 300 mM hinzugefügt. War der Nukleinsäuregehalt der Probe sehr gering wurde noch 1 μl Glykogen (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) als Trägersubstanz dazugegeben. Die Fällung

wurde über mindestens 2 Stunden bei -20°C durchgeführt. Abschließend wurde die DNA bei 15000 U/min für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und in TE-Puffer aufgenommen.

2.2.4 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion hat den Zweck Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Phenol ist ein sehr guter Wasserstoffbrückenbildner und kann gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure-Seitenketten ausbilden. Daher werden durch Phenol Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten zerlegt. Die Proteine werden denaturiert und reichern sich in der Phenolphase an. Es wurde ein Gemisch aus 25 Teilen Phenol, 24 Teilen Chloroform und 1 Teil Isoamylalkohol verwendet. Während Chloroform Proteine denaturiert und die Phasentrennung erleichtert, verhindert Isoamylalkohol das Schäumen und das Ausbilden einer starken Interphase. Zu der zu reinigenden Probe wurde das gleiche Volumen an Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugefügt und anschließend für 30 sek geschüttelt. Das Gemisch wurde für 2 min bei 13000 U/min zentrifugiert und die wässrige Phase abgenommen. Dieser Schritt wurde mit einem Gemisch aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Anschließend wurde eine Ethanolfällung durchgeführt.

2.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Größenstandards

10 μl einer 50 bp (3,4 μg) Leiter wurde 1 h bei 37°C mit 1 μl alkalische Phosphatase aus Kälberdarm in einer Pufferlösung inkubiert. Danach wurden die Proteine mit 1 μl Proteinase K (15,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zusammen mit 1% SDS verdaut und anschließend über Nacht in Ethanol gefällt.

2.2.6 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

2.2.6.1 Markierung nach der „random primed labeling“-Methode

Für die radioaktive Markierung von DNA wurde die „random-primed“-Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1983; Feinberg and Vogelstein, 1984) angewendet. Es wurde hierbei das „High Prime Kit“ von Roche verwendet. 2 – 500 ng DNA wurden mit dem Kit und 50 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (3000 Ci/mMol) nach den Angaben des Herstellers markiert. Die nicht inkorporierten, radioaktiven Nukleotide wurden mit einer NAPTM-25 Säule abgetrennt. Die eingebaute Radioaktivität wurde in einem Benchtop Radioisotop-Zähler gemessen und die Probe vor der Hybridisierung hitzedenaturiert.

2.2.6.2 Markierung mit der Klenow-Polymerase

Das Klenow-Enzym, „large fragment“ der DNA-Polymerase I, das durch Subtilisin-Behandlung der singulären Kette der DNA-Polymerase I erhalten werden kann, besitzt nur die 5'→3'-Polymerase- und die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, während die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität des ursprünglichen Enzyms nicht mehr vorhanden ist. Unterschiedliche Mengen DNA wurden durch Zugabe eines Primers und nach Angaben des Herstellers für 30 min bei 37°C markiert. Die nicht inkorporierten, radioaktiven Nukleotide wurden in einer Chromatographie an Sephadex abgetrennt. Die eingebaute Radioaktivität wurde in einem Benchtop Radioisotop-Zähler gemessen und die Probe vor der Hybridisierung hitzedenaturiert.

2.2.6.3 Radioaktive Endmarkierung von DNA-Größenstandards

Die radioaktive Markierung erfolgte mit Hilfe von [γ -³²P]-dATP. Dabei wird in einer durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe der DNA übertragen. 5 μ l des Größenstandards wurden mit 5 μ l [γ -³²P]-dATP, 1,5 μ l 10x Puffer und 1 μ l T4-Polynukleotid-Kinase bei 37°C für 30 min inkubiert. Die überschüssigen Nukleotide wurden mit einer Chromatographie an Sephadex G50 abgetrennt.

2.2.7 SDS–Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Western–Blot)

Für die Präparation von Proteinextrakten wurden ca. 1×10^7 Zellen aus einer Kultur entnommen, bei 1200 U/min abzentrifugiert und in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach 6 min Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 μ l Schindler Lyse–Puffer gelöst. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und der Überstand bei – 80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinmenge der Lysate wurde der Biorad–Protein–Assay nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Nachweis beruht auf der Beobachtung von Bradford (Reid et al., 1970), dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 495 nm nach 595 nm verschiebt. Zur Quantifizierung wurde eine Eichkurve mit BSA von 1 μ g/ μ l bis 16 μ g/ μ l erstellt. Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS als anionisches Detergenz wurde nach (Cleveland et al., 1977) durchgeführt. 10 μ g – 40 μ g

Proteinlösung wurde mit SDS-Ladepuffer gemischt und 5 min bei 95°C hitzedenaturiert und anschließend zusammen mit gefärbten Proteinstandards auf einem Polyacrylamid-Gel für ca. 1,5 h bei 150 V aufgetrennt. Das Sammelgel hatte einen Acrylamidanteil von 5%, das Trenngel von 6% - 13%. Nach dem Lauf wurden die Gele für den Western-Blot verwendet.

Die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden durch elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (Towbin et al., 1979). Der Transfer erfolgte 1 h bei 500 mA oder über Nacht bei 100 mA im Kühlraum, um ein zu starkes Erwärmen des Transferpuffers zu verhindern. Nach dem Blotten wurden die Proteinblots mit Block-Puffer abgesättigt. Dieses „Blocken“ dient dazu, überschüssige Proteinbindungsstellen der Membran zu saturieren und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern.

Es folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper (in PBS Tween 0,1%; 0,1 g BSA) für 45 min bei Raumtemperatur unter stetem Schütteln. Zur Visualisierung der Proteine wird ein Zweit-Antikörper verwendet, der gegen konstante Teile des Erst-Antikörpers gerichtet ist und an welchen eine Meerettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Die Membran wurde mit diesem Antikörper in Milchpulver für mindestens 30 min inkubiert. Der Nachweis der Antikörperkomplexe beruht auf einer lokalen Chemolumineszenzreaktion durch die Peroxidase; die Chemolumineszenz des Luminols wird durch die Phenole verstärkt (Thorpe et al., 1985) und kann durch kurzzeitige Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Für die Reaktion wurde ein ECL-Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.8 Immunpräzipitation

2.2.8.1 Lyse

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und das Pellet mit kaltem RIPA-Puffer lysiert. Hierbei wurde 1 ml RIPA-Puffer pro 1×10^7 Zellen verwendet und die Lyse für 30 min auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde für 15 min bei 15300 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß übertragen.

2.2.8.2 Preclearing

Um unspezifische Bindungen der Antikörper während der Präzipitation zu verringern, wurden die Lysate mit Staph.-A Zellen oder mit Protein A bzw. Protein G Sepharose für

15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand, wenn notwendig, in einem Mikroreaktionsgefäß mit RIPA-Puffer auf 500 µl aufgefüllt.

2.2.8.3 Immunpräzipitation

Für eine Immunpräzipitation wurden pro Antikörper 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Immunpräzipitation wurde mit unterschiedlichen Antikörpern mindestens für eine Stunde auf Eis oder über Nacht im Kühlraum durchgeführt. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Inkubation mit Staph.-A-Zellen oder Protein-A bzw. Protein-G-Sepharose für mindestens 45 min präzipitiert. Nun wurden die Präzipitate dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen; das Pellet wurde in 50 µl Lämmli-Puffer gelöst und konnte so für eine SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese verwendet werden. Hierzu wurden die Proben für 10 min auf 85 °C erhitzt und anschließend 25 µl pro Spur (entspricht $2,5 \times 10^6$ Zellen) im Western-Blot aufgetragen.

2.2.9 Chromatin-Immunpräzipitation (nach Farnham-Lab)

Für weitergehende Informationen siehe auch: <http://mcardle.oncology.wisc.edu/farnham>

2.2.9.1 Herstellung von Staph.-A-Zellen

Benutzt wurden lyophilisierte Protein-A-positive Staphylococcus aureus Zellen (Cowan I Stamm) der Firma Roche (Staph A cells, Roche, Katalognummer: 100061), die hitzegetötet und in Formalin fixiert wurden (Weinmann and Farnham, 2002). 1 g dieser Zellen wurde in 10 ml 1x Dialyse-Puffer resuspendiert und anschließend bei 10000 U/min für 5 min bei 4 °C zweimal zentrifugiert und gewaschen. Hiernach wurden die Zellen in 3 ml 1x PBS, 3 % SDS und 10 % BME resuspendiert. Dieses Gemisch wurde für 30 min gekocht und anschließend 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in 1x Dialyse-Puffer gewaschen und in 4 ml desselben resuspendiert. Nachdem die Zellen in 100 µl Aliquots aufgeteilt wurden, konnten sie in flüssigem Stickstoff blitzgefroren und gelagert werden.

Für ein Experiment wurden für 5×10^7 Zellen eine 100 µl Fraktion aufgetaut. Um den Anteil unspezifischer Bindungen zu verringern, wurde jedes Aliquot mit 10 µl salmon sperm DNA (10 mg/ml) und 10 µl BSA (10 mg/ml) inkubiert. Diese Inkubation wurde bei 4 °C für mindestens 3 h oder über Nacht auf einer rotierenden Plattform durchgeführt. Direkt vor Gebrauch wurden die Staph.A-Zellen zweimal mit 1x Dialyse-Puffer gewaschen.

2.2.9.2 Crosslink mit Formaldehyd

Raji-Zellen wurden vor dem Crosslink bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert, um das Medium zu entfernen. 270 µl Formaldehyd (37%) wurden hinzugegeben, um eine finale Konzentration von 1 % zu erreichen. Die Falcons wurden 10 min bei Raumtemperatur gerollt und der Crosslink durch Zugabe von Glycin (125 mM final) für 5 min gestoppt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen.

2.2.9.3 Kernpräparation

Das Pellet wurde in Zell-Lyse-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Um ein Freisetzen der Kerne aus den Zellen zu erleichtern, wurde 10x ein Douncer benutzt. Anschließend wurde die Kerne für 5 min bei 4 °C und 4500 U/min pelletiert. Die Kerne wurden in Kern-Lyse-Puffer für 10 min auf Eis lysiert.

2.2.9.4 Sonifizierung

Das Chromatin wurde mit Hilfe ein Sonicators auf eine durchschnittliche Länge von 1 kb zerkleinert. Der Schritt des Sonifizierens ist ziemlich kompliziert. Durch ein Kühlen der Proben auf einem Eis-Ethanol-Gemisch wurde versucht, ein Erwärmen der Proben zu verhindern. Die Dauer der Sonifizierung muss für jeden Zelltyp individuell bestimmt werden. Auch ist die Effizienz der Sonifizierung stark von der Chromatinkonzentration abhängig. Trotz zahlreicher Versuche war es nicht möglich das Chromatin auf die optimale Länge von durchschnittlich 500-700 bp zu zerkleinern. Um die Effizienz zu steigern wurde den Proben eine Spatelspitze Glaskügelchen (glass beads, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH) zugegeben. Danach wurden die Proben für 10 min bei 5000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.9.5 Immunpräzipitation (IP)

Pro IP wurde das Chromatin aus 2×10^7 Zellen eingesetzt. Es wurde immer eine Kontrolle ohne Antikörper eingeschlossen. Vor der IP wurden die Proben mit IP-dilution-buffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde ein „Preclearing“ mit geblockten Staph-A-Zellen für 15 min bei 4 °C in Rotation durchgeführt (siehe oben). Anschließend wurde 1 µg Antikörper zur Antigenerkennung eingesetzt. Die Proben wurden für mindestens 3 Stunden oder über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rotieren inkubiert. Bei monoklonalen Antikörpern wurde ein Sekundär-Antikörper für ein Stunde hinzugegeben, um die Bindung an die Staph-A-Zellen zu verbessern. Die Antigen-

Antikörper-Komplexe wurden durch Zugabe von geblockten Staph-A-Zellen bzw. Protein-A(oder G)-Sepharose für 15 min (Staph-A-Zellen) oder mindestens 3 Stunden (Protein-A(oder G)-Sepharose) bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde 20% des Überstands der Probe ohne Antikörper als „input-chromatin“ aufgehoben. Alle Proben wurden anschließend mit verschiedenen Puffern gewaschen: 2x mit Dialyse-Puffer, 4x mit IP-Puffer. Bei jedem Waschschrift wurde das Pellet zuerst in 700 µl Puffer gelöst und dann weitere 700 µl dazupipettiert und daraufhin bei 14000 U/min für 3 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift ist sehr gründlich durchzuführen, da die Proben später mit der PCR-Technologie untersucht werden, und so schon geringe Verunreinigungen zu einem falschen Signal führen können.

2.2.9.6 Elution der Proteine und Reversion der Crosslinks

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Protein-DNA-Komplexe von den Staph-A-Zellen bzw. der Protein-A(oder G)-Sepharose durch Zugabe von 150 µl IP-Elutionspuffer abgelöst. Die Proben wurden mit dem Puffer für 15 min in einem Vortexer geschüttelt, anschließend bei 14000 U/min für 3 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt und beide Elutionen wurden vereint. Bei der Elution ist es entscheidend, dass wirklich sämtliche, gebundenen Protein-DNA-Komplexe abgelöst werden. Nach der zweiten Elution wurden die Proben nochmals zentrifugiert, um jegliche Reste von Staph-A-Zellen zu entfernen. Die in den Proben enthaltene RNA, wurde durch 1 µl RNase A (10 µg/µl) verdaut. Die Crosslinks wurden nach Zugabe von NaCl (5 M) bis zu einer finalen Konzentration von 300 mM durch Inkubation in einem Wasserbad bei 67 °C für mindestens 5 Stunden rückgängig gemacht. Hiernach wurde die DNA in einer Ethanol-Fällung über Nacht bei -20°C präzipitiert.

2.2.9.7 Verdau der Proteine und Fällung der DNA

Die Pellets wurden in 100 µl TE gelöst und 25 µl des 5x PK-Puffers sowie 1,5 µl Proteinase K zu gegeben. Wenn die „Input“-Probe sich nicht löste, wurde das Volumen an TE erhöht. Anschließend wurden die Proteine durch Inkubation in einem Wasserbad bei 45 °C für 2 h verdaut. Zu den Proben wurden nun 175 µl TE-Puffer gegeben und eine Reinigung durch Phenolextraktion (siehe oben) durchgeführt. Die Prozedur wurde für die „Input“-Probe, wenn nötig, wiederholt. Nach Zugabe von 30 µl NaCl (5M) und 5 µg Glykogen wurde eine Ethanol-Fällung bei -20°C über Nacht durchgeführt. Die Pellets wurden in 30 µl TE gelöst. Die Input-Probe wurde ebenfalls in 30 µl gelöst und

anschließend nochmals 100-fach verdünnt. Für eine PCR wurden jeweils 3 µl eingesetzt. Da für das Input-Chromatin nur 20% des gesamten Ausgangsmaterials verwahrt wurden, entspricht das Input-Signal einer PCR-Reaktion 0,2% des „wahren“ Ausgangsmaterials.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Chromatin-Immunpräzipitation

Um die Frage zu beantworten, ob die RNA-Polymerase II mit einer verkürzten carboxyterminalen Wiederholungsdomäne (CTD) noch in der Lage ist an DNA im Promotorbereich eines Gens zu binden, bedarf es der Etablierung einer Chromatin-Immunpräzipitation. Durch diese Technik gelingt es Bindungsstellen eines Proteins im Genom mit einer hohen Genauigkeit vorherzusagen (Boyd and Farnham, 1999; Orlando, 2000; Weinmann and Farnham, 2002; Weinmann et al., 2002; Wells and Farnham, 2002).

3.1.1 Übersicht über die Technik der Chromatin-IP

Die Genregulation ist ein komplexer Prozess bei dem es auf die akkurate zeitliche und örtliche Regulation eines jeden Genes ankommt. Häufig sind die verantwortlichen Faktoren in Multiproteinkomplexen lokalisiert und der einzelne Faktor übt seine Funktion in zeitlich koordinierter Reihenfolge aus (Agalioti et al., 2000). Zu verstehen, wie alle diese einzelnen Teilnehmer im chromosomalen Kontext organisiert sind und wie ihre Aufgaben *in vivo* reguliert werden, ist eine herausfordernde Aufgabe (Breiling et al., 2001; Orlando, 2000).

Eine der nützlichsten Techniken zur Beantwortung dieser Fragestellung stellt die Chromatin-Immunpräzipitation dar (Abbildung 5). Sie ermöglicht in lebenden Zellen durch reversible Fixierung (Crosslink) von Proteinen und DNA und darauf folgender Immunpräzipitation die Bindungsstellen von Proteinen an DNA nachzuweisen. So lässt sich die *in vivo* Bindungsstelle eines beliebigen Proteins direkt demonstrieren. Auch können Proteine, welche nicht selbst an die DNA binden, aber durch die Anwesenheit eines anderen Proteins in die Nähe gebracht werden, mit dieser Technik untersucht werden (Orlando, 2000). Antikörper die gegen das untersuchte Protein gerichtet sind, erlauben eine Immunoselektion aller genomischen Bindungsstellen. Abschließend kann die Formaldehydfixierung (Crosslink) vollständig rückgängig gemacht werden und die DNA mit Hilfe der PCR-Technik analysiert werden (Abbildung 5).

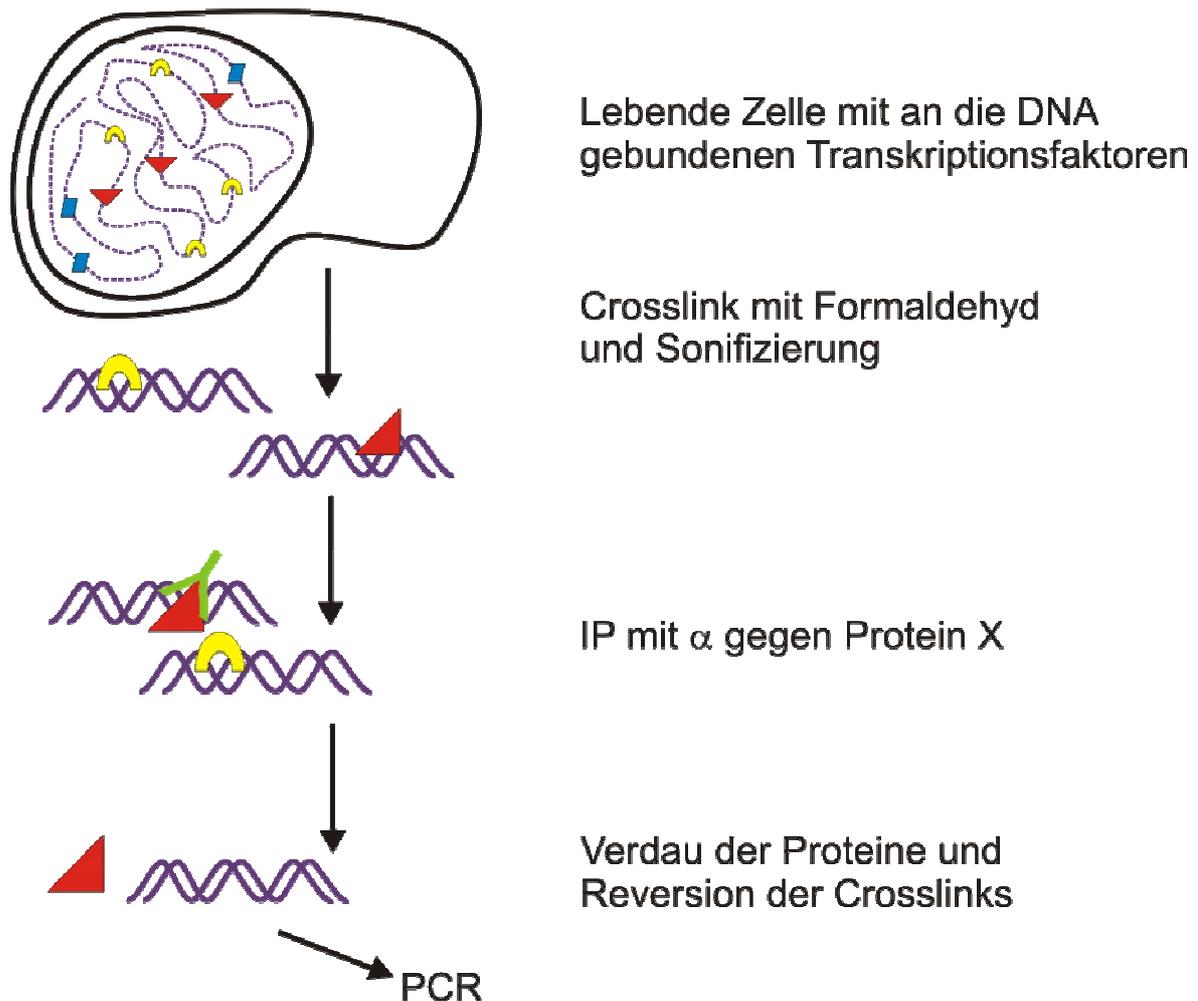


Abbildung 5 Schemazeichnung einer Chromatin-Immunpräzipitation.
 Durch Inkubation von lebenden Zellen mit Formaldehyd werden Proteine an die DNA fixiert (Crosslink). Nach Zerkleinerung der DNA durch Sonifizierung können die Proteine durch Immunpräzipitation angereichert werden. Die Bindungen zwischen Proteinen und DNA werden durch Erhitzen rückgängig gemacht und die Proteine anschließend verdaut. Die ursprünglich mit dem Protein in Kontakt gestandenen DNA-Fragmente können nun mit der PCR-Technologie amplifiziert werden. War das untersuchte Protein an einen Abschnitt gebunden, zeigt sich in der PCR eine Anreicherung dieses Fragments in Bezug auf das Produkt eines unspezifischen Antikörpers.

