Myc-Funktion im Zellwachstum und Identifikation von neuen Myc-regulierten Genen in B-Zellen

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde des Dr. rer. nat.
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Marino Schuhmacher

Dezember 2000

Diese Arbeit wurde angefertigt am
Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München

Erstgutachter: PD Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfhard Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 4.5.2001

MEINEN ELTERN

Die meine Ausbildung ermöglichten und förderten.

UND MEINEM BIOLOGIELEHRER GERHARD RINNER

der mich für die Biologie begeisterte.

I EINLEITUNG

1. Vorwort 1

2. Das *myc* Gen 2

2.1. ***myc* und Tumorentstehung** 3
2.2. **Erkenntnisse über die Funktion von *myc*** 4
2.2.1. Myc ist ein Transkriptionsfaktor 4
2.2.2. Myc regulierte Gene 4
2.3. ***myc* in der Zellzyklusregulation** 6
2.3.1. Kontrolle des Restriktionspunktes 6
2.3.2. Myc aktiviert CyclinE/Cdk2 8
2.4. ***myc*-Funktion im programmiertem Zelltod (Apoptose)** 10
2.5. ***myc* in der Zelldifferenzierung** 11
2.6. ***myc*-Funktion im Zellwachstum** 12
2.6.1. Koordination von Zellwachstum und Zellzyklus 12
2.6.2. Myc induziert Proteinsynthese und Metabolismus 13

3. Zielsetzung der Arbeit 14

II MATERIAL & METHODEN 16

1. Material 16

1.1. **Chemikalien** 16
1.2. **Radioaktive Isotope** 17
1.3. **Enzyme** 17
1.4. **Antikörper** 17
1.5. **Verbrauchsmaterial und Kits** 17
1.6. **Geräte** 18

2. Zellkultur 19

2.1. **Die Zellinie P493-6** 19
2.1.1. *Tetracyclin*-regulierbare *myc*-Expressionsvektoren 19
2.1.2. Entstehung der Zellinie P493-6 20
2.2. **Kultivierung von Zellen** 21
2.3. **Einfrieren und Auftauen von Zellen** 21
2.4. **Bestimmen der Lebendzellzahl** 23
2.5. **Arretierung und *myc*-Induktion in P493-6-Zellen** 23

2.6.	**Methoden zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung**	23
2.6.1.	Bestimmung der S-Phase durch ^{3}H-Thymidin-Einbau	23
2.6.2.	Propidiumjodid (PI)–Färbung	24
2.7.	**Methoden zur Bestimmung apoptotischer Zellen**	24
2.7.1.	DAPI-Färbung	24
2.7.2.	Apoptotische Zellen durch PI-Färbung	24
2.8.	**Methoden zur Bestimmung der Zellmorphologie**	24
2.8.1.	Zellgrößenbestimmung	24
2.8.2.	May-Grünwald / Giemsa Färbung	25
2.9.	**Methoden zur Bestimmung der Stoffwechsel-Aktivität**	25
2.9.1.	MTT-Assay	25
2.9.2.	Bestimmung der Proteinsynthese	25
3.	**RNA-Analyse**	26
3.1.	**Isolierung von gesamtzellulärer RNA**	26
3.1.1.	Präparation in großem Maßstab (über 1 mg)	26
3.1.2.	Präparation kleinerer Mengen RNA	26
3.2.	**Northern-Blot-Analyse**	26
3.3.	**Nukleärer Run-On**	27
3.3.1.	Isolierung von Zellkernen	27
3.3.2.	Run-On Reaktion	27
4.	**Methoden zur DNA-Analyse**	28
4.1.	**Gebräuchliche Methoden**	28
4.2.	**Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen**	28
4.3.	**Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**	28
4.4.	**Radioaktive Markierung von DNA**	29
4.5.	**Synthese von cDNA**	29
4.5.1.	Synthese des ersten Strangs (RT Ansatz)	29
4.5.2.	Synthese des zweiten Strangs	29
4.6.	**Hybridisierungsproben für Northern-Blot-Analysen**	30
4.7.	**DNA-Sequenzierung**	31
5.	**Protein-Analyse**	31
5.1.	**Western-Blot-Analyse**	31
5.1.1.	Zellaufschluß	31
5.1.2.	Proteinbestimmung nach Bradford (1978)	31
5.1.3.	SDS-Gelelektrophorese	31
5.1.4.	Western-Blot	32

5.1.5. Antikörper-Behandlung 32
5.2. **Nachweis der Cdk2-Aktivität** 32
5.2.1. Immunpräzipitation 32
5.2.2. Bestimmung der Histon H1-Kinase-Aktivität 33

6. **Analyse von Microarrays** 33

6.1. **Hybridisierung von cDNA-Filterarrays** 33
6.2. **Analyse von Oligonukleotid-Arrays (Genchips)** 34
6.2.1. Herstellung Biotin-markierter cRNA 34
6.2.2. Hybridisierung und Waschen der Genchips 34
6.2.3. Beschreibung der Genchips 35
6.2.4. Algorithmen bei der Auswertung der Genchips 36
6.2.4.1. Scannen der Chips 36
6.2.4.2. Hintergrund und Rauschen 36
6.2.4.3. Algorithmen zur Bestimmung von AbsCall 36
6.2.4.4. Normalisierung 37
6.2.4.5. Algorithmen zur Bestimmung von DiffCall 38
6.2.4.6. Berechnung der Fold Change 40

III **ERGEBNISSE** 41

1. **Myc abhängige Phenotypen der Zellinie P493-6** 41

1.1. **Regulierbarkeit von *myc* durch Tetracyclin** 41
1.2. **Proliferation von P493-6-Zellen** 43
1.2.1. Zur Proliferation benötigen P493-6-Zellen Myc und FKS 43
1.2.2. Induktion von S-Phase und Zellzyklusregulation 46
1.3. **Myc reguliert Zellwachstum unabhängig von Zellzykluskontrolle** 49
1.3.1. Myc-regulierte Gene bei FKS-Entzug 49
1.3.2. Zellwachstum bei FKS-Entzug 50
1.3.3. Induktion von Protein-Synthese und Stoffwechsel bei FKS-Entzug 55

2. **Identifikation neuer Zielgene von Myc** 58

2.1. **Regulation von Myc-Zielgenen in P493-6-Zellen** 58
2.2. **cdk4 wird von Myc und TGF-β gegensätzlich reguliert** 59
2.3. **Identifikation von Myc-Zielgenen über die transkriptionelle Aktivität** 61
2.4. **Identifikation von Myc-Zielgenen mit Genchips** 67
2.5. **Bestätigung der Array-Ergebnisse** 71

IV	**DISKUSSION**	74
1.	**Die Zellinie P493-6**	74
1.1	**Myc induziert in P493-6-Zellen keine Apoptose bei Serum-Entzug**	75
1.2.	**P493-6 als Burkitt-Lymphom-Modell**	76
2.	**Myc als Koordinator von Zellzyklus und Zellwachstum**	77
2.1.	**P493-6-Zellen proliferieren nur bei Anwesenheit von FKS und Myc**	77
2.2.	**Myc induziert Zellwachstum**	78
2.3.	**cdk4 als Myc-Zielgen**	80
3.	**Identifizierung von Myc-regulierten Genen mit Array-Techniken**	81
3.1.	**Gemeinsame Ergebnisse aus beiden Methoden**	81
3.2.	**Direkte oder indirekte Zielgene von Myc?**	83
3.3.	**Funktion der identifizierten Gene**	84
3.3.1.	Myc-regulierte Gene in der Proteinsynthese	85
3.3.2.	Myc-regulierte Gene im Nukleolus	86
3.3.3.	Myc-regulierte Gene in der DNA-Synthese	86
3.3.4.	Weitere Myc-regulierte Gene in der Wachstumsregulation	87
3.3.5.	Myc-regulierte Gene in der Signal-Transduktion	87
3.3.6.	Myc-regulierte Gene in der Apoptose	89
3.3.7.	Myc-reprimierte Gene	89
4.	**Bedeutung der Ergebnisse für die Biologie von Myc**	90
5.	**Ausblick**	95
V	**ZUSAMMENFASSUNG**	96
VI	**LITERATURVERZEICHNIS**	98
VII	**ANHANG**	115
1.	**Abkürzungsverzeichnis**	115
2.	**Lebenslauf**	117
3.	**Publikationsliste**	118
4.	**Danksagung**	119

EINLEITUNG

1. Vorwort

Zelluläre Programme wie Wachstum, Differenzierung und Zelltod müssen streng reguliert werden. Sind die Regulationsmechanismen im Zellverband eines höheren Organismus gestört, kann es zu schweren Krankheiten wie Krebs kommen. Bei der Krebsentstehung werden zelluläre Gene beschädigt oder dereguliert, die die obengenannten Prozesse steuern.
Ein solches Gen ist das c-*myc* Gen (*myc*). Wird *myc* in einer Zelle normal reguliert, so bezeichnet man es, wie andere potentiell krebsverursachende Gene, als Protoonkogen. Kommt es zur permanenten Aktivierung von *myc* und damit zur Entstehung einer Tumorzelle, wird *myc* zum Onkogen. Welche Funktionen erfüllt *myc* normalerweise in einer Zelle? Wie führen diese Funktionen zur Tumorentstehung? Seit der Entdeckung von *myc* im Jahre 1978, sind diese Fragen immer noch nicht vollständig beantwortet. Myc ist im Zusammenspiel mit anderen zellulären Faktoren ein zentraler Regulator von Wachstum, Differenzierung und Zelltod. Myc erfüllt seine Funktionen als Transkriptionsfaktor, d.h. es reguliert die Expression anderer Gene. Ist das 'Expressionsmuster' dieser Gene verantwortlich für die unterschiedlichen Programme, die Myc erfüllen kann?
Mit Hilfe eines neuartigen Zellsystems wird in dieser Arbeit das Expressionsmuster Myc-regulierter Gene untersucht. Die Identifizierung neuer Myc-Zielgene ist derzeit eines der herausfordernden Ziele der *myc*-Forschung und soll klären, wie Myc zu der Regulation des Zellwachstums beiträgt.

2. Das *myc*-Gen

Das c-*myc* Gen (*myc*) gehört zu einer Genfamilie, deren Mitglieder zelltypspezifisch exprimiert werden. Die am besten charakterisierten Mitglieder sind c-*myc*, N-*myc* und L-*myc*, daneben wurden noch S-*myc* und B-*myc* beschrieben. N-*myc* kommt hauptsächlich in neuronalen Zellen vor und verursacht bei Überexpression das Neuroblastom. L-*myc* wurde im kleinzelligen Lungenkarzinom identifiziert (Übersicht in Lemaitre *et al.*, 1996). Bei Vertebraten ist c-*myc* konserviert, es wurde aber auch bei *Drosophila melanogaster* und dem Seestern *Asterias vulgaris* gefunden (Gallant *et al.*,1996; Schreiber-Agus *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1992). Abbildung 1 zeigt die Genstruktur aus drei Exons, wovon Exon 2 und Exon 3 den offenen Leserahmen für das Myc-Protein (Myc) codieren. Das Gen besitzt mehrere Promotoren (P0-3). Hauptsächlich wird der Promotor P2 benutzt (75-90% der Transkripte), der zur Expression zweier Proteine von 64 und 67kd Größe führt (Übersicht in Henriksson und Lüscher, 1996).

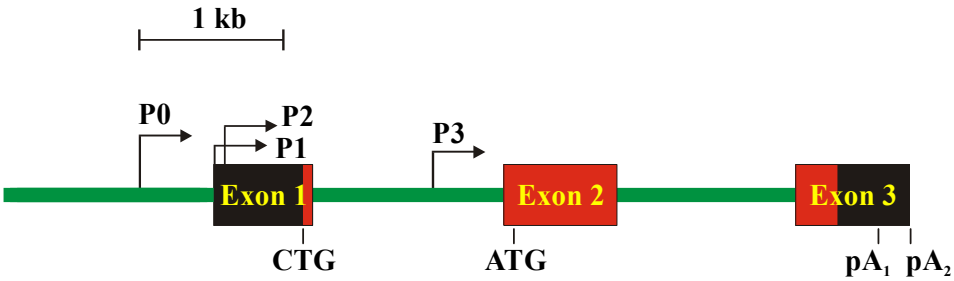

Abb. 1: Die Struktur des c-*myc* Gens (*myc*). Der P2-Promotor führt zur Transkription der *myc*-mRNA (75-90% aller Transkripte), wobei die Exons 2 und 3 für das 64kd (vom ATG-Startcodon), bzw. das 67kd Protein (CTG-Startcodon) codieren. Die Polyadenylierungsstellen sind mit pA_1 und pA_2 bezeichnet.

Myc-RNA und Protein besitzen eine kurze Halbwertszeit von 20 bis 30 min. Die Expression wird sehr früh in der G1-Phase des Zellzyklus induziert und bleibt während des Verlaufs des gesamten Zellzyklus erhalten (Übersicht in Henriksson und Lüscher, 1996).

Myc ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt, wie Zellproliferation, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Übersicht in Amati *et al.*, 1998; Obaya *et al.*, 1999; Prendergast, 1999). Die molekularen Mechanismen, durch die Myc diese Prozesse steuert, sind aber weitgehend ungeklärt. In den folgenden Abschnitten der Einleitung soll der Kenntnisstand über *myc* zu Beginn dieser Arbeit zusammengefasst werden.

2.1. *myc* und Tumorentstehung

Der Schritt vom Protoonkogen zum Onkogen kann auf verschiedene Weise erfolgen. Viren, die in das Genom des Wirtes integrieren, können zelluläre Gene in ihr eigenes Genom aufnehmen und im Virion verpacken. Infizieren solche Viren erneut einen Wirt, wird das Protoonkogen oftmals durch virale regulatorische Einheiten aktiviert (*Transduktion*).
Bei Rekombinationsereignissen können Bruchstücke eines Chromosoms auf andere Chromosomen übertragen werden (*Translokationen*). In diesem Falle gelangen Protoonkogene unter die Kontrolle regulatorischer Einheiten des Bruchstücks.
Eine *Mutation* eines Protoonkogens kann zur unkontrollierten Expression oder zur Veränderung des Proteins führen.
Die Vervielfältigung eines Gens (*Genamplifikation*) hat oft eine Überexpression zur Folge. Alle genannten genetischen Veränderungen wurden für *myc* in verschiedenen Tumoren beschrieben. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde schon früh vermutet, daß *myc* eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren spielt.
Zum ersten Mal wurde *myc* als virales Gen beschrieben (v-*myc*). Als Bestandteil des Hühner-Virus MC29 führt es in den infizierten Tieren zur **My**elo**c**ytomatose (Sheiness *et al.*, 1979). Die Entdeckung von v-*myc* führte bald zur Identifizierung des zellulären Homologs, c-*myc* (Vennstrom *et al.*, 1982). Das AL-Virus (Avian Leukosis Virus) aktiviert *myc* bei Hühnern durch Integration (Hayward *et al.*, 1981).
In humanen Tumoren findet man häufig Überexpression von Myc. In vielen Fällen ist dies auf die Amplifikation von *myc* zurückzuführen, wie bei Brustkrebs, Prostatakrebs, Darmkrebs oder dem Neuroblastom (Übersicht in Nesbit *et al.* 1999). Bei Lymphomen ist die Myc-Überproduktion meist Folge einer Translokation, wie beim Burkitt-Lymphom. Dabei fusionieren regulatorische Einheiten der Immunglobulin-Loci mit dem *myc* Gen (Chromosom 8), z.B. die μ-Schwere-Ketten-Region (Chromosom 14), die κ-Leichte-Kette (Chromosom 2) oder λ-Leichte-Kette (Chromosom 22) (Übersicht in Klein, 1999). Mutationen in der codierenden Region des *myc*-Gens betreffen hauptsächlich Phosphorylierungsstellen des Myc-Proteins (Threonin 58, Serin 62) (Übersicht in Nesbit *et al.*, 1999). Für das Multiple Myelom (MM) wurden Mutationen in der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) der mRNA von Myc beschrieben. Diese Mutation führt zu einer verstärkten Assoziation mit Polysomen und damit zur erhöhten Translation der *myc*-mRNA (Willis *et al.* 1997).

2.2. Erkenntnisse über die Funktion von *myc*

2.2.1. Myc ist ein Transkriptionsfaktor

Erst zehn Jahre nach der Entdeckung von *myc* konnten erste Ergebnisse über die vermutliche zelluläre Funktion veröffentlicht werden. Myc ist ein Protein, das eine basische/Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper (bHLH-LZ) Domäne besitzt (Abb. 2). Dies deutete darauf hin, daß Myc mit anderen bHLH-LZ-Proteinen interagieren und DNA binden kann. Tatsächlich wurde ein Protein identifiziert, das eine sehr ähnliche Struktur wie der C-terminale Bereich von Myc aufweist (Abb. 2). Dieses Protein wurde als Max bezeichnet (**M**yc **A**ssociated Factor **X**). Max bindet als Dimerisierungspartner von Myc, oder als Homodimer an DNA mit der Konsensussequenz CACGTG (Blackwood & Eisenman 1991; Prendergast *et al.*, 1991; Ferre-D'Amare *et al.*, 1993). Myc selbst bildet keine Homodimere. Der N-terminale Bereich des Myc-Proteins wurde als Transaktivierungsdomäne (TAD) identifiziert und erste direkte Zielgene konnten beschrieben werden (Kato *et al.* 1990, Amati *et al.* 1992, Kretzner *et al.* 1992, Eilers *et al.* 1991).

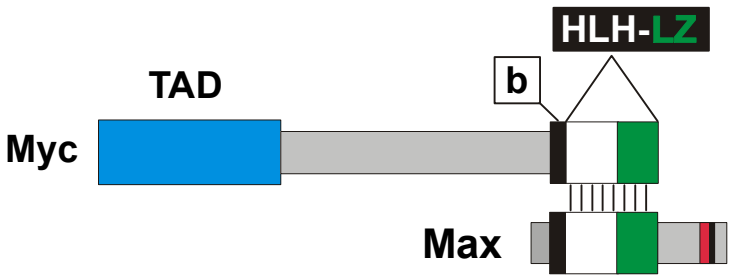

Abb. 2: Struktur der Proteine Myc und Max. Beide Proteine bilden über ihre HLH-LZ-Struktur Dimere. Über eine basische Region (b) binden Myc/Max-Komplexe an eine CACGTG-Konsensussequenz. Myc verfügt außerdem über eine Transaktivierungsdomäne (TAD), die zur Induktion von Zielgenen führt.

2.2.2. Myc-regulierte Gene

Seit der Identifizierung von Myc als Transkriptionsfaktor ist es ein Schwerpunkt der Myc–Forschung, direkte Zielgene von Myc zu finden. Oft wurden für diese Gene nur schwache Induktionen beschrieben, was deren Identifizierung erschwert. Auch ist ein formaler Beweis, daß es sich um unmittelbar durch Myc-regulierte Gene handelt, schwierig. Als Kriterien für ein direktes Myc-Zielgen wurden einige Richtlinien aufgestellt (Übersicht in Henriksson und Lüscher, 1996). So soll die Expression des Zielgens unmittelbar auf die Myc-Aktivierung

folgen. Zielgene sollen Myc-Bindestellen aufweisen und die Induktion eines Zielgens soll unabhängig von Proteinsynthese erfolgen. Die Expression des Zielgens sollte abhängig sein von Mutationen, die die Myc-Funktion beeinträchtigen. Diese Kriterien zu beweisen, erweist sich in der Praxis oft als schwierig. Auch Gene, die solche Kriterien erfüllen, sind in der Fachwelt oft als direkte Zielgene umstritten. Auch wenn der formale Beweis für ein direktes Gen nicht immer durchführbar ist, können diese Gene aber dennoch entscheidend zu einer Tumorentstehung beitragen.

In Tabelle 1 sind die Myc-Zielgene aufgelistet, die zu Beginn dieser Arbeit bekannt waren. Es wurden auch einige, durch Myc-reprimierte Gene beschrieben. Die genauen Mechanismen, wie Myc-Zielgene induziert oder reprimiert werden, sind aber noch weitgehend unklar und wird hier nicht näher erläutert (Übersicht in Cole und McMahon, 1999; Claassen und Hann, 1999).

Gen	**Funktion**	**Regulation durch Myc**	**Referenz**
α-Prothymosin	Chromatin-Struktur	induziert	Eilers *et al.* 1991
ECA39	Aminosäuretransport	induziert	Benvinisty *et al.*, 1992
ODC	Polyamin-Synthese	induziert	Bello-Fernandez *et al.*, 1993
p53	Transkriptionsfaktor	induziert	Reisman *et al.*, 1993
eIF4E	Translations-	induziert	Rosenwald *et al.*, 1993a
eIF2α	Initiationsfaktoren		
cad	Pyrimidin-Biosynthese	induziert	Miltenberger *et al.* 1995
MrDb	RNA-Helikase	induziert	Grandori *et al.* 1996
Cdc25A	Zellzyklusregulation	induziert	Galaktionov *et al.*, 1996
LDH-A	Metabolismus	induziert	Shim *et al.*, 1997
rcl	unbekannt	induziert	Lewis *et al.* 1997
ISGF3γ	Transkriptionsfaktor	induziert	Weihua *et al.* 1997
MHC I	Antigen-Erkennung	reprimiert	Versteeg *et al.*, 1988
c-*myc*	Transkriptionsfaktor	reprimiert	Penn *et al.*, 1990
Albumin	Serum Protein	reprimiert	Li *et al.*, 1994
C/EBPα	Transkriptionsfaktor	reprimiert	Li *et al.*, 1994
Ig Eμ	Immunglobuline	reprimiert	Sigvardsson *et al.*, 1994
Ig κ			
CyclinD1	Zellzyklusregulation	reprimiert	Philipp *et al.*, 1994
*gadd*45	Zellzyklusarrest	reprimiert	Constance *et al.*, 1996
			Marhin *et al.* 1997
*gadd*153	Zellzyklusarrest	reprimiert	Chen *et al.*, 1996
Thrombospodin	Angiogenese-Inhibitor	reprimiert	Tikhonenko *et al.*, 1996
Lysozym	Glykosidase	reprimiert	Mink *et al.*, 1996

Tabelle 1: Myc-regulierte Gene. Aufgelistet sind die Zielgene, die bis 1998 beschrieben waren.

2.3. *myc* in der Zellzyklusregulation

Tumorzellen sind einer ständigen Zellteilung unterworfen. Faktoren, die die Zellteilung regulieren, werden in Tumorzellen ständig neu aktiviert. Es ist daher naheliegend zu vermuten, daß Onkogene solche Faktoren regulieren oder selbst für solche Faktoren codieren. Mit der Etablierung des ersten Zellsystems, in dem Myc reguliert werden kann, wurde für Myc bereits ein solcher Zusammenhang hergestellt (Eilers *et al.*, 1989): Fibroblasten arretieren normalerweise ohne fötales Kälberserum (FKS) im Kulturmedium in der G1-Phase des Zellzyklus. Eine Aktivierung von Myc kann auch bei Abwesenheit von FKS die DNA-Synthesephase in diesen Zellen induzieren (Eilers *et al.*, 1989, 1991).

2.3.1. Kontrolle des Restriktionspunkts

Für die Entscheidung, in den Zellzyklus einzutreten, benötigt eine Zelle Signale durch Wachstumsfaktoren. Eine Zelle wird unabhängig von diesen Wachstumsfaktoren, wenn sie einen Restriktionspunkt überschreitet, der durch die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb) charakterisiert ist. Eine Tumorzelle hat typischerweise diese Abhängigkeit verloren und kann auch bei Abwesenheit von Wachstumsfaktoren den Restriktionspunkt überwinden (Übersicht in Sherr, 1996; Planas-Silvas und Weinberg, 1997).

Die wichtigsten Regulatoren dieses Prozesses sind die sogenannten Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks). Die Aktivitäten der Cdks sind streng reguliert, durch Abundanz der Cyclin-Untereinheit (Cyc), durch Inhibitoren, sowie durch ihren Phosphorylierungsgrad (detaillierte Übersicht in Morgan, 1997). Die schrittweise Phosphorylierung von Rb wird durch Cdk4[1] initiiert, was zur teilweisen Aktivierung von Cdk2/CycE-Komplexen führt. Diese übernehmen die vollständige Rb-Phosphorylierung und aktivieren so in einem Feedback-Mechanismus auch die volle Cdk2-Aktivität (Abb. 3 und Übersicht in Mittnacht, 1998). Eine wichtige Folge der Rb-Phosphorylierung ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F/DP-1, der die Expression von Faktoren für die Einleitung der DNA-Synthesephase induziert. Dazu gehören CycE und A und Cdc6 und Cdc25A. Daneben werden auch Faktoren induziert, die für die Synthese von Nukleotiden notwendig sind, wie die Dihydrofolatreduktase (DHFR),

[1] Bei Säugetieren werden in der frühen G1-Phase außerdem Cdk3,5,6 aktiviert, die mit D-Cyclinen assoziieren, wie Cyclin D1,2,3. Zur Vereinfachung werden diese hier nicht beschrieben (Übersicht in Morgan 1997).

Thymidin-Kinase (TK) und Thymidin-Synthetase (TS) (eine Übersicht über E2F-Zielgene findet sich bei Lavia und Jansen-Dürr, 1999).

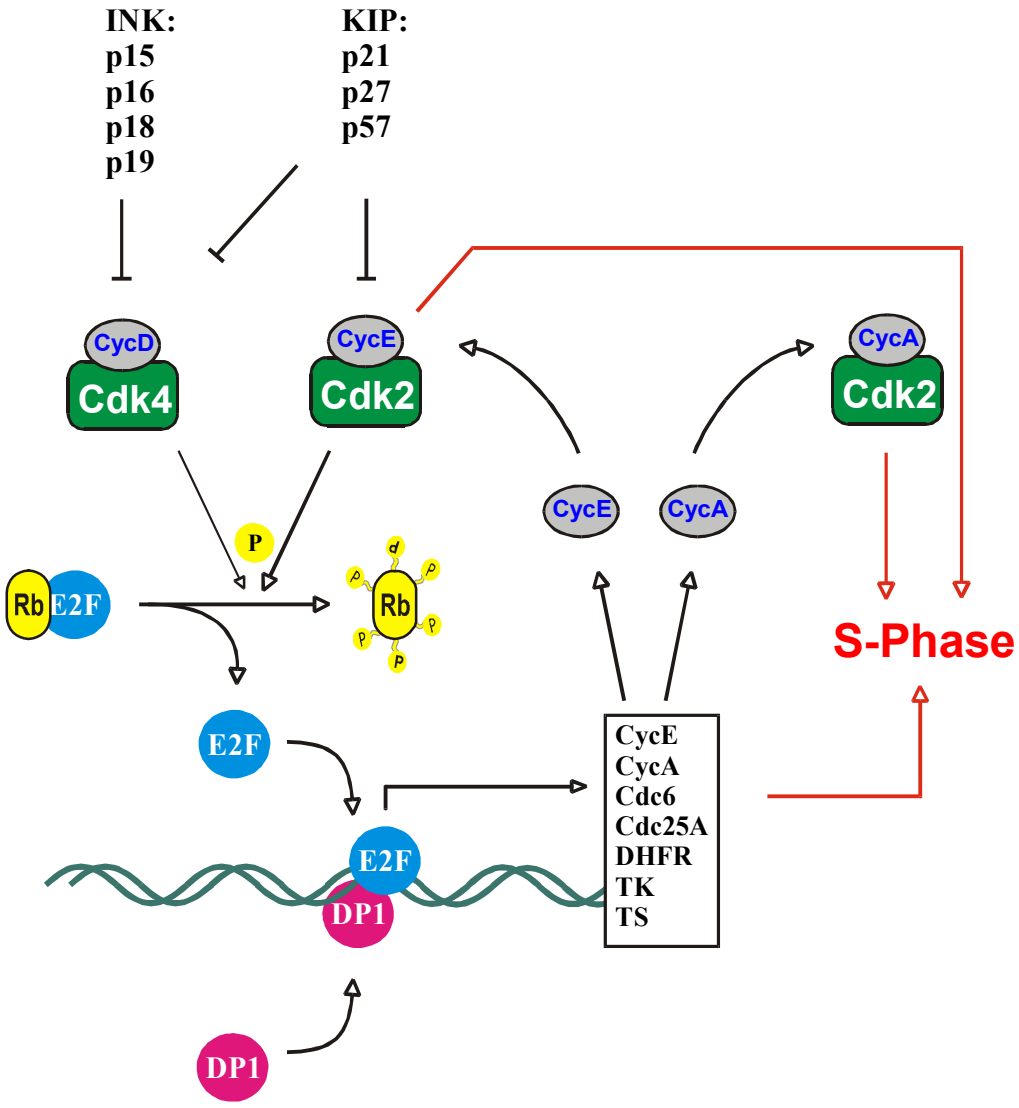

Abb. 3: Vereinfachtes Schema der Zellzyklusregulation in der G1-Phase. Die Kinasen Cdk4 und Cdk2 werden durch Assoziation mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen (Cyc) aktiviert. Die Inhibition erfolgt durch Proteine der INK-Familie (p15, p16, p18, p19) oder der KIP-Familie (p21, p27, p57). G1-Cdks phosphorylieren das Rb-Protein (durch CycD/Cdk4 und CycE/Cdk2) oder aktivieren direkt die DNA-Replikation (CycA/Cdk2). Die Rb-Phosphorylierung führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. Mit seinem Dimerisierungspartner DP1 induziert E2F die Expression von Faktoren, die für die DNA-Replikation benötigt werden.

Eine wichtige Rolle spielt die Inaktivierung von Cdk-Inhibitoren. Inhibitoren von Cdk4 (Proteine der INK-Familie: p15, p16, p18 und p19) werden früh in G1 inaktiviert. Inhibitoren der KIP-Familie (p21, p27, p57) werden durch bereits aktive Cdk2 phosphoryliert, was zur Degradation der Inhibitoren führt. Andererseits können aber Cdk4/CycD-Komplexe auch KIP-Inhibitoren binden und damit KIP-Inhibitoren von Cdk2 sequestrieren. So kommt es zu einer, für den geordneten Ablauf des Zellzyklus wichtigen, zeitlichen Abfolge von Cdk-Aktivitäten: Cdk4 aktiviert Cdk2, durch Sequestrierung der Inhibitoren und wird selbst inaktiviert (Abb. 5 und Übersicht in Morgan, 1997).

2.3.2. Myc aktiviert Cdk2/CycE

Myc induziert in ruhenden Fibroblasten DNA-Synthese (Eilers *et al.*, 1989, 1991). Für diese Beobachtungen wurden Myc-Östrogenrezeptor-Fusionsproteine (MycER) benutzt, die durch Zugabe von Östrogen in das Kulturmedium aktivierbar sind (Eilers *et al.*, 1989). MycER-Systeme induzieren DNA-Synthese durch Aktivierung von Cdk2/CycE-Komplexen. Drei Mechanismen wurden für die Aktivierung von Cdk2/CycE durch Myc beschrieben, die Induktion von cdc25A, die Induktion von CycE und die p27-Sequestrierung (Abb. 4) (Übersicht in Amati *et al.*, 1998).

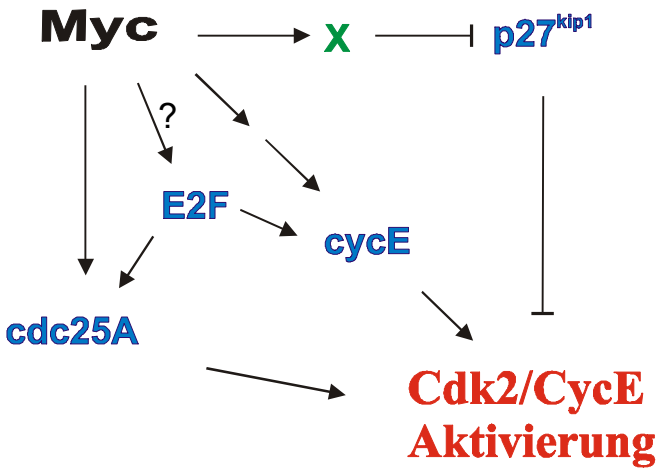

Abb. 4: Cdk2/CycE Aktivierung durch Myc. Myc fördert die Expression von CyclinE, induziert direkt cdc25A und induziert einen Faktor X, der die Inhibition von Cdk2 durch p27 aufhebt.

Die Phosphatase cdc25A aktiviert Cdks durch Dephosphorylierung (Übersicht in Morgan 1997). cdc25A wurde als direktes Zielgen von Myc beschrieben (Galaktionov *et al.*, 1997). Auch cycE wird nach Myc-Aktivierung induziert, allerdings konnte es nicht als direktes Zielgen von Myc identifiziert werden (Jansen-Dürr *et al.*, 1993; Perez-Roger *et al.*, 1997). Sowohl cycE, als auch cdc25A wurden außerdem als direkte Zielgene von E2F identifiziert (Übersicht in Lavia und Jansen-Dürr, 1999; Vigo *et al.*, 1999). Die Regulation von cycE könnte also indirekt von Myc über E2F erfolgen (Abb 4). Eine direkte Verbindung zwischen E2F-Aktivierung und Myc konnte aber bisher noch nicht gezeigt werden. Ein dritter Weg der Cdk2-Aktivierung läuft über die Sequestrierung des Cdk2-Inhibitors p27 (vgl. 2.3.1.). Für die Cdk2-Aktivierung durch Myc ist keine p27-Degradation notwendig, vielmehr unterbindet Myc die Bindung von p27 an Cdk2/CycE-Komplexe (Übersicht in Amati *et al.*, 1998). Daher wurde postuliert, daß Myc einen Faktor X induziert, der p27 bindet und damit aus Cdk2/CycE-Komplexen entfernt. Als Faktor X wurde inzwischen CycD identifiziert (Perez-Roger *et al.*, 1999; Bouchard *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, daß die Induktion von CycD zu einer Zunahme an Cdk4/CycD-Komplexen führt, die p27 aus Cdk2/CycE-Komplexen sequestrieren (Abb. 5 und 2.3.1.)