3.1.2 Die Chemie des Crosslinks

Formaldehyd produziert *in vivo* auf effiziente Weise Verknüpfungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren, sowie zwischen Proteinen und Proteinen. Formaldehyd selbst ist eine sehr reaktive, dipolare Substanz, in welcher das Kohlenstoffatom als nukleophiles Zentrum agiert. Amino- und Iminogruppen von Aminosäuren (hauptsächlich Lysin, Arginin und Histidin) und DNA (hauptsächlich Adenine und Cytosine) reagieren mit Formaldehyd

unter Bildung einer Schiffsschen Base. Dieses Zwischenprodukt kann selbst wieder mit einer zweiten Aminogruppe reagieren und kondensieren, um den finalen DNA-Protein-Komplex zu ergeben (McGhee and von Hippel, 1975a; McGhee and von Hippel, 1975b). Diese Reaktionen finden *in vivo* innerhalb von Minuten nach Zugabe von Formaldehyd zu lebenden Zellen statt. Wie schon erwähnt, besteht der besondere Vorteil von Formaldehyd-Crosslinks in ihrer vollständigen Umkehrbarkeit. Dies wird durch Protonierung der Imino-Gruppen bei niedrigem pH in wässriger Lösung erreicht.

Für die Identifizierung und Charakterisierung von *in vivo* Bindungsstellen eines bestimmten Proteins nach Immunpräzipitation von gecrosslinktem Chromatin wird die DNA gereinigt und mit konventionellen Methoden wie z.B. PCR analysiert. Diese Analyse erfordert die Entfernung aller Proteine aus der präzipitierten Probe. Daher wird die Probe mit Proteinase K und milder Hitze behandelt, um alle Proteine zu entfernen. Anschließend wird die DNA mit Standardmethoden aufgereinigt (Abbildung 5).

3.1.3 Technische Herausforderungen der Chromatin-IP

3.1.3.1 Dauer des Crosslinks und Einfluss auf das Antikörper-Epitop

Bei der Dauer der Behandlung hat sich herausgestellt, dass ein Zeitraum von 10 min gutes Mittelmaß darstellt (Weinmann and Farnham, 2002; Wells and Farnham, 2002). In diesem Zeitrahmen werden einerseits die Proteine effizient mit der DNA verknüpft und andererseits wird eine Maskierung von Epitopen durch ein zu starkes Ausmaß an Verbindungen verhindert. Bei der Behandlung der Zellen mit Formaldehyd besteht die Möglichkeit, Epitope des Antigens durch Denaturierung zu verlieren. Formaldehyd hat eine leicht denaturierende Wirkung auf Proteine und es ist bekannt, dass es mit der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen interferiert (Orlando, 2000).

3.1.3.2 Die Elution der Proteine funktioniert vollständig

Wie unter „Material und Methoden“ beschrieben werden die Protein-DNA-Komplexe von der Protein A-bzw. G-Sephrose durch Waschen in einem Puffer abgelöst. Dieser Schritt wurde kontrolliert indem die Staph-A-Zellen bzw. Protein-A(oder G)-Sephrose noch mal in 20 µl IP-Elutionspuffer inkubiert wurden. Dazu wurde dann 10 µl 2x SDS-Ladepuffer geben und die Probe auf eine SDS-Page aufgetragen. Falls sich noch eine bedeutende Menge an Proteinen auf den Staph-A-Zellen befand, würde diese auf dem Polyacrylamidgel in einer Comassie-Blau-Färbung sichtbar sein. Auch wurde auf der geblotteten Nitrozellulosemembran nach Proteinen mit einem α -HA Antikörper (3F10)

gesucht. Das mit Commassie-Blau gefärbte Gel zeigte keinen Hinweis für eine größere Menge Protein in den untersuchten Probe (Daten nicht gezeigt). Auf den Western-Blot wurden als Positivkontrollen die Lysate von Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$ Zellen aufgetragen, in denen die LS induziert wurde (Abb. 6 Spur 1-3). Hier ist das Signal der großen Untereinheit in seiner normalen Form (Spur 2) und in der Form mit trunkierter CTD zu sehen (Spur 3). Dagegen zeigen die Proben nach der Elution von den Staph-A-Zellen kein Signal (Spur 4-6). Es bleibt also festzuhalten, dass die Elution der Protein-DNA-Komplexe von den Staph-A-Zellen vollständig funktioniert.

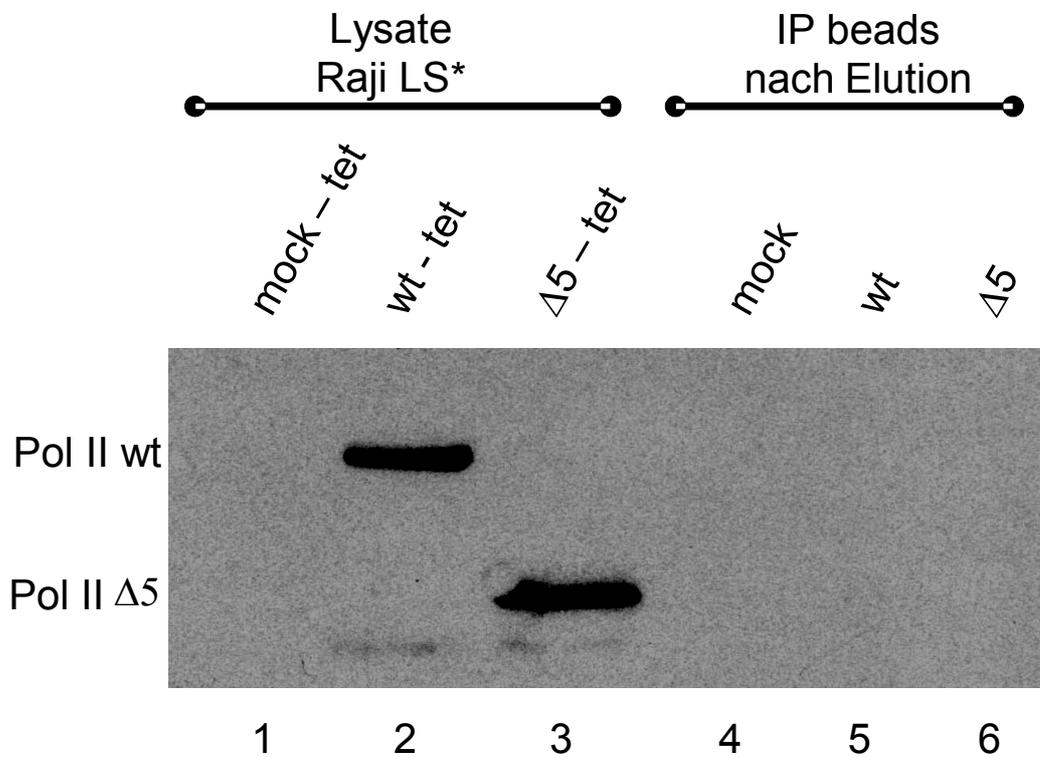


Abbildung 6 Kontrolle der Elution auf Vollständigkeit nach Chromatin-IP. Nachdem die Proteine von den Staph.-A-Zellen eluiert wurden, wurden nochmals 20 μ l IP-Elution-Puffer zu den Proben gegeben. Nach 15 min Inkubation unter stetem Schütteln wurde 10 μ l 2x SDS-Ladepuffer dazugegeben. Nach Zentrifugation wurden die Überstände auf eine SDS-Page aufgetragen (Spuren 4-6). Auf den Spuren 1-3 wurden Lysate der Zelllinien Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$, in denen die LS induziert wurde als Kontrolle aufgetragen.

3.1.4 Konditionale Expression von CTD-Mutanten

Für die Versuche wurden Raji-Zelllinien verwendet, in welchen sich die RNA-Polymerase konditional exprimieren lässt (Meininghaus et al., 2000). Bei Raji handelt es sich um eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie mit einer *c-myc* Translokation. Hierbei ist das *c-myc* Gen auf Chromosom 8q24 durch eine chromosomale Translokation mit dem Immunglobulin μ der schweren Kette auf Chromosom 14q32 fusioniert. Die Translokation hat eine transkriptionelle Aktivierung der Promotoren P1 und P2 zur Folge; die Promotoren des nicht translozierten *c-myc* Gens sind nicht aktiv (Albert et al., 1994; Hamlyn and Rabbitts, 1983; Magrath, 1990). In diese Zellen wurde ein Vektor mit einem 8,1 kb großen HindIII-EcoRI Fragment des *c-myc*-Gens kloniert, der den Replikationsursprung des Epstein-Barr-Virus (EBV-oriP) enthält (Abb. 7) (Albert et al., 1997). Für EBV-oriP enthaltende Plasmide ist keine Integration in das Genom von humanen EBV-positiven Zellen beschrieben; vielmehr liegen sie als Episom vor und werden mit der genomischen DNA repliziert (Yates et al., 1984). Das episomale *c-myc*-Gen wird in diesen Zellen nicht exprimiert, kann jedoch durch Histondeacetylase-Inhibitoren induziert werden.

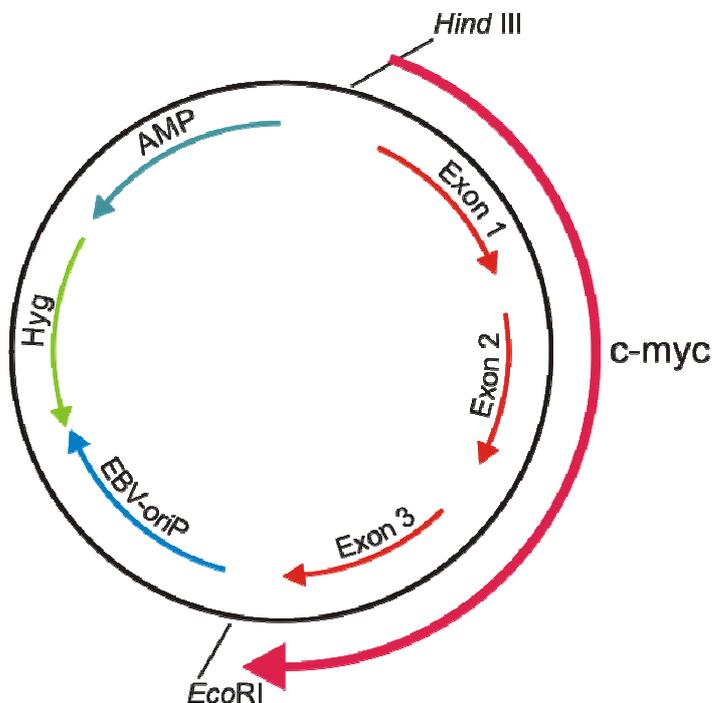


Abbildung 7 Schematische Darstellung des *c-myc*-Vektors.

Der Vektor enthält das 8,1 kb große HindIII–EcoRI–Fragment des *c-myc* Gens. Verwendete Abkürzungen: AMP, Ampicillin–Resistenzgen; EBV–ori–P ein Replikationsstartpunkt des Epstein-Barr-Virus (EBV) für die episomale Vervielfältigung des Plasmids; HYG, Hygromycin-Resistenzgen.

In diese Zelllinie, KH375 genannt, wurde ein zweites Konstrukt eingefügt, das die große Untereinheit der RNA Polymerase II (LS*wt) konditional exprimiert (Abb. 8) (Meininghaus et al., 2000). Die Konditionalität der Expression wird durch diesen Vektor gewährleistet, indem die große Untereinheit (RPB1) unter die Kontrolle eines durch Tetrazyklin-(Tc)-Entzug induzierbaren Promotors gestellt wurde. Dieses „Tc-Off“ genannte System basiert auf der Tc-abhängigen Bindung des Tc-Repressors aus *E.coli* an seine Operatorsequenz (*tetO7*). Durch Fusion des Tc-Repressors an die Transaktivierungsdomäne des VP16-Proteins wurde ein Transaktivator (TcTA) generiert, der in der Abwesenheit von Tc an seine Operatorsequenz bindet und in der Umgebung befindliche Promotoren aktiviert (Gossen and Bujard, 1992). Zur Unterscheidung der vektoriiellen Polymerase von der endogenen Polymerase wurde ein Hämagglutinin-„tag“ an das Protein fusioniert. Die große Untereinheit trägt weiterhin eine Punktmutation, welche eine Resistenz gegen das Gift des Knollenblätterpilzes, α -Amanitin, dem potentesten Inhibitor des Enzyms vermittelt (Abb. 8). Diese Mutation besteht aus einem Aminosäureaustausch an Position 793 (Asparagin \rightarrow Asparaginsäure) (Bartolomei and Corden, 1995).

Kürzlich konnte durch Röntgenstrukturanalyse die Position des zyklischen Peptids α -Amanitin im Verbund mit der Polymerase gezeigt werden (Bushnell et al., 2002). Hierbei zeigte sich, dass die Bindung von α -Amanitin an die RNA-Polymerase II zwar die Passage von Nukleotiden zum aktiven Zentrum und die RNA-Synthese gestattet, aber die Translokation von DNA und RNA verhindert. Diese Konformationsänderung ist notwendig, um am aktiven Zentrum Platz für die nächstfolgende Synthese zu schaffen. Die Inhibition der Translokation wird durch Interaktion von α -Amanitin mit der „bridge helix“ verursacht, deren Bewegung für die Translokation unerlässlich ist (Bushnell et al., 2002). Die endogene RNA-Polymerase wird durch die Inhibition beschleunigt abgebaut (Nguyen et al., 1996). Eine zweite Eigenschaft von α -Amanitin ist generell mRNAs zu stabilisieren (Meininghaus et al., 2000). Die komplette Hemmung der RNA-Polymerase durch α -Amanitin wird in der Zellkultur mit Raji-Zellen nach einer Zeit von 14-24 h erreicht. Dies wird auf die schlechte Membrangängigkeit des zyklischen α -Amanitin zurückgeführt.

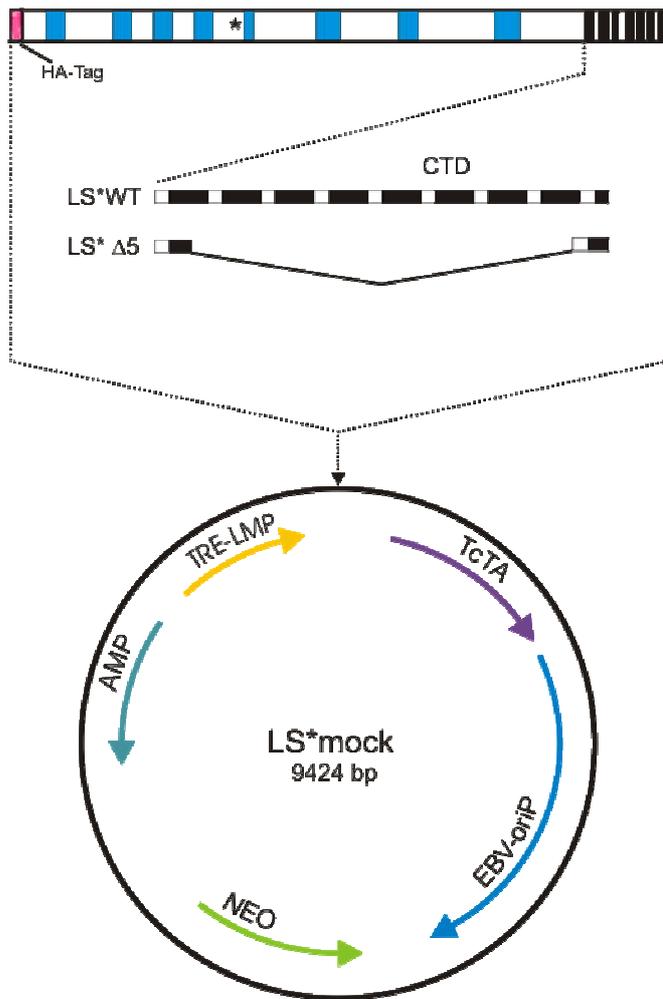


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Polymerase-Expressionsvektors.

Die murine α -Amanitin resistente Untereinheit RPB1 der RNA-Polymerase II sowie die CTD-Deletionsmutante wurden in den Vektor LS*mock kloniert (LS* wt, LS* Δ 5). Blaue Bereiche sind in der Evolution hoch konserviert. Die α -Amanitin-Resistenz vermittelnde Punktmutation ist mit einem Stern markiert. Die Bezeichnung ist LS*wt für die Wildtypvariante der CTD und LS* Δ 5 für die Variante mit nur fünf Heptapeptiden. Weitere Abkürzungen: NEO, Neomycin (G418)-Resistenzgen; AMP Ampicillin-Resistenzgen; CTD, Carboxy-terminale Domäne; EBV-ori-P ein Replikationsstartpunkt des Epstein-Barr-Virus (EBV) für die episodale Vervielfältigung des Plasmids; TcTA, Tetracyclin (Tc)-abhängiger Transaktivator, der an die *tet07*-Sequenz im responsiven Element (TRE) bindet und den EBV-Minimal-Promotor LMP2A aktiviert; (Meininghaus et al., 2000).

3.1.5 Expression der RNA-Polymerase II-Mutanten

Bevor eine Immunpräzipitation der RNA-Polymerase II durchgeführt werden konnte, wurde getestet, ob die verwendeten Zellen die vektorielle Polymerase nach Auswaschen von Tetracyclin exprimieren. Hierzu wurde ein Western-Blot mit Lysaten der Zelllinien Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* Δ 5, wie unter „Material und Methoden“

beschrieben, angefertigt. 24 h vorher wurde Tetracyclin aus dem Medium ausgewaschen und nach dem Transfer die RNA-Polymerase II mit einem α -HA Antikörper nachgewiesen (Abb. 9). Wie in der Abbildung 9 zu erkennen ist, wird die große Untereinheit der RNA-Polymerase II nur nach Auswaschen von Tetracyclin aus dem Medium exprimiert (Spur 4 und 6). Dagegen ist, sowohl bei Anwesenheit von Tetracyclin im Medium als auch bei den Lysaten von Raji LS* mock, kein spezifisches Signal zu erkennen (Spur 1, 2, 3, 5). Dies war zu erwarten, da es sich bei der Zelllinie Raji LS* mock um den Leervektor handelt. Es ist weiterhin deutlich zu erkennen, dass die LS mit der trunkierten CTD auf Grund ihrer niedrigeren Größe in der Elektrophorese schneller läuft (Spur 4 und 6) (Meininghaus and Eick, 1999).

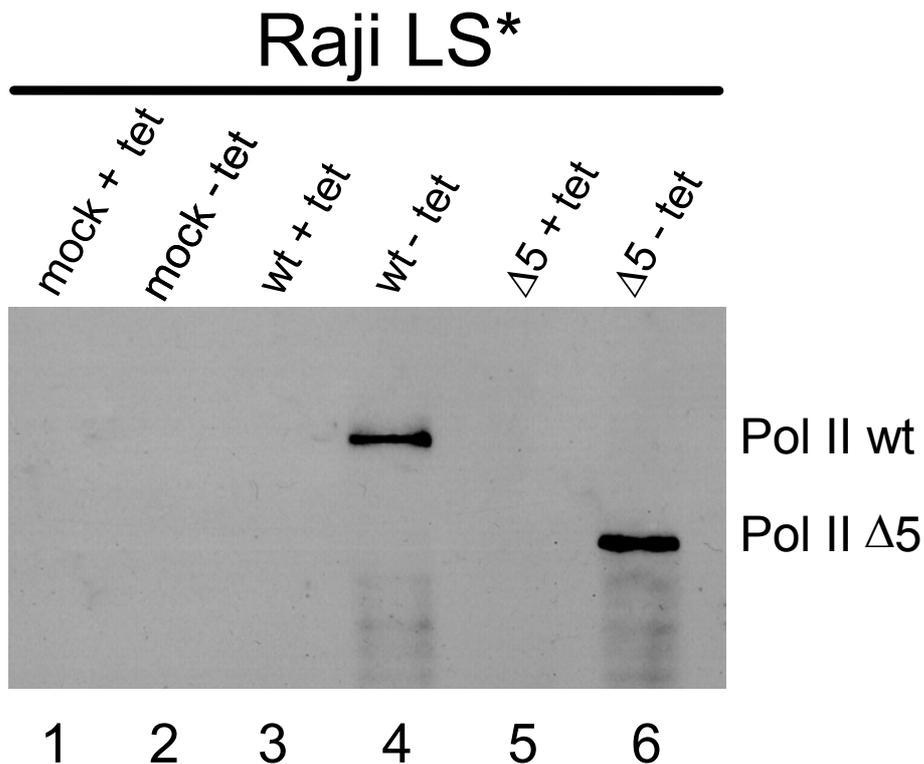


Abbildung 9 Nachweis der tetracyclin-abhängigen Expression der rekombinanten RNA-Polymerase II.

Lysate der Zelllinien Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$ wurden angefertigt und die Proteine von $5,4 \times 10^4$ Zellen pro Spur in einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetragen. Bei den mit „- tet“ gekennzeichneten Spuren wurde 24 h vor der Lyse Tetracyclin aus dem Medium ausgewaschen, während bei den als „+ tet“ bezeichneten Säulen weiterhin Tetracyclin im Medium war. Der Nachweis der RPB1 erfolgte mit einem HA spezifischen Antikörper (α HA 3F10).

3.2 Immunpräzipitation der rekombinaten RNA-Polymerase II

Nachdem nun gesichert war, dass in den Zellen die rekombinante LS konditional exprimierbar ist, wurde eine Immunpräzipitation (IP) der RNA-Polymerase durchgeführt. Bei der Etablierung einer Chromatin-IP ist der Durchführung einer IP des gesuchten Proteins größte Bedeutung beizumessen. Nur wenn eine IP funktioniert, hat auch die Chromatin-IP eine Chance auf Erfolg. Dies ist damit zu begründen, dass bei der Chromatin-IP das Epitop des Erstantikörpers durch den Prozess des Crosslinkens mit Formaldehyd verändert bzw. maskiert werden kann. Eine erfolgreiche IP kann die zufrieden stellende Durchführung einer Chromatin-IP nicht garantieren; dagegen ist eine Chromatin-IP nach nicht funktionierender IP als aussichtslos zu bewerten. Ziel des Versuches ist es, die RNA-Polymerase aus Lysaten der Zelllinien Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$ zu präzipitieren, wobei Raji LS* mock als Negativkontrolle dient, da in diese Zellen keine LS kloniert wurde. Zum Nachweis der LS kommt wieder der α -HA Antikörper 3F10 zu Anwendung, welcher schon in Abbildung 9 ein starkes Signal produzierte. Nach der IP, wie in Material und Methoden beschrieben, werden die Präzipitate auf einem Western-Blot detektiert. Die IP dient hierbei als Test, um die Präzipitationsfähigkeit der LS zu demonstrieren; auch kann die Bindung der Protein A-bzw. Protein G–Sephrose an die Antigen-Antikörper-Komplexe beurteilt werden.

Aus dem Medium wurde 48 h vor Beginn des Experiments Tetracyclin ausgewaschen und 24 h vor Beginn α -Amanitin (final: 2 μ g/ml) zugegeben. Das α -Amanitin wird vor allem für den späteren Versuch einer Chromatin-IP benötigt. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass durch α -Amanitin nicht nur die Funktion der RNA-Polymerase gehemmt, sondern auch deren Abbau beschleunigt wird (Meininghaus et al., 2000; Meininghaus and Eick, 1999; Nguyen et al., 1996). Die rekombinante, α -Amanitin resistente RNA-Polymerase II hat durch diesen Abbauprozess der endogenen Pol II einen „Standortvorteil“, da sie nun nicht mehr um Bindungsstellen an den Promotorbereichen mit der endogenen RNA-Polymerase konkurrieren muss. So erhöht sich durch Zugabe von α -Amanitin die Wahrscheinlichkeit, in einer Chromatin-IP eine rekombinante Pol II nachzuweisen.

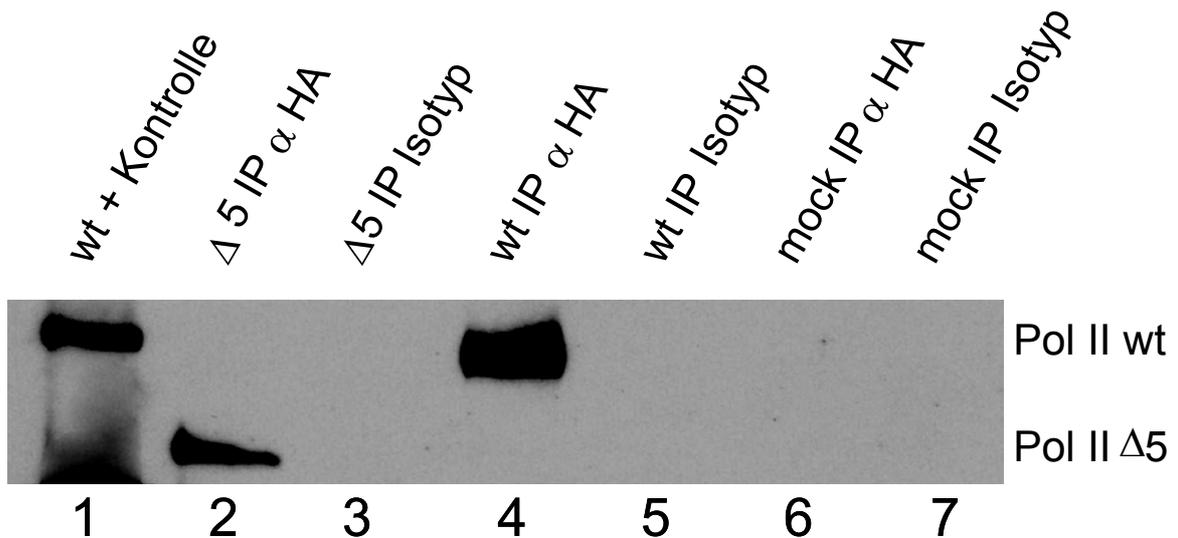


Abbildung 10 Immunpräzipitation der RNA-Polymerase II LS* wt und LS* Δ5.

Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* Δ5 Zellen wurden 48 h ohne Tetracyclin kultiviert. Nach 24 h Induktion der Pol II wurde α -Amanitin (2 μ g/ml) ins Medium gegeben und die Zellen wurden für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurden Lysate hergestellt und die Pol II mit einem α -HA Antikörper (3F10) präzipitiert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls IPs mit einem Isotyp-Antikörper durchgeführt. In Spur 1 ist eine Positivkontrolle mit LS* wt aus normalen Lysaten zu sehen. Die Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem α -HA Antikörper (3F10).

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, ist eine Immunpräzipitation der rekombinanten RNA-Polymerase möglich (Spur 2 und 4). Zum Vergleich und als Positivkontrolle wurde auch ein Lysat ohne IP auf das Gel aufgetragen (Spur 1). Es lässt sich leicht die Größe der Positivkontrolle mit der IP aus Raji LS* wt-Zellen (Spur 4) vergleichen und somit deren Spezifität bestätigen. Die IP aus Raji LS* Δ5 Zellen zeigt wiederum das Signal der trunkierten großen Untereinheit (Abbildung 10 Spur 4, siehe auch Abbildung 9). Wie zu erwarten zeigen die IPs des Leervektors (Spur 6 und 7) kein Signal. Eine zusätzliche Kontrolle stellt die Immunpräzipitation mit einem unspezifischen Antikörper dar, der kein Signal im Western-Blot zeigen darf, da er nicht gegen das HA-Epitop gerichtet ist und somit eine Anreicherung dieses Proteins nicht erlaubt (Spur 3, 5 und 7). Die Qualität der IP bzw. Antigenkomplexpräzipitation wurde durch einen zusätzlichen Schritt überprüft: Vor dem Blotten wurde das Polyacrylamidgel in einer Comassie-Blue Lösung gefärbt, um die schweren Ketten der Antikörper zu visualisieren (Daten nicht gezeigt). Die schweren Ketten sind hierbei als Beweis zu deuten, dass die Protein-A-Sepharose erfolgreich an den Antikörper gebunden hat.

3.3 Das HA-Epitop ist nach dem X-Link zugänglich

Das Crosslinken von lebenden Zellen mit Formaldehyd und die folgende Präzipitation eines DNA-gebundenen Proteins ist ein aufwendiges Verfahren, bei dem es vielerlei technische Schwierigkeiten zu beachten gilt. Durch das Crosslinken können Strukturen bzw. Epitope von Proteinen verändert oder „maskiert“ werden (Orlando, 2000). Dies hat zu Folge, dass der für die IP eingesetzte Antikörper das Epitop schlechter binden kann oder, im schlimmsten Fall, gar nicht mehr erkennt. Normalerweise kann bei nicht Funktionieren eines Antikörpers der Wahl auf einen anderen ausgewichen werden; dieser kann auch gegen ein anderes Epitop des gesuchten Proteins gerichtet sein. Bei dem hier eingesetzten Epitop des Hämagglutininproteins handelt es um eine Sequenz aus nur 9 Aminosäuren (Wilson et al., 1984). Da die rekombinante RNA-Polymerase II in den Experimenten von der endogenen Pol II unterschieden werden soll, ist man auf einen α -HA-Antikörper beschränkt. Es wurden daher einige Experimente unternommen um sicherzustellen, dass der α -HA-Antikörper (3F10) sein Epitop nach dem Crosslink noch erkennt.

Zuerst wurde getestet ob die Formaldehyd-Behandlung ein Erkennen des Antikörpers verhindert. Hierzu wurden Raji LS* wt Zellen 10 min, 3 min oder überhaupt nicht mit Formaldehyd behandelt. Das Protokoll wurde bis einschließlich des Sonifizierungsschrittes, wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt und die Proben für eine Erkennung durch einen α -HA-Antikörper (3F10) auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (Abb. 11 A). Als Positivkontrolle wurden 55 μ g normal hergestellte Lysate aus Raji LS* wt Zellen eingesetzt ((A), Spur 1, untere Zeile). Es ist zu erkennen, dass der α -HA Antikörper sein Epitop noch erkennen kann, die Signalstärke aber nach 10 min Crosslinken nachlässt. (Abb. 11 (A) Spur 3).

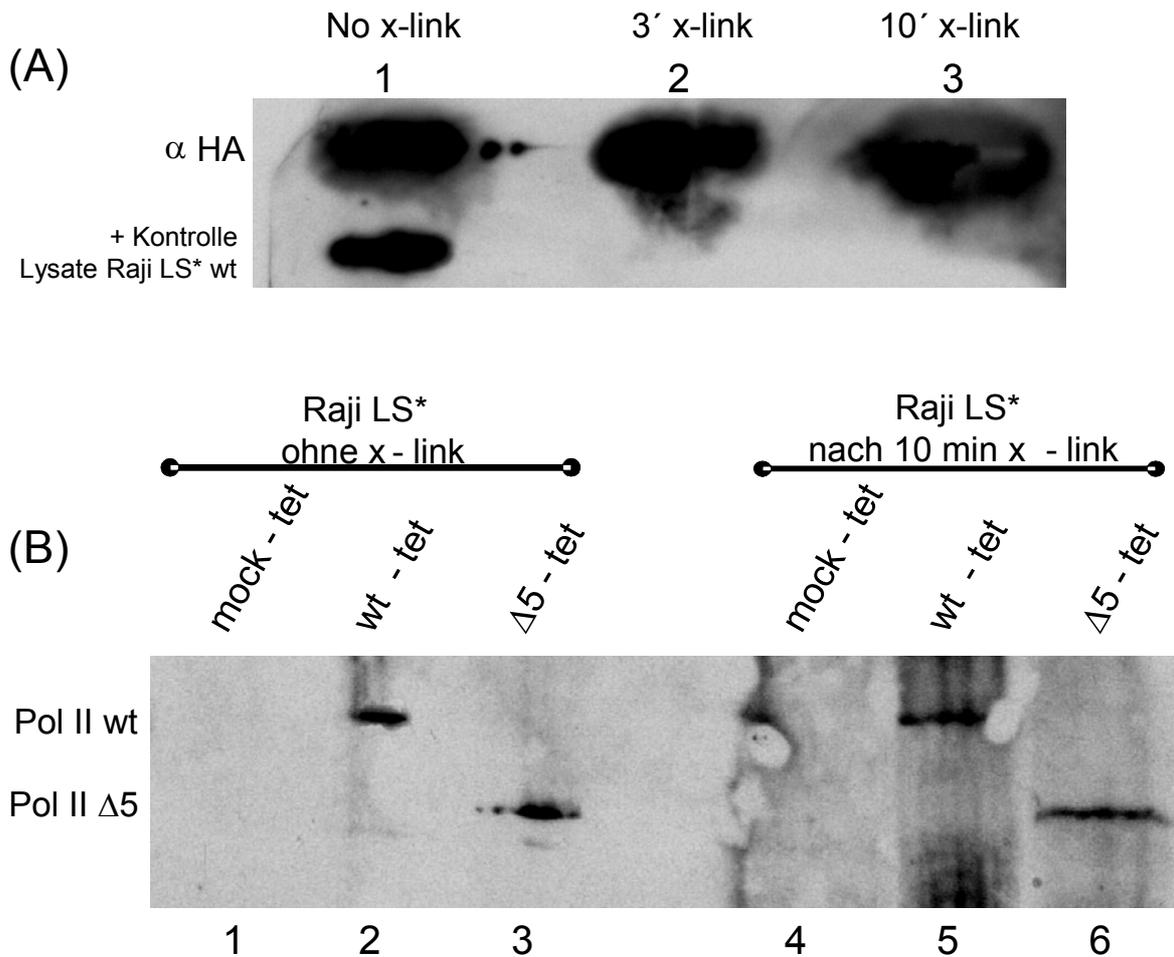


Abbildung 11 Der HA-Tag ist nach dem Crosslinking zugänglich.

(A) Raji LS* wt Zellen wurden 0 min, 3 min und 10 min mit Formaldehyd (final: 1%) behandelt. Die Proben von 2×10^7 Zellen wurden auf einem Slot-Blot aufgetragen und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (3F10). (B) Die Lysate von Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$ Zellen (je $40 \mu\text{g}$) wurden auf einer SDS-Page aufgetragen (Spur 1-3). Proben der gleichen Zelllinien (je $1,5 \times 10^6$ Zellen) wurden nach 10 min X-link aufgetrennt und ebenfalls auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Spur 4-6). Die Detektion erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (3F10).

Zur Bestätigung dieser Daten wurde ein Western-Blot mit Proben nach einem X-link durchgeführt (Abb. 11 (B)). Als Positivkontrolle wurden je $40 \mu\text{g}$ von Lysaten der Zelllinien Raji LS* mock, Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$ eingesetzt ((B) Spur 1-3). Nach X-Link, Douncing und Sonifizierung wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen für den Western-Blot eingesetzt. Dies übersteigt die sonst übliche Menge bei weitem, ist aber in Anbetracht der zahlreichen Zwischenschritte notwendig. Wie in den Spuren 4-6 in Abbildung 11 (B) zu

erkennen ist, entsprechen die Banden den Signalen aus den Spuren 1-3. Damit konnte die Verfügbarkeit des α -HA-Epitops nach X-Link gezeigt werden.

3.4 Chromatin-IP von E2F-1 (“proof of principle”)

Der nächste Schritt bestand nun in dem Versuch eine komplette Chromatin-Immunpräzipitation durchzuführen. Ziel des folgenden Experiments war es, die Bindung von E2F-1 im Bereich des *myc*-Promotors zu demonstrieren. Diese Bindung konnte bereits von einer Gruppe um Farnham und Eick gezeigt werden (Albert et al., 2001).

Bei E2F-1 handelt es sich um ein Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren. Sie bilden Heterodimere mit DP-Proteinen und spielen durch ihre Fähigkeit, die Expression ihrer Zielgene wie z.B. Cycline, Cdks und Komponenten der DNA-Synthesemaschine zu steuern, eine wichtige Rolle in der Zellzyklusregulation (Dyson, 1998; Slansky and Farnham, 1996). Viele der von E2F regulierten Gene sind an der Grenze zwischen G1- und S-Phase stark exprimiert (Weinmann et al., 2001; Weinmann et al., 2002). Es wird angenommen, dass E2F durch Assoziation mit dem Retinoblastom(Rb)-Gen inaktiviert wird (Dyson, 1998).

Mit diesen Informationen im Hintergrund stellt der Nachweis der Bindung von E2F-1 eine hervorragende Möglichkeit dar, die Chromatin-Immunpräzipitation auf ihre Aussagekraft hin zu überprüfen („proof of principle“). Die Bindung von E2F-1 wurde in Raji LS* wt Zellen überprüft. $2,9 \times 10^8$ Zellen wurden für 10 min mit Formaldehyd (final: 1%) behandelt. Das Chromatin wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben, isoliert. Für die IP wurde ein α -E2F-1-Antikörper (Klon: KH95) verwendet (Abb. 12, Spur 3). Zur Kontrolle wurde eine IP mit einem unspezifischen Antikörper der gleichen Klasse durchgeführt (Spur 2). Nach Reversion der X-Links wurde mit Primern, die den *myc*-Promotor flankieren eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde mit Primern durchgeführt, die unterschiedlich lange Fragmente aus dem *myc*-Promotor amplifizieren (Abb. 12 (A) und (B)). Durch die Präzipitation mit dem α -E2F-1-Antikörper ist eine deutliche Anreicherung von spezifischen Sequenzen gelungen (Abb. 12 (A) u. (B), Spur 3). Bei der Präzipitation mit dem unspezifischen Antikörper ist ebenfalls ein Produkt entstanden; es ist aber von der Intensität her ca. 10-mal schwächer einzustufen (Abb. 12 (A) u. (B) Spur 3) und aus diesem Grund als Hintergrund-Signal anzusehen. Die PCR-Reaktion, in der bei der IP kein Antikörper verwendet wurde, zeigt wie zu erwarten kein Signal (Spur 4). In der „Input“-Spur wurden 0,2% des Ausgangsmaterials aufgetragen. Durch dieses Vorgehen lässt sich einerseits die PCR-Reaktion kontrollieren, andererseits

kann man über die Intensität des Signals und den Vergleich mit dem Signal in Spur 3 eine Aussage darüber tätigen, wie der Crosslink und die Immunpräzipitation funktioniert haben. Dieser Versuch bestätigt die Ergebnisse von Albert et al. (2001) über die Bindung von E2F-1 im Promotor des *c-myc* Gens.