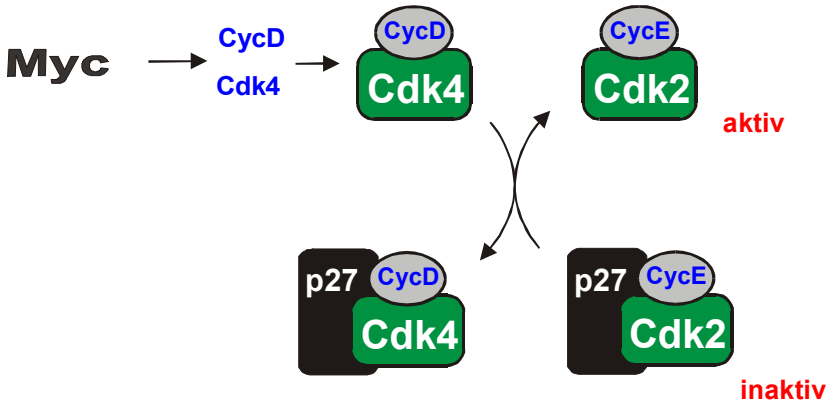

Abb. 5: Myc-induzierte Sequestrierung von p27. Myc induziert CyclinD und damit die Formierung von Cdk4/CycD-Komplexen. Diese binden p27, was zur Freisetzung von aktivem Cdk2/CycE führt.

2.4. *myc*-Funktion im programmiertem Zelltod (Apoptose)

Wie bereits beschrieben, kann Myc in Fibroblasten-Systemen den Zellzyklus aktivieren und DNA-Synthese induzieren, auch wenn Serum entzogen wurde. (Eilers *et al.*, 1989). Trotzdem wächst eine solche Kultur nicht aus und die Zellzahl nimmt ab. Dieser Widerspruch erklärte sich dadurch, daß die Zellen bei Serum-Entzug und gleichzeitiger Myc-Expression durch programmierten Zelltod (Apoptose) sterben. Myc kann also sowohl Zellproliferation als auch Apoptose auslösen (Askew *et al.*, 1991; Evan *et al.*, 1992). Zur Erklärung dieser gegensätzlichen Ereignisse wurde ein Modell aufgestellt, wonach Myc zwei Programme gleichzeitig induzieren kann (Harrington *et al.*, 1994). Normalerweise wird das Apoptose-Programm durch 'Überlebenssignale' unterdrückt und das Proliferations-Programm läuft ab. Fehlen diese Signale, wie beim Serum-Entzug in Fibroblasten, dann laufen beide Programme ab und es kommt zum Zelltod (Abb. 6). Als Überlebenssignale wurden beispielsweise PDGF (Platelet-derived growth factor) und IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) identifiziert (Übersicht in Prendergast 1999), Wachstumsfaktoren, die Zellen mitogen stimulieren können.
Die Regulation der Proteinsynthese scheint eine besondere Rolle bei der Entscheidung zur Apoptose zu spielen. IGF-1 führt zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionswegs, der unter anderem die Protein-Synthese stimuliert (Mauras, 1999). Auch die Expression des Translationsfaktors eIF4E schützt vor Apoptose (Polunovsky *et al.*, 1996). Hemmt man dagegen Protein-Synthese in Gegenwart von Überlebenssignalen, so kann es wieder zu Myc-induzierter Apoptose kommen (Übersicht in Prendergast, 1999).
Da die DNA-Bindung über Max für die Apoptoseprogramme Voraussetzung ist (Amati *et al.*, 1993), vermittelt Myc den programmierten Zelltod wohl über seine transkriptionell regulierten Gene. Beispiele sind ODC, cdc25C und LDH-A, die selbst Apoptose induzieren können (Packham und Cleveland, 1994; Galaktionov *et al.*, 1996; Shim *et al.*, 1997, 1998). Vor allem die Induktion von p53 wird mit der Myc-vermittelten Apoptose in Verbindung gebracht (Hermeking und Eick, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Bei DNA-Schäden und Stress ist p53 ein wichtiger Vermittler von Zellzyklusarrest oder Apoptose durch Induktion des Cdk-Inhibitors p21 oder des Apoptose vermittelnden Bax (Levine, 1993).
Myc kann aber auch unabhängig von p53 Apoptose vermitteln oder Zellen für Apoptose sensibilisieren, wie z.B. bei CD95 (FAS/Apo)-, oder TNF-Rezeptor-vermitteltem Zelltod (Übersicht in Prendergast, 1999).

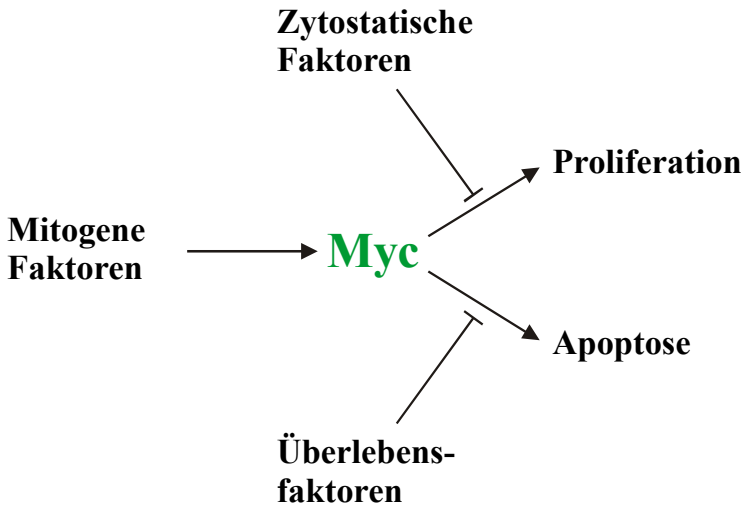

Abb. 6: Modell für Myc-induzierte Apoptose (vereinfacht nach Evan und Harrington, 1998). Myc induziert gleichzeitig Zielgene, die für Apoptose und Zellproliferation benötigt werden. Bei Anwesenheit von Überlebensfaktoren wird das Apoptoseprogramm unterdrückt.
Faktoren, die die Zellteilung hemmen (Zytostatische Faktoren), können die Myc-vermittelte Proliferation unterdrücken. Je nach Vorhandensein oder Fehlen von Überlebenssignalen kann dann Zellzyklusarrest oder Apoptose induziert werden.

2.5. *myc*-Funktion in der Zelldifferenzierung

In vielen Zellinien verhindert eine konstitutive Überexpression von Myc die Differenzierung von Zellen. Die Myc-Expression hemmt den Austritt aus dem Zellzyklus (Übersicht in Henriksson und Lüscher, 1996). In U-937-Monozyten kann Myc beispielsweise die Differenzierung zu Makrophagen blockieren. Umgekehrt findet man bei Induktion von Zelldifferenzierung eine rasche Repression sowohl von *myc*, als auch der Myc-regulierten Gene. Hier wird eine andere Familie von bHLH-LZ-Proteinen aktiviert, die MAD-Proteine (Ayer *et al.*, 1993). MAD/MAX-Komplexe binden ebenfalls an CACGTG-Konsensussequenzen und reprimieren Myc-Zielgene. MAD/MAX-Komplexe reprimieren die Transkription durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (Nagy *et al.*, 1997; Laherty *et al*, 1997; Hassig *et al.*, 1997; Heinzel *et al.*, 1997; Sommer *et al.*, 1997).

2.6. *myc*-Funktion im Zellwachstum

2.6.1. Koordination von Zellwachstum und Zellzyklus

Eine Zelle muß während der G1-Phase des Zellzyklus an Masse zunehmen, um genügend Material an zwei Tochterzellen weitergeben zu können. Gleichzeitig findet während der G1-Phase die Zellzyklusregulation statt, die schließlich die DNA-Synthese induziert (siehe 2.4.). Diese beiden Prozesse müssen koordiniert ablaufen, da es sonst zu Instabilitäten kommt. Die Überexpression von Zellzyklusregulatoren kann beispielsweise zu Apoptose führen (Hiebert *et al.*, 1995; Shan und Lee, 1994).

Vier mögliche Koordinationsmodelle wurden von Neufeld und Edgar (1998) beschrieben (Abb. 7). Das erste Modell, in dem die Stimulierung von Zellen zuerst zur Aktivierung von Zellzyklusregulatoren führt, die daraufhin das Zellwachstum aktivieren, ist eher unwahrscheinlich (Abb. 7a). Im Gegenteil, die verstärkte Expression von Zellzyklusregulatoren führt zum vorzeitigen Eintritt in die S-Phase und zur Bildung von kleineren Zellen als normal (Übersicht in Neufeld und Edgar, 1998).

Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß die Zellzyklusregulation von der Aktivierung der Stoffwechselwege abhängt. Bei dieser Alternative wäre gewährleistet, daß eine Zelle genügend Zeit hat, ihr Zellmaterial zu verdoppeln. Tatsächlich ist dies in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwirklicht. Der erste Zellzyklusfaktor (Cln3p) wird nur aktiviert, wenn die Hefezelle eine bestimmte Größe erreicht hat (Johnston *et al.*, 1977). Die Expression von Cln3p hängt zusätzlich von der Aktivität des Translationsfaktors eIF4E ab (siehe folgender Abschnitt und Polymenis und Schmidt, 1997).

Das dritte Modell beschreibt, daß Wachstum und Zellzyklus durch gemeinsame Regulatoren koordiniert werden. In Säugetierzellen findet man Signaltransduktionswege, die sowohl Wachstum als auch den Eintritt in den Zellzyklus stimulieren können (Abb. 7c). Dabei spielen Moleküle eine Rolle, die an den Verzweigungen beider Wege stehen. Als solche Koordinatoren werden beispielsweise Myc und eIF4E diskutiert (siehe 2.6.2.). Auch Komponenten der Signaltransduktion, wie Ras, spielen hier eine Rolle. Es ist wahrscheinlich, daß eine Gruppe von Molekülen, die limitierend für die Stimulierung von Translation, Transkription und Signaltransduktion sind, ein gemeinsames Netzwerk von Koordinatoren bilden (Übersicht in Neufeld und Edgar, 1998).

Nach dem vierten Modell (Abb. 7d) können Wachstum und Zellteilung auch unabhängig voneinander ablaufen. So wurde in *Drosophila* beschrieben, daß Größenwachstum in Zellen

der Flügel-Imaginalscheiben normal abläuft, wenn der Zellzyklus durch Inhibition der cdc2-Kinase blockiert wird (Weigmann *et al.* 1997). Andererseits finden die ersten Kernteilungen in der Embryonalentwicklung in *Drosophila* ohne Zellteilung und ohne Zellwachstum statt (Übersicht in Edgar und Lehner, 1996).

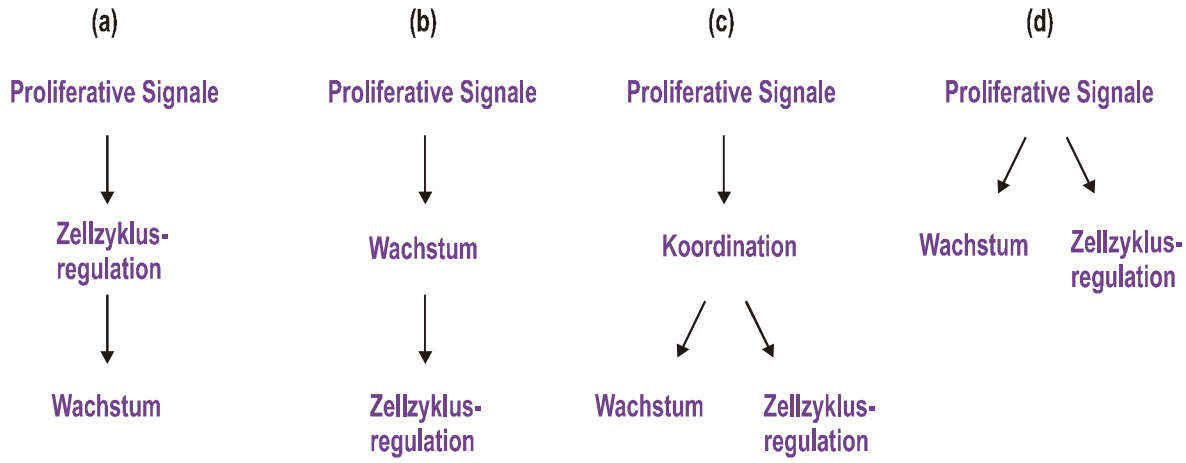

Abb. 7: Koordinationsmöglichkeiten von Zellzyklus- und Wachstumskontrolle (nach Neufeld und Edgar 1998).

2.6.2. Myc induziert Proteinsynthese und Metabolismus

Myc wird sehr früh im Zellzyklus induziert, bevor Masse akkumuliert werden kann und bevor Zellzyklusregulatoren aktiviert werden. Bei der Durchsicht Myc-regulierter Gene (Tabelle 1) fallen auch Faktoren auf, die nicht unmittelbar den Zellzyklus regulieren, wie ODC, cad oder eIF4E. Deshalb wurde jüngst vermutet, daß Myc auch eine bedeutende Rolle in der Regulation von Proteinsynthese und Metabolismus zukommt (Übersicht in Schmidt 1999; Dang 1999). Myc könnte also eine zentrale Funktion in der Koordinierung von Wachstum und Zellzyklusregulation besitzen. Mehrere Faktoren werden diskutiert, die bei dieser Koordination eine Rolle spielen, z.B. eIF4E (Übersicht in Neufeld und Edgar, 1998). Dieser Translationsfaktor initiiert die Proteinsynthese durch die Bindung der cap-Struktur von mRNAs. Seine Aktivität ist ähnlich streng reguliert, wie die von Cdks.

Das eIF4E-Protein wird nur schwach exprimiert und ist damit limitierend für die Initiation der Translation. Die Aktivität wird durch Inhibitoren reguliert (4E-BP 1,2), die durch Aktivierung

des PI3K-Signalweges inaktiviert werden. Zusätzlich muß eIF4E zur Aktivierung phosphoryliert werden (Übersicht in Raught und Gingras, 1999). Es konnte sowohl in Säugerzellen, als auch in Hefe gezeigt werden, daß die Aktivierung von eIF4E zur Akkumulation von CycD-Protein führt (Rosenwald *et al.*, 1993b; Polymenis und Schmidt, 1997). Außerdem wird eIF4E mit Tumorprogression in Zusammenhang gebracht (Übersicht in Benedetti und Harris, 1999).

Interessanterweise wird eIF4E transkriptionell durch Myc reguliert (Rosenwald *et al.* 1993). Bei der Koordination von Zellwachstum und Zellzyklusregulation muß eine Reihe von Genen reguliert werden. Es liegt nahe, daß Myc solche Gene transkriptionell reguliert, während eIF4E der wesentliche translationale Regulator ist. Die Identifizierung weiterer Myc-regulierter Gene könnte dieses Bild bestätigen.

Einen weiteren Einblick in die Myc-Funktion erbrachte die Etablierung einer Myc-defizienten Zellinie (*myc*$^{-/-}$-Zellen). In dieser Ratten-Fibroblastenlinie wurden beide *myc*-Allele deletiert und auch die Expression anderer Mitglieder der Myc-Familie konnte ausgeschlossen werden. Diese Zellen können proliferieren, wenn auch mit verlängerten G1- und G2-Phasen. Der Befund war überraschend, da vermutet wurde, daß Myc für die Zellproliferation unverzichtbar wäre. Die Beobachtung zeigt nun, daß die Zellzyklusregulation prinzipiell nicht von Myc abhängt. *myc*$^{-/-}$-Zellen zeigen deutlich reduzierte Transkriptionsraten von rRNA sowie eine verminderte Proteinsyntheserate, was die Myc-Funktion im Zellwachstum unterstreicht. Die Expression von *myc* ist aber essentiell, denn c-Myc oder N-Myc deletierte Mausembryos sterben am Tag neun der Entwicklung (Stanton *et al.*, 1992; Davis *et al.* 1993).

3. Zielsetzung der Arbeit

Die Erkenntnisse über die Funktion von *myc* wurden bisher hauptsächlich aus Mäuse- und Ratten-Fibroblastenzellinien gewonnen. Endogenes *myc* wird in diesen Systemen durch Serum (FKS) stimuliert. Deshalb müssen konditionale Systeme mit MycER in Abwesenheit von FKS aktiviert werden, was aber wiederum Apoptose in diesen Zellen auslöst.

In unserem Labor wurde eine menschliche B-Zellinie (P493-6) entwickelt, deren Myc-Aktivität durch Tetracyclin reguliert werden kann (Pajic *et al.*, 2000). In diesen B-Zellen wird endogenes *myc* nicht durch Serum stimuliert. Die Proliferation hängt in diesen Zellen von der Expression des exogenen *myc* ab. Wird Tetracyclin in das Medium gegeben, wird exogenes

myc reprimiert und die Zellen stoppen die Proliferation. Durch Auswaschen von Tetracyclin, wird die Myc-Expression und der Eintritt in den Zellzyklus wieder induziert.
Wie Myc die Regulation des Zellzyklus in Gegenwart von Serum beeinflusst, wurde in dieser Linie bereits in Vorarbeiten untersucht (Pajic *et al.*, 2000). In dieser Arbeit sollen deshalb zunächst die Auswirkungen von Serum-Entzug bei gleichzeitigem Anschalten von *myc* untersucht werden. Dabei soll gezeigt werden, ob auch in diesem B-Zellsystem Apoptose durch Myc ausgelöst wird.
Vorarbeiten haben gezeigt, daß in P493-6-Zellen bekannte Myc-Zielgene sehr schnell durch *myc*-Anschaltung reguliert werden (4-8h nach Myc-Anschalten). Die Induktion der S-Phase und die Verdopplung der Zellen dauern aber relativ lange (24h bis 4 Tage). Dieser Befund und die Vorgänge der frühen G1-Phase sollen ebenfalls näher untersucht werden.

Da Myc-Zielgene in P493-6-Zellen sehr schnell reguliert werden, eignen sich diese Zellen sehr gut zur Identifizierung neuer Myc-Zielgene. Die modernen Entwicklungen der Genchip-Technologie sollten dazu genutzt werden. Man erhofft sich dadurch, ein möglichst umfangreiches Expressionsprofil Myc-regulierter Gene zu erhalten. Möglicherweise können Gene identifiziert werden, die Regulatoren der Zellproliferation sind und damit entscheidend zur Tumorentstehung beitragen.

MATERIAL & METHODEN

1. Material

1.1. Chemikalien

Acrylamid (*Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe),* Agarose SeaKem LE *(FMC Bio Products, Rockland, USA),* Amphotericin B, Ammoniumperoxodisulfat *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe),* Ammoniumacetat, 7,5M Antifoam O-30 *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)*

Bovines Serumalbumin, acetyliert, (*GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe),* Bovines Serum Albumin Bromphenolblau, Calciumchlorid ($CaCl_2$), Dimethylsulfonat (DMSO) *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)*

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol), Dithiothreitol (DTT), *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen),* DNA-Größenstandards *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe),* dNTPs *GibcoBRL (Life Technologies GmbH, Karlsruhe)*

Ethidiumbromid *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)*

Ficoll *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen),* Fötales Kälberserum (FKS) *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe)*

Hering-Spermien-DNA, sonifiziert *(Promega GmbH, Mannheim),* Histon H1 *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)*

Guadiniumisothiocyanat *(United States Biochemical GmbH, Bad Homburg),* L-Glutamin *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe)*

MES (2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure), Natriumsalz, und freie Säure, 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)*

Natriumvanadat (Na_3VO_4) *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen),* NTPs *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)*

Ponceau-Färbelösung, Propidiumjodid *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen),* Penicillin-Streptomycin *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe),* Protein-Molekulargewichtsstandards *(Bio-Rad Laboratories GmbH, München)*

RNasin, plazentaler RNase-Inhibitor *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim),* Roscovitin *(Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach)*, RPMI 1640-Medium *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe)*

Sephadex-G50, DNA grade *(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg),* Sodiumdodecylsulfat (SDS) *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)*

TEMED, Triton X100, Trypanblau, Tween 20 *(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)*

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in reinster Form (zur Analyse) bei Merck, Darmstadt, bezogen.

1.2. Radioaktive Isotope

Radioaktive Isotope wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.
α-[^{32}P]dCTP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml), α-[^{32}P]dATP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml), α-[^{32}P]CTP (800Ci/mmol, 20mCi/ml), γ-[^{32}P]ATP (3000Ci/mmol, 10mCi/ml), Methyl-[^{3}H]-Thymidin; (87 Ci/mmol) Trans-[^{35}S]-Label ([^{35}S]-L-Met/-L-Cys, 1,4mCi), wurde von ICN Biomedicals GmbH, Eschwege bezogen.

1.3. Enzyme

DNase I, RNase-frei (10 U/µl) *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim),* E. *coli* DNA-Ligase (10 U/µl), E. *coli* DNA-Polymerase I (10 U/µl) *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe)*
Proteinase K (20 U/mg) *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)*
RNase A (50 U/mg) *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim),* RNase H (2 U/µl), SuperScript II Reverse Transkriptase, (200 U/µl) *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe)*
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl), T4-DNA-Ligase (400 U/µl), T7-RNA-Polymerase (20 U/µl) *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe),* T*aq*-DNA-Polymerase (5 U/µl) *(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)*

1.4. Antikörper

α-human c-*myc*	Maus monoklonal 9E10	(#sc-40, SantaCruz, Heidelberg)
α -human CyclinE	Maus monoklonal HE12	(#sc-247, SantaCruz, Heidelberg)
α -human Cdk2	Maus monoklonal D12	(#sc-6248, SantaCruz, Heidelberg)
α -human Cdk4	Hase polyklonal C-22	(#sc-260, Santa Cruz, Heidelberg)
α -human Rb	Maus monoklonal IF8	(#sc-102, SantaCruz, Heidelberg)

Streptavidin und Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) wurden von Roche, Penzberg zur Verfügung gestellt. Sekundärantikörper: Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte sekundäre Antikörper (*Promega, Madison, USA*)

1.5. Verbrauchsmaterial und Kits

Agarplatten *(Greiner GmbH, Frickenhausen),* Allgemeine Laborbedarfsartikel *(GLW Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg)*

Bio Array RNA Transcript Labeling Kit *(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg),* BioRad Protein Assay Kit *(Bio-Rad Laboratories GmbH, München)*
DNA Gel Extraction Kit DNA Maxi Kit *(Qiagen GmbH, Hilden)*
ECL™ Kit *(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)* Einfrierampullen Cryotubes 1,5 ml *(Nunc GmbH, Wiesbaden)* Einweg-Spritzen und -Kanülen *(Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)*
Glasfaser Mikrofilter *(Whatman Limited, Maidstone, Kentucky, USA)*
Hybond-N+ Nylonmembran *(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)*

Immobilon-P PVDF-Membran *(Millipore GmbH, Eschborn)*

Mikro-Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml *(Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg),* MTT-Zell-Proliferations Kit I, *(Roche Biochemicals, Mannheim).*

Parafilm *(Dynatech, Denkendorf),* PCR Core Kit *(Roche Biochemicals, Mannheim),* Polaroidfilm 57 *(Polaroid Co., Cambridge, Massachusetts, USA),* Polypropylenröhrchen Blue Max 15 ml, 50 ml *(Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg),* Polystyrolröhrchen Blue Max 15 ml *(Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg)*

Rediprime DNA Labelling System *(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg),* RNeasy Mini und Midi Kit *(Qiagen GmbH, Hilden),* Röntgenfilm Kodak XAR-5 *(Eastman Kodak Company, Rochester, New York)*

Sterilfilter 0,22 µm, 0,45 µm *(Millipore GmbH, Eschborn)*

Whatman-3MM-Papier, *(Whatman Limited, Maidstone, Kentucky, USA)*

Zellkulturgefäße *(Greiner GmbH, Frickenhausen)*

1.6. Geräte

Backofen Bakterien Brutschrank *(Heraeus Sepatech GmbH, Osterode),* Benchtop Radioisotop Counter QC-4000 *(Bioscan Inc., Washington, D.C., USA)*

CCO_2-Inkubator für Zellkultur, Heraeus 6000 *(Heraeus Sepatech GmbH, Osterode)*

DNA-Thermal-Cycler *(Perkin-Elmer GmbH, Überlingen)*

Eismaschine *(Ziegra GmbH, Isernhagen),* Expositionskassetten mit Verstärkerfolie Kodak Lanex fast screen *(Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA)*

Flow-Hood-Werkbank *(Bio-Flow Technik, Meckenheim),* Fuchs-Rosenthal-Zählkammer *(GLW Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg)*, FACScan-Durchflußcytometer *(Becton Dickinson)*

Gefrierschrank (-80°C) UF80-450S *(Colora Messtechnik GmbH, Lorch),* Gelelektrophoresekammer Horizon 20.25 *(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe),* Gelelektrophoresekammer Mini Sub DNA Cell und Wide Mini Sub DNA Cell *(Bio-Rad Laboratories GmbH, München)*

Heiz- und Schüttelblock Thermomixer 5436 *Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg* Hybridisierungsofen Mini 10, Minioven MKII *MWG-Biotech GmbH, Ebersberg*

Lichtmikroskop Axiovert 135 *(Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen)*

Milli-Q Reinstwasser-Aufbereitungssystem *(Millipore GmbH, Eschborn)*

pH-Meter Multi-Calimatic 763 *(Knick),* Phosphoimager Fuji BAS 1000 *(Fuji Photo Film CO. Ltd., Japan),* Polaroidkamera MP4 *(Polaroid Co., Cambridge, Massachusetts, USA),* Proteingelelektrophorese SE250 Mighty Small II *(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)*

Rotlichtfilter Kodak Wratten Nr. 23A *(Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA)*

Speed-Vac-Konzentrator SVC 100 *(Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA),* Spektrophotometer DU-64 *(Beckman Instruments GmbH, München),* Spektrophotometer Uvikon 941 *(Kontron Instruments, Neufahrn),* Stromgerät Power Pac 300 *(Bio-Rad Labortories GmbH, München)*

Ultraschallgerät Branson Sonifier 250 *(Heinemann, Schwäbisch Gmünd*)

UV-Transilluminator TL-33 und TS-40 *(UVP Inc., San Gabriel, Kalifornien, USA),* Ultra Turrax-Dispergiergerät *(Jane und Kunkel KG, Staufen)*

Vortexer Vortex Genie 2 *(Bender & Hobein GmbH, Ismaning)*

Western-Blot-Apparatur TE22 Mighty Small Transphor Unit *(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)*
Zentrifuge Sepatech Varifuge 3.2 RS *(Heraeus Sepatech GmbH, Osterode),* Zentrifuge Sigma 2K15 *(Sigma Laborzentrifugen GmbH, Taufkirchen),* Zentrifuge Sorvall RC5C, Rotoren GS3, HS4, SS34 *(DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg)*

2. Zellkultur

2.1. Die Zellinie P493-6

Das am häufigsten verwendete System zur Untersuchung der Myc-Funktion ist ein Maus-Fibroblasten-Zellsystem, das konditionales Myc als Myc/Östrogen-Rezeptor-Fusionsprotein trägt (Myc/ER) (Eilers *et al.* 1989). Dieses Protein wird in einer inaktiven Form konstitutiv exprimiert und erst durch Zugabe von Östrogen aktiviert. Ein menschliches Zellsystem mit regulierbarem Myc ist aber noch nicht bekannt. Im Labor von A. Polack wurde die Zellinie P493-6 entwickelt, die von menschlichen, EBV-infizierten B-Lymphozyten abstammt und Tetracyclin (Tc) regulierbares *myc* trägt (Pajic *et al*., 2000).

2.1.1. Tetracyclin-regulierbare *myc*-Expressionsvektoren

Das Tc-System basiert auf den Arbeiten von Gossen und Bujard (1992), die die Regulation des *tet*-Operons von E.*coli* auf eukaryontische Expressionsvektoren übertrugen. Das Prinzip ist in Abb. 8 gezeigt. Das konstitutiv exprimierte Regulatorprotein tTA (Tc-kontrollierter Transaktivator, unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotors CMV) ist ein Fusionsprotein aus der DNA-bindenden Domäne des *tet*-Repressors und der transakativierenden Domäne von VP16 (Virales Protein 16 des Herpes Simplex Virus). Dieser Transaktivator bindet mit hoher Affinität an die *tet*-Operatoren (*tet*O_7 , in 7facher Anordnung) und induziert die Transkription von *myc* unter der Kontrolle des TP-Promotors[2] aus EBV (Abb. 8A). In Gegenwart von Tc wird die Bindung von tTA an die Operatoren und damit die Transaktivierung verhindert (Abb. 8B).

[2] Der von Gossen und Bujard verwendete Promotor wurde hier durch den TP-Promotor (Terminal Protein, Laux *et al*., 1988) des Epstein-Barr Virus ausgetauscht, da die Repression des ursprünglichen Promotors durch Tc-Zugabe in Lymphozyten nicht vollständig gelang.

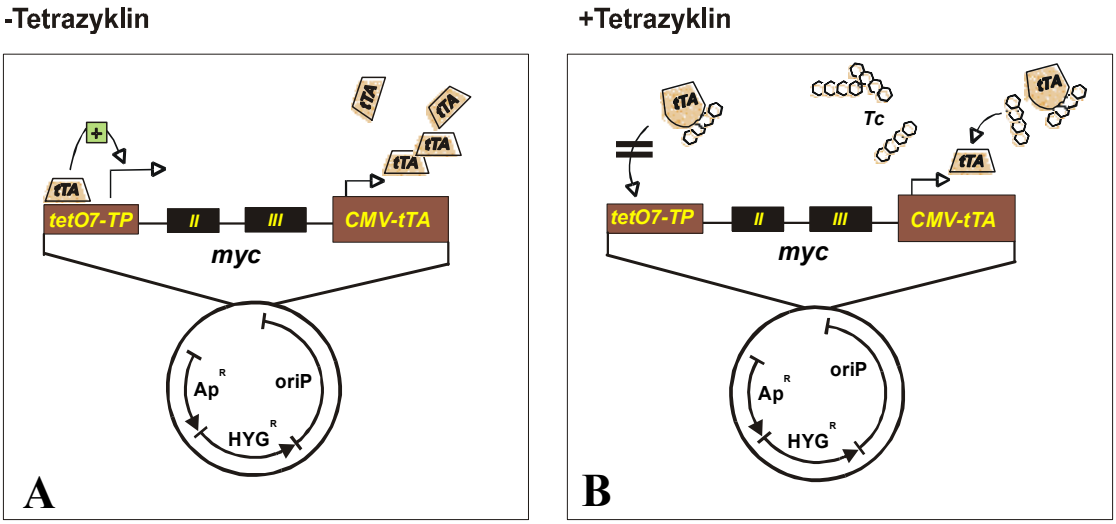

Abb. 8: Funktionsweise des Tc-regulierbaren *myc*-Expressionsvektors BC266. In Abwesenheit von Tetracyclin (Tc) funktioniert das Protein tTA (ein Fusionsprotein aus *tet*-Repressor und VP16-Transaktivierungsdomäne) als Transaktivator von *myc* (A). In Gegenwart von Tc wird die Bindung von tTA an die *tet*-Operatoren (*tet*O7) verhindert (B). Abkürzungen: **tTA**: Tc-regulierbarer Transaktivator, **CMV-tTA**: tTA Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors, **tetO7-TP**: *tet*-Operator-Repeat (7fach), mit nachfolgendem TP-Promotor, **II, III**: Exon II und III des humanen *myc*, mit dazwischenliegendem Intron, **Ap^R**: Ampicillin-Resistenzgen, **HYG^R**: Hygromycinresistenzgen, **oriP**: Replikationsursprung für EBV.

Alle Elemente wurden auf einen pHEBO-Vektor übertragen, der den Repliationsursprung oriP aus EBV trägt und somit in EBV-infizierten Zellen repliziert (für die Replikation ist außerdem das EBV exprimierte EBNA1-Protein notwendig, bei Transfektion von EBV-infizierten Zellen ist EBNA1 konstitutiv exprimiert). Der resultierende *myc*-Expressionsvektor wurde mit BC266 bezeichnet (Pajic *et al*., 2000).

2.1.2. Entstehung der Zellinie P493-6

Die Arbeiten, die zur Zellinie ER/EB2-5, der „Mutterzellinie“ von P493, führten sind in Abb. 9 beschrieben (Kempkes *et al*., 1995). ER/EB2-5 Zellen stammen von primären, periphären B-Lymphozyten (PBL) ab und wurden mit einem EBV-Stamm infiziert, dem das EBNA2-Gen durch eine Deletion fehlt (Virusstamm P3HR1, Bornkamm *et al*., 1980, Rabson *et al*., 1982). EBNA2 ist für die Immortalisierung von B-Lymphozyten notwendig und wurde als

EBNA2/Östrogen-Rezeptor-Fusionsprotein (ER/EBNA2) auf einem „Mini-EBV"-Plasmid[3] zusammen mit P3HR1 in PBL transduziert (Abb. 9). Daraus resultierte die Zellinie ER/EB2-5, die regulierbares EBNA2 exprimiert und nur in Gegenwart von Östrogen EBV-Antigene exprimiert und proliferiert. Zusätzlich zeigt diese Zellinie den Phänotyp einer EBV-infizierten Zelle (LCL, lymphoblastoide Zellinie), bezogen auf die Präsentation der Oberflächenantigene (Polack *et al*., 1996) und die Morphologie der Zellen in Kultur (die Zellen wachsen in Klumpen). ER/EB2-5 Zellen wurden mit dem Vektor BC266 (Abb. 8) stabil transfiziert. Nach Entfernung von Östrogen wuchsen Klone aus, die unabhängig von EBNA2 proliferierten (Abb. 9). Bei Kultivierung ohne Tc-Zusatz exprimieren P493-6-Zellen Myc und wie in Abschnitt III gezeigt wird, ist das Wachstum der Zellen durch An- und Abschalten von Myc kontrollierbar. EBNA2-unabhängige, Myc-exprimierende Zellen präsentieren Oberflächenantigene, die dem Phänotyp von Burkitt-Lymphomzellen entsprechen (Polack *et al.*, 1996 und Alexander Pajic, persönliche Mitteilung). Die Zellen wachsen nicht mehr in Klumpen, sondern vereinzelt (Abb. 9). Die Zellinie stellt also ein doppelt konditionales System für EBNA2 und Myc dar, die in Abwesenheit von Östrogen und Tetracyclin inaktives ER/EBNA2 und aktives Myc exprimiert.