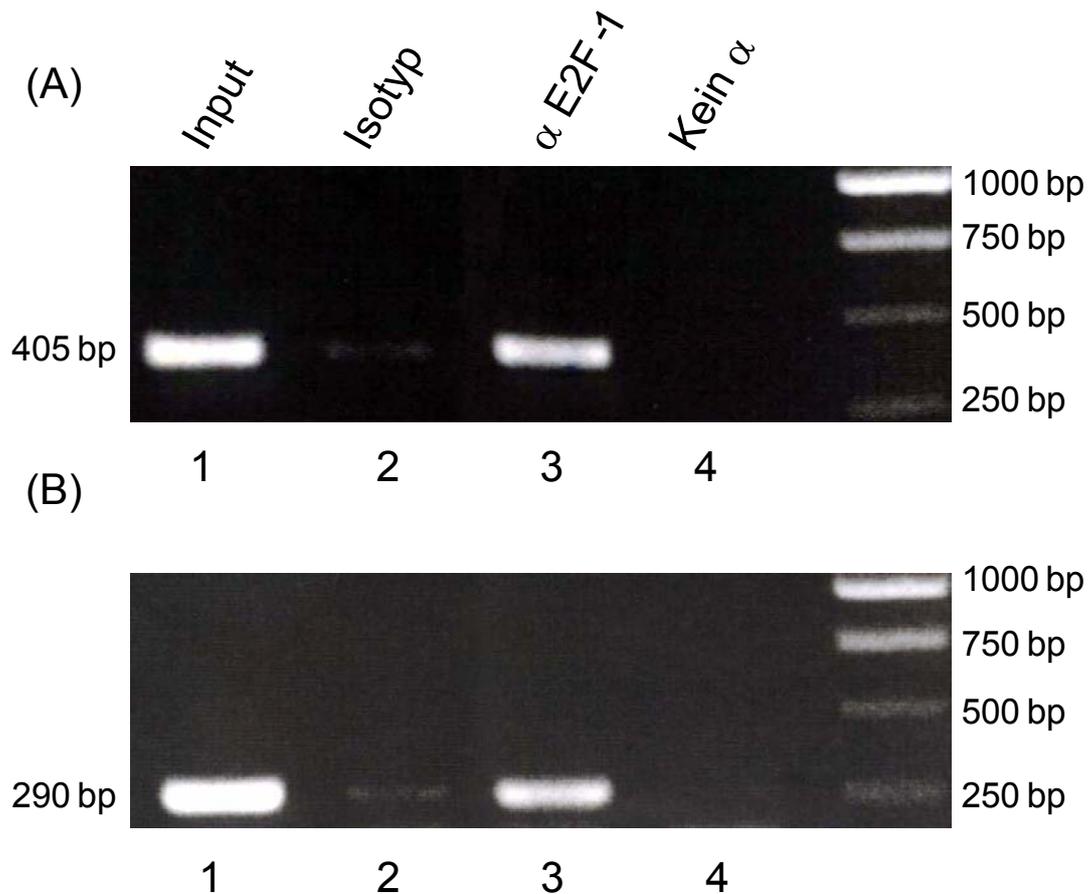


Abbildung 12 Chromatin-Immunpräzipitation von E2F-1 im Promotorbereich von *c-myc*.

Raji LS* wt Zellen wurden mit Formaldehyd behandelt. Nach der Sonifizierung wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit einem Antikörper gegen E2F-1 durchgeführt (Spur 3). Als Kontrolle wurde eine IP mit einem unspezifischen Antikörper der gleichen Klasse durchgeführt (Spur 2). Nach Reversion der Crosslinks wurde eine PCR mit Primern für den *myc*-Promotorbereich durchgeführt. In Abschnitt (A) wurde ein Primerpaar (dirkmyc3 und dirkmyc5), dessen Produkt 405 bp lang ist; in Abschnitt (B) ein Primerpaar (luxmyc3 und luxmyc4) dessen Produkt 290 bp groß ist, verwendet. An den Seiten sind jeweils die Basenlängen des Größenstandards aufgetragen. In der „Input“-Spur (1) wurden 0,2% des Ausgangsmaterials für die PCR-Reaktion eingesetzt. In Spur 4 wurde bei der IP kein Antikörper eingesetzt. Abkürzungen: bp, Basenpaare; PCR, Polymerase-Ketten-Reaktion.

Nach der erfolgreichen Durchführung einer Chromatin-IP soll nun untersucht werden, ob in Zellen, welche die große Untereinheit der RNA-Polymerase (RPB1) mit einer

verkürzten CTD exprimieren (Raji LS* $\Delta 5$), die Pol II am Promotor nachweisbar ist. Dies würde die Schlussfolgerung nach sich ziehen, dass ein Vorhandensein der CTD für die Bindung der RNA-Polymerase II an DNA nicht notwendig ist. Bei den bisherigen Untersuchungen zu diesem Thema wurde vor allem die transkriptionelle Funktion von Raji LS* $\Delta 5$ -Zellen untersucht (Meininghaus et al., 2000; Meininghaus and Eick, 1999).

3.5 Raji LS* $\Delta 5$ bindet am *c-myc*-Promotor

Von Meininghaus et al. (2000) wurde ein System in humanen B-Zellen entwickelt, in welchem die große Untereinheit der RNA-Polymerase II konditional exprimiert wird. So konnte der Effekt von CTD-Deletionen auf die Initiation der Transkription und das Promotor-proximale Pausieren untersucht werden. Raji LS* wt Zellen wachsen in Langzeitkulturen in Gegenwart von α -Amanitin normal, was bedeutet, dass die endogene LS durch die rekombinante LS ersetzt werden kann. Dagegen konnten Raji-Zellen mit einer auf 5 Heptapeptidwiederholungen verkürzte CTD in Langzeitkulturen nicht überleben. Es wurde weiterhin untersucht, auf welche Art und Weise eine Deletion der CTD die globale Genexpression beeinträchtigt. Die Transkriptionsrate der drei Zelllinien (wt, $\Delta 31$ und $\Delta 5$) wurde in „run-on“-Experimenten verglichen. Während in Raji LS* wt-Zellen die Transkription von ca. 500 Genen normal funktionierte, zeigte die $\Delta 5$ -Variante einen globalen Transkriptionsdefekt *in vivo* (Meininghaus et al., 2000). Diese Tatsache war auch deswegen interessant, da in vorherigen Studien gezeigt werden konnte, dass eine CTD-lose Pol II in der Lage ist, transient transfizierte Konstrukte zu transkribieren. Der Unterschied zwischen transfizierten Genen und chromosomalen Templates liegt in der Ausbildung einer definierten Chromatinstruktur. Eine Erklärung könnte die gezielte Rekrutierung von chromatin-modifizierenden Enzymen durch die CTD sein. Diese könnten dann den Zugang des Transkriptionskomplexes zu Promotoren erleichtern. So konnte für den Elongatorkomplex eine Histionacetyltransferase-Aktivität gezeigt werden (Otero et al., 1999). Ebenfalls könnte das Entfernen von Faktoren, die eine produktive Transkription inhibieren, wie z.B. NELF und DSIF eine Rolle spielen (Wada et al., 1998a; Wada et al., 1998b; Yamaguchi et al., 1998). In weiteren „run-on“-Experimenten konnte keine LS* $\Delta 5$ an der proximalen Pausierungsstelle der Gene *hsp70A* und *c-fos* nachgewiesen werden. Der transkriptionelle Defekt der CTD-losen RNA-Polymerase II muss also in der Phase der Initiation oder in der ganz frühen Elongation liegen (Meininghaus et al., 2000).

Um diesen Defekt genauer zu charakterisieren, wurde versucht, in einer Chromatin-IP die RNA-Polymerase II ohne CTD (Raji LS* $\Delta 5$) an einem Promotor nachzuweisen. Die

verwendeten Zelllinien tragen neben dem Polymerase-Konstrukt auch noch einen Vektor auf dem sich das *c-myc* Gen befindet (siehe Material und Methoden 3.1.4). Dieser Vektor liegt in einer Kopienzahl von ca. 10 Episomen pro Zelle vor (Heidinger, 2000). Daher bietet es sich an, das *myc*-Gen als Ort zu wählen, an dem die Polymerase nachgewiesen werden soll. Durch die 10 Kopien wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, eine RNA-Polymerase II im Promotorbereich zu crosslinken. Wie oben gezeigt, war der gut charakterisierte *myc*-Promotor auch für den „proof of principle“ von Vorteil, da er eine nachgewiesene E2F-1 Bindungsstelle besitzt.

Für den Nachweis der Polymerase am *myc*-Promotor wurde in Raji LS * wt und Raji LS* $\Delta 5$ -Zellen die Expression des Vektors durch Auswaschen von Tetracyclin induziert. Nach 24h wurde α -Amanitin hinzu gegeben. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit Formaldehyd gecrosslinkt und nach der Sonifizierung eine IP mit den jeweiligen Antikörpern durchgeführt. Für den Nachweis der Polymerase wurde wieder der α -HA-Antikörper verwendet, welcher nur das rekombinante Protein erkennt. Durch die Zugabe von α -Amanitin wird in dem Versuch die Wahrscheinlichkeit erhöht die vektorielle Polymerase nachzuweisen, da α -Amanitin eine rasche Degradation des nicht resistenten Enzyms verursacht. (Meininghaus and Eick, 1999; Nguyen et al., 1996). Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen für den *myc*-Promotor sind in Abbildung 13 zu sehen. In den Spuren 4 und 5 zeigt sich die Bindung der RNA-Polymerase mit einer normalen CTD. Dieses Ergebnis dient als Positivkontrolle für die eigentliche Fragestellung. In den Spuren 8 und 9 zeigt sich die Bindung der RNA-Polymerase mit einer trunkierten CTD. Es sind jeweils die PCR-Reaktionen aus zwei verschiedenen Immunpräzipitationen gezeigt. Zur Kontrolle wurden IPs mit unspezifischen Antikörpern durchgeführt, welche die Anreicherung durch den α -HA-Antikörper verdeutlichen (Spur 6, 7, 10 und 11). Auch wenn in Spur 10 ein Produkt entstanden ist, kann, da es sich zumal um eine deutlich geringere Menge handelt, von einer Bindung im *myc*-Promotor ausgegangen werden. Zur Positivkontrolle wurde in den Spuren 1 und 2 unterschiedliche Mengen des Ausgangschromatins für die PCR eingesetzt. In Spur 3 wurde kein Antikörper für die IP benutzt. Es wurde ebenfalls eine IP mit einem α -E2F-1 Antikörper durchgeführt (Spur12). Es zeigt sich hier ein deutliches Signal, das die Bindung von E2F-1 wie oben beschrieben bestätigt.

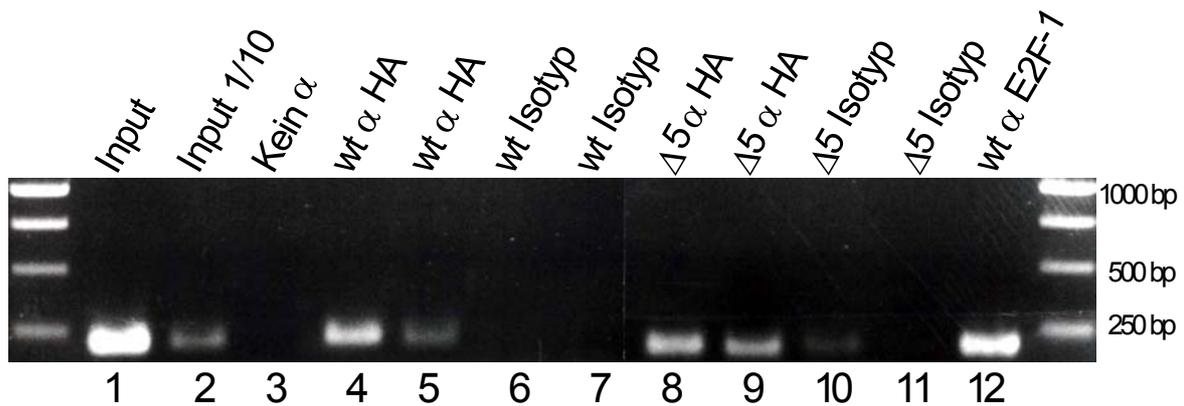


Abbildung 13 Die RNA-Polymerase II mit trunkierter CTD bindet im Promotorbereich von *c-myc*.
 Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$ Zellen wurden mit Formaldehyd behandelt. Immunpräzipitationen mit einem α -HA-Antikörper (Spur 4, 5, 8, 9) und einem α -E2F-1-Antikörper (Spur 12) wurden durchgeführt. In der PCR wurden Primer des *myc*-Promotors (*dirkmyc3* und *dirkyc4*) verwendet, die ein Produkt von 205 bp amplifizieren. In den mit „Isotyp“ bezeichneten Spuren (6, 7, 10, 11) wurde ein unspezifischer Antikörper benutzt. In Spur 3 wurde kein Antikörper für die IP verwendet.

Das mit dem E2F-1-Antikörper erreichte Produkt ist stärker als das Signal der mit α -HA-Antikörper durchgeführten Reaktionen. Dieser Unterschied war in allen durchgeführten Chromatin-IPs zu sehen. Hierbei spielt neben der Reaktivität der unterschiedlichen Antikörper sicher auch die Komplexität des präzipitierten Proteins eine Rolle. So handelt es sich bei der RNA-Polymerase II um einen Multiproteinkomplex von ca. 500 kd. E2F-1 dagegen hat im Komplex mit dem DP-Protein nur eine Größe von ca. 100kd. Deswegen könnte auch die Komplexität und die Größe des Proteins eine Rolle spielen, dass mit E2F-1 durchweg bessere Resultate zu erzielen sind. Dennoch kann durch Abb. 13 die Bindung einer RNA-Polymerase II mit nur 5 Wiederholungen von Heptapeptiden in der CTD (Raji LS* $\Delta 5$) im *myc*-Promotor demonstriert werden.

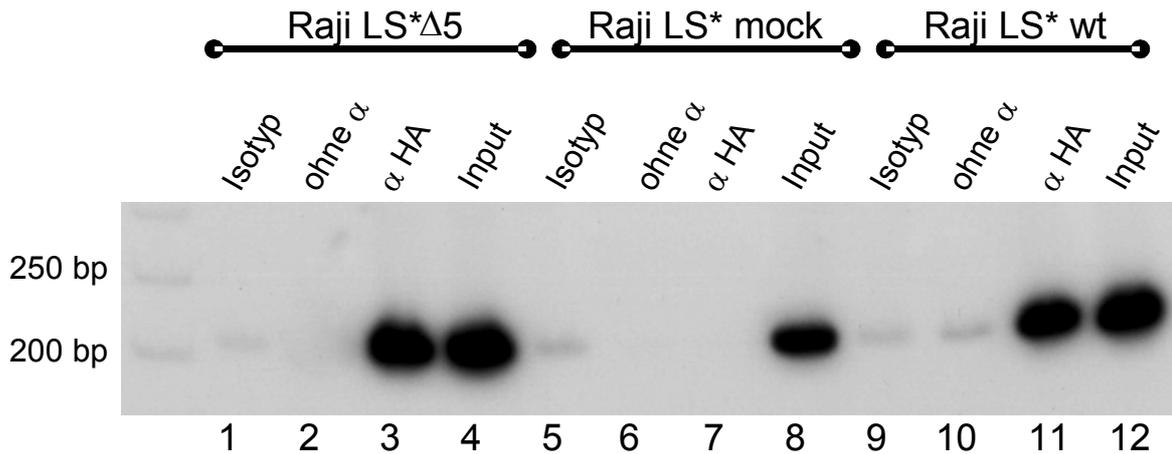


Abbildung 14 Bindung von Raji LS* $\Delta 5$ am *myc*-Promotor.

Das Chromatin aus den Zelllinien Raji LS* mock (Spur 5-8), Raji LS* wt (Spur 1-4) und Raji LS* $\Delta 5$ (Spur 9-12) wurde für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Die IPs wurden in allen Zelllinien mit einem α -HA-Antikörper (Spur 3, 7 und 11) bzw. einem Kontrollantikörper (Spur 1,5 und 9) durchgeführt. Den Ansätzen für die PCR wurde ein radioaktives Nukleotid zugegeben. In den Spuren 2, 6, und 10 wurde kein Antikörper bei der IP eingesetzt; in den Spuren 4, 8 und 12 wurde 0,2% des Ausgangs-Chromatins für die PCR benutzt. An der linken Seite ist ein Größenstandard aufgetragen.

Die Ergebnisse dieses Versuches wurden in einem weiteren Versuch bestätigt. Im Unterschied zum Ersten wurde jedoch als zusätzliche Kontrolle auch eine Chromatin-IP in der Zelllinie mit Leervektor (Raji LS* mock) durchgeführt. Weiterhin wurden die PCR-Reaktionen mit einem radioaktiven Nukleotidtriphosphat durchgeführt. Dies hat den Vorteil eine geringere Zyklenzahl bei der Amplifikation des Produkts benutzen zu können. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, kann die RNA-Polymerase II am Promotor des *myc*-Gens in den Zelllinien Raji LS* wt und Raji LS* $\Delta 5$ nachgewiesen werden (Spur 11 und Spur 3). Wird eine Chromatin-IP mit einem α -HA-Antikörper in der Zelllinie mit Leervektor durchgeführt, lässt sich kein Produkt amplifizieren (Spur 7). Die Negativkontrollen ohne Antikörper (Spur 2, 6 und 10) bzw. mit einem unspezifischen Antikörper (Spur 1, 5 und 9) zeigen kein Signal und verdeutlichen so die Spezifität der Präzipitation mit dem α -HA-Antikörper.

3.6 Die präzipitierte DNA zeigt keine Anreicherung des Insulin-Gens

Die Aussage der vorangegangenen Experiments wurde durch eine weitere Kontrolle bestätigt. In einer Chromatin-IP wird spezifisch DNA des Abschnitts angereichert, an den das untersuchte Protein bindet. So wurde die DNA aus dem vorangegangenen Versuch in einer weiteren PCR-Reaktion eingesetzt. Jedoch wurden diesmal Primer benutzt, die einen Abschnitt des Insulin-Gens amplifizieren. Eine wichtige Annahme dabei ist, dass keine RNA-Polymerase in B-Zellen zu finden ist, welche das Insulin-Gen transkribiert. Daher wird diese PCR als Negativkontrolle für das Experiment gewertet.

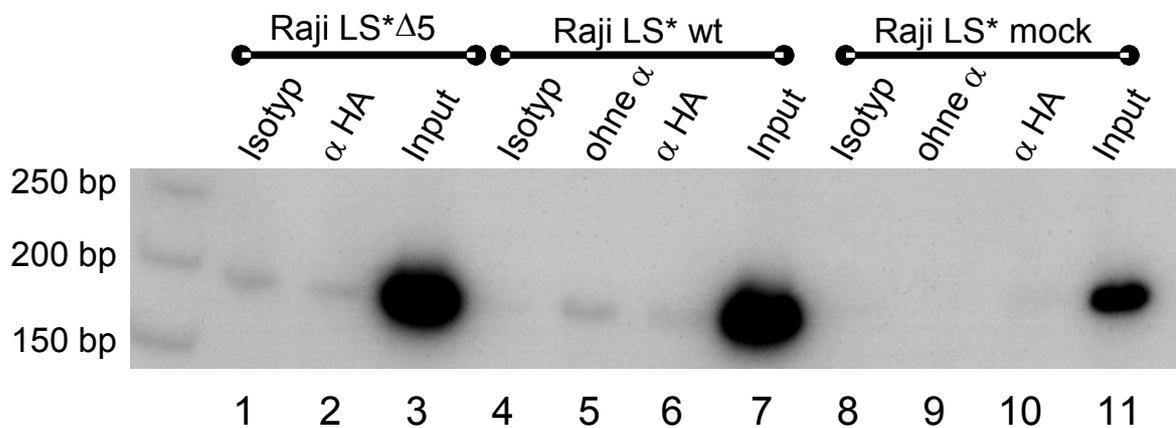


Abbildung 15 Kein Nachweis der Polymerase im Exonbereich des Insulin-Gens.

Das Chromatin aus den Zelllinien Raji LS* mock (Spur 8-11), Raji LS* wt (Spur 4-7) und Raji LS* Δ5 (Spur 1-3) wurde für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Die IPs wurden in allen Zelllinien mit einem α -HA-Antikörper (Spur 3, 7 und 11), bzw. einem Kontrollantikörper (Spur 2, 6 und 10) durchgeführt. Nach einer Chromatin-Immunpräzipitation mit dem α -HA-Antikörper wurden die Proben in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Den Ansätzen für die PCR wurde ein radioaktives Nukleotidtriphosphat zugegeben. Die verwendeten Primer amplifizieren ein 201 bp langes Fragment aus dem Insulin-Gen. In den Spuren 3, 7 und 11 wurde 0,2% des Ausgangschromatins für die PCR eingesetzt.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, ließ sich nur in den Reaktionen mit dem Ausgangschromatin als Template ein Produkt erzeugen (Abbildung 15, Spur 3, 7 und 11). Dagegen ist in allen anderen Reaktionen kein Produkt entstanden (Spur 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 und 10). Dies beweist wie spezifisch die Anreicherung von DNA aus dem *c-myc*-Promotor durch die Chromatin-IP gelungen ist (siehe Abbildung 14, Seite 52).

Zumindest in Bezug auf das *c-myc*-Gen lässt sich die Notwendigkeit der c-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II für die Bindung an die DNA verneinen. Ob diese Aussage aber ein prinzipielles Prinzip der Transkription darstellt kann nur durch weitere Experimente an anderen Genen und deren Promotoren bekräftigt werden.

4 Diskussion

Im Ergebnisteil wurden Untersuchungen über die transkriptionelle Regulation des Onkogens *c-myc* vorgestellt. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden vertiefend diskutiert, sowie Ausblicke über neue Fragestellungen gegeben werden. Ein Hauptteil der Arbeit bezieht sich auf die carboxyterminale Wiederholungsdomäne (CTD) der RNA-Polymerase II als regulatorisches Element der Gentranskription. Auf die Funktion der CTD im Rahmen der Transkription wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Für effektives Capping, Splicing und Polyadenylierung wird die carboxyterminale Wiederholungsdomäne *in vivo* benötigt (Hirose and Manley, 2000; Proudfoot et al., 2002). Die Position der CTD nahe des RNA-Ausgangs der Polymerase erhärtet die vermutete Funktion der CTD als Plattform für Enzyme der RNA-Prozessierung (Cramer et al., 2001). Mehrere Faktoren erkennen die CTD über eine konservierte Domäne, die CTD-Interagierungsdomäne (CID). Beispiele für Faktoren mit CID sind: SCAF4 (Yuryev et al., 1996), SCAF8 (Patturajan et al., 1998), Nrd1 (Steinmetz et al., 2001) und Pcf11. Pcf11 ist eine Untereinheit eines essentiellen Hefeenzym und wird für die 3'-Prozessierung sowie die Termination der Transkription benötigt (Barilla et al., 2001).

4.1 Die initiationskompetente RNA-Polymerase II

4.1.1 Die CTD als dynamisch agierende β -Spirale

In jüngster Zeit wurden bedeutende Forschungsergebnisse zur Struktur der CTD veröffentlicht (Meinhart and Cramer, 2004). Hierzu wurde eine Röntgenstrukturanalyse von einem Pcf11-Kristall in hoher Auflösung angefertigt. Um die Interaktionen zwischen der CTD-Interaktionsdomäne (CID) und der CTD zu zeigen, wurde in den Pcf11-Kristall ein synthetisch hergestelltes, an Position 2 phosphoryliertes CTD-Peptid eingebaut. Dies führte zu dem Modell einer linksorientierten β -Spirale mit 1,8 Wiederholungen der CTD-Sequenz pro Umdrehung, wobei die Autoren die Möglichkeit einer anderen Struktur nicht ausschließen (Meinhart and Cramer, 2004). Dies ergäbe eine Gesamtlänge der CTD von ca. 100Å und wäre damit wesentlich kürzer als das bisher für die Hefe propagierte Modell von ca. 650Å (Cramer et al., 2001). Eine Phosphorylierung der CTD am Serin Position 5 würde in dieser Anordnung zu einer Verlängerung der CTD führen. So schlagen die Autoren folgendes Modell vor: Die CTD ist als dynamische β -Spirale in den Transkriptionszyklus eingebunden. In der kompakten, unphosphorylierten Form befindet

sich die CTD während der Initiation. Findet eine Phosphorylierung an Serin 5 statt, öffnet sich die Spirale und eine Bindung der Enzyme für die 7-Methylguanosinium-Kappe wird ermöglicht (Meinhart and Cramer, 2004). Während der Elongation stabilisiert die Phosphorylierung an Serin 2 die β -Spirale und triggert die Bindung von Faktoren mit CID-Domänen für die 3'-Prozessierung des Transkripts. Durch Phosphatasen wird die Phosphorylierung an Serin 2 aufgehoben und somit die Interaktion zwischen CTD und Faktoren mit CID-Domänen beendet. Eine komplette Dephosphorylierung der CTD stellt den Ausgangszustand wieder her, und die nun wieder initiationskompetente RNA-Polymerase II kann in einen neuen Transkriptionszyklus eintreten (Meinhart and Cramer, 2004).

4.1.2 Rpb4 und Rpb7 als Brücke zwischen CTD und rekrutierten Faktoren

Die schon bekannten Strukturen der RNA-Polymerase II (Cramer et al., 2000; Cramer et al., 2001) wurden kürzlich durch Ergebnisse neuer Publikationen erweitert. Die bisher kristallographisch untersuchte Polymerase II der Hefe bestand nur aus 10 der 12 Untereinheiten. Diese „Kernpolymerase“ war zwar katalytisch aktiv, brauchte aber die zwei fehlenden Untereinheiten Rpb4 und Rpb7 und die generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) für die Initiation von einem Promotor (Cramer, 2004). Nun konnte durch unterschiedliche Methoden ein kristallographisches Modell der kompletten RNA Polymerase II der Hefe mit allen 12 Untereinheiten vorgelegt werden (siehe Abbildung 16) (Armache et al., 2003; Bushnell and Kornberg, 2003). Der Rpb4/7-Komplex ist in diesem Model an der Basis der Klammer („clamp“) durch das N-terminale Ende von Rpb7 mit dem Kernstück verbunden. Der größte Teil ragt nach außen vor und steht für Bindungen mit Proteinen und Nukleinsäuren zu Verfügung (siehe Abb. 16). Eine potentielle Bindungsstelle für Nukleinsäuren in Rpb7 liegt in direkter Nähe zu dem vermuteten RNA-Ausgang (Armache et al., 2003; Cramer, 2004; Orlicky et al., 2001; Todone et al., 2001). In direkter Nachbarschaft ist auch die carboxyterminale Wiederholungsdomäne (CTD) mit der Polymerase verbunden (siehe Abbildung 16). Deshalb ist es offensichtlich, dass der Rpb4/7-Komplex Faktoren zu der austretenden RNA oder der CTD rekrutiert. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass der RNA-bindende Faktor Nrd1 und die CTD-Phosphatase Fcp1 direkt mit dem Rpb4/7-Komplex interagieren können (Kimura et al., 2002; Mitsuzawa et al., 2003).

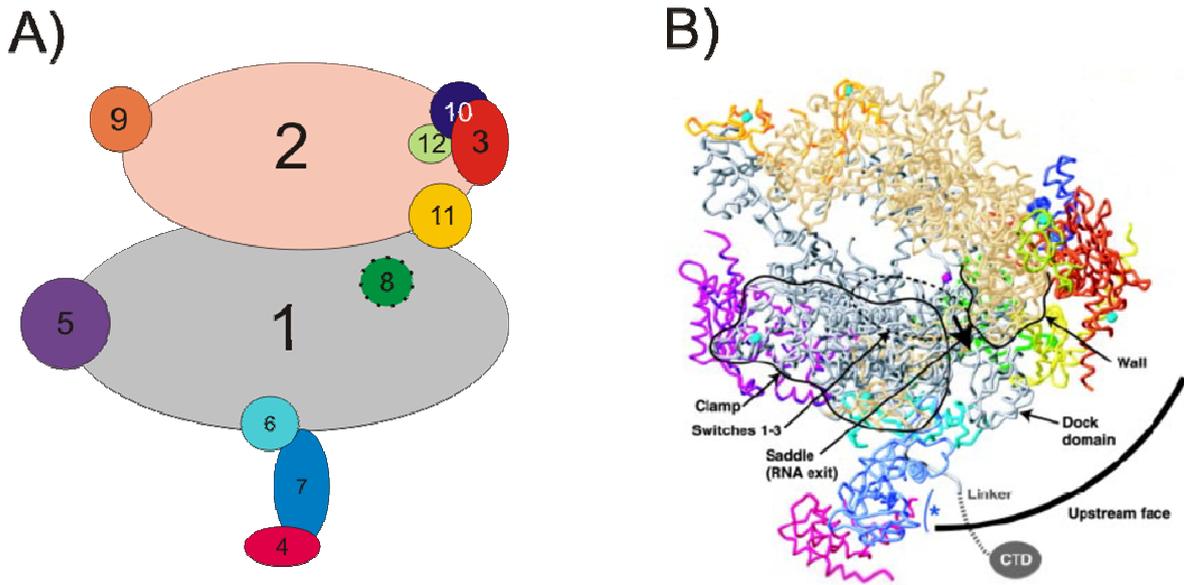


Abbildung 16 Modell der RNA-Polymerase II der Hefe

A) Schematische Anordnung der Untereinheiten. Die Ziffern geben die jeweilige Untereinheit an. **B)** Strukturmodell nach kristallographischen Daten. Die Farben der Untereinheiten entsprechen der Darstellung in A. Pink, Magnesium-Ion des aktiven Zentrums; die schwarze Linie markiert einen Kreis um das aktive Zentrum mit dem minimalen Abstand zwischen TATA-Box und dem Transkriptionsstartpunkt ($85\text{\AA} \approx 25\text{bp}$). Der blaue Stern markiert eine potentielle RNA-Bindungsstelle in Rpb7 (Abbildung entnommen aus (Armache et al., 2003)).

Aus diesem Grund kann man sich den Rpb4/7-Komplex als eine Art Brücke zwischen der Polymerase und der CTD vorstellen, die den genannten Anteilen sowie rekrutierten Faktoren Stabilität verleiht. Ist nun keine oder nur noch eine rudimentäre CTD, wie bei den durchgeführten Experimenten vorhanden, wird dieses diffizile Netzwerk gestört. Dies könnte eine Möglichkeit für die fehlende Transkriptionsfähigkeit der $\Delta 5$ -Mutante sein. So kann sie noch an DNA binden und vielleicht einen kompletten Initiationskomplex aufbauen; sobald aber die strukturellen Änderungen für den Schritt der Elongation benötigt werden, kommt der Defekt zum Tragen. Proteine, die in dem Bereich der Untereinheiten Rpb4/7 an die Polymerase binden möchten, kommen mit den veränderten Strukturen nicht zu Recht. Dies könnte die gesamte Polymerase so beeinflussen, dass sie in eine Art „Starre“ verfällt.

4.2 Fehlende Phosphorylierung als Ursache für den Transkriptionsblock

Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren in der Tumorgenese wurde bereits erwähnt. Es können aber auch andere Erkrankungen durch Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden. Hierbei sind Entwicklungsstörungen und Erkrankungen der Hormonantwort zu nennen (Latchman, 1996). Auf die Aktivierung von Genen, die bei der Tumorgenese eine Rolle spielen wurde an Hand des *myc* Onkogens schon im Detail eingegangen. Aber nicht nur durch transkriptionelle Aktivierung von Onkogenen, sondern auch durch Mutationen in der Transkriptionsmaschinerie selbst können Krankheiten entstehen. So können Veränderungen im generellen Transkriptionsfaktor TFIID zu Erkrankungen führen (Egly, 2001). Dieses Protein spielt sowohl in der Transkription als auch in der DNA-Reparatur eine Rolle (Frit et al., 1999; Svejstrup et al., 1996). Im humanen TFIID-Komplex können Mutationen in der XPD-und XPB-Helikase-Untereinheit zu der Erkrankung Xeroderma pigmentosum führen; UV-Sensitivität, Hyperpigmentation der Haut und eine Prädisposition für die Entwicklung von Hautkrebs sind charakteristisch (Egly, 2001; Liu et al., 2001). Dabei beeinflussen diese Mutationen sowohl die Exzisionsreparatur als auch die basale Transkription (Dubaele et al., 2003). Diese Tatsache stellt ein beeindruckendes Beispiel für die Bedeutung der Grundlagenforschung für das Verständnis bestimmter Krankheiten dar.

4.2.1 TFIID und TFIIE - gestörte Kommunikation mit der Δ -5 Mutante

Der generelle Transkriptionsfaktor TFIID besteht aus 10 Untereinheiten mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen. So unterscheidet man Domänen mit Helikase-Aktivität von einer Domäne mit Kinase-Aktivität (CAK, cdk activating kinase). Die Domäne mit Kinase-Aktivität enthält Cdk7 (Chang and Kornberg, 2000; Schultz et al., 2000). Wie TFIID räumlich in den Präinitiationskomplex eingebunden ist, kann zurzeit nur spekuliert werden, da keine Informationen über die Verbindung mit anderen Faktoren bekannt sind. Dennoch weiß man, dass die XPB-Helikase für die Bildung eines offenen Komplexes, der Transkriptionsblase essentiell ist und sie die einzige TFIID Untereinheit ist, welche in Crosslinking-Experimenten an die Promotor-DNA gebunden vorliegt (Zurita and Merino, 2003).

Die generellen Transkriptionsfaktoren TFIIE und TFIID üben ihre Hauptfunktion nach der Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC) aus (Lee and Young, 2000). TFIIE bindet an

die RNA-Polymerase II und es wird angenommen, dass es die Helikase- und Kinaseaktivität von TFIIH verstärkt (Bushnell et al., 1996; Ohkuma, 1997). Biochemische Analysen legen den Schluss nahe, dass TFIIE mit mehreren anderen GTFs interagiert und auch Kontakt zu einsträngiger und doppelsträngiger DNA aufnehmen kann. TFIIE ist vermutlich ein Heterodimer (Sayre et al., 1992) und kristallographische Studien lassen vermuten, dass es nahe der als „Cleft“ bezeichneten Position an die Polymerase bindet. Dies würde auch mit den Ergebnissen in Einklang stehen, welche TFIIE in Crosslinking-Experimenten direkt an der DNA im Bereich des Präinitiationskomplexes (PIC) vorfanden (Leuther et al., 1996). Deshalb könnten zur weiteren Charakterisierung der RNA-Polymerase $\Delta 5$ auch Chromatin-Immünpräzipitationen gegen TFIIE von Nutzen sein, um Einblicke in die Beziehungen zwischen den Faktoren TFIIE, TFIIH und der CTD zu bekommen.

4.2.2 CTD-Phosphorylierung durch Cdk7 ist nicht mehr möglich

Wie schon beschrieben wechselt die CTD während des Transkriptionszyklus ihren Phosphorylierungszustand; im allgemeinen ist eine hypophosphorylierte CTD mit der Initiation und eine hyperphosphorylierte CTD mit der Elongation verknüpft (Armache et al., 2003). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Cdk7 als Untereinheit von TFIIH die CTD der RNA-Polymerase II phosphoryliert (Adamczewski et al., 1996; Rossignol et al., 1997; Roy et al., 1994). Dadurch wird die Effektivität der Transkription *in vitro* und *in vivo* positiv beeinflusst (Abbildung 17). Nun konnte in den oben gezeigten Experimenten eine Bindung der RNA-Polymerase II ohne CTD (RNA Pol II $\Delta 5$) an einem Promoter demonstriert werden. Diese ist aber nicht mehr in der Lage bis zur proximalen Pausierungsstelle zu transkribieren (Meininghaus et al., 2000). Eine Erklärung für diese Tatsache könnte die fehlende Phosphorylierung der CTD durch Cdk7 sein. Da dieser Kinase nun das Substrat fehlt bleibt der Polymerasekomplex nach der Initiation an der DNA hängen (Abbildung 17). Die nur noch in sehr kurzer Form vorhandene CTD müsste phosphoryliert werden, um diesen Block zu überwinden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant die Verteilung von TFIIH und dessen Untereinheit Cdk7 zu untersuchen. Lässt sich vielleicht ein Unterschied im Verteilungsmuster von TFIIH zwischen einer RNA-Polymerase mit CTD und der Mutante ohne CTD (RNA Pol II $\Delta 5$) feststellen? Man müsste also eine Chromatin-IP gegen TFII H an den verschiedenen Polymerase-Mutanten durchführen. Würde im Ergebnis eine Anwesenheit von TFIIH bei der „normalen“

Polymerase zu erkennen sein, sie aber bei CTD-losen Polymerase fehlen, könnte man eine fehlende Phosphorylierung durch Cdk7 als Ursache für die Blockierung postulieren.

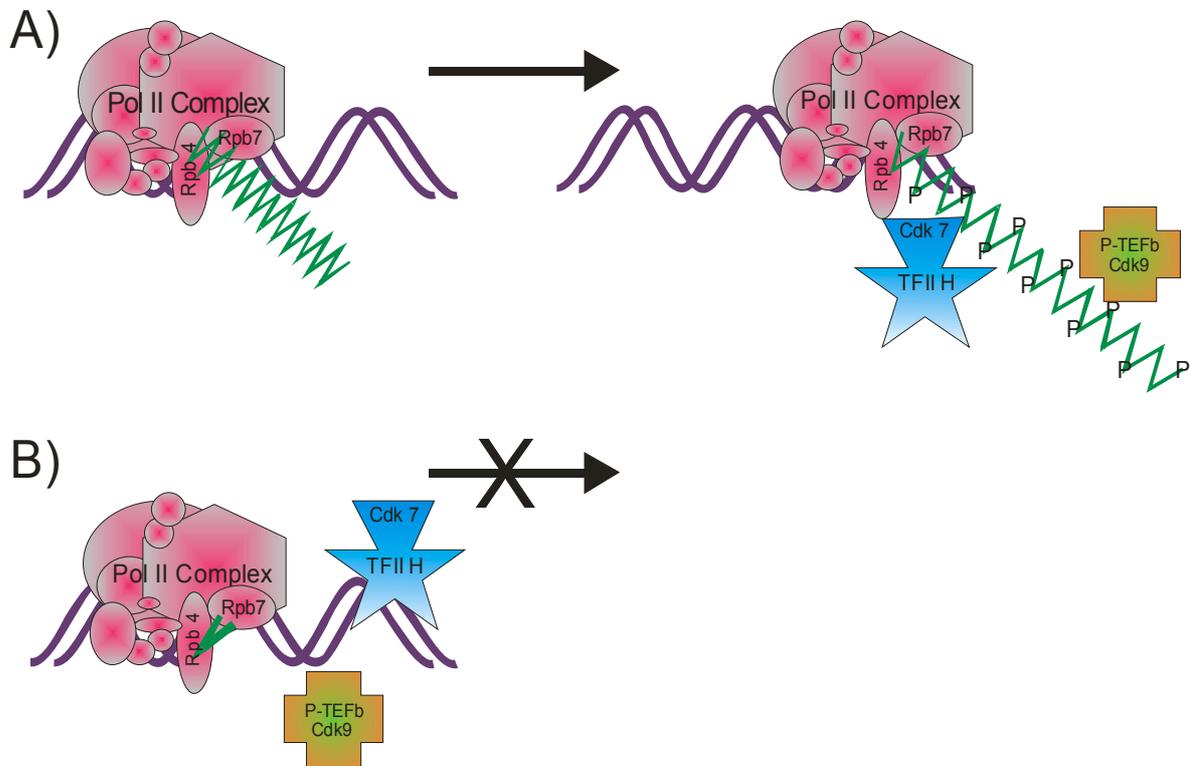


Abbildung 17 Schemazeichnung des Transkriptionsblockes der RNA-Polymerase $\Delta 5$
A) Die in der Nähe der Untereinheiten Rpb4 und Rpb7 angebrachte CTD wird durch die Kinase Cdk7 phosphoryliert. Dies hat eine Konformationsänderung der CTD und ein Fortschreiten des Transkriptionsvorganges zur Folge. Durch Cdk9, eine Untereinheit des positiven Elongationsfaktors b wird die CTD ebenfalls phosphoryliert. Dies geschieht vermutlich beim Übergang von Initiation zu Elongation. **B)** Durch die fehlende CTD ist eine Phosphorylierung durch Cdk7 nicht mehr möglich und die Polymerase wird blockiert. Cdk9 kann die fehlende CTD nicht phosphorylieren; der Übertritt in die Elongationsphase wird verhindert.