2.2. Kultivierung von Zellen

Die Zellinie P493-6 wurde als Suspensionskultur bei 37 °C und 5 % CO_2 Partialdruck in RPMI 1640-Medium (Moore *et al.,* 1969) kultiviert. Dem Medium wurde 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 750 ng/ml Amphotericin B zugesetzt. Bei Erreichen einer Zelldichte von 10^6 Zellen/ml wurde die Kultur im Verhältnis 1:3 oder 1:4 verdünnt.
Bei Experimenten unter Serumentzug wurden die Zellen in RPMI/ 0,25% FKS inkubiert.

2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

$5x10^7$ Zellen wurden abzentrifugiert (1200 Upm, 10 min) und in 1 ml RPMI-Medium (mit 20 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die Kultur wurde in Einfrier-Ampullen überführt und schrittweise abgekühlt: 30 min bei 0 °C , über Nacht bei -80 °C und dann bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

[3] „Mini-EBV"-Plasmide sind wie pHEBO-Plasmide in EBV-infizierten Zellen replizierbar, tragen aber zusätzlich noch Elemente, die für die Verpackung des Virus notwendig sind. Mit einem Helfervirus können diese Plasmide in Virushüllen verpackt werden und B-Zellen infizieren (Hammerschmidt und Sugden, 1989).

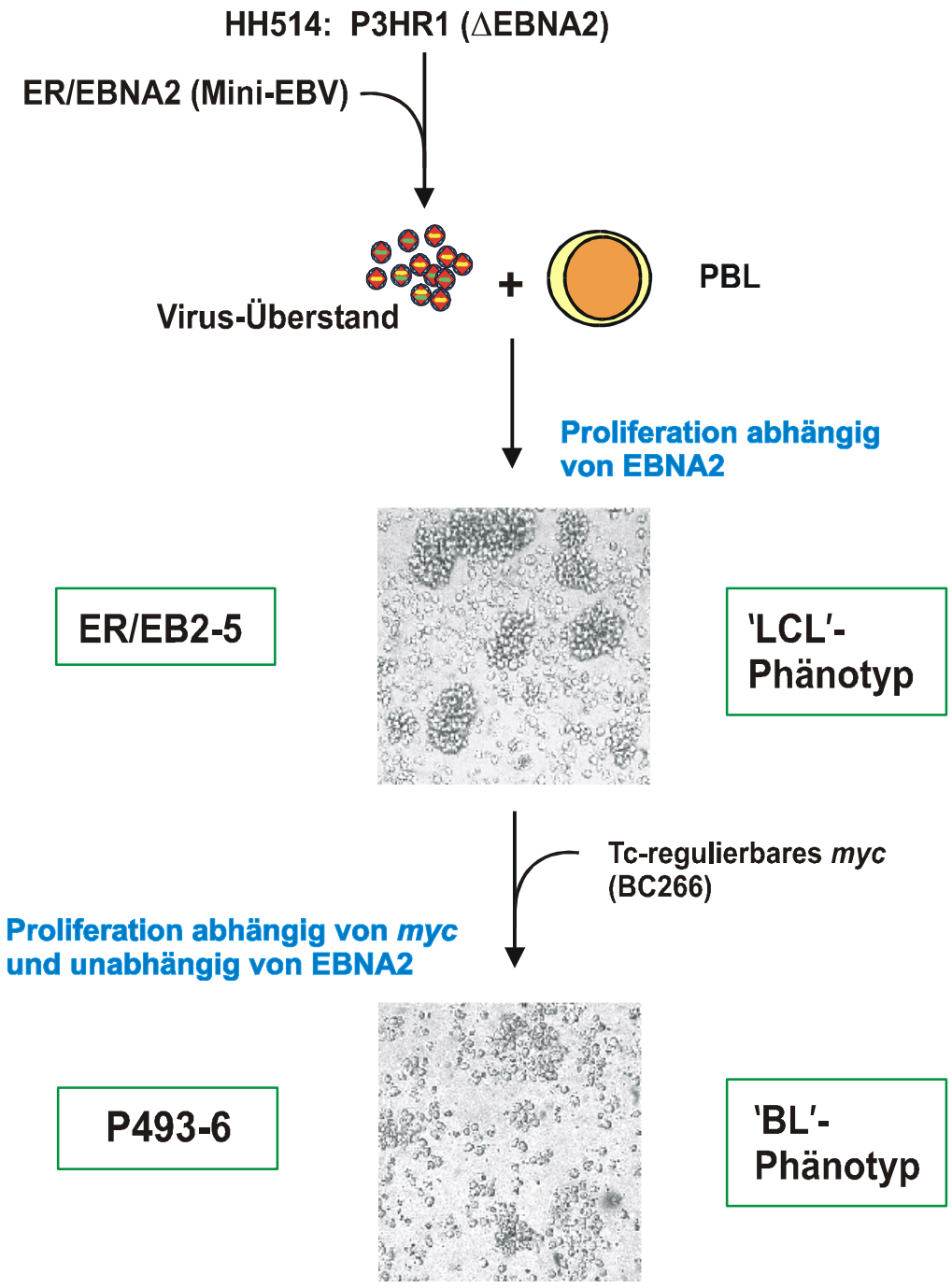

Abb. 9: Entstehung der Zellinie P493-6. HH514 ist eine Burkitt-Lymphomzellinie, die den Virusstamm P3HR1 trägt (P3HR1 ist deletiert in EBNA2). Nach Transfektion mit einem Vektor, der für ein EBNA2/Östrogen-Rezeptor-Fusionsprotein codiert (ER/EBNA2), wurde der Virus-Überstand gewonnen und damit EBV-freie periphäre B-Lymphozyten (PBL) infiziert. Klone konnten nur auswachsen, wenn die Zellen P3HR1 und das ER/EBNA2-Konstrukt trugen und dem Kulturmedium Östrogen zugesetzt war. Die resultierende Zellinie ER/EB2-5 zeigt den Phänotyp einer EBV-infizierten Zelle (LCL). Nach Transfektion mit BC266 entstand eine Zellinie, die unabhängig von Östrogen und abhängig von *myc* proliferiert. Phänotypisch ähnelt P493-6 einer Burkitt-Lymphomzelle.

Zur Rekultivierung wurden die Ampullen bei 37 °C rasch aufgetaut und sobald die Suspension flüssig wurde, in 10 ml 37 °C vorgewärmtes RPMI-Medium überführt. Anschließend wurde das DMSO durch einmaliges Zentrifugieren ausgewaschen und die Zellen in 10 ml frischem Medium aufgenommen.

2.4. Bestimmen der Lebendzellzahl

Eine Zellsuspension wurde mit 1 Volumen 0,5 %iger Trypanblaulösung gemischt. Nach 5 min wurde die Anzahl lebender und toter Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Dazu wurden die Zellen gezählt, die sich in 16 Kästchen der Kammer befanden. Die Zahl wurde mit 2 (wegen der 1:2 Verdünnung mit Trypanblau) und mit 10^4 multipliziert. Man erhielt dann die Zellzahl/ml Kultur. Tote Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau auf und erscheinen im Lichtmikroskop blau oder dunkel gefärbt, während lebende Zellen farblos bleiben.

2.5. Arretierung und *myc*-Induktion in P493-6-Zellen

In P493-6-Zellen ($5x10^5$ Zellen/ml) wurde *myc* durch Zugabe von Tetracyclin (0,1 µg/ml Endkonzentration) reprimiert. Um *myc* wieder zu induzieren, wurde nach 72h das Tetracyclin ausgewaschen (dreimaliges Waschen im gleichen Volumen PBS/10 % FKS). Schließlich wurden die Zellen in frischem, Tc-freiem Medium so aufgenommen, daß die Zelldichte derjenigen vor dem Waschen entsprach. Die Zellen wurden dann bei 37 °C kultiviert und zu beliebigen Zeitpunkten nach *myc*-Induktion geerntet.
Bei Experimenten, bei denen Zellen unter Serumentzug inkubiert wurden, wurden die Zellen nach dem Waschen in RPMI/ 0,25% FKS aufgenommen.

Tetracyclin-Stammlösung:	100 µg/ml Tetracyclin in Wasser, sterilfiltriert
PBS (Phosphate-buffered saline):	0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na_2HPO_4; 1,8mM KH_2PO_4

2.6. Methoden zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung

2.6.1.Bestimmung der S-Phase durch ^{3}H-Thymidin-Einbau

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate wurden $3x10^5$ Zellen in 100 µl Medium in Lochplatten ausgesät. ^{3}H-Thymidin wurde dazugegeben (0,5 µCi) und die Zellen für 24 h inkubiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde mit einem Harvester Filtermate 196 der Firma Packard nach Vorschrift gemessen. Es wurden gleichzeitig 5 identische Ansätze gemessen und aus den Werten Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

2.6.2. Propidiumjodid (PI) -färbung

Um zu bestimmen, in welchen Anteilen in einer Zellpopulation $G_{0/1}$-, S- oder G_2/M-Phase-Zellen vorhanden sind, wurde der DNA-Gehalt quantitativ mit Propidiumjodid gefärbt. $5x10^6$ Zellen wurden abzentrifugiert und mit PBS/10% FKS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen in 300 µl PBS/10% FKS aufgenommen und 700 µl Ethanol (100%) wurden unter Schütteln auf dem Vortexer vorsichtig zugetropft. Die Zellsuspension wurde bei -20 °C gelagert, mindestens aber 30 min. Zur Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS/10% FKS gewaschen und dann in PI-Färbelösung aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Die PI-gefärbten Zellen wurden mit einem FACScan-Durchflußzytometer (Firma Beckson Dickinson) nach Herstellerangaben detektiert. Zellen der $G_{0/1}$ Phasen (einfacher DNA Gehalt), Zellen der G_2/M Phase (doppelter DNA-Gehalt) und Zellen der S-Phase (Zellen zwischen einfachem und doppelten DNA-Gehalt) wurden quantitativ mit dem "Cell Quest Analysis Programm" bestimmt.

PI-Färbelösung: PBS/10% FKS, 50 µg/ml Propidiumjodid, 0,5 mg/ml RNaseA

2.7. Methoden zur Bestimmung apoptotischer Zellen

2.7.1. DAPI-Färbung

Zur Bestimmung von Apoptose wurden 50 000 Zellen mit einer Cytospin Zentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit einer DAPI-Färbelösung (20 µg/ml in PBS) gefärbt. Gesunde Zellen zeigen im mikroskopischen Bild bei UV-Bestrahlung einen intakten, blau gefärbten Zellkern. Apoptotische Zellen zeigen eine typische Blasenbildung ohne Zellkern, die dann ausgezählt werden können.

2.7.2. Apoptotische Zellen durch PI-Färbung

Zellen wurden behandelt, wie unter 2.5.2. beschrieben. Apoptotische Zellen zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal, das unter dem des einfachen DNA Gehalts lag. Die Anzahl dieser Zellen wurde mit dem "Cell Quest Analysis Programm" bestimmt.

2.8. Methoden zur Bestimmung der Zellmorphologie

2.8.1. Zellgrößenbestimmung

Im Durchflußzytometer (FACS-Scan) konnte die sog. "Forward Scatter" (FCS) Einstellung als Maß für die Größe von Partikeln (z.B. Zellen) einer vermessenen Suspension verwendet werden. Dazu wurden 10^6 Zellen abzentrifugiert und mit PBS/10% FCS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS/10 % FCS/ 20 µg/ml PI aufgenommen und im Durchflußzytometer ausgewertet. Eine Zellpopulation zeigt in einem FCS-Diagramm ein bestimmtes Größenprofil.

Unterschiedliche Größenprofile zweier oder mehrerer Populationen wurden dann durch Übereinanderlegen in einem Diagramm gezeigt. Tote Zellen, die sich dabei auch ohne Ethanol-Behandlung mit PI färben (vgl. 2.5.2.), wurden dabei von der Auswertung ausgeschlossen.

2.8.2. May-Grünwald / Giemsa Färbung

Mit dieser Färbetechnik können Cytoplasma, bzw. Zellkern angefärbt werden. 50 000 Zellen wurden mit einer Cytospin-Zentrifuge direkt auf einen Objektträger zentrifugiert (500 U/min, 5min). Die Objektträger wurden für 10 min in Aceton fixiert, für 5 min in May-Grünwald Lösung (0,7g/l, Merck) und anschließend für 15 min in Giemsa-Lösung (0,2 g/l, Merck) inkubiert. Die Objektträger wurden dann mikroskopiert und fotographiert.

2.9. Methoden zur Bestimmung der Stoffwechsel-Aktivität

2.9.1. MTT-Assay

Im MTT Assay wird die Aktivität des Succinat-Dehydrogenase (SDH) Komplexes gemessen, der in der innerern Mitochondrienmembran lokalisiert ist. SDH reduziert hierbei ein Tetrazoliumsalz (MTT) zu unlöslichem Formazan. Die ausgefallenen Kristalle werden wieder gelöst, wobei ein Farbumschlag des Mediums erfolgt. Dieser Farbumschlag wird photometrisch bestimmt und ist direkt proportional zur ausgefallenen Formazan-Menge.
Tetracyclin wurde aus arretierten Zellen ausgewaschen und $3x10^4$ Zellen wurden in 96-Loch-platten inkubiert. Der Assay wurde nach den Kit-Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.9.2. Bestimmung der Proteinsynthese

Um die Proteinsyntheserate zu bestimmen, wurde der Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren im Gesamtprotein der Zellen gemessen.
Arretierte Zellen wurden gewaschen, wie in 2.5. beschrieben und $3x10^6$ Zellen wurden zunächst in Cystein- und Methionin-haltigem Medium inkubiert. Zur Markierung wurden die Zellen gewaschen und in Cystein- und Methionin-freiem Medium inkubiert. Der Einbau der radioaktiven Aminosäuren wurde durch Zugabe von 200 µCi [^{35}S]-Methionin und [^{35}S]-Cystein induziert. Nach 1h wurden die Zellen in PBS gewaschen und lysiert (Puffer siehe 5.1.1.). Gleiche Mengen Lysat wurden mit Trichloressigsäure behandelt. Dabei wurde Protein auf Glasfaser-Mikrofilter (Whatman) präzipitiert. Die inkorporierte Radioaktivität wurde mit einem Harvester Filtermate 196 der Firma Packard nach Vorschrift gemessen. Es wurden gleichzeitig 3 identische Ansätze gemessen und aus den Werten Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

3. RNA-Analyse

3.1. Isolierung von gesamtzellulärer RNA

3.1.1. Präparation in großem Maßstab (über 1 mg)

Etwa 10^8 Zellen wurden in 5 ml Guanidiniumthioisocyanat (GIT)-Puffer lysiert. Um die chromosomale DNA zu scheren, wurde das Lysat 30-60 s mit einem Dispergiergerät (IKA Ultra-Turrax) homogenisiert. In ein UZ-Röhrchen wurden 5 ml CsCl-Lösung vorgelegt und das Zellysat darauf überschichtet. Die Proben wurden im SWT41 Rotor bei 20 °C, 32000 Upm, 20 bis 25 Stunden ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das getrocknete RNA-Pellet wurde in 400 µl H_20 aufgenommen und durch eine Ethanol-Fällung aufgereinigt.

GIT-Puffer: 500 g/l Guanidiniumthioisocyanat; 0,1 M Tris (pH 7,5), 1 % Mercaptoethanol

CsCl-Lösung: 5,7 M CsCl; 0,1 M EDTA; (Brechungsindex der Lösung: 1,40)

3.1.2. Präparation kleinerer Mengen RNA

Hierfür wurde der „RNeasy Midi-Kit" der Firma Qiagen verwendet. Alle Puffer und Lösungen sind Bestandteil des Kits und die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2. Northern-Blot-Analyse

10 µg gesamtzelluläre RNA wurden in 20 µl RNA-Ladepuffer aufgenommen. Die Proben wurden 10 min bei 70 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgt in einem 1 %igem Formaldehyd-Agarosegel in 1xMOPS-Puffer bei 25 V über Nacht (16h). Nach dem Lauf wurde die RNA über einer UV-Lampe (254 nm) sichtbar gemacht und photographiert. Die Übertragung auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) erfolgte als Saugtransfer in 20x SSC (Aufbau siehe Sambrook *et al.* , 7.46). Nach dem Transfer (über Nacht) wurde der Filter kurz in 5x SSC gewaschen und eine Stunde in Church-Puffer bei 65 °C prähybridisiert.

Der Puffer wurde dann gegen 25 ml frischen Church-Puffer ausgetauscht, der ca. 10^7 cpm/ml einer radioaktiven, hitzedenaturierten Probe enthielt. Die Hybridisierung dauerte etwa 16 h bei 65 °C, danach wurde der Filter 2x 15 min mit 0,5 % SSC/0,5 % SDS-Lösung bei 60 °C gewaschen, luftgetrocknet und autoradiographiert, bzw. mit einem Phosphoimager (FujiBAS 2000) quantitativ ausgewertet.

RNA-Ladepuffer: 50 % Formamid; 2,2 M Formaldehyd; 1x MOPS-Puffer; 0,2 % Bromphenolblau (w/v); 50 mg/ml Ethidiumbromid; 10 % (w/v) Ficoll

1x MOPS-Puffer: 20 mM MOPS (pH 7,0); 0,5 mM Natrium-Acetat; 1 mM EDTA
Formaldehyd-Agarosegel: 1 % Agarose; 2,2 M Formaldehyd; 1x MOPS-Puffer
Church-Puffer: 0,4 M Na_2HPO_4; 0,1 M NaH_2PO_4; 1 mM EDTA; 7 % SDS

3.3. Nukleärer Run-On

Zur Hybridisierung von cDNA-Filterarrays (siehe 6.1.) wurden Run-On markierte RNAs eingesetzt. Bei dieser Methode werden Kerne isoliert und eingefroren, wobei die Transkription der RNA-Polymerase-Komplexe stoppt. Nach dem Auftauen und Inkubation in der Gegenwart von Nukleotiden, wird die Transkription fortgesetzt und radioaktive Nukleotide werden in die naszierende RNA eingebaut. Diese RNA wird isoliert und direkt mit den Filtern hybridisiert. Im Run-On markierte RNA gibt Aufschluß darüber, auf welchen Genen die Transkription von RNA-Polymerase initiiert wurde. Der Run-On ist daher ein Hinweis auf die Transkriptionsrate eines Gens zu in einer bestimmten Situation.

3.3.1. Isolierung von Zellkernen

Zur Präparation von Kernen wurden 10^8 Zellen abzentrifugiert (7 min, 1200 U/min, 4°C), das Zellsediment in 40 ml kaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 40 ml kaltem Lysepuffer für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellkerne durch Zentrifugation (7 min, 1500 U/min, 4°C) pelletiert und vorsichtig in soviel TMEG-Puffer resuspendiert, daß sich eine Anzahl von $2x10^7$ Kerne/100 µl TMEG-Puffer ergab. Daraus wurden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10mM $MgCl_2$; 10 mM NaCl; 0,5 % (v/v) NP40
TMEG-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,3; 5 mM $MgCl_2$; 0,1 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 40 % (v/v) Glyzerin

3.3.2. Run-On-Reaktion

Eine Zellkernpräparation mit $2x10^7$ Kernen (3.3.1.) wurde auf Eis aufgetaut, mit 100 µl 2x Run-On-Puffer und 100 µCi [α-^{32}P]-CTP (800 Ci/mmol, 10 mCi/ml) versetzt und gut durchmischt. Die Transkriptionsreaktion erfolgte für 15 min bei 28 °C . Danach wurden 50 U DNase I (RNase-frei) zugemischt und weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Behandlung mit DNase I wurde wiederholt, wenn Sarkosyl im Run-on-Puffer vorhanden war. Die Lösung wurde nun mit 20 µl Proteinase K/SDS behandelt und für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die nukleären Transkripte wurden über eine Sephadex G50-Säule (Pasteurpipette, Säulenvolumen: 2 ml, Laufpuffer: TE-Puffer) von den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt und in 500 µl TE-Puffer gesammelt. Der radioaktive Einbau wurde in einem Benchtop Radioisotop Counter in cpm/ml bestimmt.

4xRun-on-Puffer :	600 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; je 1 mM ATP, UTP, GTP; 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 2,4 % (w/v) Sarkosyl
Proteinase K/SDS:	2,5 mg/ml Proteinase K, 2,5 % (w/v) SDS

4. Methoden zur DNA-Analyse

4.1. Gebräuchliche Methoden

Häufig angewandte Methoden wurden durchgeführt, wie in Sambrook *et al*., 1989 beschrieben. Hierzu gehören Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren (Sambrook *et al*., E.10-15), Phenol-Extraktion von Nukleinsäuren (Sambrook *et al*., E.3), Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration (Sambrook *et al*., E.5) und Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al*., E6.3).

4.2. Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (360 nm) aus dem Gel herausgeschnitten. Nach den Herstellerangaben des "DNA Gel Extraction Kits" (Qiagen) wurde die DNA aus den Gelstücken isoliert.

4.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Reaktionen wurde der „PCR Core-Kit" der Firma Boehringer verwendet und in einem DNA-Thermalcycler (Perkin Elmer) eingesetzt.

PCR-Ansatz:

100 ng	Template-DNA
5 µl	10x PCR-Puffer
6 µl	25 mM $MgCl_2$ (EK: 1,5 mM)
2 µl	dNTP-Mix (10 mM)
1 µl	5‘-Primer (10 pmol/µl)
1 ml	3‘-Primer (10 pmol/µl)
1U	*Taq* DNA-Polymerase
	H_2O ad 50 µl

Reaktionsbedingungen:

25 Zyklen:		
Denaturierung	95 °C	1 min
Annealing	55-65 °C	2 min
Extension	72 °C	3min
1 Zyklus:		
Extension	72 °C	5 min

Die Reaktionsbedingungen wurden für jede Reaktion hinsichtlich $MgCl_2$-Konzentration, Template- und Primerkonzentration, Annealing-Temperatur optimiert. PCR-Produkte wurden vor Gebrauch durch Gelelution gereinigt (3.2.).

4.4. Radioaktive Markierung von DNA

DNA wurde nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) radioaktiv markiert. Dazu wurde der „Rediprime DNA Labelling-Kit“ der Firma Amersham Life Science verwendet. Die Markierung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide von der Probe erfolgte durch Sephadex-G50-Säulen. Die Radioaktivität der Probe wurde mit einem Benchtop Radioisotope Counter (Bioscan) gemessen. Die Probe wurde denaturiert (10 min, 95 °C) und in Northern-Blots eingesetzt.

4.5. Synthese von cDNA

4.5.1. Synthese des ersten Strangs (RT Ansatz)

Ein Ansatz mit 20 µg gesamtzellulärer RNA, 0,5 µg T7-T24-Primer wurde mit RNase-freiem Wasser auf 22 µl aufgefüllt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Dann wurden 8 µl RT-Puffer (Gibco BRL), 4 µl 0,1 M DTT, 2 µl dNTPs (je 10 mM) dazu pipettiert und in zwei Minuten auf 42 °C temperiert. Schließlich wurden 200 U Reverse Transkriptase (Super Script II, GibcoBRL) hinzugefügt und die Reaktion 60 min bei 42 °C gehalten (Endvolumen 39 µl).

T7-T24 Primer: 5‘-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG T(24)-3‘

4.5.2. Synthese des zweiten Strangs

Zum Reaktionsansatz der Erststrangsynthese wurden 97,2 µl H_2O, 30 µl Zweitstrangsynthese-Puffer, 3 µl dNTPs (10 mM), 2 U RNaseH, 40 U E.*coli* DNA-Polymerase I und 10 U E.*coli* DNA-Ligase (alle Lösungen und Enzyme GibcoBRL) gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 150 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 2,5 h bei 16°C inkubiert, dann wurden 20 U T4-DNA-Polymerase (Promega) dazu pipettiert und weitere 5 Minuten bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 µl Glykogen/EDTA-Mix gestoppt. Zur Entfernung von ribosomaler RNA wurde der Ansatz mit 0,5 µl RNaseA (100 µg/µl) behandelt (30 min bei 37°C) und anschließend mit Proteinase K/SDS (30 min bei 37°C). Die cDNA wurde durch eine Phenol-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt (3.1.).

Proteinase K/SDS: 20 mg/ml Proteinase K, 2,5 % (w/v) SDS

4.6. Hybridisierungsproben für Northern Blot Analysen

Ein Teil der cDNA-Proben wurde zur Verfügung gestellt: c-*myc* cDNA stammt aus dem Labor Eick, Proben für Nucleolin (NCL), Nucleophosmin (NPM), Laktat-Dehydrogenase-A (LDH-A), Nukleotiddiphosphatkinase A (NDKA, Nm23-H1), Cyclin-abhängige Kinase 4 (cdk4), eukaryontischer Initiationsfaktor 5A (eIF5A), eukaryontischer Initiationsfaktor 3 (eIF3), JTV-1, p130 wurden von Carmen Kaiser und Gerhard Laux bereitgestellt (Tabelle 2, Carmen Kaiser, Doktorarbeit).
Proben für ODC, HDGF, MCM4, RFC-4, DP-1 und THR-1 wurden durch RT-PCR (s.u.) synthetisiert. PCR Primer von 20 - 22 Nukleotiden Länge wurden aus den jeweiligen cDNA-Sequenzen bestimmt (Tabelle) und von der Firma ARK synthetisiert.

RT-PCR:

Reaktionsansatz:

1 µl	RT-Ansatz (4.5.1.)
1 µl	3‘Primer (10 pmol/µl)
1 µl	5‘Primer (10 pmol /µl)
1 µl	dNTP (je Nukleotid 10 mM)
5 µl	Taq-Polymerase-Puffer
4 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
36 µl	H_2O
1 U	Taq-Polymerase

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung	95 °C	
Annealing		55-65 °C
Extension	72 °C	
30 Zyklen	72 °C	

Tabelle 2:

Gen	*Accession*	*cDNA-Abschnitt*
NCL	M60858	1075-1199
NPM	M23613	34-258
LDH-A	X02152	98-1160
NDKA	X17620	101-327
CDK4	M14505	286-487
JTV-1	U24169	185-425
eIF3	U78525	1512-1739
p130	D21262	504-634
ODC	M16650	144-1466
HDGF	D16431	359-597
DP-1	L23959	935-1162
THR-1	M24898	1676-2070
MCM4	X74794	1948-2192
RFC-4	M87339	98-329

4.7. DNA-Sequenzierung

Hierfür wurden die Sequenzierdienste der Firmen Metzger (München) und Toplab (Martinsried) in Anspruch genommen.

5. Protein-Analyse

5.1. Western-Blot-Analyse

5.1.1. Zellaufschluß

$5x10^6$ Zellen wurden abzentrifugiert (5000 Upm, 2 min, 4 °C) und in 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (15 min, 12000 Upm, 4 °C). Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt

Lyse-Puffer: 250 mM NaCl, 0,25% Nonidet P40, 1mM DTT, 0,5 mM PMSF, 10mM NaF, 0,5 mM Na_3VO_4, 10% Glycerin, 20 mM HEPES (pH 7,9)

5.1.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proben wurden kurz auf einem Vortexer durchmischt, 5 min bei 95 °C inkubiert und gleich auf Eis gestellt. 2 µl dieses Ansatzes wurden mit 800 µl Wasser und 200 µl Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay) verdünnt (1:500) und 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Um eine Eichkurve zu erhalten, wurden Proben mit BSA (0-10 µg) auf dieselbe Weise vorbereitet. Die Extinktion aller Proben wurde bei 566 nm bestimmt. Als Referenz diente eine Probe aus 800 µl Wasser und 200 µl Färbelösung. Aus den Extinktionswerten der BSA-Proben wurde eine Eichkurve erstellt und daraus die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

5.1.3. SDS-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden in diskontinuierlichen Gelen aufgetrennt, die aus Sammel- und Trenngel bestehen. Im vertikalen Gelgießstand (8x12 cm Minigele), wurden zunächst 10 ml 10 %ige Trenngellösung bis 3 cm unter den Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol durch Spülen mit H_2O bidest. entfernt, 3 ml 5 %ige Sammelgellösung aufgetragen und der Probenkamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer Protein- Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt und die Kammer mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. 10 µg der Proben wurden mit gleichem Volumen Protein-Ladepuffer angefärbt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Die Proben wurden in die Geltaschen gefüllt und die Elektrophorese durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine Spannung von 100 V angelegt, solange, bis die Bromphenolblau-Front in

das Trenngel eingedrungen war. Dann wurde die Spannung auf 200 V erhöht und die Proben getrennt, bis das Bromphenolblau gerade aus dem Gel herausgelaufen war. Die Apparatur wurde abgebaut und das Gel geblottet.

Trenngel (10 %): 3,3 ml einer 30 %igen Polyacrylamid-Lösung (PAA), 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) und 4 ml H_2O bidest. wurden gemischt. Unmittelbar vor dem Gießen wurde 100 µl 10 %iges SDS, 4 µl TEMED und 100 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) dazugegeben.

Sammelgel (5 %): 500 µl 30 %ige PAA; 380 µl 1 M Tris/HCl (pH 6,8); 2,1 ml H_2O bidest., 30 µl 10 %ige SDS; 3 µl TEMED; 30µl 10 %ige APS; Verfahren wie bei Trenngel

Protein-Ladepuffer: 4 % SDS, 200 mM DTT, 20 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 100 mM Tris/HCl (pH 6,8)

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris/HCl; 250 mM Glycin (pH 8,3); 0,1 % SDS

5.1.4. Western-Blot

Die Proteine wurden mittels Elektroblotting vom SDS-PAA-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C extra, Amersham Life Science) übertragen. Das Blotten erfolgte 90 min in einer Western-Blot-Apparatur mit Transfer-Puffer. Danach wurde die Apparatur abgebaut und die Membran 1-2 min in Ponceau S-Lösung gefärbt und 2mal in Wasser gewaschen. Die gefärbte Membran diente als Ladekontrolle.

Transfer-Puffer: 39 mM Glycin; 24 mM Tris; 0,04 % SDS; 20 % Methanol

5.1.5. Antikörper-Behandlung

Die Membran wurde 2x20 min in PBS-Milch blockiert und dann über Nacht mit primärem Antikörper in PBS-Milch inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit PBS-Milch (je 10 min), wurde 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen, mit PBS, PBS + 0,1 % Tween und wieder mit PBS (je 10 min). Die Detektion erfolgte mit dem ECL Western-blotting-Kit der Firma Amersham Life Science, nach deren Angaben.

PBS: 0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10,1 mM Na_2HPO_4; 1,8 mM KH_2PO_4

PBS-Milch: 5 % Milchpulver in PBS

5.2. Nachweis der Cdk2-Aktivität

5.2.1. Immunpräzipitation

400 µg Protein und 20 µl Protein A-Sepharose wurden mit Lysepuffer (4.1.1.) auf ein Volumen von 400 µl gebracht und 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Protein A-Sepharose wurde abzentrifugiert und der Überstand mit 1 µg spezifischem Antikörper versetzt und 12h

bei 4 °C rotiert. Zur Adsorption der Immunkomplexe wurde dann 1h bei 4 °C mit Protein A-Sepharose unter Rotation inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Sepharose wurde zweimal mit Lysepuffer bei 4°C gewaschen und für eine Histon H1-Kinase Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

5.2.2. Bestimmung der Histon H1-Kinase-Aktivität

Um die Aktivität von Cdk2 zu bestimmen, wurden Immunpräzipitationen mit monoklonalen Cyclin E-Antikörpern (Santa Cruz) durchgeführt. Die Protein A-Sepharose-adsorbierten Antikörper (4.2.1.) wurden je zweimal mit Lysepuffer und Kinasepuffer bei 4 °C gewaschen. Ein Viertel der Sepharose wurde in 25 µl Kinasepuffer aufgenommen und 0,1 µg Histon H1 (als Kinasesubstrat), 2,5 mM ATP und 100 µCi/ml [γ^{32}P]-ATP dazu pippetiert. Die Lösung wurde für 20 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zusatz von 25 µl Protein-Ladepuffer (5.1.3.) wurde 5 min auf 95 °C erhitzt. Der Ansatz wurde in einem SDS-Gel aufgetrennt und radioaktiv markierte Histon-Proteine wurden durch Audioradiographie detektiert.
Kinasepuffer: 10 mM $MgCl_2$, 5 mM $MnCl_2$, 1mM DTT, 50 mM HEPES (pH 7,9)

6. Analyse von Microarrays

6.1. Hybridisierung von cDNA-Filterarrays

Die Herstellung radioaktiv-markierter Run-On-RNA wurde bereits unter 2.3. beschrieben. Gereinigte, nukleäre Transkripte wurden mit ATLAS Human1.2-Arrays oder ATLAS HumanCancer1.2-Arrays (ClonTech) bei 68°C für 36 h in 5 ml ExpressHyb (ClonTech) hybridisiert. Die ATLAS-Filter wurden danach bei 45 °C zweimal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen (je 20 min). Es schloss sich eine RNaseA-Behandlung (15 min, 30 °C) und eine abschließende Waschung mit Waschpuffer II bei 45 °C an. Da RNaseA nur einzelsträngige RNA degradiert, waren RNA/DNA-Hybride auf dem Filter vor Abbau geschützt. Mit dieser Behandlung wurde erreicht, daß nur spezifische Hybridisierungen vor Abbau geschützt wurden und unspezifischer Hintergrund reduziert wurde. Die Filter wurden dann feucht autoradiographiert. Die Autoradiographien wurden per Auge ausgewertet, die Intensitäten einzelner Bereiche mit einem Phosphoimager ermittelt.
ATLAS-Filter beinhalten etwa 1200 verschiedene cDNAs von 200-500bp Größe, die an definierten Positionen auf dem Filter immobilisiert sind. Die Position und Beschreibung der cDNAs kann auf der Clontech Homepage eingesehen werden, unter http://www.clontech.com/atlas/genelists/index.html.
Waschpuffer I: 1 % (w/v) SDS; 2xSSC
Waschpuffer II: 0,5 % (w/v) SDS; 0,1xSSC

6.2. Analyse von Oligonukleotid-Arrays (Genchips)

6.2.1. Herstellung von Biotin-markierter cRNA

Die Herstellung von cDNA wurde unter 4.5. beschrieben. Die präzipitierte cDNA eines Ansatzes wurde in 1,5 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Eine *in vitro*-Transkription wurde mit dem "BioArray RNA Transcript Labeling Kit" in Gegenwart von biotinyliertem UTP mit Reverser Transkriptase nach Herstellerangaben (Amersham/Pharmacia) durchgeführt. Der Ansatz wurde mit einem RNeasyMini Kit (Qiagen) aufgereinigt und 20 µg cRNA wurden in Fragmentierungspuffer für 35 min bei 95 °C fragmentiert. Der Ansatz wurde bei -20 °C gelagert oder sofort in eine Hybridisierung eingesetzt.

Fragmentierungspuffer: 40 mM Tris-Acetat (pH 8,1), 0,3 mM Kaliumacetat, 30mM Natriumacetat

6.2.2. Hybridisierung und Waschen der Genchips

15 µg fragmentierte cRNA wird mit 162 µl Hybridisierungspuffer gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Dieser Hybridisierungscocktail wird bei -20 °C gelagert oder gleich in einen Genchip Hu6800 (Affymetrix, Santa Clara, CA) pippetiert und 16 h bei 45 °C unter Rotation inkubiert.

Anschließend an die Hybridisierung wird der Chip in einer Waschstation (Affymetrix FluidicsStation) gemäß Herstellerangaben computergesteuert mit nicht stringenten und stringenten Puffern gewaschen. Zur Detektion und Verstärkung der Fluoreszenzsignale wurde der Chip mit drei Antikörperlösungen (1-3) behandelt. Zwischen jeder Antikörperbehandlung und abschließend wurden die Chips mit nicht stringenten und stringenten Puffern gewaschen.

Hybridisierungscocktail: 15 µg Proben-cRNA, Kontroll-cRNA I-IV (1,5; 5; 25 und 100 pM), 5 nM Kontroll-Oligonukleotide, 0.1 µg/µl sonifizierte Hering-Spermien-DNA, 0.5 µg/µl , acetyliertes BSA, 75 mM MES Natrium-Salz und 27.5 mM MES freie Säure (2-[N-**M**orpholino]**e**than**s**ulfonsäure).

Kontroll-cRNA I-IV (BioB, BioC, BioD und Cre) und Kontroll-Oligonukleotide wurden von Roche, Penzberg zur Verfügung gestellt. Die Kontroll-Oligonukleotide hybridisieren am Rande des Chips und als Kreuz innerhalb des Chips. Diese Markierungen dienen zur Ausrichtung eines Gitters bei der Auswertung des Chips. Kontroll-cRNAs verschiedener Konzentration dienen als quantiative Kontrolle für die Hybridisierung auf dem Chip.

Nicht-stringenter Waschpuffer: 75mM MES Natrium-Salz, 27,5 mM MES freie Säure, 26mM NaCl, 0,01% Tween 20

Stringenter Waschpuffer:	0,9 M NaCl, 60 mM NaH_2PO_4, 6 mM EDTA, 0,005 % Triton, 0,02 % Tween 20, 0,1 g/l Antifoam-30
Antikörperlösung 1:	1 mg/ml Streptavidin in 600 µl Färbepuffer
Antikörperlösung 2:	10 mg/ml Ziegen-IgG, 0,5 mg/ml Biotinylierter αIgG in 600 µl Färbepuffer
Antikörperlösung 3:	1 mg/ml Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) in 600 µl Färbepuffer
Färbepuffer:	150 mM MES Natrium-Salz, 200 mM MES freie Säure, 1,85 M NaCl, 0,1% Tween 20, 0,01% Antifoam O-30

6.2.3. Beschreibung der Genchips

Es wurden Genchips Hu6800 der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA) verwendet. Auf diesen Chips (1,28 x 1,28 cm^2) sind Sequenzen von 6800 verschiedenen menschlichen cDNAs repräsentiert. Die Sequenzen entstammen den Datenbanken Unigene, GenBank und TIGR (The Institute for Genomic Research), Stand Oktober 1997.

Etwa 10^7 Kopien eines Oligonukleotids von durchschnittlich 25 Basenpaaren Länge werden auf eine Fläche von 25 x 25 μm^2 direkt auf die Chipmatrix synthetisiert. Diese Fläche wird als **Probenzelle** bezeichnet. Die Sequenz dieses Oligonukleotids entspricht exakt derjenigen einer cDNA und wird mit **PM** (Perfect Match) bezeichnet. Direkt unter eine PM-Zelle wird ein Oligonukleotid mit der gleichen Sequenz, aber einem Basenaustausch in der Mitte aufsynthetisiert und mit **MM** (MisMatch) bezeichnet. Ein **Probenpaar (PP)** besteht aus einer PM- und einer MM-Zelle. Zehn Probenpaare, nebeneinander auf dem Chip angeordnet, entsprechen zehn verschiedenen Sequenzen einer cDNA und werden als **Probenset (PS)** bezeichnet (Abb. 10).

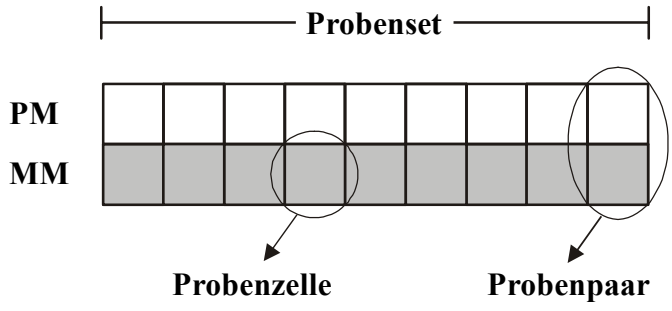

Abb. 10: Anordnung von 20 Oligonukleotiden auf dem Chip, die einer cDNA der Datenbanken entsprechen. Die Abkürzungen sind im Text erläutert.

6.2.4. Algorithmen bei der Auswertung der Genchips

Im folgenden werden die wichtigsten Algorithmen bei der Auswertung der Genchips beschrieben, die englischen Originalbezeichnungen und Abkürzungen werden weitgehend beibehalten. Die Algorithmen wurden von Affymetrix empirisch ermittelt. Die Auswertung wurde mit den Programmen GeneChip und Data Mining Tool (Affymetrix) durchgeführt.

6.2.4.1. Scannen der Chips

Das Scannen der Chips erfolgte mit einem HP GeneArray™ Scanner (Affymetrix). Ein Laser erzeugt eine Fluoreszenz, die bei einer Auflösung von 3 µm/Pixel als sog. .Dat Datei gespeichert wird. Damit werden ca. 64 pixel/Probenzelle berechnet. Da die Pixel auf der Fläche nicht gleichmäßig verteilt sind, wird die durchschnittliche Intensität/Probenzelle berechnet (.CEL Datei). Damit werden Probenzellen untereinander rechnerisch vergleichbar. Die .CEL-Datei dient zur Berechnung bestimmter Größen (gespeichert als .CHP Datei), aus denen die quantitative Auswertung des Chips erfolgt.

6.2.4.2. Hintergrund und Rauschen

Hintergrundintensitäten entstehen durch unspezifische SAPE Bindung an die Chipmatrix. Zur Subtraktion des Hintergrunds wird der Chip in 16 Sektoren geteilt. Die Intensitäten der niedrigsten 2% der Probenzellen werden gemittelt und von der durchschnittlichen Intensität eines Sektors abgezogen. Rauschen ist die Varianz der gemessenen Pixel, wenn der Laser eine bestimmte Fläche scannt. Die Berechnung des Rauschens (**Q)** wird nicht näher erläutert.

6.2.4.3. Algorithmen zur Bestimmung von AbsCall

Bei der Auswertung der Chips wird zunächst der **Absolute Call** (**AbsCall**) bestimmt, der angibt, ob ein Probenset auf einem Chip als anwesend (**present = P**) oder nicht anwesend (**absent = A**) berechnet wird. Eine Zelle ist positiv, wenn die Differenz aus den Intensitäten von PM und MM über einem Schwellenwert liegt und der Quotient aus PM und MM über 1,5 liegt (Gleichung 1). Entsprechendes gilt für negative Zelle (Gleichung 2).

Gleichung 1:

positive Zelle:	**PM - MM ≥ 4Q**	**und**	**PM/MM ≥ 1,5**

Gleichung 2:

negative Zelle:	**MM - PM ≥ 4Q**	**und**	**MM/PM ≥ 1,5**

(Die Werte 4 und 1,5 wurden empirisch ermittelt)

Zur Bestimmung des AbsCall eines Probensets werden drei Größen miteinander verrechnet. Die **Positive Fraction** gibt den Anteil positiver Zellen / Chip an (Gleichung 3). Die **Pos/Neg Ratio** ist der Quotient aus der Anzahl positiver Zellen und der Anzahl negativer Zellen (Gleichung 4). Schließlich wird die **LogAvgRatio** ermittelt (Gleichung 5), in die der Quotient aus PM und MM eingeht. Die LogAvgRatio ist somit ein Maß für die Hybridisierungseffizienz von PerfectMatch und MisMatch. Hybridisieren beide mit gleicher Effizienz, so nimmt die LogAvgRatio den Wert Null an. Ein weiterer Algorithmus gewichtet diese drei Gößen unterschiedlich und ermittelt so den AbsCall "P" (present), "A" (absent) oder "M" (marginal). Dabei gehen empirisch ermittelte Schwellenwerte ein:

	Absent	Marginal	Present
PosFraction	≤ 3		≥ 4
Pos/Neg Ratio	$\leq 0{,}33$		$\geq 0{,}43$
LogAvgRatio	$\leq 0{,}9$		$\geq 1{,}3$

Gleichung 3:

$$\textbf{Positive Fraction} = \frac{\textbf{n (positive PP)}}{\textbf{n (all PP)}}$$

Gleichung 4:

$$\textbf{pos/neg Ratio} = \frac{\textbf{n (positive PP)}}{\textbf{n (negative PP)}}$$

Gleichung 5:

$$\textbf{LogAvgRatio} = 10 \bullet \frac{\sum_{i=1}^{n} [\log (PM/MM)]_i}{\textbf{n (PP)}}$$

6.2.4.4. Normalisierung

Beim Vergleich werden die durchschnittlichen Intensitäten **(AvgIntensity)** zweier Chips einander angeglichen (Normalisierung). Ein Chip wird als Basislinie **(Base)** gewählt, der zu vergleichende Chip wird mit **Exp** abgekürzt. Ein Normalisierungfaktor **NF** wird so bestimmt, daß Gleichung 6 gilt.

Gleichung 6:

$$\textbf{AvgIntensitiy (Base)} = \textbf{NF} \cdot \textbf{AvgIntensitiy (Exp)}$$

Die AvgIntensity eines Chips wird berechnet aus dem Durchschnitt der AvgDiff Werte (Gleichung 7) aller Probensets auf einem Chip, wobei die niedrigsten und höchsten 2% der Werte abgezogen werden. Hierbei geht eine Größe in die Gleichung ein, die ein Maß für die Intensität eines Probensets auf einem Chip und somit als Maß für die Abundanz einer RNA in der Probe dient, die **AvgDiff** (Gleichung 7).

Gleichung 7:

$$\mathbf{AvgDiff} = \frac{\sum_{i=1}^{n} (PM - MM)_i}{n\ (PP)}$$

6.2.4.5. Algorithmen zur Bestimmung von DiffCall

Beim Vergleich zweier Genchips wird bestimmt, ob ein Probenset gegenüber dem gleichen Probenset auf der Baseline induziert (**induced = Inc**), reprimiert (**decreased = Dec**) ist, oder keinen Unterschied zeigt (**no change = NC**). Dieser Parameter wird als Difference Call (**DiffCall**) bezeichnet.

Zunächst wird berechnet, ob ein Probenpaar gegenüber dem gleichen Probenpaar der Basislinie induziert (bzw. reprimiert) ist. Dazu muß die Differenz der AvgDiff Werte (Gleichung 8) und der prozentuale Anteil (Gleichung 9) über (bzw. unter) einem Schwellenwert (**Change Threshold, CT**) liegen.

Gleichung 8:

$$(PM\text{-}MM)_{Exp} - (PM\text{-}MM)_{Base} \geq CT$$

Gleichung 9:

$$\frac{(PM - MM)_{Exp} - (PM - MM)_{Base}}{(PM - MM)_{Base}} \geq \frac{CT}{100}\ \%$$

Ob Probensets induziert oder reprimiert sind geht aus vier Größen hervor.

Der $\mathbf{Max(Inc/PP_{used}\ ,\ (Dec/PP_{used})}$ gibt den Anteil an induzierten bzw. reprimierten Probenpaaren an (Gleichung 10). Der größere der beiden Werte wird verwendet.

Gleichung 10:

$$\mathbf{Max\ (Inc/PP_{used}\ ,\ Dec/PP_{used}) = Max}\left(\frac{n\ (increased\ PP)}{n\ (all\ PP)}\ ,\ \frac{n\ (decreased\ PP)}{n\ (all\ PP)}\right)$$

Dann wird das Verhältnis aus beiden Werten berechnet (Gleichung 11).

Gleichung 11:

$$\textbf{Inc/Dec} = \frac{\textbf{n (increased PP)}}{\textbf{n (decreased PP)}}$$

Der **LogAvgRatioChg** (Gleichung 12) ist wieder ein Maß für die Hybridisierungseffizienz von Perfect Match und Mismatch (vgl. 5.2.4.3. und Gleichung 5). Da diese Effizienzen auf beiden Chips gleich sein sollten liegt der LogAvgRatioChg im Idealfall bei 0. Er kann aber positive Werte annehmen, wenn mehrere Probensets sehr stark induziert sind, z.B. wenn ein Probenpaar auf der Baseline als absent berechnet wurde.

Gleichung 12:

$$\textbf{LogAvgRatioChg} = \textbf{LogAvg (Exp)} - \textbf{LogAvg (Base)}$$

Die **Dpos – Dneg Ratio** (Gleichung 13) gibt an, wie viele positive und negative Probenpaare auf einem Chip im Vergleich zur Baseline berechnet werden. Diese Rate sollte wieder bei Null liegen, wenn man nur Probensets vergleicht, die keine Änderung in der Expression zeigen (Kontrollen, Haushalts-Gene). Bei der Berechnung über alle Probensets treten dann wieder Abweichungen auf, wenn Probensets sehr stark induziert (reprimiert) sind, z.B. wenn ein Probenpaar auf einem der Chips als absent berechnet wurde.

Gleichung 13:

$$\textbf{Dpos-Dneg Ratio} = \frac{[\textbf{n (positive PP)}_{\textbf{Exp}} - \textbf{n (positive PP)}_{\textbf{Base}}] - [\textbf{n (negative PP)}_{\textbf{Exp}} - \textbf{n (negative PP)}_{\textbf{Base}}]}{\textbf{n (all PP)}}$$

Eine Matrix gewichtet die vier Größen unterschiedlich und ermittelt so den DiffCall "Inc" (increased), "NC" (no change) oder "MC" (marginal change). Dabei gehen empirisch ermittelte Schwellenwerte ein (analog für reprimierte Probensets).

	NC	**MC**	**Inc**
Inc/PPused	$\leq 0{,}33$		$\geq 0{,}43$
Inc/Dec Ratio	≤ 3		≥ 4
LogAvgRatioChg	$\leq 0{,}9$		$\geq 1{,}3$
Dpos – Dneg Ratio	$\leq 0{,}2$		$\geq 0{,}3$

6.2.4.6. Berechung der Fold Change

Zur Berechnung, um welchen Faktor ein Probenset gegenüber dem gleichen auf einem anderen Chip induziert (reprimiert) ist, ist wieder die **AvgDiff** entscheidend (vgl. Gleichung 7). Zunächst wird die **AvgDiffChg** berechnet, der Unterschied aller AvgDiff von Chip1 und Chip2 (Gleichung 14).

Gleichung 14:

$$\mathbf{AvgDiffChg = AvgDiff_{Exp} - AvgDiff_{Base}}$$

Die Berechnung von **FC** (Fold Change) ist in Gleichung 15 gezeigt.

Gleichung 15:

$$\mathbf{FC} = \frac{\mathbf{AvgDiffChg}}{\mathbf{Max\ [min(AvgDiff_{Exp}\ ,\ AvgDiff_{Base})\ ,\ 2{,}8 \bullet max(Q_{exp}\ ,\ Q_{base})]}} + \begin{cases} \mathbf{+1} & \mathbf{wenn\ AvgDiff_{Exp} \geq AvgDiff_{Base}} \\ \mathbf{-1} & \mathbf{wenn\ AvgDiff_{Exp} < AvgDiff_{Base}} \end{cases}$$

Die Fold Change hängt also von den Beträgen der AvgDiff Werte und dem Rauschen (vgl. 5.2.4.2.) ab. Ist beispielsweise der Wert von $AvgDiff_{Base}$ kleiner als $AvgDiff_{Exp}$, aber größer als 2,8 Q, dann vereinfacht sich die Berechnung zu:

$$\mathbf{FC} = \frac{\mathbf{AvgDiff_{Exp}}}{\mathbf{AvgDiff_{Base}}}$$

ERGEBNISSE

1. Myc-abhängige Phänoptypen der Zellinie P493-6

1.1. Regulierbarkeit von *myc* durch Tetracyclin

Die Stimulierung des *myc*-Gens ist normalerweise Voraussetzung für die Proliferation von Zellen. In ruhenden Fibroblasten wird die Aktivierung von *myc* und anderer Faktoren, die für den Eintritt in den Zellzyklus benötigt werden, durch Behandlung mit fötalem Kälberserum (FKS) erreicht.

In B-Zellen stimuliert FKS das endogene *myc*-Gen nicht. Die Kultivierung gereinigter, menschlicher B-Zellen aus Blut wird durch Stimulierung von B-Zellrezeptor und gleichzeitiger Aktivierung des CD40-Rezeptors für wenige Wochen erreicht (Banchereau *et al*., 1991). Die Aktivierung dieser mitogenen Signalwege führt in B-Zellen zur Zellzyklus-Aktivierung (Übersicht in Craxton *et al*., 1999).

Die Immortalisierung von B-Zellen ist durch eine Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) möglich (Übersicht in Kieff, 1996). Um die Zellzyklus-Aktivierung durch EBV in B-Zellen zu untersuchen, wurde von Kempkes *et al.* (1995) die Zellinie ER/EB2-5 entwickelt, die ein konditionales EBV trägt. Dazu wurde eine Mutante des Virus mit einem konditionalen EBNA2-Gen verwendet. Da EBNA2 für die Immortalisierung von B-Zellen durch EBV essentiell ist, wurde es als Fusionsprotein mit der Hormon-Bindedomäne des Östrogenrezeptors (ER/EBNA2) exprimiert. Die entstandene Zellinie ER/EB2-5 aktiviert das Fusionsprotein nur in Gegenwart von Östrogen (Kempkes *et al*. 1995). EBNA2 induziert dabei die Expression zellulärer Gene, unter anderem das endogene *myc* und induziert so die Proliferation (Kaiser *et al*. 1999). In Abwesenheit von Östrogen wird endogenes *myc* nicht exprimiert und die Zellen ruhen.

ER/EB2-5 Zellen wurden anschließend mit einem Expressionsplasmid für ein Tetracyclin (Tc)-regulierbares *myc* stabil transfiziert. Die Zellinie P493-6 entstand durch Selektion auf Zellen, die in Abwesenheit von Östrogen und bei kontinuierlicher *myc*-Expression proliferieren konnten. In diesen Zellen ist die Proliferation von der *myc*-Expression abhängig. Durch Zugabe von Tc wird *myc* reprimiert und die Zellen arretieren in der G1-Phase des

Zellzyklus. Durch Auswaschen von Tc wird *myc* induziert und die Zellen treten wieder in den Zellzyklus ein (Pajic *et al*. 2000).

Der zeitliche Verlauf der *myc*-Induktion in P493-6-Zellen ist in Abb. 11 gezeigt. Proliferierende Zellen (P) zeigen hohe Myc-Expression (Spur 1). Nach Zugabe von Tc wird *myc* reprimiert und ist nicht mehr detektierbar (Spur 2). Bereits 40 min nach dem Auswaschen von Tc wird Myc in der Western-Blot-Analyse wieder sichtbar (Spur 4) und nach etwa 5 h ist die maximale Expression wieder erreicht (Spur 9).

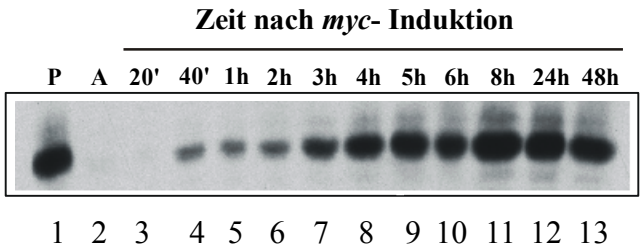

Abb. 11: *myc*-Induktion in P493-6-Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellextrakte hergestellt und Myc-Protein in einer Western-Blot-Analyse detektiert. Proliferierende Zellen (P) mit hoher Myc-Expression (Spur 1) wurden mit Tetracyclin behandelt. Die Zellen arretieren im Zellzyklus (A) und exprimieren kein *myc* (Spur 2). Nach Auswaschen von Tetracyclin wird *myc* neu induziert und erreicht nach 5h wieder die maximale Expression (Spuren 3-13).

Da endogenes *myc* in B-Zellen nicht durch Serum stimuliert wird, ist Myc nach Tc-Behandlung in P493-6-Zellen nicht mehr detektierbar (Abb. 11, Spur 2). Damit haben diese Zellen gegenüber den Fibroblasten-Systemen den Vorteil, daß endogenes *myc* in Gegenwart von Serum keine Hintergrund-Aktivität zeigt. Myc-abhängige Funktionen können also in P493-6-Zellen auch in Gegenwart von Serum sehr gut untersucht werden.

Die Myc-Protein-Menge in P493-6 ist deutlich höher als in der Mutterzellinie ER/EB2-5, die nur endogenes *myc* exprimiert. Myc wird in diesem System also überexprimiert. Die Protein-Menge ist aber vergleichbar mit den Proteinmengen, wie sie in Burkitt-Lymphomlinien beobachtet werden (Pajic *et al*. 2000).

1.2. Proliferation von P493-6-Zellen

1.2.1 Zur Proliferation benötigen P493-6-Zellen Myc und FKS

FKS reicht nicht aus, um B-Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Hat die Anwesenheit von FKS überhaupt Auswirkungen auf die Kultivierung von P493-6-Zellen? In Fibroblastensystemen wurde gezeigt, daß Myc-Aktivierung in Abwesenheit von FKS Apoptose induziert (Abschnitt I). Um in P493-6-Zellen zu untersuchen, inwieweit FKS für die Proliferation eine Rolle spielt, wurden die Zellen nach *myc*–Induktion mit und ohne FKS untersucht. P493-6-Zellen wurden dazu durch Zugabe von Tetracyclin für drei Tage arretiert. Anschließend wurde *myc* durch Auswaschen von Tc induziert und in vier verschiedenen Situationen über vier Tage kultiviert (+Myc/+FKS, -Myc/+FKS, +Myc/-FKS und -Myc/-FKS). Das experimentelle Vorgehen ist in Abb. 12 gezeigt.

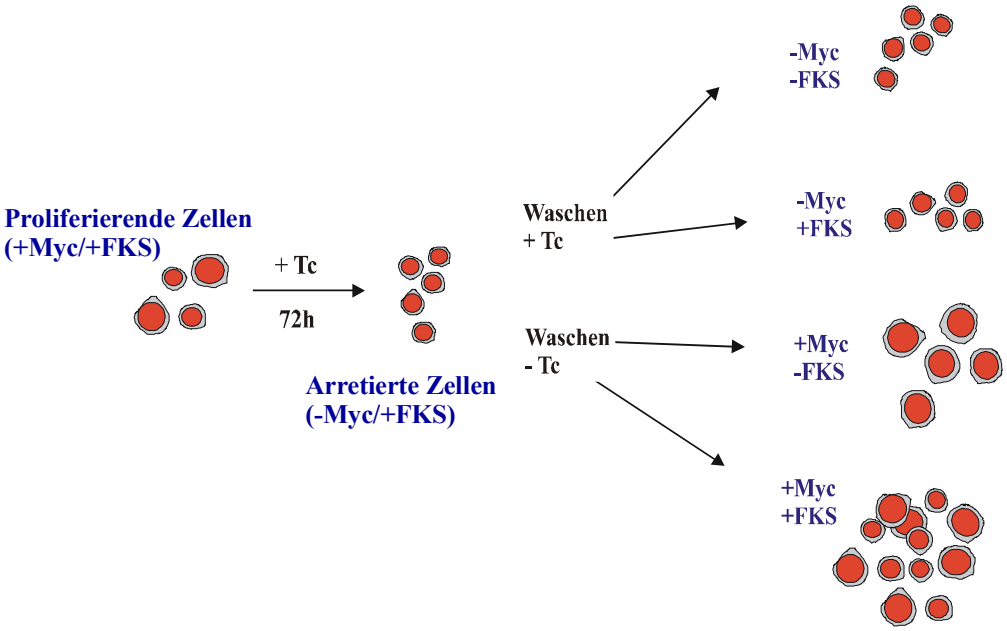

Abb. 12: Experimentelles Vorgehen bei der Untersuchung der Proliferation von P493-6-Zellen. Proliferierende Zellen (+Myc/+FKS) wurden für 72h mit Tetracyclin (Tc) behandelt und im Zellzyklus arretiert (-Myc/+FKS). Anschließend wurde eine Hälfte der Zellen mit PBS gewaschen, um Tc zu entfernen und *myc* zu induzieren (+Myc). Die andere Hälfte wurde mit Tc-haltigem PBS gewaschen (keine Myc-Expression, -Myc). Die Zellen, aus denen Tc entfernt wurde, wurden wieder halbiert und einmal in FKS-haltigem Medium kultiviert, die andere Hälfte in Medium ohne FKS (0,25%). Mit Zellen, die in Gegenwart von Tc gewaschen wurden, wurde genauso verfahren, nur daß das Medium Tc enthielt.

Die Proliferation der Zellen wurde zunächst in einer Wachstumskurve bestimmt (Abb. 13). Wie bereits beschrieben, ist die Proliferation von *myc* abhängig. Nach *myc*-Induktion traten die Zellen wieder in den Zellzyklus ein, erreichten nach vier Tagen die doppelte Zellzahl und proliferierten kontinuierlich weiter (Abb. 13, +Myc/+FKS). In Gegenwart von Tetracyclin blieb *myc* reprimiert und die Zellen arretierten in der G1-Phase des Zellzyklus. Die Zellzahl in der Kultur blieb konstant (Abb. 13, -Myc/+FKS).

Ein überraschender Befund ergab sich jedoch, als *myc* in Abwesenheit von FKS induziert wurde. Auch hier war keine Proliferation zu beobachten und die Zellzahl blieb ebenfalls konstant (Abb. 13, +Myc/-FKS). Die Myc-Expression alleine ist also nicht ausreichend, um Zellteilung zu induzieren. Die Tatsache, daß die Zellzahl konstant blieb, warf aber die Frage auf, ob in P493-6-Zellen keine Apoptose bei Serum-Entzug induziert wird, wie es für Fibroblasten und Burkitt-Lymphomzellinien beschrieben wurde (vgl. Abschnitt I, 2.4.).

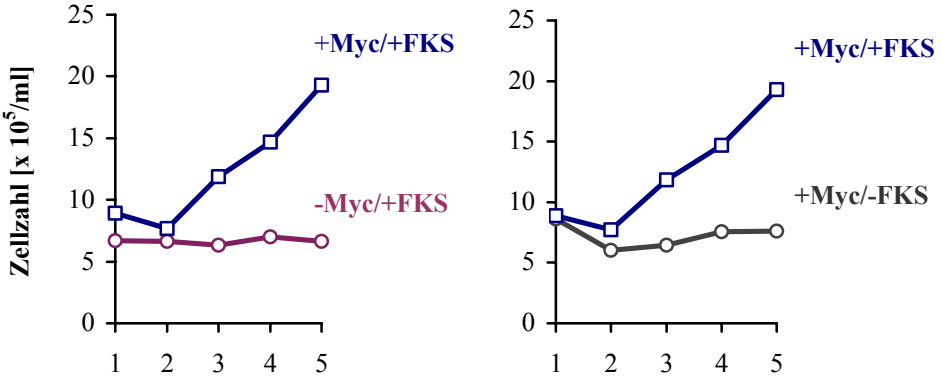

Abb. 13: Die Proliferation von P493-6-Zellen hängt von der Myc-Expression und von FKS ab. P493-6-Zellen wurden mit Trypanblau gefärbt und die Anzahl ungefärbter Zellen (Lebendzellzahl) bestimmt. Nach Auswaschen von Tetracyclin induziert Myc in P493-6-Zellen bei Anwesenheit von FKS Proliferation (blaue Linie). Zellen in Tetracyclin-haltigem Medium exprimieren kein Myc und können nicht proliferieren (rote Linie). Wird *myc*-Expression ohne FKS induziert, wird ebenfalls keine Zellteilung beobachtet und die Zellzahl bleibt konstant (graue Linie).

In Abb. 13. sind Zellzahlen von lebenden Zellen gezeigt. Der Anteil toter Zellen, die durch Trypanblaufärbung sichtbar wird, blieb bei diesen Experimenten konstant. Der Farbstoff Trypanblau ist nicht zellpermeabel und färbt tote Zellen nur dann blau, wenn die Membranstruktur der Zelle bereits beschädigt ist.

Bei Zelltod durch Apoptose bleibt die Membranstruktur jedoch oft intakt, oder die Zellen zeigen eine charakteristische Blasenbildung. Zur Identifizierung apoptotischer Zellen wurden deshalb die Farbstoffe DAPI und Propidiumjodid (PI) verwendet. Zellmembranen sind permeabel für DAPI, das DNA auch in intakten Zellen färbt. Auf diese Weise kann fragmentierte DNA in Blasen oder stark kondensierte DNA in Kernen detektiert werden, als typische Merkmale apoptotischer Zellen. Solche Zellen können dann im Mikroskop ausgezählt werden. Bei der PI-Färbung wird die DNA von fixierten Zellen zunächst mit Farbstoff gesättigt, anschließend der DNA-Gehalt einer Zelle durch Durchflußzytometrie bestimmt. Apoptotische Zellen mit fragmentierter DNA sind detektierbar als Zellen, die einen geringeren DNA-Gehalt als G1-Zellen (2n) haben.

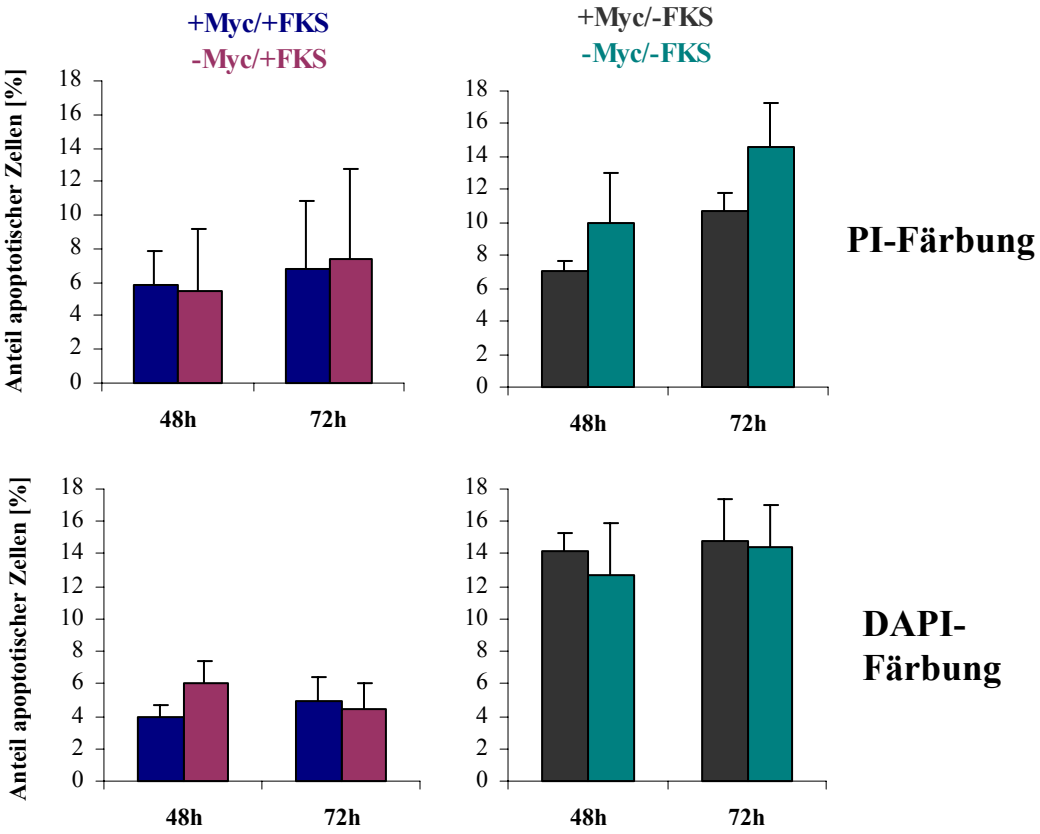

Abb. 14: Induktion von Apoptose in Abhängigkeit von Myc und FKS. In arretierten P493-6-Zellen wurde *myc* induziert oder weiter unter Tc gehalten. Dazu wurde entweder mit (links) oder ohne FKS inkubiert (rechts). Nach 48h und 72h wurde der Anteil an apoptotischen Zellen durch DNA-Färbung mit Propidiumjodid und Durchflußzytometrie bestimmt. DAPI gefärbte Zellen wurden im Mikroskop ausgezählt.