4.2.3 P-TEFb und Cdk9

Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist die Phosphorylierung der CTD keine exklusive Eigenschaft von Cdk7. Kurz nach der Initiation werden von der RNA-Polymerase II kurze Transkripte generiert, welche normalerweise schnell wieder abgebaut werden. Dies konnte unter anderem für *c-myc*, *c-fos* und *HSP 70* gezeigt werden (Bentley, 1995; Minvielle-Sebastia and Keller, 1999). Der positive Elongationsfaktor b (PTEF-b) erlaubt es nun der

RNA-Polymerase in einen produktiven Elongationschritt einzutreten und lange Transkripte zu generieren (Marshall et al., 1996; Marshall and Price, 1995). In weiteren Studien wurden die verschiedenen Untereinheiten von P-TEFb beschrieben; so ist nun bekannt, dass P-TEFb in Mammaliern aus 2 Untereinheiten besteht (Cdk9, Cyklin T1, Cyklin T2a, Cyklin T2b und Cyklin K) (Price, 2000). In mehreren Studien konnte die Phosphorylierung der CTD durch Cdk9 gezeigt werden (Abbildung 17) (Kim et al., 2002). Es wird angenommen, dass sich die Phosphorylierung beim Eintritt der Polymerase in den Elongationsschritt vollzieht und so die Wirkung von blockierenden Faktoren wie N-TEFs überwunden werden kann (Abbildung 17) (Palancade and Bensaude, 2003).

Zusammenfassend scheint die Wirkung von P-TEFb auf die RNA-Polymerase II über die Phosphorylierung der CTD vermittelt zu werden. So besteht durchaus die Möglichkeit, dass die fehlende Transkriptionsfähigkeit der RNA-Polymerase II ohne CTD (RNA-Pol II $\Delta 5$) mit der Wirkung von Cdk 9 zusammenhängt. Das bereits an die DNA gebundene Enzym „wartet“ auf das positive Signal der Phosphorylierung um die Einflüsse von bremsenden Faktoren zu überwinden (Abbildung 17). Trotz der Anwesenheit von P-TEF-b kann das Signal ohne eine voll funktionstüchtige CTD aber nicht verstanden werden und der Polymerase-Komplex verharrt in der Warteposition.

Durch diese Überlegungen hoffe ich interessante Anregungen für die Fortführung der Arbeit auf dem Gebiet der transkriptionellen Regulation von Proto-Onkogenen gegeben zu haben.

5 Appendix

In der Einleitung wurde bereits die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren als Auslöser von Krankheiten deutlich gemacht (Berns, 1994; Latchman, 1996). So kann ein deregulierter Transkriptionsfaktor an der Auslösung von Krebs beteiligt sein (Egly, 2001). Die Tumorentstehung ist dabei nicht dem Faktor allein zuzuschreiben. Meist reguliert ein Transkriptionsfaktor eine große Anzahl von Zielgenen; damit hat eine Störung seiner Funktion oft eine große Auswirkung auf unterschiedliche Signalwege (Alberts, 2002). Aus diesem Grund ist es eine wichtige Aufgabe, die von einem Transkriptionsfaktor regulierten Gene zu identifizieren. Viele Transkriptionsfaktoren erkennen eine spezifische Basensequenz, ihr Bindungsmotiv, in der DNA und üben so ihre Funktion aus. Bei dem Transkriptionsfaktor MYC handelt es sich um die Sequenz CACGTG (Fernandez et al., 2003). Hiermit lässt sich ein ungenaues, aber interessantes Rechenbeispiel durchführen: Bei einer Möglichkeit von 4 Basen ist die Wahrscheinlichkeit einer bestimmten 6er-Sequenz 4^6 , also 4096. Bei einer Basenzahl von 3×10^9 Basen im menschlichen Genom würde dies bedeuten, die gesuchte Sequenz würde ca. 700.000 Mal vorkommen. Diese potentiellen 700.000 Bindungsstellen können natürlich nicht alle von einem Myc-Protein besetzt sein, da normalerweise nur wenige tausend Myc-Moleküle in einer proliferierenden Zelle vorhanden sind. Deshalb stellt sich zum besseren Verständnis der Funktion von Transkriptionsfaktoren die Frage, welche der möglichen Bindungsstellen *in vivo* besetzt sind. Zusätzlich lassen sich unbekannte Zielgene finden und so die Funktion des Transkriptionsfaktors komplettieren.

5.1 Chromatin-Immunpräzipitation und Microarrays

Durch die verwendete Technik der Chromatin-Immunpräzipitation kann man Transkriptionsfaktoren an ihren natürlichen Bindungsstellen nachweisen. Die dabei angereicherten DNA-Fragmente werden, wie unter Material und Methoden beschrieben, mit der PCR-Technologie amplifiziert. Möchte man nun alle potentiellen Bindungsstellen von MYC im menschlichen Genom auf eine Bindung hin überprüfen, würde man unzählige PCR-Reaktionen durchführen müssen. Weiterhin würde für jede putative Bindungsstelle ein Set von Primern synthetisiert werden müssen. Insgesamt wäre diese Vorgehensweise mit einem enormen arbeitstechnischen und finanziellen Aufwand verbunden. Aus diesem Grund würde eine Technik mit der möglichst viele Bindungsstellen

von Transkriptionsfaktoren in einem einzigen Experiment untersucht werden können einen enormen Fortschritt bedeuten.

Ein viel versprechender Ansatz ist hierbei die Kombination der Chromatin-Immunpräzipitation mit der Hybridisierung auf DNA-Microarrays (Ren et al., 2000). Mittlerweile ist die DNA-Microarraytechnologie eine verbreitete Methode in der Molekularbiologie und der medizinischen Forschung (Brown and Botstein, 1999; Haferlach et al., 2003; Kohlmann et al., 2003; Popescu, 2000; Schoch et al., 2002). Sie wird hauptsächlich zur Expressionsanalyse verwendet, indem die RNA verschiedener Zelltypen miteinander verglichen wird. So kann man von Zellen ein Expressionsprofil erstellen und beispielsweise beim Vergleich gesunder Zellen mit Tumorzellen Rückschlüsse auf die Entstehung der Malignität ziehen (Alizadeh et al., 2000; Popescu, 2000; Schuhmacher et al., 2001). Bei der Kombination der beiden Techniken wird die durch Chromatin-IP erhaltene DNA nicht mit der PCR-Technologie untersucht, sondern auf einen DNA-Chip hybridisiert. Auf diesem DNA-Chip befinden sich Abschnitte aus den Promotorbereichen von Genen, von denen man annimmt, dass der untersuchte Transkriptionsfaktor zur Regulation beiträgt. Im optimalen Fall würden sich die Promotorbereiche aller Gene auf dem Chip befinden. Würde nun die komplementäre Sequenz aus der Chromatin-IP radioaktiv oder durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden, entstünde auf dem Chip an definierter Stelle ein Signal. Natürlich müsste eine, mit einem unspezifischen Antikörper durchgeführte Chromatin-IP die Spezifität des Signals beweisen. Weiterhin könnten Stichproben mit der konventionellen Technik (Chromatin-IP → PCR) die Ergebnisse verifizieren.

Es wurde nun in Kooperation mit der Firma MWG der Versuch unternommen diese Technik zu entwickeln. Nach unseren Angaben wurde ein DNA-Microarray mit den Promotorsequenzen verschiedener Gene bestückt (siehe Abb. 18 und 5.2.2). Ziel war es mit Hilfe des Testchips ein Hybridisierungsprotokoll zu entwickeln und die Menge an Radioaktivität zu bestimmen, die für spezifische Signale notwendig ist. Die durchgeführten Experimente werde ich im Folgenden kurz beschreiben.

5.2 Der Promotor-Chip von MWG

5.2.1 Testchip für Hybridisierungen

Die Testchips wurden von der Firma MWG-Biotech nach unseren Vorgaben hergestellt. In Abbildung 18 ist eine Schemazeichnung mit Größenangaben dargestellt.

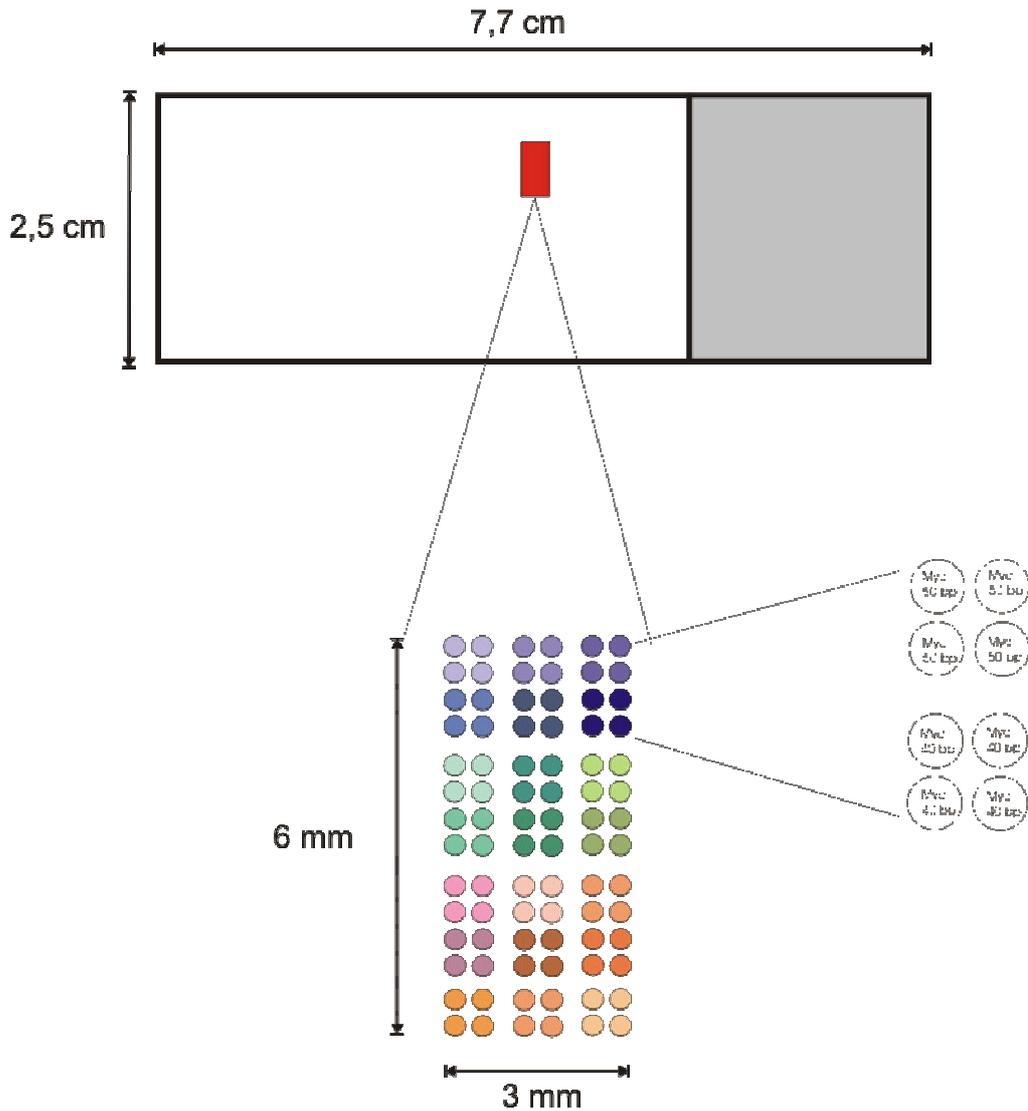


Abbildung 18 Schemazeichnung des Testchips.

Die Testchips bestanden aus beschichteten Glasslides auf denen die unter 5.2.2 benannten Oligonukleotide mit Hilfe der „pin and ring“-Technologie gespottet wurden. Das Areal mit den Oligonukleotiden ist rot markiert; die jeweiligen realen Größen sind angegeben. Um die spätere Erkennung zu erleichtern, wurden vier identische Oligonukleotide in Form eines Quadrates angeordnet.

5.2.2 Oligonukleotide auf dem Test-Chip

Folgende Oligonukleotide wurden auf den Chip gespottet. Hinter dem Namen des Gens wird die zugehörige Accession-Nummer angegeben.

Gen: c-fos; #K00650

GCTCGAGCCCAGGGCTGGAGGTTAGGGGATGAAGGTCTGCTTCCACGCT

Gen: c-myc; #V00568

CTCCCCTCCTGCCTCGAGAAGGGCAGGGCTTCTCAGAGGCTTGCGGGAA

Gen: RFC-4; #M87339

ACCTGAGGAACGAGCCGGCGGGTACCTGCACGAGAAGCCAGGCTAAC

Gen: CDC25C; #M34065

ATTGGCTGACGCAGCTTAGAGGCGAGCGGGGATAGGTTACTGGGCTGGCG

Gen: CDK4; #M14505

CCGGGAGTTGGGCTCTGGGTGGCCTAGGTTGCCATGGCACCGCCTCGGGC

Gen: Id3; #X69111

TGCCCCCTGCCAGTCCGCCTTTAGCCCAACACTGGTTCGAGCCACAGCTC

Gen: beta-actin; #X00351

GATATCGCCGCGCTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGG

Gen: GAPDH; #X01677

GAAGATGCGGCTGACTGTGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGGAAGG

Gen: NM23-H1; #X17620

TGCTGCGAACACGTGGGTCCCGGGCGCGTTTCGGGTGCTGGCGGCTGCA

Gen: c-jun; #J04111

GAGGGTAGGAGAAAGAAGGGCCCGACTGTAGGAGGGCAGCGGAGCATTAC

5.2.3 Hybridisierungsprotokoll auf einem „Promotor-Chip“ von MWG™

Um das Areal auf welches die Oligonukleotide gespottet worden sind, wurde ein Hybridisierungsrahmen aufgeklebt, welcher nach Verschluss ein Volumen von 65µl beinhaltet. Der gesamte Chip befand sich während der Hybridisierung in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Hybridisierungslösung bei einer Temperatur von 65°C zu verhindern.

Die markierten DNA-Fragmente wurden, wie unter radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten beschrieben, markiert. Da nach der Abtrennung an Sephadex das Volumen der Probe zu groß war, wurde die markierte DNA, wie unter Ethanol-Präzipitation beschrieben, gefällt. Das Pellet wurde in 10µl TE-Puffer gelöst.

5.2.3.1 Prähybridisierung

15µl salmon sperm DNA (9,4 µg/µl) wurden 10 min auf 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und zu 100µl 65°C warmen Church-Puffer (0,5M Natriumphosphat pH 7,1; 7% SDS; 1mM EDTA) gegeben. Mit 80µl dieser Lösung wurde der Chip 30 min bei 65°C prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig abpipetiert.

5.2.3.2 Hybridisierung

Die Proben wurden bei 98°C denaturiert, ebenfalls in 100µl Church-Puffer aufgenommen und 65µl in den vom Hybridisierungsrahmen umschlossenen Bereich pipettiert. Der Rahmen wurde mit dem dazugehörigen Verschluss versiegelt und der Chip über Nacht bei 65°C inkubiert.

5.2.3.3 Waschen

Der Hybridisierungsrahmen wurde mitsamt dem Verschluss entfernt und der Chip jeweils für 15 min in Waschlösung 1 (0,1% SDS; 0,2x SSC) und 15 min in Waschlösung 2 (0,2x SSC) bei 55°C gewaschen. Um den Chip zu trocknen wurde der Chip bei 2000 U/min für 2 min in einer Cytospin-Zentrifuge zentrifugiert. Zur Visualisierung erfolgreicher Hybridisierungen wurde mit den Chips eine Autoradiographie bei -80°C durchgeführt.

5.2.4 DNA-Mengen nach High-Prime Markierung

Zur Bestimmung der für die Hybridisierungen eingesetzten DNA-Menge wurden folgende Berechnungen verwendet. Nach der Markierung wurden die nicht inkorporierten Nukleotide über eine Säulenchromatographie abgetrennt. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers eine Effizienz von 93% angenommen.

Folgende Formeln wurden zur Berechnung verwendet:

$$\text{Neu synthetisierte DNA-Menge (ng):} \frac{\mu\text{Ci dNTP} \times 13,2 \times \% \text{ Einbau}}{\text{Spezifische Aktivität des eingesetzten Nukleotids}}$$

$$\text{Eingebaute Aktivität (dpm):} \quad \mu\text{Ci dNTP} \times 2,2 \times 10^4 \times \% \text{ Einbau}$$

$$\text{Spezifische Aktivität (dpm/}\mu\text{g):} \quad \frac{\text{eingebaute Radioaktivität} \times 10^3}{\text{Eingegebene DNA} + \text{neu synthetisierte DNA (ng)}}$$

5.3 Etablierung eines Hybridisierungs-Protokolls

5.3.1 Hybridisierungen mit PCR-Fragmenten

Durch Hybridisierungen mit markierten PCR-Produkten wurde ein Protokoll für die Testchips entwickelt. Zuerst musste das optimale Volumen für die Hybridisierung bestimmt werden. Es zeigte sich, dass ein Volumen von 65µl und Church-Puffer als Hybridisierungs-Lösung die besten Ergebnisse brachte. Um ein Vertrocknen der Proben während der Hybridisierung zu verhindern, wurden die Glasslides in einer

Plexiglaskammer zusammen mit feuchten Tüchern inkubiert. Nachdem beim Waschen der Glasslides bei 50°C noch einige unspezifische Signale zu sehen waren, wurde die Waschtemperatur auf 55°C erhöht.

Für die ersten Hybridisierungen wurden PCR-Fragmente aus dem *c-myc*-Gen und dem *id3*-Gen hergestellt, welche komplementäre Sequenzen zu den Oligonukleotiden des Chips enthalten. Die korrekte Größe der DNA-Stücke (*c-myc*: 205bp, *id3*: 476bp) wurde in einer Gelelektrophorese überprüft und die Proben für den Versuch aus dem Gel extrahiert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden jeweils 25ng der PCR-Produkte mit dem High-Prime[®] Kit nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Je 1µl der markierten *c-myc*-Probe und 1µl der *id3*-Probe wurden nach Hitzedenaturierung in 98µl Churchpuffer aufgenommen. Diese Lösung wurde dann, wie oben beschrieben, für 24h auf dem Chip hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 zu sehen. Zur Verdeutlichung der Signale ist rechts die Verteilung der Spots für den *c-myc*- und *id3*-Promotorbereich wiedergegeben. Durch die Anordnung lässt sich erkennen, dass es sich um spezifische Signale handelt, da die Verteilung in 4er Gruppen derjenigen auf dem Chip entspricht (Abbildung 19, linke Seite) (siehe auch Abbildung 18 Seite 63).