Zur Untersuchung von Apoptose wurden P493-6-Zellen behandelt, wie in Abb. 12 gezeigt. Die Zellen wurden mit den Farbstoffen DAPI oder Propidiumjodid gefärbt und die Anzahl apoptotischer Zellen wurde 48h und 72h nach *myc*-Induktion bestimmt (Abb. 14).
In beiden Experimenten stellte man einen Anteil von etwa 5% apoptotischen Zellen in der Kultur mit FKS fest. Entfernte man FKS, dann erhöhte sich der Anteil apoptotischer Zellen auf etwa 14%, bei DAPI-Färbung (Abb. 14, rechts unten), bzw. auf 7 bis 14% bei der PI-Färbung (Abb. 14, rechts oben). Zellen ohne *myc*-Expression, zeigten unter FKS-Entzug die gleiche Anzahl apoptotischer Zellen (-Myc/-FKS) wie Zellen mit *myc*-Expression bei FKS-Mangel (+Myc/-FKS). Eine Zunahme an Apoptose war deshalb nicht auf eine Myc-Aktivität zurückzuführen, sondern auf Serum-Entzug.
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Proliferation von P493-6-Zellen sowohl von der Expression von Myc, als auch von der Anwesenheit von FKS im Kulturmedium abhängt. Myc-Expression alleine ist für die Proliferation nicht ausreichend, ebenso kann die Gegenwart von FKS alleine P493-6-Zellen nicht stimulieren. Die Gegenwart von FKS konnte allerdings den Anteil von apoptotischen Zellen in der Kultur verringern.

1.2.2. Induktion von S-Phase und Zellzyklusregulation

P493-6-Zellen können ohne FKS im Kulturmedium nicht proliferieren. Ist Myc in P493-6-Zellen überhaupt in der Lage, DNA-Synthese zu induzieren, wie es für Fibroblastensysteme gezeigt wurde? Falls ja, müßten diese Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretieren.
Um diese Frage zu beantworten, wurden folgende wichtige Parameter untersucht, die anzeigen, ob Zellen in die S-Phase eintreten: die DNA-Syntheserate, die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) und die Zunahme der Cdk2/Cyclin E-Aktivität (vgl. Abschnitt I).
Zunächst wurde die DNA-Syntheserate durch Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNA bestimmt (Abb. 15). Dazu wurden die Zellen nach *myc*-Induktion 24h in der Gegenwart von ^{3}H-Thymidin inkubiert. Die eingebaute Radioaktivität wurde in vier Zeitintervallen gemessen, so daß über 96h kontinuierlich die DNA-Synthese bestimmt wurde (0-24h, 24-48h, 48-72h und 72-96h nach dem Waschen der Zellen). Abb. 15a zeigt den ^{3}H-Thymidin-Einbau nach *myc*-Induktion in Gegenwart von FKS (+Myc/+FKS) und bei FKS-Entzug (+Myc/-FKS).

In Anwesenheit von FKS nahm die DNA-Syntheserate kontinuierlich zu, während die gemessenen Werte bei +Myc/-FKS konstant niedrig blieben. Blieb *myc* durch Tc reprimiert, war keine Zunahme der DNA-Syntheserate messbar (Abb. 15b).

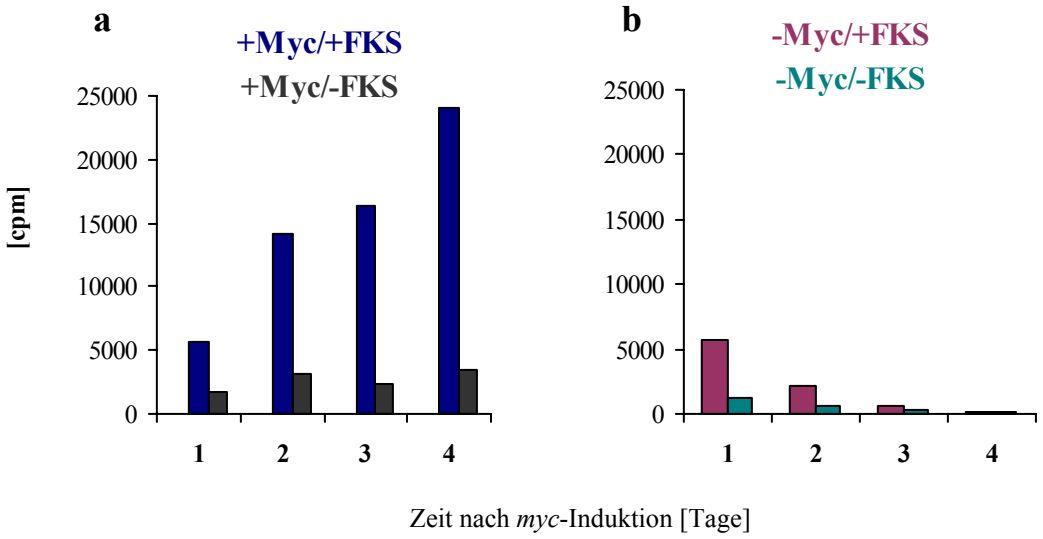

Abb. 15: DNA-Syntheseraten in P493-6-Zellen in Abhängigkeit von Myc und FKS. Die Zellen wurden nach *myc*-Induktion für jeweils 24h in Gegenwart von ^{3}H-Thymidin inkubiert: **1**: 0-24h nach *myc*-Induktion; **2**: 24-48h nach *myc*-Induktion; **3**: 48-72h nach *myc*-Induktion; **4**: 72-96h nach *myc*-Induktion. **a:** Zellen mit hoher Myc-Expression synthetisieren DNA nur in Gegenwart von FKS (blaue Balken). Ohne FKS konnte keine Erhöhung der DNA-Syntheserate festgestellt werden (graue Balken). **b:** In Gegenwart von Tc konnten die Zellen ebenfalls nicht in die S-Phase eintreten.

Als zweiter Parameter wurde der Phosphorylierungsgrad von Rb untersucht. Proliferierende Zellen (P) zeigten in der Western-Blot-Analyse mehrere phosphorylierte Rb-Formen (hyperphosphorylierte Form, Abb. 16a, Spur 1, mit Rb-P gekennzeichnet). Diese Formen treten in Zellen bei S-Phasen-Eintritt und während der S-Phase auf. Bei arretierten Zellen (A) war die nicht-phosphorylierte (hypophosphorylierte) Form dominant (Abb. 16a, Spur 2, mit Rb gekennzeichnet). Nach Induktion von *myc* in Gegenwart von FKS wurde Rb hyperphosphoryliert (Abb. 16a, Spuren 3-5, +Myc). Nach *myc*-Induktion in Abwesenheit von FKS war die hypophosphorylierte Rb-Form dominant (Abb. 16a, Spuren 6-8, +Myc). Zellen in Gegenwart von Tc blieben arretiert und zeigten ebenfalls keine Rb-Hyperphosphorylierung (Spuren 2-8, -Myc).

Damit deckten sich diese Daten mit den Ergebnissen der ^{3}H-Thymidin-Inkorporation: P493-6-Zellen konnten nach *myc*-Induktion bei Serum-Entzug nicht in die S-Phase eintreten.

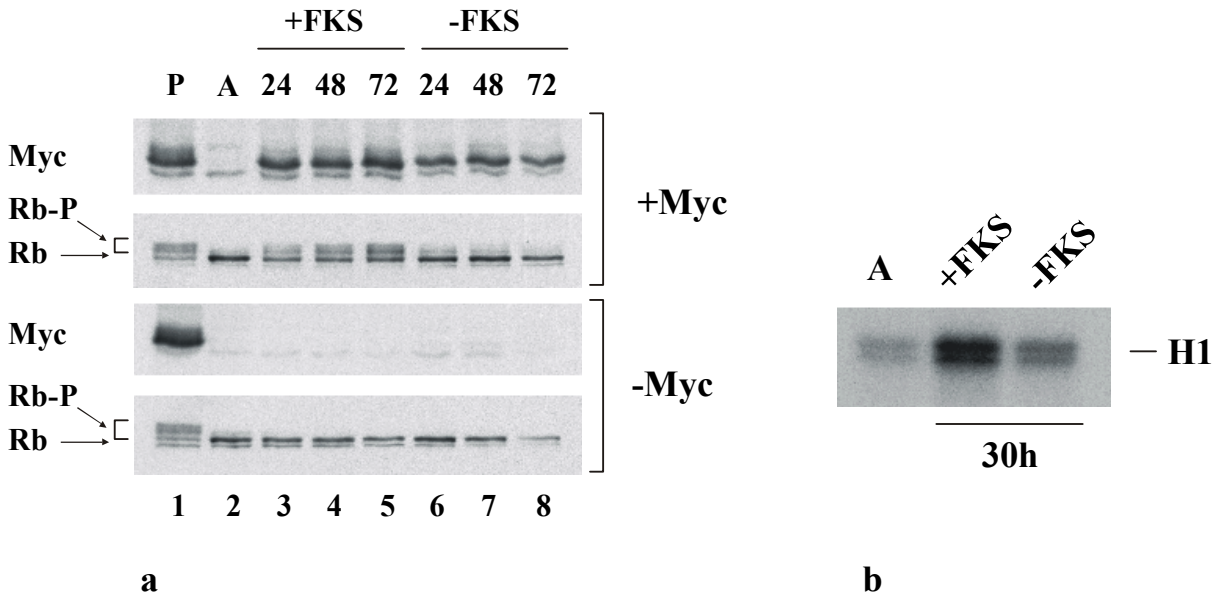

Abb. 16: Zellzyklusregulation in Abhängigkeit von Myc und FKS. P493-6-Zellen wurden behandelt, wie in Abb. 12 beschrieben. P: Proliferierende Zellen (+Myc/+FKS). A: Arretierte Zellen, 72h nach Tetracyclin-Behandlung (-Myc/+FKS). **a**: **Phosphorylierung von Rb**. Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse von Zellextrakten, die auf gleiche Zellzahl normalisiert wurden. Nur bei Expression von Myc und Kultivierung mit FKS waren hyperphosphorylierte Formen von Rb (Rb-P) detektierbar (P, Spuren 3-5 +Myc). Bei reprimiertem *myc* und/oder Fehlen von FKS war nur die hypophosphorylierte Rb-Bande nachweisbar.
b: Aktivität von Cdk2/CyclinE. Aus arretierten Zellen (A) und aus Zellen 30h nach *myc*-Induktion (mit und ohne FKS), wurden Proteinextrakte gewonnen. Cdk2 wurde mit einem Antikörper gegen CyclinE (CycE) kopräzipitiert. Die Kinaseaktivität wurde durch Inkubation gleicher Proteinmengen mit γ-[^{32}P]-ATP und Histon H1 (H1) als Substrat bestimmt. Bei Abwesenheit von FKS zeigte sich eine deutliche Reduktion der Cdk2/CycE-Aktivität (rechte Spur).

Als letzter Parameter des S-Phase-Eintritts wurde die CyclinE-gekoppelte Cdk2-Aktivität bestimmt. *myc* wurde in An- und Abwesenheit von FKS induziert, nach 30h wurden Proteinextrakte gewonnen und Cdk2 durch Inkubation mit CyclinE-Antikörpern kopräzipitiert. Das Präzipitat wurde in Gegenwart von γ-[^{32}P]-ATP und Histon H1 als Kinase-Substrat inkubiert. Die Mengen von markiertem Histon H1 wurden mittels einer Autoradiographie detektiert.

Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß die maximale Cdk2/CyclinE-Aktivität in P493-6-Zellen 30h nach *myc*-Induktion erreicht wird (Pajic *et al*., 2000). Es wurde überprüft, ob dies

auch in Abwesenheit von FKS der Fall ist (Abb. 15b). Arretierte Zellen zeigten in diesem Experiment nur geringe CycE/Cdk2-Aktivität (Abb. 15b, A). Nach *myc*-Induktion wurde die Aktivität in FKS-freiem Medium zwar schwach induziert (Abb. 15b, -FKS), blieb aber deutlich unter der Aktivität mit FKS (Abb. 15 b, +FKS). Da Rb ein Substrat von Cdk2 ist, könnte die verminderte Cdk2-Aktivität ein Grund für die ausbleibende Rb-Phosphorylierung in der +Myc/-FKS-Situation sein.
Die Ergebnisse aus Abb. 15 und 16 zeigen, daß Myc-Expression alleine nicht ausreicht, um in P493-6-Zellen die DNA-Synthesephase einzuleiten. In diesem B-Zellsystem kann Myc bei Serum-Entzug keine volle Cdk2-Aktivität induzieren, die Hyperphosphorylierung von Rb und der Eintritt in die S-Phase sind dann blockiert. Eine unbekannte Serum-Komponente wird offensichtlich benötigt, um den Zellzyklus zu aktivieren.

1.3. Myc reguliert Zellwachstum unabhängig von Zellzykluskontrolle

1.3.1. Myc-regulierte Gene bei FKS-Entzug

Nach den bisher gezeigten Ergebnissen schien es, daß die Myc-Expression bei Serum-Entzug keinen Effekt auf die Zellen hatte. Ist Myc in P493-6-Zellen unter Serum-Mangel überhaupt funktionell? Eine fehlende Serum-Komponente könnte beispielsweise an einer Modifikation von Myc beteiligt sein, die für die Zellzyklusaktivierung benötigt wird.
Erfüllt Myc bei FKS-Entzug immer noch seine Funktion als Transkriptionsfaktor? Um diese Frage zu klären, wurde die Regulation von bekannten Myc-Zielgenen bei Serum-Entzug untersucht. Dazu wurde RNA aus Zellen isoliert, in denen *myc* mit oder ohne FKS induziert wurde. Ornithin-Decarboxylase (ODC), Laktat-Dehydrogenase-A (LDH-A) und Nucleolin (NCL) sind direkte Myc-Zielgene (Bello-Fernandez *et al*., 1993; Shim *et al*., 1997 und Greasley *et al.*, 2000). Die Regulation dieser Gene wurde in einer Northern-Blot-Analyse untersucht (Abb. 17). Unter beiden Serum-Situationen wurden die untersuchten Gene bereits 8h nach Auswaschen von Tc induziert. Die Induktion von ODC und LDH-A war in Abwesenheit von FKS nach 8h etwas schwächer als in der Situation mit FKS (vgl. Spuren 2 und 5). Nach 24h wurde in allen Fällen die maximale Induktion erreicht (Spur 6). Die zeitliche Verzögerung ist wahrscheinlich auf die ebenfalls etwas schwächere *myc*-Induktion nach 8h bei FKS-Entzug zu erklären (Spur 5).

Alle getesteten Gene wurden somit unmittelbar durch Myc reguliert. Daraus ließ sich schließen, daß die transkriptionelle Aktivität von Myc auch ohne FKS noch funktionell war.

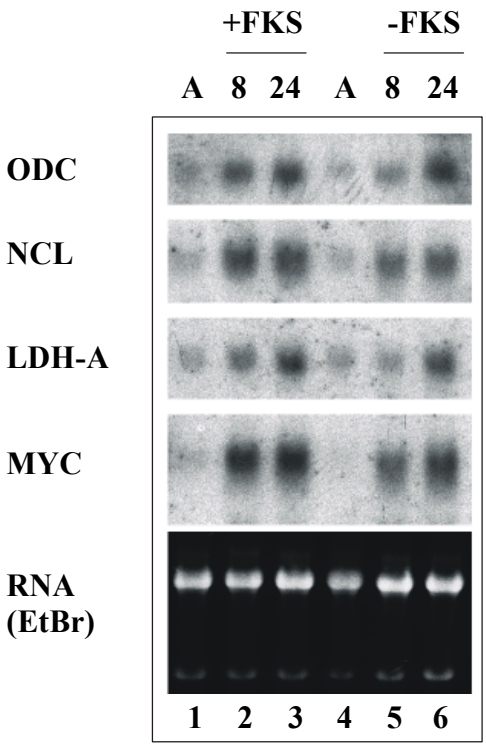

Abb. 17: Regulation bekannter Myc-Zielgene. Aus arretierten Zellen (A), 8 und 24h nach *myc*-Induktion mit oder ohne FKS wurde gesamtzelluläre RNA isoliert und eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Pro Spur wurden 10µg RNA aufgetragen, die gleichmäßige Ladung ist durch die Ethidiumbromidfärbung des Gels gezeigt (EtBr). Bei Kultivierung mit oder ohne FKS werden die Myc-Zielgene ODC, Nucleolin (NCL) und LDH-A in P493-6-Zellen induziert.

1.3.2. Zellwachstum bei FKS-Entzug

Ein wesentlicher Phänotyp der Zellen wurde bei der einfachen Beobachtung im Mikroskop deutlich. In Abhängigkeit der *myc*-Induktion veränderte sich unter FKS-Entzug die Morphologie der Zellen deutlich. Zellen aus einem Experiment wie in Abb. 12 gezeigt, wurden auf einen Objektträger getropft und im Lichtmikroskop fotographiert (Abb. 18).

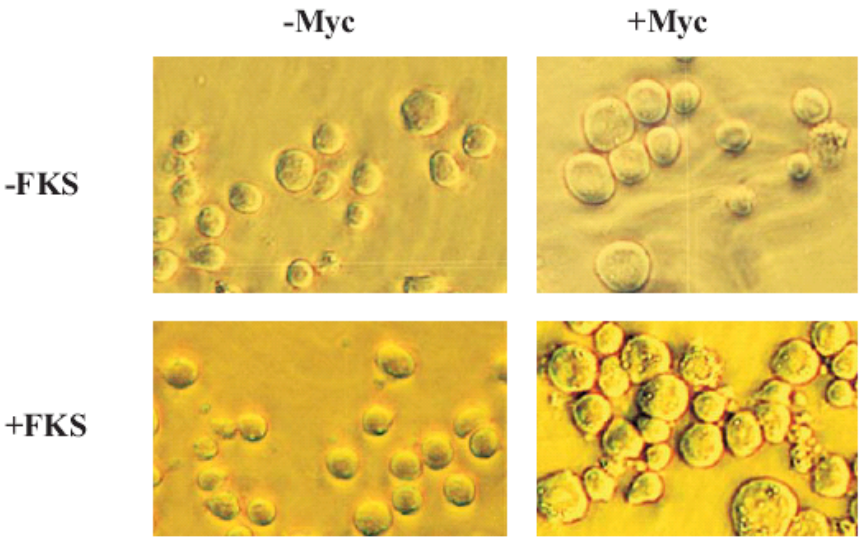

Abb. 18: Zellgrößen von P493-6-Zellen in Abhängigkeit von Myc und FKS. Die Zellen wurden den entsprechenden Kulturbedingungen entnommen und auf einen Objektträger aufgebracht. Zellen, die kein Myc exprimieren, arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus und waren klein (links oben und links unten). Zellen, mit Myc-Expression, denen FKS im Medium fehlte, konnten keine DNA-Synthese induzieren und zeigten auch keine Anzeichen von Apoptose (rechts oben). Sie nahmen aber trotzdem, wie proliferierende Zellen (rechts unten), an Zellgröße zu.

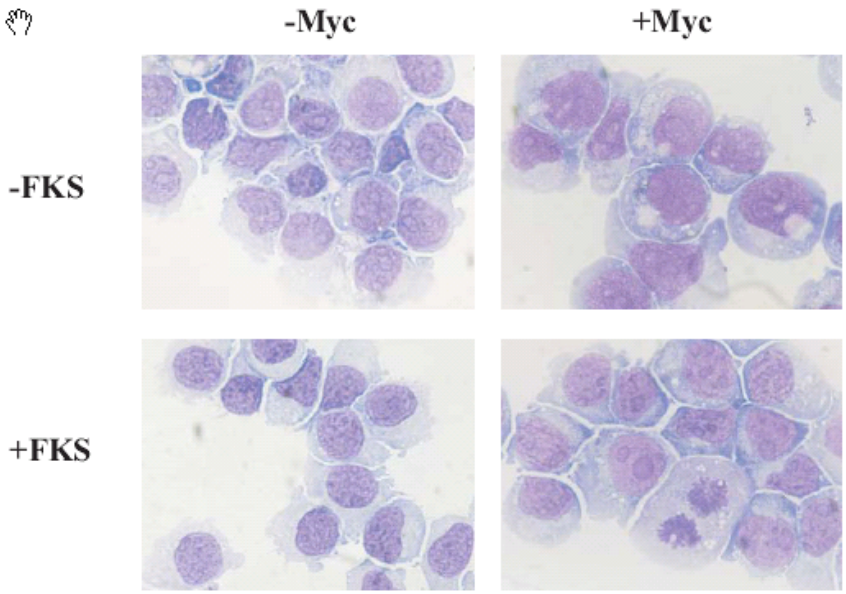

Abb. 19: Morphologie von Zytoplasma und Zellkern. Zellen wurden auf Objektträger zentrifugiert, fixiert und mit May-Grünwald/Giemsa gefärbt. Gezeigt sind Zellen wie in Abb. 18, nach Färbung von Zytoplasma und Zellkern. Auch hier erscheinen Zellen ohne Myc-Expression (linke Seite) kleiner als Myc-exprimierende Zellen. Auffällig ist außerdem der sehr große Nukleolus (bzw. mehrere große Nukleoli), bei allen Zellen (zu erkennen als dunklere runde Färbung innerhalb des Kerns).

Zellen, die Myc exprimierten, aber nicht in die S-Phase eintraten, wiesen einen hohen Anteil an auffällig großen Zellen auf (Abb. 17, rechts oben), ähnlich einer proliferierenden Kultur (Abb. 18, rechts unten). Arretierte Zellen ohne Myc-Expression, mit oder ohne FKS-Behandlung, akkumulierten dagegen als kleine Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 18, links).
Myc-Expression führte also zu einer Zunahme an Zellvolumen, wie es für die Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus notwendig ist, ohne nachfolgenden S-Phase-Eintritt.
Die Morphologie der Zellen nach Färbung von Zytoplasma und Zellkern bestätigte das Wachstumverhalten (Abb. 19). P493-6-Zellen wurden dazu auf einen Objektträger zentrifugiert und mit Aceton fixiert. Zur Färbung wurden die Farbstoffe May-Grünwald für das Zytoplasma und Giemsa für die Färbung der Kerne verwendet. Auch hier erschienen Myc-exprimierende Zellen deutlich größer als arretierte Zellen ohne Myc. Myc-exprimierende Zellen (Abb. 19, rechts) besaßen große Kerne, auffällig war die Zunahme des Zytoplasmas, verglichen mit Zellen, die kein Myc exprimierten (Abb. 19, links).

Die Größenzunahme einer Population konnte außerdem mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS) untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen der Kultur entnommen und in Gegenwart des Farbstoffs PI im Durchflußzytometer gemessen. Unfixierte Zellen nehmen PI nur auf, wenn ihre Zellmembranen beschädigt sind. So konnten tote Zellen aus der Größenbestimmung ausgeschlossen werden. Der Forward Scatter (FSC) wurde als Maß für die Zellgröße gemessen. Der FSC entspricht der Beugung des Laserstrahls, die proportional zur Zelloberfläche ist und somit als Maß für die Größe des gemessenen Partikels dienen kann.
Ein solches Experiment ist in Abb. 20 gezeigt. Arretierte Zellen wurden in drei Ansätze aufgeteilt, von denen zwei in Tc-freien Medium (+Myc) und einer in Tc-haltigen Medium gewaschen wurde. Die erhaltenen Ansätze wurden inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben für die FACS-Analyse entnommen. Das FACS-Diagramm in Abb. 20 zeigt das Größenprofil dieser Kultur unmittelbar nach dem Waschen.
Die Zellen waren klein und in G1 arretiert (a-c, rote Linien). Nach 24h wurden erneut Zellproben aus den drei Ansätzen gemessen. Bereits zu diesem Zeitpunkt ist eine Zunahme an großen Zellen erkennbar, wenn *myc* induziert wurde (a, b schwarze Linien). Zellen, die in Gegenwart von Tc inkubiert wurden, zeigten keine Veränderung im Größenprofil (c). Nach 48h war das Zellwachstum deutlich fortgeschritten (blaue Linien), während ohne Myc-Expression keine Volumenzunahme auftrat (c).

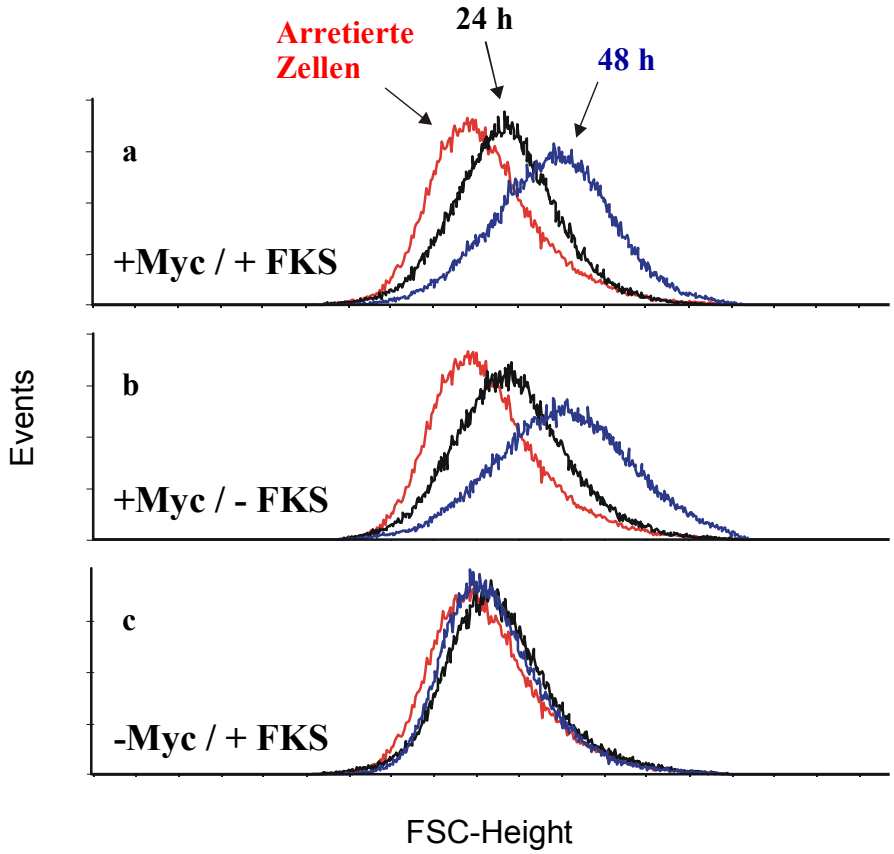

Abb. 20: Analyse der Zellgröße im Durchflußzytometer. Arretierte Zellen, die 72h mit Tc behandelt wurden, stellen sich in der Durchflußzytometrie als Population mit einheitlicher, kleiner Zellgröße dar (rote Linien). Zellproben aus denselben Populationen wurden nach 24h (schwarze Linien) und 48h (blaue Linien) erneut gemessen. Bereits nach 24h ist die Zunahme der Zellgröße erkennbar, deutlich größer sind die Zellen einer Population 48h nach *myc*-Induktion, mit (**a**) oder ohne FKS (**b**) im Kulturmedium. In Gegenwart von Tc ändert sich die Größe der Zellen nicht (**c**).

Offensichtlich kann Myc die Volumenzunahme und damit das Zellwachstum in kleinen G1-Zellen induzieren, ohne daß die Aktivierung der Zellzyklusregulation erfolgen muß.

Um diesen Befund zu erhärten, wurde der Zellzyklus durch Roscovitin, einem chemischen Inhibitor von Cdk2, in Gegenwart von FKS geblockt. Roscovitin-behandelte Zellen zeigen als Folge keine Hyperphosphorylierung von Rb und treten nicht in die S-Phase ein (Meijer und Kim, 1997; de Azevedo *et al*., 1997). Dieser Effekt von Roscovitin wurde auch in P493-6-Zellen beobachtet (Abb. 21).

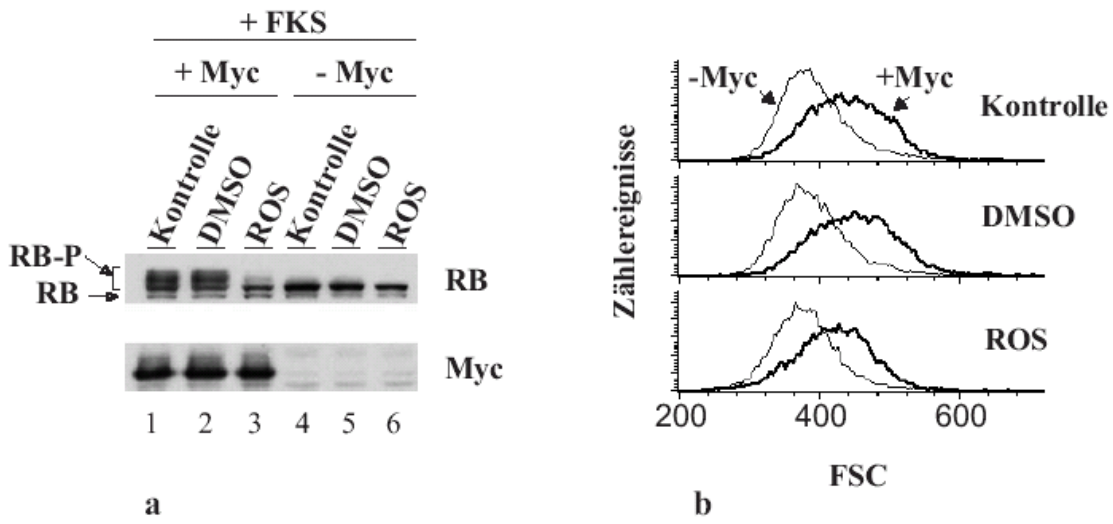

Abb. 21: Myc induziert Zellwachstum auch bei Zellzyklusblock. a: Proliferierende Zellen zeigen hyperphosphoryliertes Rb (Spur 1), während Roscovitin (ROS) die Rb-Phosphorylierung (auch bei aktivem Myc) hemmt (Spur 3). Das Lösungsmittel DMSO hat keinen Effekt (Spur 2). Ohne Myc-Expression bleibt die Rb-Phosphorylierung ebenfalls aus (Spuren 4-6). **b:** Arretierte Zellen, die 72h mit Tc behandelt wurden, stellten sich in der Durchflußzytometrie als Population mit einheitlicher, kleiner Zellgröße dar (dünne Linien). 72h nach Myc-Induktion nahm die durchschnittliche Zellgröße zu (dicke Linien). Dem Medium wurde nach dem Waschen nur FKS (oben), FKS und DMSO (Mitte) oder FKS und Roscovitin (unten) zugesetzt.

Roscovitin unterdrückt die Rb-Phosphorylierung (Abb. 21a, Spur 3), während unbehandelte Zellen oder DMSO-behandelte Zellen (das Lösungsmittel für Roscovitin) in Gegenwart von Myc hyperphosphoryliertes Rb zeigten (Abb. 21, Spuren 1 und 2) und proliferierten. Im gleichen Experiment wurde die Zellgrößenverteilung in der Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt (Abb. 21b). Das FACS-Größenprofil für arretierte Zellen (-Myc) ist in Abb. 21b als dünne Linie gezeigt. Bei Myc-Induktion nahm die mittlere Zellgröße und damit das Zellwachstum deutlich zu (Abb. 21b, dicke Linien), auch wenn der Eintritt in die S-Phase durch Roscovitin blockiert wurde (Abb. 21b, unten).

Die Untersuchungen der Abb. 18-21 zeigen, daß die Myc-Expression einen Phänotyp erzeugt, der unabhängig von der Zellzyklusregulation ausgeprägt wird. Myc ist offensichtlich in der Lage, Zellwachstum zu induzieren, unabhängig vom Eintritt der Zelle in den Zellzyklus. Myc reguliert also Zellwachstum und Zellzykluskomponenten wie Cdk2 über zwei unterschiedliche Wege.

1.3.3. Induktion von Protein-Synthese und Stoffwechsel bei FKS-Entzug

Wie kommt es in Zellen beim Eintritt in den Zellzyklus zur Volumenzunahme? Der wahrscheinlichste Mechanismus der Massenzunahme ist die Steigerung der Proteinbiosynthese- und der Metabolismusrate. Eine Erhöhung des osmotischen Potentials durch die Zunahme von Protein und die damit verbundene Wasseraufnahme könnte eine weitere Rolle spielen. Es wurde bereits gezeigt, daß Myc tatsächlich die Proteinsynthese in Fibroblasten steigern kann (Rosenwald *et al*. 1996). Um diese Beobachtung in P493-6-Zellen zu zeigen, wurde die Einbaurate von [^{35}S]-Methionin/Cystein (Met/Cys) in Protein der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden behandelt, wie in Abb. 12 gezeigt. Eine Stunde vor Entnahme der Proben wurden die Zellen gewaschen und in Met/Cys-freiem Medium inkubiert. Mit [^{35}S]-markiertem Met/Cys wurde dann für eine Stunde markiert und Gesamtprotein der Zellen mit Trichloressigsäure gefällt. Anschließend wurde die Radioaktivität des Präzipitats gemessen. Die Messung der inkorporierten Radioaktivität zeigte, daß Myc auch in P493-6-Zellen die Proteinbiosynthese steigert (Abb. 22).

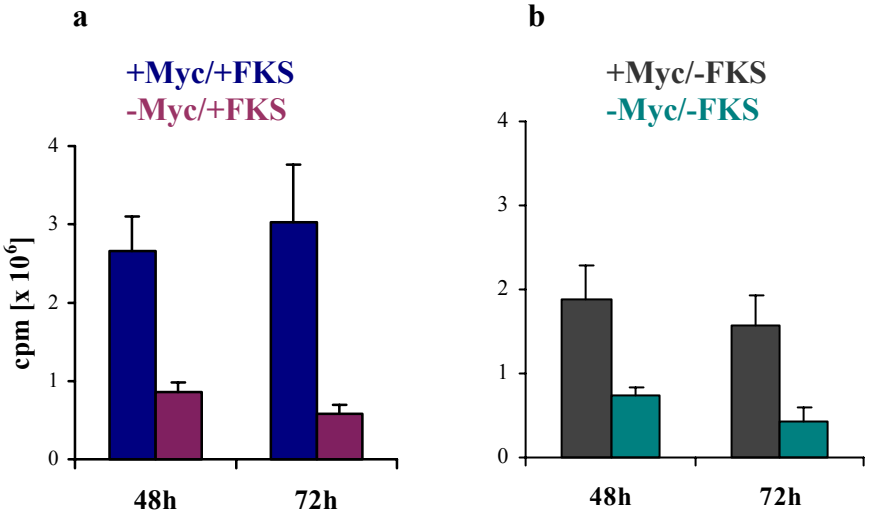

Abb. 22: Myc erhöht die Proteinsyntheserate in P493-6. Zellen wurden behandelt wie in Abb. 12 gezeigt. Nach 47h bzw. nach 71h wurden die Zellen gewaschen, in Cys/Met-freiem Medium aufgenommen und in Gegenwart von [^{35}S]-Cys/Met für 1h weiter inkubiert. Die eingebaute Radioaktivität im Gesamtprotein der Zellen wurde anschließend in Zerfällen pro Minute (cpm) bestimmt. Bei *myc*-Induktion erhöhte sich die Rate der Proteinsynthese um den Faktor 3 in Gegenwart von FKS (a) bzw. um den Faktor 2,5 ohne FKS (b), im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen ohne Myc.

Sowohl in der Situation mit FKS (Abb. 22a, +Myc/+FKS) als auch bei Serum-Mangel (Abb. 22b, +Myc/-FKS) wurden höhere Werte für den Einbau von [^{35}S]-Met/Cys gemessen als in den jeweiligen Kontrollen ohne *myc*-Induktion (-Myc/+FKS bzw. -Myc/-FKS). Die Proteinsynthese steigerte sich 48h nach Myc-Expression um den Faktor 3 in Gegenwart von FKS, bzw. um den Faktor 2,5 bei Abwesenheit von FKS.
Dies bedeutet, daß Myc auch in Abwesenheit von FKS die Proteinsynthese induzieren kann, allerdings nicht in vollem Umfang. Es handelt sich nicht um eine zeitliche Verzögerung, wie bei der Induktion von Zielgenen (Abb. 17), denn auch nach 72h ohne FKS wird die Protein-Synthese nicht mehr gesteigert. FKS trägt also zur vollen Aktivierung der Proteinsynthese bei.

Zur Analyse der Stoffwechsel-Aktivität wurde außerdem eine MTT-Analyse durchgeführt. Hierbei wird die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (SDH) gemessen, einer Komponente des Zitratzyklus. SDH reduziert ein lösliches Tetrazolium-Salz (MTT) zu einer unlöslichen Form, was zu einer Farbänderung führt. Diese Farbreaktion kann fotometrisch ausgewertet werden. P493-6-Zellen wurden unter verschiedenen Konditionen gehalten, wie in Abb. 12 beschrieben. Vier Stunden vor der Messung wurde MTT zugegeben (Abb. 23).

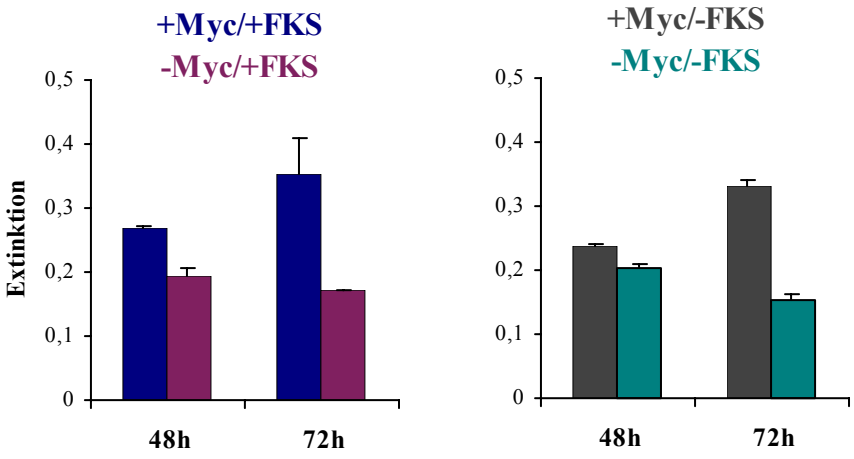

Abb. 23. Myc aktiviert SDH auch in Abwesenheit von FKS. P493-6-Zellen wurden behandelt wie in Abb. 12 gezeigt. Je 3x10^4 Zellen wurden pro Situation inkubiert. Nach 44h bzw. 68h wurde MTT dazugegeben und für weitere 4h inkubiert. Die Farbänderungen wurden fotometrisch bestimmt. Myc-Expression aktiviert SDH in Gegenwart und Abwesenheit von FKS gleichermaßen (blaue und graue Balken). Ohne Myc-Expression ist eine Grundaktivität von SDH zu beobachten, die bei längerer Inkubation in Gegenwart von Tc abnimmt (72h).

Die Ergebnisse deckten sich mit denjenigen der Analyse der Proteinsynthese. Myc-Expression führt auch unter Serum-Mangel zur Aktivierung von SDH.
Im MTT-Assay war die Wirkung der Myc-Expression erst nach 48h zu beobachten. Deshalb waren die gezeigten Effekte sicherlich eine Konsequenz der Myc-Induktion und damit indirekt. Über welche Mechanismen Myc zur Aktivierung des Zitratzyklus führt, ist offen.
Der MTT-Assay wird häufig als Indikator für Proliferation benutzt. In dem gezeigten Experiment war der Assay jedoch positiv, auch wenn Zellen nicht proliferierten (+Myc/-FKS). Also ist zu beachten, daß ein positiver MTT-Assay nicht unbedingt auch Proliferation bedeutet.
Eine weiterer Indikator für erhöhte Stoffwechselrate ist die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH). Die Aktivierung von LDH führt zum schnelleren Energiegewinn durch Milchsäuregärung. In Tumorzellen findet man häufig eine erhöhte Aktivität von LDH auch in Gegenwart von Sauerstoff (aerobe Milchsäuregärung, Warburg-Effekt). Es wurde beschrieben, daß LDH ein direktes Zielgen von Myc ist und Myc-Expression zur gesteigerten Milchsäure-Gärung führt (Shim et al. 1997). Wie in Abb. 17 gezeigt, wurde LDH in P493-6-Zellen in Gegenwart von FKS und Abwesenheit von FKS induziert. Die Produktion von Milchsäure führte zur Ansäuerung des Kulturmediums. Da das Medium den Indikator Phenolrot enthielt, war diese Ansäuerung 96h nach *myc*-Induktion durch Gelbfärbung des Mediums sichtbar, auch in Abwesenheit von FKS. Bei Tc-behandelten Zellen war das Medium auch nach 96h noch rot gefärbt (nicht gezeigt). Die Beobachtungen in P493-6-Zellen stimmen also mit den Arbeiten von Shim *et al* (1997) überein.

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß Zellwachstum eine Funktion von Myc ist. Diese Funktion äußerte sich in der Aktivierung der Proteinsynthese und von energie-gewinnenden Stoffwechselwegen, wie Zitratzyklus und der aeroben Milchsäuregärung. Myc induzierte in kleinen, G1-arretierten P493-6-Zellen die Volumenzunahme und somit die Zunahme der Zellmasse. Myc erfüllte diese Funktion, ohne daß der Eintritt in die S-Phase erfolgen mußte und unabhängig von Zellzyklusregulation. Dieser Phänotyp wurde allerdings erst nach längerer Beobachtungszeit sichtbar (24-48h), so daß unklar blieb, welche Mechanismen von Myc direkt reguliert werden, die zur Akkumulierung von Zellmasse führen. Da Myc ein Transkriptionsfaktor ist, lag die Beantwortung dieser Frage in der Identifikation von weiteren Myc-regulierten Genen. Der Schwerpunkt der weiteren Untersuchung lag deshalb auf dieser Frage, wie im nächsten Kapitel beschrieben wird.

2. Identifikation neuer Zielgene von Myc

2.1. Regulation von Myc-Zielgenen in P493-6-Zellen

Seit Myc als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde, gilt der Identifikation Myc-regulierter Gene besonderes Augenmerk. Es war naheliegend, daß Myc das Zellwachstum auf der Ebene der Transkription reguliert. Viele der noch unbekannten Myc-Zielgene könnten daher Faktoren und Enzyme sein, die Bestandteile von Stoffwechselwegen sind. Ein Schwerpunkt der Arbeit war es deshalb, mit Hilfe verschiedener Methoden neue Myc-Zielgene zu identifizieren.

Einige Myc-Zielgene konnten in früheren Arbeiten mit Methoden gefunden werden, die im Verhältnis zum Aufwand nur wenige Kandidaten brachten. Beispiele hierfür sind Nucleolin (NCL) und Nucleophosmin (NPM), die mit Hilfe einer subtraktiven cDNA-Hybridisierung identifiziert wurden. Nukleotiddiphosphat-Kinase A (nm23-H1) und eIF5A wurden durch 2D-Gelelektrophorese identifiziert (Kohlhuber *et al*., unveröffentlichte Daten).

Um die Regulation dieser Gene auf mRNA-Ebene zu zeigen, wurden Northern-Blot-Kinetiken analysiert. In arretierten P493-6-Zellen wurde *myc* induziert, die gesamtzelluläre RNA zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert. Die Northern-Blot Analyse zeigte, daß die mRNA der Kandidatengene der Induktion der *myc*-mRNA folgte. Der erste Anstieg der mRNA von NCL, NPM, nm23-H1 und cdk4 war nach 4h bis 5h zu beobachten (Abb. 24, Spur 5), der der *myc*-mRNA bereits nach 2h (Spur 3). Die maximale mRNA-Expression der genannten Gene wurde nach etwa 6h (Spur 7), die von Myc nach etwa 5h (Spur 6) erreicht. Die Induktion der Kandidatengene folgte somit der *myc*-Induktion mit einer Verzögerung von 1 bis 2h. Nur eIF5A schien bereits nach 2h induziert zu werden (Spur 3), was aber auf ungleichmäßige RNA-Mengen zurückzuführen war.

NCL wurde unabhängig von den Beobachtungen in dieser Arbeit als direktes Myc-Zielgen beschrieben (Greasley *et al*., 2000). Im NCL-Promotor findet man bei Sequenzvergleichen mit Hilfe von Datenbanken vier in Maus und Mensch konservierte Myc/Max-Bindestellen. Die Promotorstruktur ist sehr ähnlich wie die des cdk4-Gens (nächstes Kapitel, Abb. 25). NPM-mRNA wird mit der gleichen Kinetik wie NCL-mRNA durch Myc reguliert (Abb. 24). Interessanterweise finden sich im NPM-Gen keine CACGTG-Konsensussequenzen für Myc/Max-Bindestellen in der Promotor-Region.

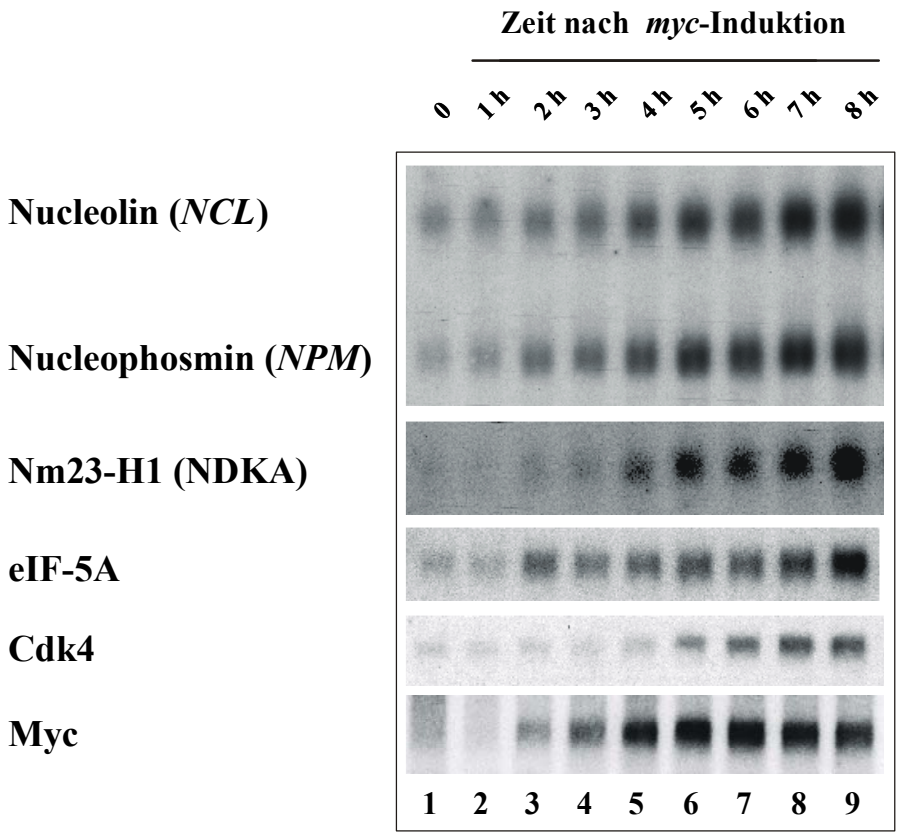

Abb. 24: Kinetik der Induktion von *myc* und von Myc-Zielgenen. Gezeigt sind vier verschiedene Northern-Blots. Für die Hybridisierungsproben von NCL und NPM wurde derselbe Blot benutzt, ebenso für die Proben von cdk4 und *myc*. Für nm23-H1 und eIF5A wurde jeweils ein eigener Blot benutzt. In allen Fällen wurden pro Spur 10µg RNA desselben Experiments aufgetragen. Myc wurde in P493-6 in Gegenwart von FKS induziert und RNA unmittelbar nach dem Waschen (0), sowie 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, und 8h nach dem Auswaschen von Tc isoliert. Nucleolin (NCL), Nucleophosmin (NPM), nm23-H1 (NDKA), eIF5A und cdk4 wurden unmittelbar nach *myc* induziert und sind neue Kandidaten für direkte Regulation durch Myc.

2.2. Cdk4 wird von Myc und TGF-β gegensätzlich reguliert

Die Zellzyklusregulation in P493-6-Zellen wurde bereits in einer früheren Arbeit untersucht. Dabei zeigte sich, daß die *myc*-Induktion rasch zur gesteigerten Synthese von Cdk4-Protein führt (Pajic *et al*., 2000). Cdk4 war daher ein guter Kandidat für ein neues Myc-Zielgen. Dies bestätigte sich in der Northern-Blot-Analyse, in der die cdk4-mRNA durch Myc induziert wurde (Abb. 24). Unabhängig von der Beobachtung in P493-6-Zellen, wurde cdk4 auch in humanen Fibroblasten als direktes Zielgen von Myc identifiziert (Hermeking *et al.*, 2000).

Der cdk4-Promotor enthält vier, in Mensch und Maus konservierte Myc/Max-Bindestellen (MBS) (Abb. 25). In Gelshift-Experimenten wurde gezeigt, daß Myc/Max-Komplexe an den Promotor binden. Myc aktiviert diesen Promotor in Konstrukten, in denen die Promotorregion an das Reportergen Luciferase ligiert wurde. Nach Deletion von MBS 3 und 4 war der Promotor nicht mehr durch Myc regulierbar, so daß vor allem diese beiden Bindestellen zur Regulation durch Myc beitragen (Hermeking *et al.,* 2000).

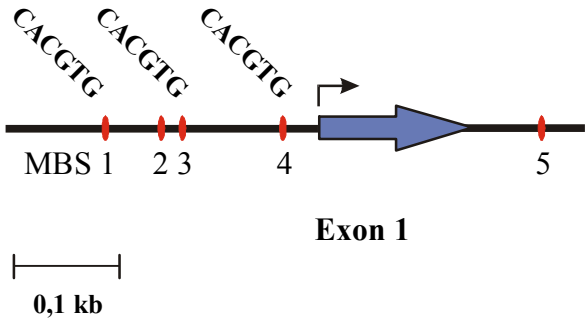

Abb. 25: Promotorregion des cdk4-Gens. Der Bereich vor dem Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil) weist vier Myc/Max-DNA-Bindestellen (MBS 1-4) in einem Bereich von 200bp auf. Der blaue Pfeil markiert das erste Exon von cdk4. In Intron 1 findet sich eine weitere MBS (MBS 5). Für die Aktivierung des Promotors durch Myc sind vor allem MBS 3 und 4 wichtig.

Eine besondere Rolle bei der Regulation der Proliferation von P493-6-Zellen spielt der Wachstumsfaktor TGF-ß. TGF-ß reguliert Signalwege, die zur Induktion und Repression von Zielgenen führen (Übersicht in Massagué *et al*., 2000a). Die Aktivierung dieser Signalwege führt in vielen Zellsystemen zum Zellzyklusarrest. Gibt man TGF-ß in das Kulturmedium, führt dies auch bei P493-6-Zellen zum Arrest (Bettina Kempkes, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung ist sehr interessant, denn in B-Zellen und Endothelzellen reprimiert TGF-ß das *myc*-Gen (Übersicht in Massagué *et al*., 2000b). In P493-6 wird *myc* aber ektopisch exprimiert, TGF-ß induziert hier also auch in Gegenwart von Myc-Protein den Zellzyklusarrest. Daher war anzunehmen, daß TGF-ß Gene reguliert, die in Signalwegen unterhalb von Myc liegen. Eine Regulation von cdk4 durch TGF-ß wurde bereits beschrieben (Ewen *et al*., 1993, 1995; Ando und Griffin, 1995). Um zu testen, ob TGF-ß-Behandlung auch zur Repression von cdk4 in P493-6-Zellen führt, wurde *myc* in Gegenwart und Abwesenheit von TGF-ß induziert. In Northern- und Western-Blot-Analysen wurde untersucht, ob TGF-ß die Induktion von cdk4 durch *myc* unterdrücken kann (Abb. 26).

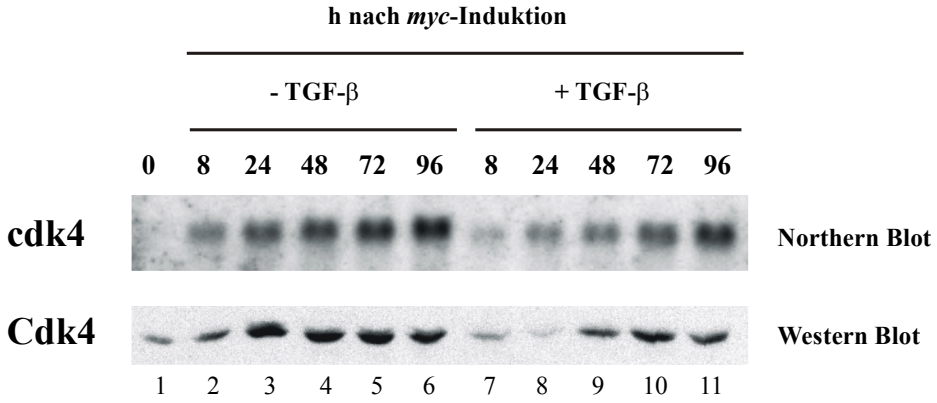

Abb. 26.: TGF-β-Behandlung verzögert die Induktion von cdk4. In arretierten P493-6-Zellen wurde *myc* induziert und entweder ohne (Spuren 2-6) oder mit TGF-ß inkubiert (Spuren 7-11). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden RNA und Protein präpariert und in einer Northern- und Western-Blot-Analyse auf cdk4-Expression untersucht.

Die Expression von cdk4 nach Myc-Induktion wurde durch TGF-ß verzögert (Abb. 26). Ohne TGF-ß waren cdk4-RNA und -Protein nach 8h bereits deutlich exprimiert. In Gegenwart von TGF-ß blieb cdk4 zunächst reprimiert (vgl. Spuren 2 und 7), auch nach 24h war in Gegenwart von TGF-ß keine cdk4-Expression zu beobachten (vgl. Spuren 3 und 8). Im weiteren Verlauf wurde cdk4 auch in Gegenwart von TGF-ß induziert, blieb aber etwa um 50% reduziert, gegenüber der Situation ohne TGF-ß. Der Eintritt in die DNA-Synthesephase war in Gegenwart von TGF-ß ebenfalls verzögert. 72h nach der *myc*-Induktion waren in Abwesenheit von TGF-ß 18% der Zellen in die S-Phase eingetreten, in Gegenwart von TGF-ß nur 8,8% der Zellen (Daten nicht gezeigt).
Welche *myc*-regulierten Gene sind an der Tumorentstehung beteiligt? Vielleicht spielen hier besonders Gene wie cdk4 eine Rolle, die durch TGF-ß und Myc gegensätzlich reguliert werden.

2.3. Identifikation von Myc-Zielgenen über die transkriptionelle Aktivität

In P493-6-Zellen konnten durch die Anwendung verschiedener Techniken bereits einige neue Myc-Zielgene identifiziert werden. Die bisher genannten Techniken (2.1.) erwiesen sich allerdings als zu aufwendig im Vergleich zur Anzahl der identifizierten Gene. Um einen umfangreicheren Überblick zu gewinnen, wurden deshalb die neu entwickelten Array-Techniken angewandt, die im Verlauf dieser Arbeit zugänglich wurden. Bei diesen Techniken

verwendet man Filter oder andere Trägersubstanzen, auf die DNA-Proben bestimmter Gene an definierter Position aufgebracht sind. RNA-Proben aus zwei Situationen, z.B. Myc-An und Myc-Aus, werden markiert und mit zwei Arrays hybridisiert. Wenn ein Gen in den beiden Situationen differentiell exprimiert wird, erzeugt es auf den beiden Arrays unterschiedlich starke Signale, die dann ausgewertet werden können. Da Position und Identität des Gens auf dem Array bekannt sind, ist der entsprechende Kandidat sofort identifizierbar.

Zunächst wurden cDNA-Filterarrays verwendet, um neue Myc-regulierte Gene zu identifizieren. Auf diesen Filtern sind 1176 verschiedene cDNA-Fragmente fixiert. Es wurden zwei verschiedene Arrays verwendet (Human 1.2 und Human Cancer 1.2, vgl. Abschnitt II, 6.1.), die zusammen 1891 verschiedene Gene repräsentieren.

Für die Markierung der Filter wurde nicht die herkömmliche Methode benutzt, bei der aus RNA-Proben cDNA hergestellt wird, die dann nach weiterer Behandlung markierte Hybridisierungsproben liefern. Hier wurden statt dessen nukleäre Run-On-Reaktionen eingesetzt. Bei der Run-On-Methode werden aus Zellen intakte Kerne isoliert, gewaschen und eingefroren. Bei diesem Prozeß werden bereits initiierte RNA-Polymerase II-Komplexe, mit ihren naszierenden RNAs „eingefroren“. Werden die Kerne aufgetaut und in Gegenwart von Nukleotiden inkubiert, wird die Transkription wieder aufgenommen. Bei der Inkubation wird radioaktiv markiertes CTP dazugegeben, so daß die naszierende RNA radioaktiv markiert wird. Diese RNA wird isoliert und kann mit den Filterarrays hybridisiert werden. Da im Run-On nur naszierende, also gerade transkribierte mRNA radioaktiv markiert wird, kann mit dieser Methode eine Veränderung der Transkriptionsrate eines Gens gemessen werden.

Das Ergebnis eines solchen Experiments zeigt Abb. 27. Die Kerne wurden aus Zellen gewonnen, in denen *myc* für vier Stunden induziert wurde (Abb. 27 unten, ‘+Myc’). Die Kerne der Kontrolle stammten aus arretierten Zellen, die unter gleichen Bedingungen, allerdings in Gegenwart von Tc inkubiert worden waren (Abb. 27 oben, ‘-Myc’). Insgesamt wurden fünf voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Im fünften Experiment wurden neben den Kernen der 4h *myc*-Induktion zusätzlich Kerne nach 2, 6, 8h und aus proliferierenden Zellen (P) in einer Kinetik untersucht (Abb. 28). Für drei Experimente wurde der Filter ‚Human 1.2’ verwendet, für die beiden anderen Experimente der Filter ‚Human Cancer1.2’.

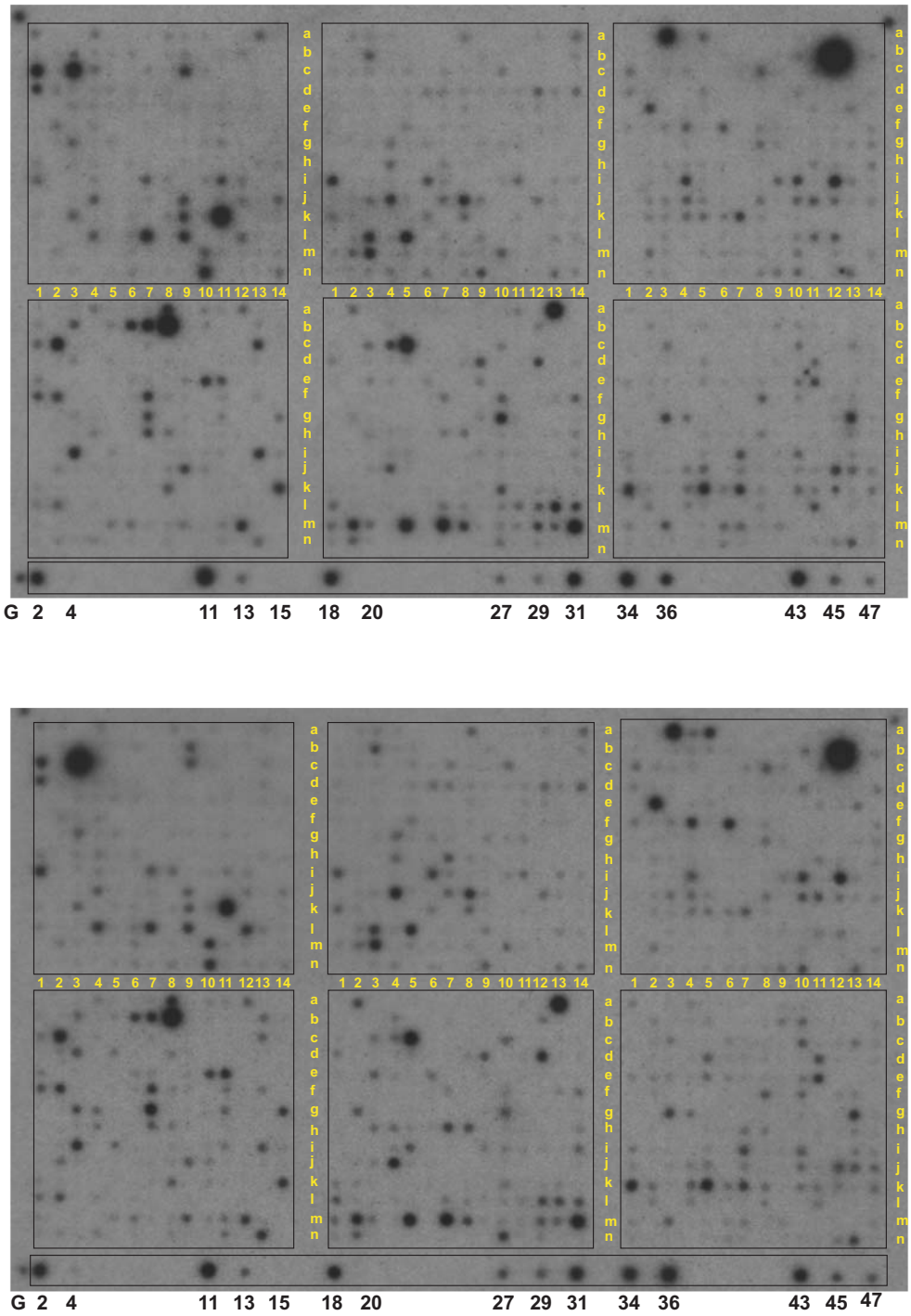

Abb. 27: Transkriptionsrate von Myc-Zielgenen in nukleären Run-On-Experimenten. Aus arretierten Zellen (-Myc) und 4h nach *myc*-Induktion (+Myc) wurden je $2x10^7$ Kerne isoliert. In Run-On-Reaktionen wurde radioaktiv markierte RNA gewonnen. $30x10^6$ cpm dieser Reaktion wurden je Filter eingesetzt. Nach dem Waschen wurden die Filter für drei Wochen autoradiographiert. Reproduzierbare induzierte und reprimierte Gene sind in Tabelle 3 aufgelistet. Ein Filter ist in sechs Sektoren aufgeteilt: A, B, C (obere Reihe) und D, E, F (untere Reihe). Die Position eines Gens ist durch einen Großbuchstaben für den Sektor, der Zahl und einem kleinen Buchstaben für die Koordinaten gegeben (z.B. A3c für *myc*). In der G-Reihe sind Haushalts-Gene und Kontrollen aufgetragen, wie Ubiquitin (G11), GAPDH (G27), Tubulin- (G29) oder -Aktin (G43).

Nach 4h *myc*-Induktion zeigten sich deutliche Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität gegenüber Tc-behandelten Zellen. Gene, die reproduzierbar induziert oder reprimiert waren, sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die mit **c** gekennzeichneten Gene sind nur auf dem Human Cancer 1.2-Filter lokalisiert und wurden daher nur in zwei unabhängigen Experimenten reproduziert. Insgesamt wurden 33 induzierte und 8 reprimierte Kandidaten in Tabelle 3 aufgenommen. Die Gene wurden nach ihrer Funktion in mögliche Gengruppen unterteilt. Einige der Kandidaten wurden bereits als mögliche Myc-Zielgene beschrieben, was die Ergebnisse der Hybridisierungen bestätigte (in Tabelle 3 mit **a** gekennzeichnet). Schon beschriebene induzierte Gene sind LDH-A (Shim *et al*., 1997), ODC (Bello-Fernandez *et al*., 1993) und HDGF (Coller *et al.*, 2000). Als reprimiert wurden bereits *gadd*45 (Constance *et al*., 1996) und CTGF (Coller *et al*., 2000) beschrieben.

Nm23, das bereits mit anderen Techniken gefunden wurde (2.1.), fand sich in diesen Experimenten auch wieder. Allerdings war der Kandidat auf den Filterarryas nm23-H2 (Position A9b in Abb. 27) und nicht nm23-H1 (Position A10b in Abb. 27), wie bei den anderen Techniken. nm23-H1 erzeugte auf den cDNA-Filtern kein detektierbares Signal. Bei CyclinD zeigt sich eine ähnliche Diskrepanz. In der Arbeit von Pajic *et al*. (2000) wurde vor allem die Regulation von CyclinD2 beschrieben, während CyclinD3 im Western-Blot kaum detektierbar war. CyclinD2 (Position A7i in Abb. 27) zeigt aber im Array kaum Änderung der transkriptionellen Aktivität, statt dessen aber cyclinD3 (Position A8i in Abb. 27). In den cDNA-Sequenzen von nm23H1 und H2 bzw. von cyclinD2 und cyclinD3 befinden sich Bereiche mit hoher Homologie. Möglicherweise tritt bei cDNA-Filterarrays das Problem auf, daß Gene einer Genfamilie nicht genau differenzierbar sind (siehe Abschnitt IV).

Um den zeitlichen Verlauf der Induktion zu untersuchen, wurden die Run-On-Experimente zusätzlich mit verschiedenen Zeitwerten durchgeführt (Abb. 28). Run-On-markierte RNA aus arretierten Zellen (0), aus Zellen 2, 4, 6, 8h nach *myc*-Induktion und aus proliferierenden Zellen (P) wurde auf sechs verschiedene Filter hybridisiert und die Kinetiken einzelner Gene aus Tabelle 3 verglichen.

Bei einigen Genen war die Transkriptionsrate bereits zwei Stunden nach *myc*-Induktion erhöht, wie bei nm23, RFC4, MCM4, PAC-1, FGFR3, ADAM9, DSC3 und LDH-A (Abb. 22). Diese Gene könnten daher direkte Myc-Zielgene sein.