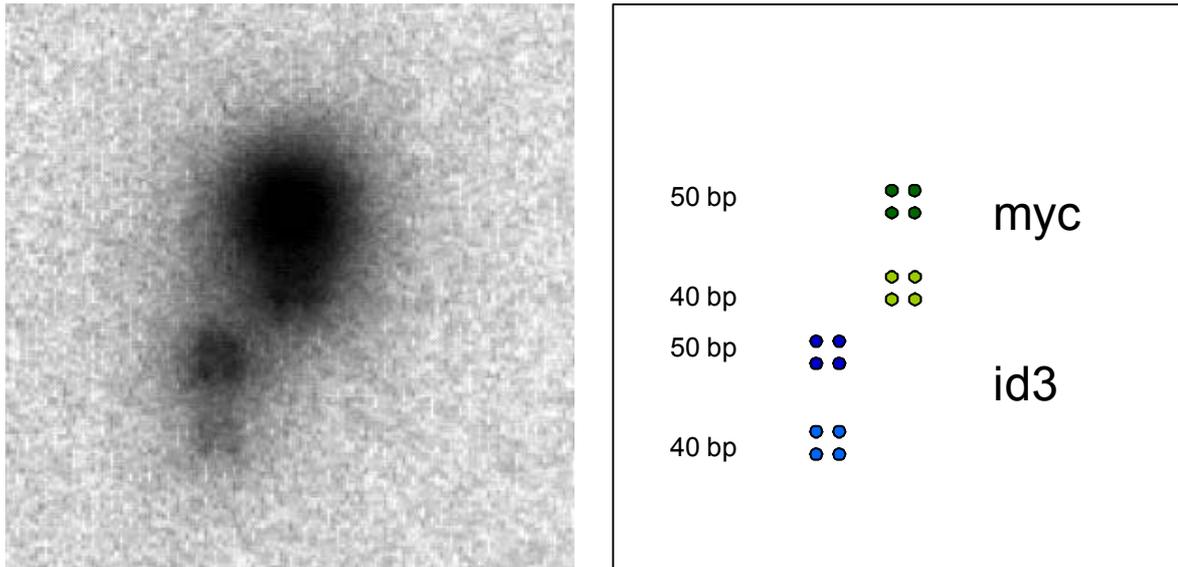


Abbildung 19 Hybridisierung von PCR-Produkten auf dem Testchip

Es wurden PCR-Produkte aus dem Promotorbereich von *c-myc* (Primerpaar dirkmyc 3/4) und *id3* (dirkmyc 8/10) amplifiziert. Diese wurden mit der „random-primed“-Methode markiert. Der Chip wurde mit 132pg der *myc*-Probe (303.000 dpm) und 120pg der *id3*-Probe (156.000dpm) für 24h hybridisiert. Die Abbildung zeigt auf der linken Seite einen stark vergrößerten Ausschnitt einer Autoradiographie mit einer Expositionszeit von 24h. Auf der rechten Seite ist die Verteilung der Spots auf dem Chip schematisch wiedergegeben.

5.3.2 Welche DNA-Menge wurde eingesetzt?

Um einen Eindruck von der Qualität der Testchips und der Effektivität der Hybridisierungen sowie die anschließende Visualisierung zu bekommen, wurden die DNA-Mengen errechnet. Bei der Markierung von 25ng DNA nach der „random-primed“-Methode (High Prime[®]) werden 16,5ng neu synthetisiert (siehe 5.2.4). Bei der Abtrennung der nicht inkorporierten Nukleotide mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (NickColumn[®]) wird nach Angaben des Herstellers eine Effizienz von 93% angenommen. So ergibt sich aus der Summe von eingesetzter DNA und neu synthetisierter DNA abzüglich 7% 38,6ng radioaktiv markierte DNA. Da nach der Säulenchromatographie nur die radioaktivsten Aliquots (je 100µl) verwendet wurden, musste diesem Vorgehen Rechnung getragen werden: Hierbei wurde die Summe der Radioaktivitäten aller Aliquots der Gesamt-DNA-Menge gleichgesetzt. So ergab sich für Abbildung 19 bei der *myc*-Probe eine Gesamtaktivität von 89 Millionen dpm in 38,6ng DNA. Die Fraktion der gepoolten Aliquots ergab eine Aktivität von 47 Millionen dpm in 100µl und entsprach somit 20,38ng. Diese Menge wurde vor der Hybridisierung noch 1:100 verdünnt und davon dann 65µl eingesetzt. So lässt sich abschließend für die *myc*-Probe eine DNA-Menge von 132pg mit

einer spezifischen Aktivität von 303.000dpm berechnen. Analog dazu ergeben sich für die *id3*-Probe 120pg mit 156.000dpm.

5.3.3 Mögliche Faltung ohne Einfluss auf Signalstärke

Wie in der Zeichnung auf der rechten Seite der Abbildung 19 zu erkennen, wurden die Oligonukleotide in zwei verschiedenen Längen auf den Chip gespottet (Abbildung 19, rechte Seite). Da bei einigen der verwendeten Oligonukleotide eine Faltung des abstehenden Endes möglich war, wurde auch noch eine verkürzte Variante auf dem Chip platziert. Es war anfangs nicht abzusehen welche Auswirkung die Etablierung einer so genannten „hairpin-structure“ der gespotteten Oligonukleotide auf das Hybridisierungsverhalten haben würde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein längeres Oligonukleotide bei allen getesteten Genen zu einem besseren Signal führte (Abbildung 19). Als Beispiel sind die Signale von *myc* und *id3* in der Abbildung 19 wiedergegeben. Bei beiden Genen zeigt das 10 Basen längere Oligonukleotid das stärkere Signal. Hierbei ist höchstwahrscheinlich sowohl die größere Menge an Radioaktivität, als auch die größere Stabilität des DNA-Hybrids gegenüber der Waschprozedur ursächlich.

5.3.4 Die PCR-Zyklenzahl wurde variiert

In weiteren Experimenten wurden aus genomischer DNA die Segmente mehrerer Gene des Testchips amplifiziert. Hierbei wurde die Zyklenzahl variiert um möglichst im exponentiellen Bereich der PCR-Reaktionskurve zu bleiben. In dem in Abbildung 20 wiedergegebenen Versuch wurden aus HL-60-DNA die Sequenzen von *c-myc*, *RFC-4* und *id3* in 20 Zyklen amplifiziert. Der Produkte wurden nach der Reaktion gereinigt und mit der random-primed-Methode radioaktiv markiert. In der anschließenden Hybridisierung zeigten sich für alle drei Gene gut sichtbare Signale (Abb. 20). Ungefähr 2cm rechts des Signals der 50bp langen Oligonukleotide von *id3* ist eine schwache Schwärzung zu erkennen. Bei diesem Signal handelt es sich um eine Kreuzhybridisierung des RFC-4-Promotorfragments mit dem gespotteten Anteil des CDC25C-Promotors. Wie in Abschnitt 5.2.2 dokumentiert, besitzen die gespotteten Oligonukleotide in ihren Sequenzen homologe Basenfolgen. Diese Kreuzhybridisierung war in allen mit dem RFC-4-Fragment durchgeführten Versuchen vorhanden. Da das Signal aber um etliche Größenordnungen unterhalb der korrekten Hybridisierungen liegt, kann es vernachlässigt werden. Vielmehr belegt es die hohe Sensitivität der sich paarenden Oligonukleotide.

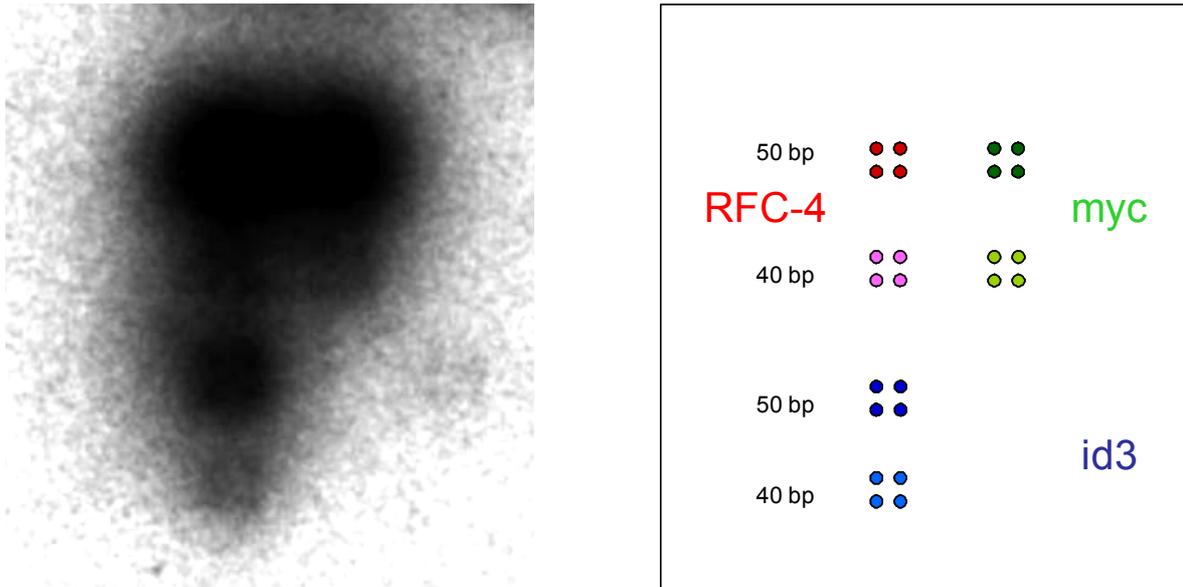


Abbildung 20 Hybridisierung mit drei Promotorfragmenten

Aus 500ng genomischer DNA wurden die Promotorsequenzen der Gene *c-myc*, *id3* und RFC-4 in 20 Zyklen amplifiziert. Die DNA wurde radioaktiv markiert und nach Ethanol-Fällung auf dem Chip hybridisiert. Der linke Bildteil zeigt die stark vergrößerte Autoradiographie nach 19h Exposition. Auf der rechten Seite ist die Verteilung der Spots auf dem Chip schematisch wiedergegeben.

5.4 Aktuelle Publikationen belegen den Wert der neuen Technik

Mittlerweile wurden einige Studien publiziert, die den Wert der Kombination von Chromatin-IP und Hybridisierung auf Microarrays belegen (Patel et al., 2004). So wurde diese neue Technik eingesetzt um die Bindung von MYC in großen Bereichen des Genoms zu untersuchen (Li et al., 2003; Mao et al., 2003; Orian et al., 2003). Auch andere Proteine wie z.B. E2F wurden in großem Maßstab untersucht (Weinmann et al., 2002).

In einer Studie wurde die Bindung von MYC an 7776 GpC-Inseln in der menschlichen Zelllinie HL60 mit Hilfe der neuen Technik untersucht. Es wurde eine Assoziation mit MYC bei 235 Sequenzen entdeckt, von denen 107 bekannte Gene darstellten (Mao et al., 2003). Interessanterweise war aber nur von 10% dieser 107 Gene bekannt, dass sie unter der transkriptionellen Kontrolle von MYC stehen (Patel et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde das Material aus MYC-Chromatin-IPs aus einer Burkitt-Lymphom Zelllinie auf Microarrays mit den Promotor-proximalen Sequenzen von 4839 Genen hybridisiert (Li et al., 2003). Die Forscher konnten eine Bindung von MYC an 876 Genen ($\approx 15\%$) zeigen, von denen 776 auch eine Assoziation mit MAX zeigten. Eine große Überlappung bestand

ebenfalls mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIID. Dies könnte bedeuten, dass MYC vor allem an Gene bindet, die schon eine gewisse basale Transkriptionsaktivität besitzen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass sich die Kombination aus ChIP und „Chips“ als eine interessante, innovative Technik herausgestellt hat. In Zukunft werden sicher noch Veränderungen, vor allem der Auswahl und Anzahl der gespotteten Sequenzen zu Verbesserungen führen und uns einen detaillierteren Einblick in die Regulation unseres Genoms geben.

6 Zusammenfassung

Genetische Veränderungen in menschlichen Tumoren führen häufig zur konstitutiven Expression des Proto-Onkogens *c-myc*. Das *c-myc* Protein (MYC) ist ein Transkriptionsfaktor, der zentral an der Regulation des Zellzyklus, von Wachstum und Zelltod (Apoptose) beteiligt ist. In Burkitt-Lymphom-Zellen erfolgt die transkriptionelle Aktivierung des *c-myc* Gens durch chromosomale Translokation an einen der drei Immunglobulin-Genloci. Ein wichtiger Regulationsmechanismus für das *c-myc* Gen wird dadurch aufgehoben: Die RNA-Polymerase II (Pol II) kann unmittelbar unterhalb des *c-myc* Promotors nicht mehr durch Pausieren reguliert werden, und es kommt zur konstitutiven Expression des Gens.

Die vorgelegte Dissertation untersucht die transkriptionelle Regulation von *c-myc* durch die RNA-Polymerase II in einem rekonstituierten Zellsystem. In diesem System wird eine α -Amanitin resistente große Untereinheit von Pol II konditional exprimiert. Für diese Pol II konnte bereits früher gezeigt werden, dass sie die endogene Pol II ersetzen kann und zelluläre Gene normal transkribiert. Wird die hoch repetitive, carboxy-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit deletiert, geht die transkriptionelle Aktivität *in vivo* nicht aber *in vitro* verloren. Zusätzlich wurde in dieses Zellsystem ein episomales *c-myc* Gen eingeführt, auf dem das Pausieren der Pol II nachgestellt werden kann.

Fragestellung der hier vorgelegten Arbeit war es, die Rolle der CTD für die Bindung an den *c-myc* Promotor zu untersuchen. Mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitations-Experimenten konnte ich zeigen, dass eine Pol II mit deletierter CTD immer noch mit ähnlicher Effizienz an den *c-myc* Promoter bindet wie eine Polymerase mit CTD. Allerdings kann eine Pol II ohne CTD wahrscheinlich keinen Isomerisierungsschritt am Promotor vollziehen, der sie in einen stabilen Elongationsmodus überführt und die Transkription zu Promotor-proximalen Pausierungsstellen erlaubt. Die Ergebnisse bestätigen Beobachtungen aus *in vitro* Untersuchungen, in denen die CTD für die Promotorerkennung und Transkription nicht essentiell ist. *In vivo* wird die CTD aber zwingend benötigt, um die Genrepression durch Chromatin aufzuheben.

In der Diskussion wurden verschiedene Möglichkeiten aufgezeigt, warum das Vorhandensein der CTD für eine produktive Transkription durch die RNA-Polymerase II wichtig ist. Weiterhin wird versucht Anregungen für neue interessante Fragestellungen zu geben, die die erbrachten Ergebnisse präzisieren könnten.

7 Literatur

Adamczewski, J. P., Rossignol, M., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Moncollin, V., and Egly, J. M. (1996). MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH. *Embo J* 15, 1877-1884.

Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533-538.

Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., and Thanos, D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103, 667-678.

Albert, T., Mautner, J., Funk, J. O., Hortnagel, K., Pullner, A., and Eick, D. (1997). Nucleosomal structures of c-myc promoters with transcriptionally engaged RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 17, 4363-4371.

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

Albert, T., Wells, J., Funk, J. O., Pullner, A., Raschke, E. E., Stelzer, G., Meisterernst, M., Farnham, P. J., and Eick, D. (2001). The chromatin structure of the dual c-myc promoter P1/P2 is regulated by separate elements. *J Biol Chem* 276, 20482-20490.

Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*, 4th edn (New York, Garland Science).

Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., *et al.* (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.

Allison, L. A., Wong, J. K., Fitzpatrick, V. D., Moyle, M., and Ingles, C. J. (1988). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, and mammals: a conserved structure with an essential function. *Mol Cell Biol* 8, 321-329.

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

Amati, B., Frank, S. R., Donjerkovic, D., and Taubert, S. (2001). Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1471, M135-145.

Armache, K. J., Kettenberger, H., and Cramer, P. (2003). Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6964-6968.

Barilla, D., Lee, B. A., and Proudfoot, N. J. (2001). Cleavage/polyadenylation factor IA associates with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 445-450.

Bartolomei, M. S., and Corden, J. L. (1995). Clustered alpha-amanitin resistance mutations in mouse. *Mol Gen Genet* *246*, 778-782.

Bazett-Jones, D. P., Cote, J., Landel, C. C., Peterson, C. L., and Workman, J. L. (1999). The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol Cell Biol* *19*, 1470-1478.

Bentley, D. L. (1995). Regulation of transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* *5*, 210-216.

Berns, A. (1994). Cancer genetics. Is p53 the only real tumor suppressor gene? *Curr Biol* *4*, 137-139.

Berns, E. M., Klijn, J. G., Smid, M., van Staveren, I. L., Look, M. P., van Putten, W. L., and Foekens, J. A. (1996). TP53 and MYC gene alterations independently predict poor prognosis in breast cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer* *16*, 170-179.

Berns, K., Hijmans, E. M., and Bernards, R. (1997). Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene* *15*, 1347-1356.

Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* *251*, 1211-1217.

Blyth, K., Terry, A., O'Hara, M., Baxter, E. W., Campbell, M., Stewart, M., Donehower, L. A., Onions, D. E., Neil, J. C., and Cameron, E. R. (1995). Synergy between a human c-myc transgene and p53 null genotype in murine thymic lymphomas: contrasting effects of homozygous and heterozygous p53 loss. *Oncogene* *10*, 1717-1723.

Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* *15*, 2042-2047.

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* *18*, 5321-5333.

Bowman, T., Broome, M. A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W. J., Sedivy, J. M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S. A., and Jove, R. (2001). Stat3-mediated Myc

expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7319-7324.

Boyd, K. E., and Farnham, P. J. (1999). Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells. *Mol Cell Biol* *19*, 8393-8399.

Breiling, A., Turner, B. M., Bianchi, M. E., and Orlando, V. (2001). General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature* *412*, 651-655.

Brown, P. O., and Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* *21*, 33-37.

Bushnell, D. A., Bamdad, C., and Kornberg, R. D. (1996). A minimal set of RNA polymerase II transcription protein interactions. *J Biol Chem* *271*, 20170-20174.

Bushnell, D. A., Cramer, P., and Kornberg, R. D. (2002). Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1218-1222.

Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 6969-6973.

Cadena, D. L., and Dahmus, M. E. (1987). Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II. *J Biol Chem* *262*, 12468-12474.

Carty, S. M., and Greenleaf, A. L. (2002). Hyperphosphorylated C-terminal repeat domain-associating proteins in the nuclear proteome link transcription to DNA/chromatin modification and RNA processing. *Mol Cell Proteomics* *1*, 598-610.

Chang, W. H., and Kornberg, R. D. (2000). Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIIH. *Cell* *102*, 609-613.

Chesnut, J. D., Stephens, J. H., and Dahmus, M. E. (1992). The interaction of RNA polymerase II with the adenovirus-2 major late promoter is precluded by phosphorylation of the C-terminal domain of subunit IIa. *J Biol Chem* *267*, 10500-10506.

Chiariello, M., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001). Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. *Nat Cell Biol* *3*, 580-586.

Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* *252*, 1102-1106.

Conaway, R. C., and Conaway, J. W. (1997). General transcription factors for RNA polymerase II. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 56, 327-346.

Cramer, P. (2004). RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev* 14, 218-226.

Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., and Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640-649.

Cramer, P., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292, 1863-1876.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C., and Croce, C. M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824-7827.

Dang, C. V., Resar, L. M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J. E., Wonsey, D., and Zeller, K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 253, 63-77.

Dubaele, S., Proietti De Santis, L., Bienstock, R. J., Keriell, A., Stefanini, M., Van Houten, B., and Egly, J. M. (2003). Basal transcription defect discriminates between xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy in XPD patients. *Mol Cell* 11, 1635-1646.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-2262.

Eberhardy, S. R., D'Cunha, C. A., and Farnham, P. J. (2000). Direct examination of histone acetylation on Myc target genes using chromatin immunoprecipitation. *J Biol Chem* 275, 33798-33805.

Egly, J. M. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIID: from transcription to clinic. *FEBS Lett* 498, 124-128.

Eilers, M. (1999). Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells* 9, 1-6.

El Gedaily, A., Bubendorf, L., Willi, N., Fu, W., Richter, J., Moch, H., Mihatsch, M. J., Sauter, G., and Gasser, T. C. (2001). Discovery of new DNA amplification loci in prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Prostate* 46, 184-190.

Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.

- Fanidi, A., Harrington, E. A., and Evan, G. I. (1992). Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* *359*, 554-556.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* *132*, 6-13.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* *137*, 266-267.
- Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* *4*, 199-207.
- Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* *17*, 1115-1129.
- Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* *15*, 2069-2082.
- Frit, P., Bergmann, E., and Egly, J. M. (1999). Transcription factor IIIH: a key player in the cellular response to DNA damage. *Biochimie* *81*, 27-38.
- Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J. Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E. W., Magrath, I. T., Knowles, D. M., and Dalla-Favera, R. (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5413-5417.
- Gazin, C., Dupont de Dinechin, S., Hampe, A., Masson, J. M., Martin, P., Stehelin, D., and Galibert, F. (1984). Nucleotide sequence of the human c-myc locus: provocative open reading frame within the first exon. *Embo J* *3*, 383-387.
- Gerber, H. P., Hagmann, M., Seipel, K., Georgiev, O., West, M. A., Litingtung, Y., Schaffner, W., and Corden, J. L. (1995). RNA polymerase II C-terminal domain required for enhancer-driven transcription. *Nature* *374*, 660-662.
- Gilhuis, H. J., Anderl, K. L., Boerman, R. H., Jeuken, J. M., James, C. D., Raffel, C., Scheithauer, B. W., and Jenkins, R. B. (2000). Comparative genomic hybridization of medulloblastomas and clinical relevance: eleven new cases and a review of the literature. *Clin Neurol Neurosurg* *102*, 203-209.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* *421*, 290-294.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5547-5551.

Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699.

Greenleaf, A. L. (1993). A positive addition to a negative tail's tale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10896-10897.

Gregory, M. A., and Hann, S. R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 20, 2423-2435.

Haferlach, T., Kohlmann, A., Kern, W., Hiddemann, W., Schnittger, S., and Schoch, C. (2003). Gene expression profiling as a tool for the diagnosis of acute leukemias. *Semin Hematol* 40, 281-295.

Hamlyn, P. H., and Rabbitts, T. H. (1983). Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* 304, 135-139.

Heidinger, M. (2000) Wirkung von konditional exprimierten RNA Polymerase II - Mutanten auf die Expression des c-myc - Gens, Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S., and Young, R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* 2, 43-53.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., *et al.* (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-2234.

Herms, J., Neidt, I., Luscher, B., Sommer, A., Schurmann, P., Schroder, T., Bergmann, M., Wilken, B., Probst-Cousin, S., Hernaiz-Driever, P., *et al.* (2000). C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value. *Int J Cancer* 89, 395-402.

Hirose, Y., and Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* 14, 1415-1429.

Hogarty, M. D., and Brodeur, G. M. (1999). Wild-type sequence of MYCN in neuroblastoma cell lines. *Int J Cancer* 80, 630-631.

Ichikawa, A., Hotta, T., and Saito, H. (1993). Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 11, 21-25.

Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C. D., Bishop, J. M., and Felsher, D. W. (2002). Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297, 102-104.

Jenkins, R. B., Qian, J., Lieber, M. M., and Bostwick, D. G. (1997). Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 57, 524-531.

Kim, Y. K., Bourgeois, C. F., Isel, C., Churcher, M. J., and Karn, J. (2002). Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. *Mol Cell Biol* 22, 4622-4637.

Kimura, M., Suzuki, H., and Ishihama, A. (2002). Formation of a carboxy-terminal domain phosphatase (Fcp1)/TFIIF/RNA polymerase II (pol II) complex in *Schizosaccharomyces pombe* involves direct interaction between Fcp1 and the Rpb4 subunit of pol II. *Mol Cell Biol* 22, 1577-1588.

Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-2352.

Kohlmann, A., Schoch, C., Schnittger, S., Dugas, M., Hiddemann, W., Kern, W., and Haferlach, T. (2003). Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology. *Genes Chromosomes Cancer* 37, 396-405.

Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.

Latchman, D. S. (1996). Transcription-factor mutations and disease. *N Engl J Med* 334, 28-33.

Latil, A., Vidaud, D., Valeri, A., Fournier, G., Vidaud, M., Lidereau, R., Cussenot, O., and Biache, I. (2000). htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer. *Int J Cancer* 89, 172-176.

Lee, T. I., and Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34, 77-137.

Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.

Leuther, K. K., Bushnell, D. A., and Kornberg, R. D. (1996). Two-dimensional crystallography of TFIIB- and IIE-RNA polymerase II complexes: implications for start site selection and initiation complex formation. *Cell* 85, 773-779.

Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W. K., Zhang, M. Q., and Ren, B. (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8164-8169.

Liao, S. M., Zhang, J., Jeffery, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M., van Vuuren, H. J., and Young, R. A. (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* *374*, 193-196.

Licciardo, P., Ruggiero, L., Lania, L., and Majello, B. (2001). Transcription activation by targeted recruitment of the RNA polymerase II CTD phosphatase FCP1. *Nucleic Acids Res* *29*, 3539-3545.

Litingtung, Y., Lawler, A. M., Sebald, S. M., Lee, E., Gearhart, J. D., Westphal, H., and Corden, J. L. (1999). Growth retardation and neonatal lethality in mice with a homozygous deletion in the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Gen Genet* *261*, 100-105.

Little, C. D., Nau, M. M., Carney, D. N., Gazdar, A. F., and Minna, J. D. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* *306*, 194-196.

Liu, J., Akoulitchev, S., Weber, A., Ge, H., Chuikov, S., Libutti, D., Wang, X. W., Conaway, J. W., Harris, C. C., Conaway, R. C., *et al.* (2001). Defective interplay of activators and repressors with TFIH in xeroderma pigmentosum. *Cell* *104*, 353-363.

Magrath, I. (1990). The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res* *55*, 133-270.

Mao, D. Y., Watson, J. D., Yan, P. S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W. W., Farnham, P. J., Huang, T. H., and Penn, L. Z. (2003). Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* *13*, 882-886.

Marcu, K. B., Harris, L. J., Stanton, L. W., Erikson, J., Watt, R., and Croce, C. M. (1983). Transcriptionally active c-myc oncogene is contained within NIARD, a DNA sequence associated with chromosome translocations in B-cell neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 519-523.

Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D. H. (1996). Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* *271*, 27176-27183.

Marshall, N. F., and Price, D. H. (1995). Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem* *270*, 12335-12338.

Mateyak, M. K., Obaya, A. J., Adachi, S., and Sedivy, J. M. (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* *8*, 1039-1048.

Mathew, P., Valentine, M. B., Bowman, L. C., Rowe, S. T., Nash, M. B., Valentine, V. A., Cohn, S. L., Castleberry, R. P., Brodeur, G. M., and Look, A. T. (2001). Detection of MYCN gene amplification in neuroblastoma by fluorescence in situ hybridization: a pediatric oncology group study. *Neoplasia* *3*, 105-109.

- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., and Bentley, D. L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* *385*, 357-361.
- McGhee, J. D., and von Hippel, P. H. (1975a). Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochemistry* *14*, 1281-1296.
- McGhee, J. D., and von Hippel, P. H. (1975b). Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. *Biochemistry* *14*, 1297-1303.
- McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* *94*, 363-374.
- McMahon, S. B., Wood, M. A., and Cole, M. D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol Cell Biol* *20*, 556-562.
- Meinhart, A., and Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3"-RNA-processing factors. *Nature* *430*, 223-226.
- Meininghaus, M., Chapman, R. D., Horndasch, M., and Eick, D. (2000). Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription. *J Biol Chem* *275*, 24375-24382.
- Meininghaus, M., and Eick, D. (1999). Requirement of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II for the transcriptional activation of chromosomal c-fos and hsp70A genes. *FEBS Lett* *446*, 173-176.
- Minvielle-Sebastia, L., and Keller, W. (1999). mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 352-357.
- Mitsuzawa, H., Kanda, E., and Ishihama, A. (2003). Rpb7 subunit of RNA polymerase II interacts with an RNA-binding protein involved in processing of transcripts. *Nucleic Acids Res* *31*, 4696-4701.
- Mougeon, E., Lemieux, L., Rassoulzadegan, M., and Cuzin, F. (1984). Biological activities of v-myc and rearranged c-myc oncogenes in rat fibroblast cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 5758-5762.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 263-273.
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M., and Prochownik, E. V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* *18*, 3004-3016.

- Nguyen, V. T., Giannoni, F., Dubois, M. F., Seo, S. J., Vigneron, M., Kedinger, C., and Bensaude, O. (1996). In vivo degradation of RNA polymerase II largest subunit triggered by alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res* 24, 2924-2929.
- Niklinski, J., Claassen, G., Meyers, C., Gregory, M. A., Allegra, C. J., Kaye, F. J., Hann, S. R., and Zajac-Kaye, M. (2000). Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma. *Mol Cell Biol* 20, 5276-5284.
- Nomdedeu, J. F., Lete, I., Baiget, M., Lasa, A., Estivill, C., Rubiol, E., Badell, I., Pardo, N., Cubells, J., Mateu, R., *et al.* (1997). Mutational analysis of p53 in 16 cases of acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 82, 550-554.
- Ohkuma, Y. (1997). Multiple functions of general transcription factors TFIIE and TFIIH in transcription: possible points of regulation by trans-acting factors. *J Biochem (Tokyo)* 122, 481-489.
- Orian, A., van Steensel, B., Delrow, J., Bussemaker, H. J., Li, L., Sawado, T., Williams, E., Loo, L. W., Cowley, S. M., Yost, C., *et al.* (2003). Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev* 17, 1101-1114.
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25, 99-104.
- Orlicky, S. M., Tran, P. T., Sayre, M. H., and Edwards, A. M. (2001). Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of rna polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. *J Biol Chem* 276, 10097-10102.
- Oster, S. K., Ho, C. S., Soucie, E. L., and Penn, L. Z. (2002). The myc oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res* 84, 81-154.
- Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A. M., Gustafsson, C. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* 3, 109-118.
- Palancade, B., and Bensaude, O. (2003). Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur J Biochem* 270, 3859-3870.
- Patel, J. H., Loboda, A. P., Showe, M. K., Showe, L. C., and McMahon, S. B. (2004). Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer* 4, 562-568.
- Patturajan, M., Wei, X., Berezney, R., and Corden, J. L. (1998). A nuclear matrix protein interacts with the phosphorylated C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 18, 2406-2415.

- Payne, J. M., Laybourn, P. J., and Dahmus, M. E. (1989). The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of subunit Ila. *J Biol Chem* *264*, 19621-19629.
- Pelengaris, S., and Khan, M. (2003). The many faces of c-MYC. *Arch Biochem Biophys* *416*, 129-136.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* *2*, 764-776.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* *3*, 565-577.
- Peterson, C. L. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile. *FEBS Lett* *476*, 68-72.
- Peterson, C. L., and Workman, J. L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* *10*, 187-192.
- Pinion, S. B., Kennedy, J. H., Miller, R. W., and MacLean, A. B. (1991). Oncogene expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer of cervix. *Lancet* *337*, 819-820.
- Popescu, N. C. (2000). Comprehensive genetic analysis of cancer cells. *J Cell Mol Med* *4*, 151-163.
- Prendergast, G. C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* *18*, 2967-2987.
- Price, D. H. (2000). P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* *20*, 2629-2634.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., and Dye, M. J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* *108*, 501-512.
- Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* *39*, 238-240.
- Reid, P. E., Donaldson, B., Secret, D. W., and Bradford, B. (1970). A simple, rapid, isothermal gas chromatographic procedure for the analysis of monosaccharide mixtures. *J Chromatogr* *47*, 199-208.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., *et al.* (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* *290*, 2306-2309.

- Rossignol, M., Kolb-Cheynel, I., and Egly, J. M. (1997). Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIH. *Embo J* 16, 1628-1637.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T., and Stehelin, D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* 281, 452-455.
- Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J. P., Schaeffer, L., Nigg, E. A., Hoeijmakers, J. H., and Egly, J. M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell* 79, 1093-1101.
- Sayre, M. H., Tschochner, H., and Kornberg, R. D. (1992). Purification and properties of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II general initiation factor a. *J Biol Chem* 267, 23383-23387.
- Schlosser, I., Holzels, M., Hoffmann, R., Burtscher, H., Kohlhuber, F., Schuhmacher, M., Chapman, R., Weidle, U. H., and Eick, D. (2005). Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* 24, 520-524.
- Schlosser, I., Holzels, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U. H., and Eick, D. (2003). A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* 31, 6148-6156.
- Schoch, C., Kohlmann, A., Schnittger, S., Brors, B., Dugas, M., Mergenthaler, S., Kern, W., Hiddemann, W., Eils, R., and Haferlach, T. (2002). Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10008-10013.
- Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S., and Bentley, D. (2000). Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes Dev* 14, 2435-2440.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzels, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., and Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.
- Schuhmacher, M., Staeger, M. S., Pajic, A., Polack, A., Weidle, U. H., Bornkamm, G. W., Eick, D., and Kohlhuber, F. (1999). Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* 9, 1255-1258.
- Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D., and Egly, J. M. (2000). Molecular structure of human TFIIH. *Cell* 102, 599-607.
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., and Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* 14, 2501-2514.

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

Slansky, J. E., and Farnham, P. J. (1996). Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 208, 1-30.

Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J., and Eilers, M. (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *Embo J* 14, 4814-4826.

Steinmetz, E. J., Conrad, N. K., Brow, D. A., and Corden, J. L. (2001). RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413, 327-331.

Stiller, J. W., and Hall, B. D. (2002). Evolution of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6091-6096.

Strobl, L. J., and Eick, D. (1992). Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *Embo J* 11, 3307-3314.

Strobl, L. J., Kohlhuber, F., Mautner, J., Polack, A., and Eick, D. (1993). Absence of a paused transcription complex from the c-myc P2 promoter of the translocation chromosome in Burkitt's lymphoma cells: implication for the c-myc P1/P2 promoter shift. *Oncogene* 8, 1437-1447.

Svejstrup, J. Q., Vichi, P., and Egly, J. M. (1996). The multiple roles of transcription/repair factor TFIIF. *Trends Biochem Sci* 21, 346-350.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837-7841.

Thorpe, G. H., Kricka, L. J., Moseley, S. B., and Whitehead, T. P. (1985). Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* 31, 1335-1341.

Todone, F., Brick, P., Werner, F., Weinzierl, R. O., and Onesti, S. (2001). Structure of an archaeal homolog of the eukaryotic RNA polymerase II RPB4/RPB7 complex. *Mol Cell* 8, 1137-1143.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., and Bishop, J. M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* *42*, 773-779.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., *et al.* (1998a). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev* *12*, 343-356.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., and Handa, H. (1998b). Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *Embo J* *17*, 7395-7403.
- Wang, Z. R., Liu, W., Smith, S. T., Parrish, R. S., and Young, S. R. (1999). c-myc and chromosome 8 centromere studies of ovarian cancer by interphase FISH. *Exp Mol Pathol* *66*, 140-148.
- Weinmann, A. S., Bartley, S. M., Zhang, T., Zhang, M. Q., and Farnham, P. J. (2001). Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol Cell Biol* *21*, 6820-6832.
- Weinmann, A. S., and Farnham, P. J. (2002). Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation. *Methods* *26*, 37-47.
- Weinmann, A. S., Yan, P. S., Oberley, M. J., Huang, T. H., and Farnham, P. J. (2002). Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev* *16*, 235-244.
- Wells, J., and Farnham, P. J. (2002). Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods* *26*, 48-56.
- Wilson, I. A., Niman, H. L., Houghten, R. A., Cherenson, A. R., Connolly, M. L., and Lerner, R. A. (1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* *37*, 767-778.
- Yamaguchi, Y., Wada, T., and Handa, H. (1998). Interplay between positive and negative elongation factors: drawing a new view of DRB. *Genes Cells* *3*, 9-15.
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D., and Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3806-3810.
- Young, R. A. (1991). RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* *60*, 689-715.
- Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R. V., Gentile, C., Gebara, M., and Corden, J. L. (1996). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II

interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6975-6980.

Zurita, M., and Merino, C. (2003). The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends Genet* *19*, 578-584.

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Christoph Sebastian Lux
Adresse: Ludwigstraße 6, 80539 München
Telefon: 089/28996764; 0179/4574080
Email: christoph-lux@t-online.de

Geburtsdatum: 03. März 1976
Geburtsort: Bamberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Christel Lux, Pharmazeutin
Dr. Bernhard Lux, Facharzt für Urologie

SCHULAUSBILDUNG UND STUDIUM

1981 - 1986 Ruprechtschule, Bamberg
1986 – 1995 Franz–Ludwig–Gymnasium, Bamberg
1995 – 1996 Ersatzdienst, Offene Behinderten Arbeit des Malteser Hilfsdienstes
Bamberg; Sprecher der Zivildienstleistenden
1996 Immatrikulation an der Ludwig–Maximilians-Universität im Fach
Humanmedizin
1998 Ärztliche Vorprüfung
2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Gesamtnote: 1,8

Beschäftigung

Seit 08/04 Facharztausbildung in der Urologischen Klinik der Technischen Universität München

Praktische Tätigkeit

Famulaturen

03/1999 **Kardiologie**, Praxis Prof. Dr. Silber
08/1999 **Chirurgie**, Kreiskrankenhaus Regensburg
08/2000 **Urologie**, Kreiskrankenhaus Bamberg
03/2001 **Innere Medizin**, Praxis Dr. Helmut Adam

Praktisches Jahr

10/2002 – 03/2003 **Innere Medizin**

- Medizinische Klinik II, Universität München, Klinikum Großhadern
- Medizinische Klinik III, Universität München, Klinikum Großhadern

03/2003 – 06/2003 **Urologie**
Urologische Klinik der Universität München, Klinikum Großhadern

06/2003 – 09/2003 **Chirurgie**

- Chirurgische Klinik der Universität München, Klinikum Innenstadt
- Department of Surgery, Surgical Oncology, Tulane University, New Orleans, USA

Tätigkeiten neben dem Studium

11/1999 – 03/2003 Co-Assistent, Kursus der makroskopischen Anatomie, Anatomische Anstalt, LMU, München

Promotion

Seit 10/2000 **Promotion im Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik**, GSF – Forschungsgesellschaft für Umwelt und Gesundheit in München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eick

Thema: „Transkriptionelle Regulation des Oncogens *c-myc*“

Präsentation:

- Factors and Mechanism of Gene Regulation; III. Meeting, 12.-13.10. 2001, Munich
“Genetic manipulation of the large subunit of RNA polymerase II”
Rob Chapman, Mark Meininghaus, Christoph Lux, Andreas Lang, Maria Sobennikova and Dirk Eick
- 6th EMBL Transcription Meeting, EMBL – Heidelberg, Germany; August 28 to September 01, 2004
“Importance of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II (CTD) for promoter binding and Pol II distribution within chromatin”
Lux, C., Lang, A., Albiez, H., Meininghaus, M., Brack-Werner, R., Sobennikova, M., Chapman, R., Cremer, T. and Eick, Dirk
Insitute for Clinical Molecular Biology and Tumour Genetics, GSF-Research Centre, Marchioninistrasse 25, 81377 Munich, Germany

Publikation:

- C. Lux, H. Albiez, R. D. Chapman, M. Heidinger, M. Meininghaus, R. Brack-Werner, A. Lang, M. Ziegler, T. Cremer and D. Eick
„Transition from initiation to promoter proximal pausing requires the CTD of RNA polymerase II”
Nucleic Acids Research, 2005, Vol. 33, No. 16, 5139-5144

Persönliche Interessen

Sprachen Englisch, sehr gute Kenntnisse

 Französisch, Grundkenntnisse

Computer Windows, Word, PowerPoint, Corel Draw, Photoshop

Private Interessen Basketball, Lesen, Skifahren, Reisen,

München, den 23. Oktober 2005

Christoph Lux

9 Danksagung

- Großen Dank möchte ich meinem Gruppenleiter Prof. Dr. Dirk Eick für die Betreuung und die Geduld aussprechen, die er als „Biologe“ einem „Mediziner“ entgegenbrachte.
- Besonderer Dank gilt Gertrud Stelzer, Dr. Marion Ritzi und Dr. Alois Scheppers für die große Unterstützung und Hilfestellung bei der Etablierung der Chromatin-IP.
- Weiterhin möchte ich Julie Wells, Ph.D. für ihre technische Unterstützung besonders danken.
- Für die schöne Zeit und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen, Ratschläge und Tipps, sowie die nicht-wissenschaftlichen Gespräche möchte ich mich bei der gesamten Mannschaft des Eick-Labors bedanken: Dr. Michael Hölzel, Dr. Rob Chapman, Dr. Martin Schlee, Dr. Manuela Horndasch, Dr. Isabell Schlosser, Andreas Lang und Maria Slobennikova
- Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Gustav Klobeck vom Adolf-Butenandt-Institut für die Unterstützung meiner Dissertation bedanken
- Für die große Unterstützung möchte ich mich bei meinem Institutsleiter Prof. Dr. Georg Bornkamm bedanken.
- Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Karin Forster aus der klinischen Kooperationsgruppe Prof. Michael Hallek für die gemeinsamen Stunden und Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken.
- Abschließend möchte ich allen Personen in der GSF danken, die an dem reibungslosen Ablauf des Forschungsbetriebes ihren Anteil haben. Beispielhaft sind unsere Sekretärinnen, die Männer von der Haustechnik und die Spülfrauen zu nennen.