Array-Position		Accession	Gruppe Gen-Beschreibung	Regulation durch Myc
			Protein-Synthese	
B14d		X85106	S6KII-α2 (Ribosomales Protein S6 Kinase alpha 2)	induziert
F 8k	**c**	U78525	EIF3 (Translations Initiation Factor 3 β-Untereinheit)	induziert
F13j	**c**	X51466	EEF-2 (Elongation Factor 2)	induziert
F14j	**c**	M60854	S16 (40S Ribosomales Protein)	induziert
F 2k	**c**	U14970	S5 (40S Ribosomales Protein)	induziert
			Nucleotid-/ DNA-Synthese	
A 9b		L16785	Nm23-H2 (Nucleosid Diphosphat Kinase B)	induziert
C 4f		M87339	RFC4 (Replikations Faktor C 37 kDa-Untereinheit)	induziert
C 6f		X74794	MCM4 (DNA replication licensing factor)	induziert
F10b		J05272	IMPDH1 (Inosin-5'-Monophosphat Dehydrogenase 1)	induziert
F11d	**c**	X91247	Thioredoxin-Reduktase	induziert
			Zellzyklus Kontrolle	
A12l		M34065	CDC25C	induziert
A 8i		M92287	CyclinD3	induziert
			Transkription / Splicing	
A13c		X16707	FRA-1 (Fos-related antigen)	induziert
F10i	**c**	L22253	SFRS7 (Splicing Factor, Arginine/Serine reich 7)	induziert
A13l		L23959	DP-1 (Transkriptions Faktor)	induziert
			Signal Transduktion	
	b	M24898	THRA1 (Thyroid Hormon Rezeptor, c-ERBA-1)	induziert
B 7h		L11329	PAC-1 (Dual-specific protein phosphatase)	induziert
D 5i		M58051	FGFR3 (Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor 3)	induziert
E12d		X14445	FGF-3 (Fibroblasten Wachstumsfaktor-3)	induziert
E 4b	**a**	D16431	HDGF (Hepatoma-derived growth factor)	induziert
E 4j		U41766	ADAM9 (Metalloprotease, MDC9)	induziert
E 6e		L36034	PBSF (Pre-B cell stimulating factor)	induziert
F 8l		D63485	KIAA0151 (Putative serine/threonine kinase)	induziert
	b	M59371	EPHA2 (Ephrin Typ-A Rezeptor 2)	induziert
	b	L41939	EPHB2 (Ephrin Typ-B Rezeptor 2)	induziert
E12b		M60278	HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor)	induziert
			Zelladhäsion	
D 3g	**c**	L34059	CDH4 (Retinal-Cadherin)	induziert
D 7g	**c**	M94151	CTNNA2 (Alpha-Catenin verwandtes Protein)	induziert
D11g	**c**	U53786	EVPL (Envoplakin)	induziert
D14g	**c**	X83929	DSC3 (Desmocollin Typ 3)	induziert
E14i		D50477	MMP16 (Membran-Matrix Metalloproteinase 3)	induziert
			Verschiedenes	
F 5d	**a, c**	X02152	LDH-A (Lactat-Dehydrogenase A)	induziert
F 5e	**a, c**	X16277	ODC (Ornithin Decarboxylase)	induziert
			Reprimierte Gene	
D13c	**c**	U10485	JAW1 (Lymphoid-spezifisches Membran Protein)	reprimiert
A14n		M20681	GLUT3 (Glukose Transporter 3)	reprimiert
F 6m	**c**	X03557	IFI56 (Interferon induziertes 56-kDa Protein)	reprimiert
A11i		U11791	Cyclin H	reprimiert
			Wachstumsarrest	
A13a		M62397	MCC (Colorectal mutant cancer protein)	reprimiert
C 9i	**a**	M60974	GADD45 (Growth arrest & DNA-damage-inducible protein)	reprimiert
D13i	**c**	D50683	TGFR-2 (Transforming growth factor, beta receptor II)	reprimiert
E 4c	**a**	M92934	CTGF (Connective tissue growth factor)	reprimiert

Tabelle 3: Myc-regulierte Gene, die in Run-On Experimenten auf cDNA-Filterarrays identifiziert wurden. *Spalte 1*: Position auf dem Filter (Abb. 27), *Spalte 2*: Kennzeichnung der cDNA-Sequenz in der GenBank-Datenbank, *Spalte 3*: Genbeschreibung nach Clontech, *Spalte 4*: Art der Regulation durch Myc.

a Gene, die bereits als *myc* regulierte Gene beschrieben wurden.

b nur auf dem Human 1.2 Filter lokalisiert, **c** nur auf dem Human Cancer1.2 Filter lokalisiert

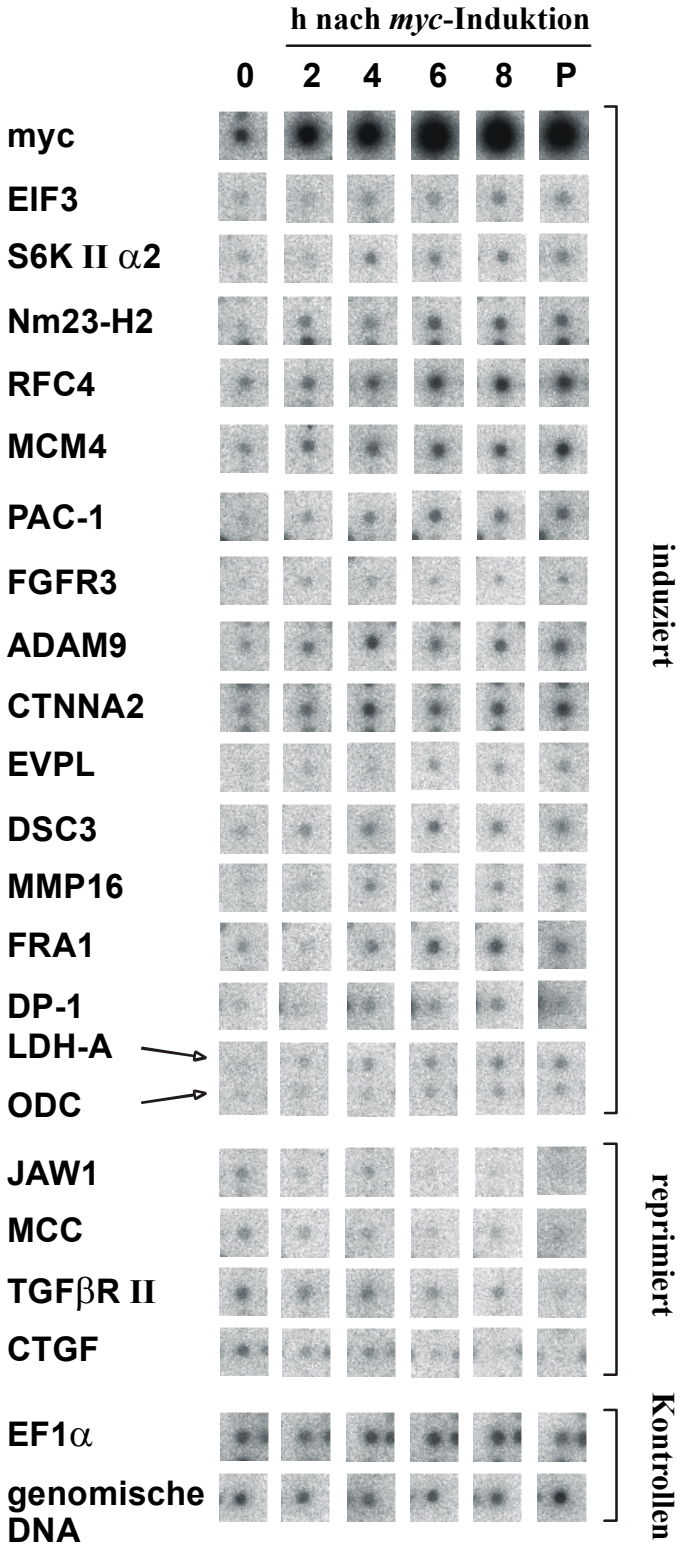

Abb. 28: Induktion der Transkription einiger Kandidatengene in Run-On-Kinetiken. Kerne aus arretierten Zellen (0), Zellen nach *myc*-Induktion (2, 4, 6, 8h) und aus proliferierenden Zellen (P) wurden für Run-On-Reaktionen präpariert und die markierte RNA auf sechs verschiedene Human Cancer 1.2-Filter hybridisiert. Die Signale einiger Kandidaten aus Tabelle 3 wurden nebeneinander als Kinetik dargestellt.

2.4. Identifikation von Myc-Zielgenen mit Genchips

Eine weitere Untersuchung der Genexpression in P493-6-Zellen wurde mit Oligonukleotid-Arrays (Genchips) durchgeführt. Diese Genchips repräsentieren eine umfangreichere Bibliothek an bekannten Genen (6800 verschiedene Gene) als die cDNA-Filterarrays. Auf den verwendeten Genchips sind cDNAs nicht durch größere cDNA-Fragmente repräsentiert, sondern durch 10 verschiedene Oligonukleotide, die eine Länge von durchschnittlich 20 Nukleotiden besitzen. Die Oligonukleotide sind so gewählt, daß sie eine hohe Hybridisierungsspezifität für das jeweilige Gen aufweisen. Mit diesem Verfahren wird eine höhere Spezifität gegenüber den cDNA-Arrays erreicht. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Genchips findet sich in Abschnitt II, 6.2.3.
Für die Hybridisierung der Chips werden RNAs verwendet, die in einer *in-vitro*-Transkription durch biotinylierte Nukleotide markiert werden (vgl. Abschnitt II, 6.2.1.). Biotinylierte Nukleotide können von RNA-Polymerase II nicht verwertet werden, so daß eine Run-On-Markierung in diesem Fall nicht möglich war.
Für die Markierung wurde Gesamt-RNA 4 und 8h nach *myc*-Induktion aus P493-6-Zellen präpariert, markiert und mit den Genchips hybridisiert. Die Experimente wurden zweimal durchgeführt. Induzierte bzw. reprimierte Kandidaten, die in beiden Experimenten reproduzierbar waren, wurden ausgewertet. Die Menge der Daten aus 6800 analysierten Genen machte es notwendig, Kriterien für die Auswahl der Kandidatengene zu treffen. Folgende Kriterien wurden eingesetzt:
-Es wurden nur Kandidaten analysiert, die als ‚present' (P) erkannt wurden, also ein signifikantes, auswertbares Signal auf dem Chip zeigten (Abschnitt II, 6.2.4.3.). Ein Kriterium dafür ist der AvgDiff-Wert (Abschnitt II, 6.2.4.4.), der ein Maß für die Abundanz einer RNA ist. Der AvgDiff mußte mindestens 200 betragen.
-Gene mußten induziert oder reprimiert sein (Abschnitt II, 6.2.4.5.).
-Die Induktion (Fold Change, vgl. Abschnitt II, 6.2.4.6.) mußte mindestens Faktor 3 in Experiment 1 und Faktor 2 in Experiment 2 betragen. Die Fold Change war in Experiment 1 generell etwas höher als in Experiment 2, weshalb diese Schwelle willkürlich gewählt wurde. Für reprimierte Gene wurde in beiden Experimenten Faktor 0,5 gewählt.

Vier Stunden nach *myc*-Induktion erfüllte keines der Gene auf dem Chip die genannten Kriterien außer *myc* selbst. Gene, die für JTV-1, p130, Gu und Kinase A-Ankerprotein

codieren, wurden zwar nach 4h in beiden Experimenten als induziert gefunden (Tabelle 3), erfüllten aber die Kriterien nicht. Da die *myc*-mRNA selbst erst nach 4h das Maximum erreicht (vgl. Abb. 24), war eine Detektierung von Myc-Zielgenen zu diesem Zeitpunkt wohl nicht zu erwarten. Das Experiment wurde durchgeführt, um eventuell Gene zu identifizieren, die sehr schnell von Myc reguliert werden.

Das Ergebnis der 8h-Werte mit den geforderten Kriterien ist in Tabelle 4 gezeigt. Insgesamt wurden 74 induzierte und 8 reprimierte Kandidatengene gefunden. In anderen Arbeiten wurden davon bereits 10 Gene als Myc-Zielgene beschrieben (in Tabelle 4 mit [a] markiert).

Mehr noch als in Tabelle 3, finden sich bei der Verwendung von Genchips Kandidaten, die in Stoffwechselwegen involviert sind, wie Aminosäure- und Nukleotidsynthese, Fettstoffwechsel, Transport von Metaboliten, usw. Auf die Bedeutung der in Tabelle 3 und 4 gefundenen Ergebnisse wird in der Diskussion eingegangen.

Wie in Abschnitt II näher beschrieben wurde, ist der AvgDiff-Wert bei dieser Analyse ein Kriterium für die Kopienzahl einer RNA in der Zelle (Abundanz). Um die in diesem Experiment detektierten RNAs hinsichtlich ihrer Abundanz zu vergleichen, wurden die AvgDiff Werte der Gene aus Tabelle 4 analysiert (Abb. 29).

78 % der Gene lagen über dem Wert 2000 (Abb. 23), was darauf hindeutet, daß nur wenige der Kandidatengene schwach abundant exprimiert sind. Ein Wert von 2000 ist in der Northern-Blot-Analyse bereits deutlich erkennbar (Abb. 30, p130 nach 4h). Mit dieser Methode finden sich also hauptsächlich stark exprimierte Gene (vgl. Abschnitt IV).

Accession	Induktion Exp1/Exp2	Gruppe Gen-Beschreibung
		Aminosäure -/ Protein-Synthese
D00723	11.8 / 6.9	Hydrogen Carrier Protein
U24169	4.3 / 2	JTV-1 [b]
D28473	3.4 / 3.5	Isoleucyl-tRNA Synthetase[a]
M77836	3.2 / 4.7	Pyrroline 5-Carboxylat Reduktase
X59303	2.8 / 3.1	Valyl-tRNA Synthetase
X06323	2.7 / 3	L3 (Ribosomales Protein MRL3)
		Fettstoffwechsel
M94856	12.4 / 5.1	Fettsäuren-bindendes Protein[a]
D50678	7 / 3.9	Apolipoprotein E Rezeptor 2
D4204	3.9 / 2.9	KIAA0089 (Glycerinphosphat-Dehydrogenase)
X75252	3 / 2.1	Phosphatidylethanolamin bindendes Protein
S80437	3.4 / 4.9	Fettsäure Synthase
U23942	3.5 / 1.8	Cytochrome P450 (CYP51)
D10040	3.4 / 2.4	Acyl-CoA Synthetase
X79888	3 / 5.4	AUH (RNA bindendes Protein mit Enoyl-CoA Hydratase Aktivität)
		Protein-folding /-turnover
U07550	3.1 / 2.3	Chaperonin 10
X87212	3.7 / 2.2	Cathepsin C
M30496	3.8 / 2.3	Ubiquitin Carboxyl terminale Hydrolase (PGP9.5)
		Nukleotid-/ DNA-Synthese
D78586	2.8 / 3.6	CAD[a]
U00238	27.3 / 23.3	GPAT (Gln-PRPP Amidotransferase)
Y00971	3.8 / 7.5	PRPP Synthetase Untereinheit II
HG4157	3.1 / 2.1	Glycinamid Ribonucleotid Synthetase
D78335	9.4 / 34.8	UMK (UMP Kinase)
L35035	9.4 / 3.2	RPI (Ribose 5-Phosphat Isomerase)
X52142	5.8 / 4.2	CTP Synthetase
X60673	5.6 / 3.8	AK3 (Adenylat Kinase)
X17620	4.6 / 4.1	Nm23 (Drosophila Awd Homolog)
J04031	3.6 / 2.1	MTHFD
M94065	3.3 / 1.9	Dihydroorotat Dehydrogenase
X53793	9.1 / 9.7	ADE2H1 (AIR Carboxylase)
U21090	3.6 / 3.4	DNA Polymerase δ kleine Untereinheit
		Nucleolus / RNA-bindende Proteine
U86602	4.8 / 3	Nucleoläres Protein p40
D21262	7 / 4	KIAA0035 (p130) [b]
U41387	6.1 / 4	Gu Protein [b]
U38847	2.5 / 3.6	TRP-185 (TAR RNA loop bindendes Protein)
U28042	4.3 / 4.2	DEAD Box RNA Helikase [a]
U07231	3.6 / 2.5	GRSF-1 (G-reicher Sequenz Factor-1)
X74987	4.9 / 5.8	2-5 Oligoadenylat bindendes Protein
		Transport
M83416	3.3 / 2.7	4F2hc/CD98E1 (Aminosäure-Permease)
Z97074	5.4 / 5.2	Rab9 Effektor p40
D00591	5.2 / 3.4	RCC1 [a]
U51478	4.4 / 2	Na, K –ATPase β3 Untereinheit
L31801	3.3 / 2.2	SLC16A1 (Monocarboxylat Transporter) [a]
L20859	3.1 / 2.5	GLVR1 (Leukemie Virus Rezeptor 1)
		Antioxidative Enzyme
U25182	5.1 / 3.6	AOE37-2 (Thioredoxin Peroxidase)
L29008	4.7 / 5.3	L-iditol-2 Dehydrogenase
U46499	4.6 / 3.7	GST12 (Glutathion Transferase)

Accession	Induktion Exp1/Exp2	Gruppe Gen-Beschreibung
		Transkription / Splicing
U09564	4.2 / 4.4	SRPK1 (Splicing Faktor/Serin Kinase)
M37197	3.9 / 2	CBF (CCAAT-box-binding factor) [a]
L07648	3.2 / 2.4	MXI1
U37689	3.1 / 2.2	hsRPB8 (RNA polymerase II-Untereinheit) [a]
U07563	2.4 / 3	c-abl
M88279	5.4 / 3.3	FKBP52 (Immunophilin) [a]
		Verschiedenes
AB000449	3.2 / 2	VRK1
L00058	15.1 / 22.8	c-myc
X15306	5.4 / 3.3	NF-H (Neurofilament)
X97335	4.3 / 3.9	Kinase A-Anker Protein (AKAP149) [b]
M34338	3.2 / 3.1	Spermidin Synthase
U12595	6 / 5	TRAP1 (TNF 1 assoziiertes Protein) [a]
M22877	3.5 / 3.1	HCS (Somatisches Cytochrome c)
U43747	3.7 / 2.4	Frataxin (FRDA)
U37022	3.2 / 1.9	CDK4
		Unbekannte Funktion
U02609	20.5 / 28.2	SazD (Transducin ähnliches Protein)
D78611	2.8 / 3.2	MEST
L19183	5.3 / 3.4	MAC30
L48692	2.4 / 4	Homo sapiens clone p5-23-3 mRNA
X82125	5.5 / 6.8	HOK-2
U41060	3.8 / 2.5	LIV-1 (Brust Krebs, Östrogen reguliertes Protein)
D13645	3.7 / 3.3	KIAA0020
D31887	7.4 / 3.9	KIAA0062
D25218	3.3 / 2.2	KIAA0112
D29958	4.3 / 2.3	KIAA0116
D50914	4.1 / 4.6	KIAA0124
D28589	3.1 / 2.7	KIAA0167
D80001	5.4 / 4.7	KIAA0179
D87466	2.4 / 3	KIAA0276
		Bekannte Myc-Zielgene, um weniger als Faktor 3 induziert
U02020	2.7 / 2.4	PBEF (Pre-B cell enhancing factor) [a]
M33764	1.4 / 1.7	ODC (Ornithine decarboxylase) [a]
X02152	1.5 / 1.8	LDH-A (Lactat-Dehydrogenase-A) [a]
D38076	2.5 / 2.2	RanBP1 (Ran bindendes Protein 1) [a]
X01060	1.6 / 2.1	Transferrin Rezeptor [a]
M61832	nd / 2.5	AHCY (S-adenosylhomocystein Hydrolase) [a]
L33842	2.5 / 2.6	IMPDH2 (Type II Inosin-Monophosphat Dehydrogenase) [a]
		Reprimierte Gene
M54992	0.37 / 0.45	B-Zell Differenzierungs Antigen
AF006087	0.2 / 0.5	ARC20 (Arp2/3 Protein Komplex Untereinheit p20)
M83652	0.38 / 0.36	Complement component properdin
M97796	0.5 / 0.4	Id-2 (Helix-Loop-Helix Protein)
U40282	0.5 / 0.5	ILK (Intregin-linked kinase)
J04430	0.5 / 0.45	Tartrat-resistente Säure-Phosphatase 5
U72882	0.5 / 0.3	IFP35 (Interferon-induziertes Leucin Zipper Protein)
D29642	0.5 / 0.4	KIAA0053

Tabelle 4: Liste der Myc-regulierten Gene, die mit Oligonukleotid-Microarrays identifiziert wurden. *Spalte 1*: Kennzeichnung der Datenbank, *Spalte 2*: Induktion durch *myc*, *Spalte 3*: Genbeschreibung nach Affymetrix. Aufgelistet sind die Gene, die in zwei unabhängigen Experimenten (Exp1 und Exp2) differentiell reguliert waren. In der Tabelle wurden nur Gene berücksichtigt, die in Exp1 mindestens um Faktor 3 induziert oder reprimiert waren, und in Exp 2 mindestens um Faktor 2 induziert oder Faktor 2 reprimiert waren.

[a] Diese Gene wurden bereits als Myc-reguliert beschrieben.

[b] Gene, die für diese Proteine codieren, wurden auch nach 4h in beiden Experimenten gefunden: JTV-1 (1,7/1,5); p130 (3,5/1,7); Gu (2,4/2,1); Kinase A-Ankerprotein (4,6/1,7).

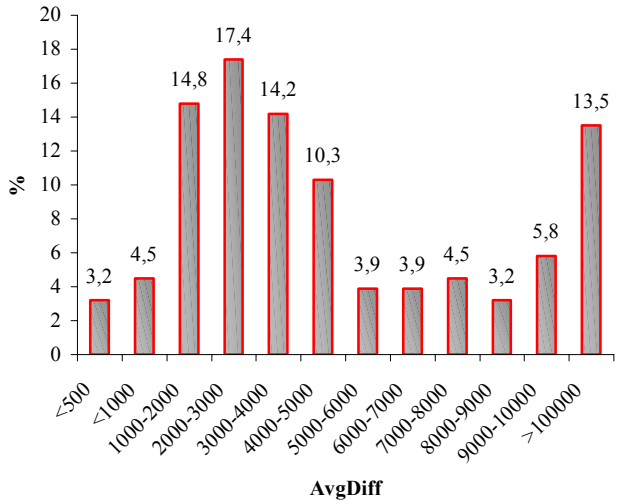

Abb. 29: Abundanz der detektierten RNAs. Gezeigt sind die AvgDiff-Werte der Gene aus Tabelle 4, die in beiden Experimenten nach 8h um den Faktor 2 induziert waren. Besonders hoch ist der Anteil an AvgDiff zwischen 1000 und 5000 (57%) und an stark abundanten Genen mit AvgDiff-Werten über 9000 (19%).

2.5. Bestätigung der Array-Ergebnisse

Bei der Analyse der Arrays wurden Kandidatengene in Tabelle 3 und 4 aufgenommen, die in mindestens zwei Experimenten durch Myc induziert oder reprimiert waren. Um die Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse auszuschließen, müßten noch mehr Experimente verglichen werden, oder die Ergebnisse mit anderen Techniken bestätigt werden. Die eindeutigste Aussage, ob ein Gen induziert oder reprimiert ist, erhält man mit der Analyse der RNA in Northern-Blots. Einige Kandidatengene wurden auf ihre differentielle Expression in P493-6-Zellen getestet. Untersucht wurden nm23-H1, JTV-1 und p130, die mit Oligonukleotid-Arrays identifiziert wurden. EIF3, RFC4, MCM4, THRA-1, HDGF und DP-1 waren Kandidaten, die mit cDNA-Arrays gefunden wurden (Tabelle 3). Da die cDNA-Arrays nicht computergestützt ausgewertet werden konnten, wurden mehr Gene aus diesen Experimenten in Northern-Blots getestet. Alle getesteten Gene waren im Northern-Blot differentiell exprimiert. Allerdings variierte die Kinetik der RNA-Induktion. Bei nm23-H1, JTV-1, p130 und EIF3 findet man eine Zunahme der mRNA bereits 4h nach *myc*-Induktion (Abb.30). THRA-1 und HDGF sind nach 8h induziert, RFC4, MCM4 und DP-1 erst nach 8 bis 24h (Abb. 30). Daraus müßte gefolgert werden, daß zumindest RFC4, MCM4 und DP-1 indirekte Myc-Zielgene sind. Interessanterweise zeigen diese Gene aber eine höhere

Transkriptionsrate bereits nach 2h (RFC4, MCM4) oder 4h (DP-1) (vgl. Abb. 28). Dies läßt vermuten, daß RNA-stabilisierende Regulationsschritte nach der Transkription stattfinden (siehe Abschnitt IV).

Die AvgDiff-Werte aus der Chipanalyse können Aussagen über die Abundanz einer RNA in der Zelle und über das Signals im Northern-Blot machen. Allerdings hängt das Blot-Signal stark von Faktoren wie verwendeter Probe, Hybridisierungseffizienz und Expositionsdauer ab. Die AvgDiff-Werte können deshalb nur einen Anhaltspunkt für die Analyse der Blot-Signale geben. Die Expositionen von *myc* und p130 in Abb. 24 waren vergleichbar. Die AvgDiff-Werte für *myc* waren nach 4h ca. 8000 und nach 8h ca. 20000, für p130 wurden nach 4h ca. 2000 und nach 8h ca. 12000 gemessen.

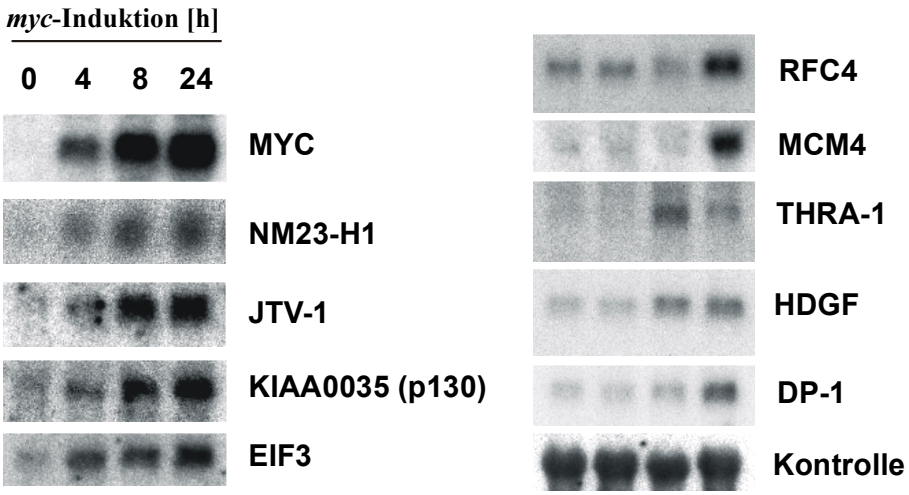

Abb. 30: Kandidatengene in Northern-Blot-Analysen. Einige Kandidaten aus Tabelle 3 (EIF3, RFC4, MCM4, THRA-1 HDGF, DP-1) und Tabelle 4 (Nm23-H1, JTV-1 und p130) wurden in Northern-Blots auf differentielle Expression überprüft. Die für diese Blots verwendete RNA stammte aus den Experimenten für die Genchip-Analyse.

Beim Vergleich der Ergebnisse aus Tabelle 3 und 4 fiel auf, daß nur wenige Kandidaten bei beiden Techniken erscheinen. So fanden sich nur drei Gene aus den Chip-Ergebnissen, die auch auf den cDNA-Arrays induziert waren (nm23, ODC, LDH-A), obwohl insgesamt 18 Gene aus Tabelle 4 auch auf die cDNA-Arrays gespottet sind. Die übrigen 15 Kandidaten zeigten auf den cDNA-Arrays nur sehr schwache, nicht auswertbare Signale.

Umgekehrt wurden mit den cDNA-Arrays insgesamt 41 Kandidaten identifiziert (33 induziert, 8 reprimiert), wovon wiederum nur die oben genannten 3 auch auf dem Chip identifiziert wurden (alle 41 Kandidaten sind auf dem Chip repräsentiert).
Die möglichen Ursachen für die geringen Gemeinsamkeiten werden in Abschnitt IV diskutiert.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Myc im Zellwachstum untersucht. Dazu wurde ein neuartiges B-Zellsystem mit regulierbarem *myc* verwendet. Zwei Fragen standen im Zentrum der Arbeit: Wie wirkt die Myc-Expression bei Abwesenheit von Serum im Kulturmedium auf das Zellsystem und welche Gene werden in P493-6-Zellen durch Myc reguliert? Die erarbeiteten Ergebnisse und ihre Bedeutung für die Biologie von Myc werden in diesem Abschnitt diskutiert.

1. Die Zellinie P493-6

Die Zellinie P493-6 ist das erste humane B-Zellsystem, in dem *myc* konditional untersucht werden konnte. Die Verwendung des Tetracyclin-regulierbaren Vektorsystems erlaubte die Expression des nativen Myc-Proteins. P493-6-Zellen exprimieren kein endogenes *myc*.
Zur Untersuchung von *myc* dienten bisher meist Nager-Fibroblastensysteme, die induzierbares Myc in Form eines MycER-Fusionsproteins trugen (Eilers *et al*., 1989). Myc ist in diesen Systemen an die Hormon-bindende Domäne des Östrogenrezeptors (ER) fusioniert. In Gegenwart von Östrogen wird das Fusionsprotein durch Translokation in den Nukleus aktiviert. Die Verwendung dieses Systems hat aber gegenüber dem P493-6-System folgende Nachteile: In Fibroblasten wird nicht das natürliche Myc-Protein untersucht und die Verwendung von Östrogen aktivierte eine kryptische Transaktivierungsdomäne im ER-Teil des Fusionsproteins. Dieses Problem konnte erst mit der Entwicklung einer Modifikation des Fusionsrezeptors und der Verwendung von Tamoxifen statt Östrogen umgangen werden (Solomon *et al*., 1995). Zweitens muß MycER in Fibroblasten in Abwesenheit von FKS induziert werden, da FKS die Expression des endogenen *myc* induziert. Die Aktivierung von MycER bei FKS-Mangel induziert in Fibroblasten Apoptose, was die Untersuchung erschwert. In P493-6-Zellen kann die Myc-Funktion dagegen in Gegenwart von Serum und ohne Induktion von Apoptose untersucht werden.

1.1. Myc induziert in P493-6-Zellen keine Apoptose bei Serum-Entzug

Die Expression von Myc bei gleichzeitigem Fehlen von Überlebensfaktoren führt in Fibroblasten zu Zelltod durch Apoptose (Übersicht in Prendergast, 1999).
In P493-6-Zellen dagegen kommt es bei Serum-Mangel nicht zur Myc-abhängigen Apoptose (Abschnitt II, 1.2.1.). Serum-Mangel kommt in diesem B-Zellsystem also keinem Fehlen von Überlebensfaktoren gleich, wie es im Modell von Harrington und Evan (1994) vorgeschlagen wurde (vgl. Abschnitt I, 2.4.). Was sind die Ursachen hierfür?
Eine einfache Erklärung wäre, daß Mutationen bei der Selektion von P493-6-Zellen zum Schutz vor Apoptose führten. Das p53-Gen, das ein Vermittler der Myc-induzierten Apoptose ist, wird häufig in mutierter Form in Tumoren gefunden (Hermeking und Eick, 1994; Wagner *et al*., 1994; Levine, 1997). Myc induziert p53 in P493-6-Zellen. Ein Zielgen von p53, der cdk-Inhibitor p21, wird als Antwort auf die p53-Induktion ebenfalls transient induziert. Daher ist anzunehmen, daß p53 in P493-6 noch funktionell ist (Pajic *et al*., 2000).
Myc kann Apoptose auch über p53-unabhängige Signalwege induzieren, z.B. bei gleichzeitiger Aktivierung des TNF-Rezeptors. Die Behandlung von P493-6-Zellen mit dem Liganden TNFα hatte aber ebenfalls keine Apoptose zur Folge (Daten nicht gezeigt). Trotzdem war Myc-abhängige Apoptose zu beobachten, wenn die Zellen mit Apoptose-induzierenden Chemikalien wie Cis-Platin, Etoposid, Hydroxyurea und Taxol behandelt wurden (Shlomo Handeli, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen zeigen, daß Apoptose-induzierende Mechansimen in P493-6-Zellen funktionieren.
Welche Mechanismen schützen P493-6-Zellen vor Myc-induzierter Apoptose bei Serum-Entzug? Die Ursachen sind vielleicht in der Tatsache zu suchen, daß P493-6 eine EBV-infizierte Zellinie ist (vgl. Abschnitt II, 2.1.2. und Abschnitt III, 1.1.). Prinzipiell ist die Expression viraler Gene in P493-6-Zellen abgeschaltet. Exprimiert werden nur das virale Gen EBNA1 und die nicht-translatierten RNAs EBER 1 und 2. Die Funktion dieser Gene ist allerdings noch unklar (Wensing und Farrell, 2000). Es wurde aber beschrieben, daß EBV-infizierte Zellen mit dem gleichen EBV-Expressionsmuster eine erhöhte Resistenz gegen Apoptose zeigen. Die Anwesenheit des einzigen EBV-Proteins (EBNA1) scheint keine Rolle zu spielen, so daß die molekularen Mechanismen noch unklar sind (Ruf *et al*., 1999; Spender *et al*., 1999).

1.2. P493-6 als Burkitt-Lymphom-Modell

Eine primäre B-Zelle kann durch Infektion mit EBV immortalisiert werden (siehe Abschnitt III, 1.1.). Um den Zellzyklus der Zelle zu aktivieren, werden virale Faktoren wie EBNA2 induziert (Übersicht in Kieff, 1996). EBV-infizierte Zellinien werden auch Lymphoblastoide Zellinie (LCL) genannt. Neben viralen Genen (EBNA1, EBNA2, EBNA3, EBNA-LP, LMP1 und LMP2A) exprimieren LCLs zelluläre Gene, die ihren Phänotyp bestimmen. Charakteristisch für LCL ist die Expression der Oberflächenmoleküle CD23 und CD40, sowie die Repression von CD10 und CD38 (Rowe *et al*., 1987). Eine LCL, die diese zellulären und viralen Marker exprimiert, besitzt den sogenannten Latenztyp III. *In vivo* findet man diesen Latenztyp III aber nur in wenigen der EBV-infizierten Zellen, da das Immunsystem die Expression viraler Proteine sofort erkennt und die entsprechenden Zellen eliminiert.

Zellen des Burkitt-Lymphoms (BL) findet man häufig mit EBV assoziiert. Ein Modell der BL-Pathogenese geht davon aus, daß eine EBV-Infektion in B-Zellen kurzzeitig zur Proliferation führt. Als zweites Ereignis tritt eine Translokation auf, die zur Aktivierung von *myc* führt (Übersicht in Klein, 1999). Um dem Angriff des Immunsystems zu entgehen, müssen BL-Zellen das Virus aber inaktivieren. Es entsteht der Latenztyp I, d.h. virale Marker, wie EBNA2 und LMP1 werden reprimiert. Als Folge ist auch die Expression der oben genannten Oberflächenmoleküle verändert (Rowe *et al*., 1987).

Die Zellinie P493-6 ist aus der EBV-infizierten Zellinie ER/EB2-5 entstanden (Abschnitt II, 2.3.). ER/EB2-5-Zellen tragen ein konditionales Virus, in dem EBNA2 durch Östrogen aktivierbar ist. In Gegenwart von Östrogen zeigen diese Zellen Latenztyp III. Nach stabiler Transfektion mit einem Vektor, der die konditionale *myc*-Expression erlaubt, wurde auf Zellen selektioniert, die in Abwesenheit von Östrogen proliferieren (Pajic *et al*., 2000). In Abwesenheit von Östrogen zeigen diese Zellen Latenztyp I. Die Entstehung der Zellinie P493-6 ist daher mit der Entstehung eines BL *in vitro* vergleichbar.

Wird in P493-6-Zellen das Virus durch Östrogen aktiviert, dann werden wieder Latenztyp III-spezifische Marker induziert (Alexander Pajic, persönliche Mitteilung). Die verschiedenen Latenztypen sind in dieser Zellinie also ineinander überführbar und sie ist somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung der BL-Pathogenese.

Welche genetischen Veränderungen müssen in LCLs auftreten, damit ein Burkitt-Lymphom entsteht? Es ist anzunehmen, daß neben der Myc-Translokation weitere Mutationen für die

Entstehung eines BL verantwortlich sind. Mit Array-Techniken könnte die Genexpression der Zellinie P493-6 und der Mutterzellinie ER/EB2-5 untersucht werden. Gene, die in beiden Linien unterschiedlich und unabhängig von EBNA2 und Myc exprimiert werden, könnten solche Mutationen tragen. Die Identifikation solcher Gene ist durch die Entwicklung der Genchip-Methoden möglich und könnte entscheidend zur Klärung der Entstehung eines Burkitt-Lymphoms beitragen.

2. Myc als Koordinator von Zellzyklus und Zellwachstum

2.1. P493-6-Zellen proliferieren nur in Anwesenheit von FKS und Myc

Lange Zeit wurde vermutet, daß die Myc-Funktion ausschließlich in der Aktivierung des Zellzyklus liegt. In Fibroblastensystemen führt die ektopische Expression von Myc zur Induktion der Cdk2/CycE-Aktivität, zu Rb-Hyperphosphorylierung und schließlich zur DNA-Synthese (Eilers *et al*., 1989; Steiner *et al*., 1995; Berns *et al*., 1997; Prall *et al*., 1998).
Es galt bislang als Dogma, daß die Myc-Expression den Eintritt in die S-Phase auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren bewirkt.
Für P493-6-Zellen wurde nun gefunden, daß Myc-Expression nicht ausreicht, um die S-Phase zu induzieren (Abb. 15). Bestätigt wurde dieser Befund durch die reduzierte Cdk2/CycE-Aktivität und die Blockierung der Rb-Hyperphosphorylierung bei Serum-Mangel (Abb. 16) .
Werden Zellzykluskomplexe im B-Zellsystem anders reguliert als in Fibroblasten? Eine Antwort könnte in der Expression von Zellzyklus-Inhibitoren liegen. In Fibroblasten kann Myc die Cdk2-Aktivität nur induzieren, wenn p27 die Cdk2/CycE-Komplexe hemmt. Myc sequestriert p27 und aktiviert so Cdk2 (vgl. Abschnitt I, 2.3.2.). In Fibroblasten von p27-defizienten Mäusen ($p27^{-/-}$) kann Myc diese Aktivität unter FKS-Mangel aber nicht mehr induzieren (Beier *et al*., 2000). Der Grund hierfür ist, daß in diesen Zellen Cdk2/CycE durch p130 inhibiert wird (Coats *et al*., 1999). Myc ist aber nicht in der Lage, p130 aus Cdk2/CycE-Komplexen zu sequestrieren (Beier *et al*., 2000). Eine ähnliche Situation könnte in P493-6-Zellen vorliegen. Aus noch unklaren Gründen wird in P493-6-Zellen p27 nicht exprimiert, statt dessen aber p130 (Pajic *et al*., 2000). In Gegenwart von Serum führt das Anschalten von Myc, wie bei $p27^{-/-}$-Fibroblasten, zur Aktivierung von Cdk2/CycE. Beim Fehlen von FKS könnte es sein, daß p130/Cdk2/CycE-Komplexe stabil bleiben. Es muß aber noch untersucht

werden, welche Serum-Komponenten in P493-6-Zellen an der Aktivierung des Zellzyklus beteiligt sind. Außerdem muß angemerkt werden, daß Myc in $p27^{-/-}$-Fibroblasten zwar nicht Cdk2/CycE aktiviert, es aber trotzdem zum Eintritt in die S-Phase kommt. Myc induziert in diesem Fall die DNA-Synthese über einen alternativen Weg[3] (Baier *et al*., 2000). Dieser Weg wäre in P493-6-Zellen durch Myc aber nicht aktivierbar.

2.2. Myc induziert Zellwachstum

Der Begriff ‚Wachstum' wird oftmals gleichgesetzt mit dem Begriff ‚Proliferation'. Streng genommen muss man dabei aber zwei Vorgänge unterscheiden. Erstens, eine Zelle muß an Zellmasse zunehmen, um genügend Material an beide Tochterzellen weiterzugeben (Zellwachstum). Zweitens muß der Eintritt in die entsprechende Phase des Zellzyklus durch Cdks reguliert werden, damit der Zellzyklus zeitlich geordnet abläuft, (Zellzyklusregulation). Wenn beide Prozesse koordiniert ablaufen, können Zellen proliferieren (vgl. Abschnitt I). Erst das Erreichen einer bestimmten Zellgröße erlaubt den Eintritt in die DNA-Synthesephase (Übersicht in Neufeld und Edgar, 1998). Für die charakterisierten Zellzyklusregulatoren wurde bisher nicht beschrieben, daß sie das Wachstum regulieren können. Im Gegenteil, sowohl in der Bäckerhefe als auch in *Drosophila* wurde gezeigt, daß die Überexpression von Cyclinen zum vorzeitigen Eintritt in die S-Phase und damit zu kleineren Zellen führt (Neufeld und Edgar, 1998).

Wachstumssignale induzieren Faktoren, die an der Verzweigung von Zellwachstums- und Zellzyklusregulation stehen. Einer dieser Koordinatoren von Wachstum und Zellzyklusregulation könnte Myc sein (Neufeld und Edgar, 1998; Schmidt, 1999; Elend und Eilers, 1999). Myc-Aktivierung führt zur Induktion von Proteinsynthese, noch bevor die Zellen in die DNA-Synthesephase eintreten (Rosenwald *et al*., 1995). Es blieb aber unklar, ob die Aktivierung der Proteinsynthese die Aktivierung von Zellzyklusregulatoren erfordert, oder ob Zellwachstum auch unabhängig davon durch Myc reguliert werden kann (Schmidt, 1999). Da in Fibroblastensystemen Myc in Abwesenheit von FKS S-Phase und Apoptose induziert, konnten Zellwachstum und Zellzyklusregulation durch Myc nicht unabhängig (entkoppelt) voneinander untersucht werden. Dies war erstmals mit der Zellinie P493-6

[3] Diskutiert wird, ob die Aktivierung von Cdk2 durch CycE2 unabhängig von p130 durch Myc ermöglicht wird (Baier *et al*., 2000).

möglich, in der Myc nach Serum-Entzug keine S-Phase induzierte. In diesen Zellen konnte eindeutig gezeigt werden, daß Myc Zellwachstum nicht über seinen Einfluß auf die Cdk2/CycE-Aktivität reguliert. Zellwachstum ist eine Funktion von Myc, die unabhängig vom Eintritt in den Zellzyklus vermittelt wird (Schuhmacher *et al*., 1999).

Ähnliche Beobachtungen wurden zeitgleich in anderen Systemen gemacht. Die Klonierung eines Myc-Homologs in Drosophila (dMyc) erlaubte die Untersuchung einer Mutante mit verringerter dMyc-Expression (Gallant *et al*. 1996; Schreiber-Agus *et al*. 1997). Die Expression der Myc-Mutante in Zellen der Flügel-Imaginalscheiben führte zu kleineren Zellen, ohne daß sich die Verdopplungszeit der Zellen änderte. Eine Überexpression von Wildtyp-dMyc führte dagegen zu größeren Zellen als normal, ebenfalls ohne Änderung der Verdopplungszeit (Johnston *et al*., 1998). Ähnliche Ergebnisse wie in Drosophila konnten auch in B-Zellen der Maus beobachtet werden (Iritani und Eisenman, 1999).

In den zitierten Arbeiten konnte die Zellgröße einer Population nur in Relation zu einer anderen Population bestimmt werden. Die Schlußfolgerung, daß Myc Wachstum unabhängig von Zellzyklus reguliert, wurde indirekt durch Vergleich der Längen der Zellzyklusphasen dieser Populationen gezogen. Im Unterschied dazu konnte in der hier durchgeführten Arbeit das Zellwachstum in einer Kultur direkt gemessen werden. Von kleinen G1 Zellen ausgehend wurde die Zunahme an Zellvolumen in zeitlichen Abständen verfolgt (Abb. 20). Die Unabhängigkeit vom Zellzyklus konnte eindeutig durch Blockierung von Cdk2 durch Roscovitin demonstriert werden (Abb. 21). Die Zellen wuchsen auch, wenn die Rb-Phosphorylierung und der Eintritt in die S-Phase durch FKS-Entzug verhindert wurden (vgl. Abb. 15, 16 und 20).

Daneben ergab sich aus diesen Beobachtungen ein weiterer, wichtiger Befund: Das Rb-Protein wird als Koordinator von Zellwachstum und Zellzyklusregulation diskutiert (Neufeld und Edgar, 1998). Die Rb-Phosphorylierung wird als Restriktionspunkt des Zellzyklus bezeichnet und ist damit ein ‚Tor' zum S-Phase-Eintritt (Übersicht in Planas-Silvas und Weinberg, 1997). Hypophosphoryliertes Rb interagiert mit RNA-Polymerasen I, II und III und hemmt deren Aktivität. RNA-Polymerase I und III werden für die Transkription von Genen benötigt, die für Proteinsynthese wichtig sind (z.B. ribosomale RNA und tRNAs). Ob diese Interaktionen von Rb limitierend für das Zellwachstum sind, wurde bisher nicht beschrieben (Herrera *et al*., 1996; Cavanaugh *et al*., 1995; Voit *et al*., 1997; White *et al*., 1996). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Zellwachstum auch unabhängig von Rb-Phosphorylierung abläuft (Abb. 21).

Auch bei hypophosphoryliertem Rb können Proteinsynthese, Stoffwechsel und Volumenzunahme durch Myc induziert werden (vgl. Abb. 16 mit Abb. 22, 23 und 20). Die gleiche Beobachtung wurde kürzlich in Drosophila gemacht, wo ebenfalls die Unabhängigkeit von Zellwachstum und Rb-Inaktivierung gezeigt wurde (Dater *et al*., 2000).

2.3. Cdk4 als Myc-Zielgen

Cdk4 induziert die Rb-Phosphorylierung in der frühen G1-Phase und wurde als direktes Zielgen von Myc vorgestellt (Abb. 26, Hermeking *et al.*, 2000). Durch kürzlich veröffentlichte Arbeiten hat dieses Ergebnis noch an Bedeutung zugenommen, da cdk4 eine weitere Funktion im Zellwachstum hat. Die Fruchtfliege *Drosophila* entwickelt sich bei Inaktivierung von cdk4 zwar normal, die Fliege ist aber kleiner. Bei genauerer Untersuchung wurde festgestellt, daß cdk4 für die Regulation und den Ablauf des Zellzyklus verzichtbar ist. Dafür ist cdk4 aber bei der Regulation von Zellgröße direkt beteiligt. Die Überexpression von Cdk4 führt in vielen Zelltypen der Fliege zu übergroßen Zellen, ohne den zeitlichen Ablauf der Zellzyklusphasen zu ändern (Meyer *et al.*, 2000; Datar *et al*., 2000). Zu ähnlichen Ergebnissen kam es bei der Untersuchung von *myc* in Drosophila (Johnston *et al.* 1999). Die Ergebnisse, die in Kapitel 1.3., Abschnitt II gezeigt wurden, werden durch die Arbeiten in Drosophila bestätigt. Da cdk4 ein direktes *myc*-Zielgen ist, könnte cdk4 ein entscheidender Vermittler des Myc-induzierten Zellwachstums sein.

Welche Gene, die durch *myc* reguliert werden, sind an der Tumorentstehung beteiligt? Vielleicht spielen hier gerade Gene eine Rolle, die in unterschiedlichen Situationen auf mehreren Ebenen reguliert werden. Die Behandlung von P493-6-Zellen mit dem Faktor TGF-ß führt in diesen Zellen zum Zellzyklusarrest (Bettina Kempkes, persönliche Mitteilung). TGF-ß reprimiert auch in Anwesenheit von Myc die Expression von cdk4 (Abb. 26). Es wäre interessant, noch weitere Kandidatengene zu finden, die von Myc und TGF-β gegensätzlich reguliert werden. Diese Untersuchungen könnten durch Benutzung von Array-Techniken in P493-6-Zellen einfach durchgeführt werden (siehe Ausblick).

3. Identifizierung von Myc-regulierten Genen mit Array Techniken

In den letzten Jahren wurden Methoden entwickelt, die es erlauben, tausende von Genen auf ihre differentielle Expression hin zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden zwei solcher Array-Methoden eingesetzt, um nach *myc*-regulierten Genen zu suchen. Zum einen wurden cDNA-Filterarrays eingesetzt, die mit radioaktiv markierter Run-On-RNA hybridisiert wurden. Im zweiten Ansatz wurden Oligonukleotid-Arrays verwendet, bei denen cDNA in einer *in vitro*-Transkription mit biotinyliertem UTP markiert wird.

3.1. Gemeinsame Ergebnisse aus beiden Methoden

Werden für eine Fragestellung zwei unterschiedliche Techniken verwendet, erwartet man idealerweise gleiche Ergebnisse. Interessanterweise war die Übereinstimmung der Ergebnisse in dieser Arbeit gering. Nur ODC, LDH-A und Nm23 wurden mit beiden Array-Techniken gemeinsam als Myc-Zielgene identifiziert (vgl. Tabellen 3 und 4).
Mit der cDNA-Filtertechnik konnten insgesamt 41 Kandidaten identifiziert werden (33 induziert, 8 reprimiert). Alle 41 Kandidaten waren auch auf dem Genchip vertreten.
Mit den Genchips konnten insgesamt 82 Kandidaten identifiziert werden (74 induziert, 8 reprimiert). Davon waren 18 auch auf die cDNA-Filter gespottet.
Was sind die Gründe für die geringen Gemeinsamkeiten? Die Zellinie P493-6 ist ein Zellsystem, in dem sich Experimente immer gut reproduzieren liessen. Instabilitäten im verwendeten Zellsystem sollten daher kein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Warum findet man die Ergebnisse der cDNA-Filter nicht bei den Genchips?
Zur Herstellung der Hybridisierungsproben wurden für die cDNA-Filter und Genchips unterschiedliche Verfahren angewandt.
cDNA-Filter wurden mit Run-On-RNA hybridisiert (Abschnitt II, 3.3.). Bei der Run-On-Methode werden Kerne isoliert und eingefroren, wobei die Transkription der RNA-Polymerase-Komplexe stoppt. Nach dem Auftauen und der Inkubation der Kerne in der Gegenwart von Nukleotiden wird die Transkription fortgesetzt, und radioaktive Nukleotide werden in die naszierende RNA eingebaut (vgl. Abschnitt III, 2.2.). Run-On-markierte RNA gibt Aufschluß darüber, auf welchen Genen die Transkription durch die RNA-Polymerase

initiiert wurde und ist daher ein Hinweis auf die Transkriptionsrate eines Gens in einer bestimmten Situation (hier: Myc An- und Abschaltung).
Einige der Gene, die im Run-On identifiziert wurden, zeigten im Northern-Blot nach 8h keine differentielle Expression (Abb. 30, RFC4, MCM4 und DP-1), obwohl ihre transkriptionelle Aktivität zum Teil bereits nach 2h gesteigert war. Diese Gene können also im Genchip nach 8h nicht als differentiell exprimiert identifiziert werden, da sich die mRNA-Mengen in der Zelle noch nicht unterschieden (Abb. 30). Eine mögliche Erklärung, warum diese Gene im Run-On, nicht aber auf dem Chip gefunden wurden, könnte der Bedarf weiterer regulatorischer Schritte für die Stabilisierung der mRNAs sein. Das bedeutet, daß die Transkription dieser Gene zwar initiiert wird, die entsprechende mRNA aber erst später akkumuliert. Solche regulatorischen Schritte könnten die Stabilisierung des 5'-Endes der mRNA durch die 7'-Methyl-Guanosin-Kappe (cap-Stuktur) oder des 3'-Endes durch Polyadenylierung sein. Ein wichtiger Schritt des mRNA-Umsatzes ist außerdem der Transport aus dem Kern in das Zytoplasma. Gerade für Gene wie RFC4, MCM4 und DP-1 ist eine spätere Aktivierung denkbar, denn ihre Produkte werden erst kurz vor dem Eintritt in die S-Phase benötigt.

Warum finden sich die Gene der Genchip-Analyse nicht auf den Filterarrays?
Die einfachste Erklärung ist die Tatsache, daß nur 18 von den 82 auf den Chips identifizierten Genen auch auf den Filtern vertreten sind. Von diesen 18 wurden aber nur die drei obengenannten in beiden Experimenten gefunden. Die Proben für die restlichen 15 Gene erzeugten kaum sichtbare Transkriptionssignale. Für einzelne dieser Signale konnte man eine differentielle Regulation vermuten. Die Signalstärken waren aber so schwach, daß sie keine verlässliche Aussage zuliessen und somit nicht auswertbar waren. Interessanterweise befanden sich 10 dieser 18 Gene auf dem F-Sektor des HumanCancer1.2.Filters (Abb. 27). Der F-Sektor dieses Filters repräsentiert viele Gene der Stoffwechselregulation. Einige dieser 18 Gene zeigen eine hohe Expression auf dem Genchip, gemessen an den AvgDiff-Werten. Beispiele hierfür sind die Fettsäure-Synthase (Position auf dem Filter F3e) mit einem AvgDiff-Wert auf dem Chip von 6300, ADE2H1 (F8d) mit einem Wert von 7030 und MTHFD (F2c) mit einem Wert von 3960. Die AvgDiff Werte zeigen an, daß es sich um relativ stark exprimierte RNAs handelt (vgl. Abschnitt III, 2.3.). Umso erstaunlicher ist es, daß keine oder nur sehr schwache Transkriptionssignale auf dem Filter detektierbar waren.

Diese Beobachtungen zeigen möglicherweise interessante Zusammenhänge zwischen Transkriptionsrate und mRNA-Abundanz. Schwach transkribierte Gene, wie ADE2H1 liefern abundante RNAs, während stark transkribierte Gene auf RNA-Niveau nicht detektierbar sind. Es wäre durchaus denkbar, daß bestimmte Gene bereits zu einem frühen Zeitpunkt transkribiert werden, die mRNAs aber erst zu einem späteren Zeitpunkt der G1-Phase benötigt werden. Beispiele sind RFC4, MCM4 und DP-1.
Ob die Run-On-Methode für Gene mit schwach abundanter RNA sensitiver ist, muß noch genauer untersucht werden. Hierzu müssten exakte Vergleiche zwischen Run-On-Transkriptionsrate und RNA-Menge für mehrere Gene durchgeführt werden.

3.2. Direkte oder indirekte Zielgene von Myc?

Die Analyse der Genexpression in P493-6-Zellen lieferte insgesamt 123 Kandidatengene (107 induziert, 16 reprimiert), von denen 108 (94/14) vorher noch nicht als Myc-reguliert beschrieben worden sind. Die schnelle Induktion oder Repression dieser Gene in P493-6-Zellen macht sie zu guten Kandidatengenen für eine direkte Regulation durch Myc. Einige der in dieser Arbeit identifizierten Gene wurden bereits als direkte Myc-Targets beschrieben, wie *cad*, cdk4 oder *gadd*45 (Miltenberger *et al*., 1995; Hermeking *et al*., 2000; Constance *et al*., 1996). Andere Gene decken sich mit einer kürzlich veröffentlichten Arbeit, in der mit Genchips Myc-regulierte Gene in Fibroblasten identifiziert wurden (Coller *et al*., 2000). Diese Befunde bestätigen die hier gezeigten Ergebnisse. Der formale Beweis, daß es sich um direkte Zielgene handelt, muss aber noch erbracht werden. Hierfür wurden einige Kriterien aufgestellt, die ein solches Zielgen aufweisen muss (Cole und McMahon, 1999).
1. Die Expression der Kandidatengene sollte in der *myc*$^{-/-}$-Zellinie verändert sein.
2. Myc/Max-Komplexe sollten *in vivo* am regulierten Gen nachweisbar sein (durch Chromatin-Präzipitations-, Footprint- und Gel Shift-Experimente).
3. Eine translations-unabhängige Regulation durch MycER in der Gegenwart von Proteinsyntheseinhibitoren (Cycloheximid) sollte nachweisbar sein.
4. Die Kandidatengene sollten durch induzierbares Myc regulierbar sein und der Kinetik der *myc*-Induktion folgen.

5. Transiente Promotorstudien sollten die Myc-Abhängigkeit des Kandidatenpromotors zeigen[4].

Die Erfüllung der Punkte 2 und 5 setzt voraus, daß Myc/Max-Bindestellen im Kandidatengen gefunden werden. Das Fehlen einer CACGTG- oder ähnlichen Sequenz kann aber kein Kriterium sein, daß ein Gen kein Myc-reguliertes Gen ist. In Abb. 24 wurde gezeigt, daß NPM mit der gleichen Kinetik wie NCL in P493-6-Zellen reguliert wird, obwohl im Gen für NPM keine CACGTG-Sequenz gefunden wurde. Noch schwieriger wird der Sachverhalt durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit, in der eine neue Myc/Max-Bindestelle im FasL-Promotor beschrieben wurde. Dieser Promotor kann durch Myc über eine ATTCTCT-Sequenz aktiviert werden (Kasibhatla *et al*., 2000).

Prinzipiell müßte für jedes der in dieser Arbeit vorgestellten Gene separat gezeigt werden, daß es direkt durch *myc*-reguliert wird. Besonders die Induktionskinetiken der Run-On-Experimente, die einen direkten Hinweis auf die Initiation der Transkription geben, zeigen daß die Gene dieser Arbeit gute Kandidaten sind. Die Identifizierung Myc-regulierter Gene ist wichtig für das Verständnis der Myc-Biologie und der Tumorentstehung durch Myc, auch wenn die Gene nicht immer eindeutig hinsichtlich direkter oder indirekter Regulation klassifiziert werden können.

3.3. Funktion der identifizierten Gene

Die Analyse von Genexpressionsmustern liefert eine Vielzahl von Daten und eine häufig gestellte Frage ist, welche der gefundenen Gene „wichtig“ sind. Zielgene onkogener Transkriptionsfaktoren, deren Funktion in der Stoffwechselregulation liegt, werden häufig als unbedeutend gewertet. Dabei wird mißachtet, daß viele dieser Gene für das Überleben einer Zelle essentiell sind und deshalb ihre Bedeutung dieser Gene für die Tumorentstehung sehr groß sein kann. Beispielhaft seien nur LDH und eIF4E genannt, die zunehmend mit

[4] Die genannten Kriterien wurden von Cole und McMahon (1999) aufgestellt und gefordert. Es sollte angemerkt werden, daß diese Kriterien nicht immer zwingend sein müssen:
Zu 1: Viele der Myc-regulierten Gene werden in der *myc*$^{-/-}$-Zellinie auch durch andere Signalwege reguliert und sind daher Myc-unabhängig exprimiert (Bush *et al*., 1998).
Zu 3: Es wurde beobachtet, daß die Behandlung mit Cycloheximid zur Stabilisierung und auch zur Induktion von RNA führen kann, so daß eine Regulation vorgetäuscht wird.
Zu 5: Genregulation läßt sich durch Promotor-Reporter-Konstrukte oft nicht reproduzieren, da oftmals andere regulatorische Elemente aus dem Chromatinkontext fehlen.

Tumorprogression in Verbindung gebracht werden (Dang *et al*., 1999; Schmidt, 1999; De Benedetti und Harris, 1999).
Ein erster Schritt zur Analyse der erhobenen Daten war die Ordnung der Gene in bestimmte Gruppen. Durch Literatursuche wurde versucht, jedes der identifizierten Gene nach seiner Funktion bestimmten Gengruppen zuzuordnen (vgl. Tabellen 3 und 4). Dabei ergaben sich große Gruppen von Genen, deren Funktionen in Stoffwechselwegen lagen. Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse, daß Myc eine wesentliche Funktion im Zellwachstum hat. Durch die Identifikation vieler Gene, die an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt sind, wurde verständlich, daß Myc zur Regulation des Zellwachstums nicht die Funktion von Zellzyklusfaktoren benötigt.

3.3.1. Myc-regulierte Gene in der Proteinsynthese

Es konnte bereits früher gezeigt werden, daß Myc in der Regulation der Proteinsynthese eine wichtige Rolle spielt (Übersicht in Schmidt, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden Gene gefunden, die am Ablauf der Translation beteiligt sind und diese Befunde bestätigten.
Dazu gehören Translationsfaktoren, wie EIF3 (Abb. 30) und EEF2, und ribosomale Proteine wie S16 und S5.
Die Aktivierung der S6-Kinase (S6K) ist eine wichtige Voraussetzung der Initiation der Translation (Übersicht in Thomas und Hall, 1997). Ähnlich wie für cdk4 und *myc* konnte gezeigt werden, daß auch S6K das Zellwachstum bei Drosophila reguliert (Montagne *et al*., 1999). S6K war ebenfalls unter den Kandidatengenen (Tabelle 3, Abbildung 28).
Daß Myc an der Genese von Ribosomen beteiligt ist, wurde bereits postuliert, als NCL als direktes Myc-Zielgen beschrieben wurde (Greasley *et al*., 2000).
Die Synthese von Aminoacyl-tRNAs ist eine wichtige Voraussetzung für die Proteinsynthese. Für die Verknüpfung der tRNA mit der Aminosäure wird das Enzym Aminoacyl-tRNA-Synthetase benötigt. Für jede Aminosäure gibt es dabei eine eigene, spezifische Untereinheit. In der Genchip-Analyse wurden die Untereinheiten für Isoleucyl-tRNA-Synthetase und Valyl-tRNA-Synthetase gefunden (Tabelle 4). Es fanden sich drei weitere dieser Enzyme, die in der Analyse induziert waren, aber nicht die Selektionskriterien für Tabelle 4 erfüllten (Glycyl-, Aspartyl-, Glutamyl-tRNA-Synthetasen). Zusätzlich wurde JTV-1 als potentielles Myc-Zielgen identifiziert. Die cDNA-Sequenz von JTV-1 zeigt eine 85%ige Homologie zu einem Hamster-Gen, das für p38, einem wichtigen Assemblierungsfaktor für tRNA-

Synthetasen codiert (Quevillon *et al*., 1999). Die Expression von tRNA-Synthetase-Genen könnte somit ein wesentlicher Punkt in der Wachstumsregulation durch Myc sein.

3.3.2. Myc-regulierte Gene im Nukleolus

Der Nukleolus ist der wesentliche Ort der Ribosomen-Genese. In letzter Zeit gab es zahlreiche Hinweise darauf, daß der Nukleolus auch an RNA-Transport und Zellzyklusregulation beteiligt ist (Übersicht in Lewis und Tollervey, 2000; Carmo-Fonesca *et al*., 2000; Visintin und Amon, 2000).
Nucleolin (NCL) und Nucleophosmin (NPM, Abb. 24) sind sehr abundante Proteine im Nukleolus, die zwischen Zytoplasma und Nukleolus transportiert werden (Borer *et al*., 1989).
Eine der Funktionen von NCL liegt in der Prozessierung von rRNA (Übersicht in Ginisty *et al*., 1999). Beide Proteine, NCL und NPM, werden Zellzyklus-abhängig phosphoryliert. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß NPM eine wichtige Funktion in der Einleitung der Mitose erfüllt. NPM lokalisiert am Zentrosom und reprimiert dessen Duplikation. Erst nach Phosphorylierung durch Cdk2/CycE Komplexe dissoziiert NPM vom Zentrosom (Okuda *et al*., 2000).
Daneben sind in Tabelle 4 Gene aufgelistet, deren Produkte im Nukleolus akkumulieren und dort an der rRNA-Prozessierung oder am RNA-Transport beteiligt sein könnten, wie die RNA-Helikasen Gu (Zhu *et al*., 1999), MrDb (Grandori und Eisenman, 1997) oder p130 (Pai *et al*., 1995).

3.3.3. Myc-regulierte Gene in der DNA-Synthese

Das *cad*-Gen war eines der ersten Myc-regulierten Gene, die identifiziert werden konnten. CAD ist ein multifunktionaler Enzymkomplex der Nukleotidsynthese, daher wurde schon früh vermutet, daß Myc eine Rolle in der DNA-Synthese spielt (Miltenberger *et al*., 1995). Die Gene, die in dieser Arbeit gefunden wurden, erweitern dieses Bild.
Tabelle 3 und 4 enthalten insgesamt 14 Gene, die am Ablauf der Nukleotid-Synthese beteiligt sind. Ein Beispiel ist die Thioredoxin-Reduktase, deren Funktion limitierend ist für die Aktivität der Ribonukleotid-Reduktase.

Auch einige Faktoren, die direkt an der DNA-Synthese beteiligt sind, scheinen von *myc* reguliert zu werden. Dazu gehören MCM4, ein Lizenzfaktor für den Replikationsstartpunkt und RFC4 und DNA-Polymerase δ, die an der Elongation der DNA-Replikation beteiligt sind (Mossi und Hubscher, 1998; Lee and Bell, 2000).
Der E2F-Dimerisierungspartner DP-1 ist ein weiteres mögliches Zielgen von Myc (Abb. 30). E2F ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung daran beteiligt ist, die S-Phase einzuleiten. Die Aktivität von E2F wird unter anderem durch die Hyperphosphorylierung von Rb reguliert (vgl. Abschnitt I, 2.3.1.). In P493-6-Zellen wird E2F-1-Protein in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert (Pajic *et al*., 2000). Die Aktivität von E2F scheint in P493-6-Zellen neben der Rb-Phosphorylierung über die Expression von DP-1 reguliert zu werden. Die Vermutung, daß Myc die E2F-Aktivität über alternative Wege regulieren kann, wurde kürzlich bestätigt. In Fibroblastenzellen wurde gezeigt, daß Myc die E2F-Aktivität über einen Cdk2-unabhängigen Weg induzieren kann (Beier *et al*., 2000).

3.3.4. Weitere Myc-regulierte Gene in der Wachstumsregulation

Um die Bedeutung von Myc im Zellwachstum hervorzuheben, seien noch einige Gene der Tabellen 3 und 4 erwähnt, die für Stoffwechselvorgänge von Bedeutung sind.
Neben Enzymen für Aminosäure- und Nukleotidmetabolismus fiel eine dritte Gruppe von Genen für den Fettsäure-Stoffwechsel auf (Tabelle 4). In dieser Gruppe sind sowohl Enzyme für den Fettsäureumsatz vertreten (Fettsäure-bindendes Protein, Fettsäure-Synthase) als auch Enzyme, die bei der Synthese von Membranlipiden eine Rolle spielen (Phosphatidyl-Ethanolamin-bindendes Protein).
Bei Stoffwechselprozessen anfallende Metaboliten müssen in der Zelle transportiert werden. Einige der dafür benötigten Transporter sind ebenfalls durch Myc reguliert, z.B. h4F2hc, das für eine Aminosäurepermease codiert (Mastroberardino *et al*., 1998), GLVR1, das anorganisches Phosphat transportiert (Kavanaugh *et al.*, 1994) und SLC16A1, ein Lactat-/ Pyruvattransporter (Garcia *et al*., 1994).
Weitere Gene, die hier nicht im Detail diskutiert werden, wie Enzyme, die oxidativen Stress regulieren, aber auch Transkriptionsfaktoren wie CBF oder FRA-1 (Tabellen 3 und 4) tragen ebenfalls zum Zellwachstum bei.

3.3.5. Myc-regulierte Gene in der Signal-Transduktion

Myc wurde bisher noch nicht mit der Regulation von Signaltransduktions-Komponenten in Verbindung gebracht. Erst in der Arbeit von Coller *et al*. (2000) wurden drei Wachstumsfaktoren beschrieben, die von Myc reguliert werden, HDGF, PBEF und CTGF. Die große Gruppe dieser Faktoren in Tabelle 3 ist daher ein neuer Befund. Dieser Gruppe wurden neben Komponenten der Signaltransduktion auch Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren zugeordnet (Tabelle 3). Die meisten dieser Gene wurden in den Run-On-Experimenten entdeckt, was an der schon besprochenen schwachen Abundanz der mRNAs liegen könnte (siehe oben).

Einige dieser Faktoren könnten in der Regulation autokriner Stimulationen eine Rolle spielen. Eine Beobachtung für die Proliferation von P493-6-Zellen könnte damit erklärt werden: Proliferierende P493-6-Zellen haben normalerweise eine Verdopplungszeit von etwa 30h (Daten nicht gezeigt). Ruhende Zellen benötigen nach *myc*-Induktion aber vier Tage, um ihre Zellzahl zu verdoppeln (Abb. 13). Dies könnte mit der bei geringer Zelldichte fehlenden Stimulation durch Wachstumsfaktoren erklärt werden, die nach *myc*-Induktion sezerniert werden. Neben HDGF und CTGF wurden HB-EGF und die Metalloprotease ADAM9 gefunden. ADAM9 wird für die Aktivierung von HB-EGF und des EGF-Rezeptors benötigt (Izumi *et al*., 1998; Prenzel *et al*., 1999). Auch die Induktion des Prä-B-Zell-stimulierenden Faktors (Tabelle 3) unterstreicht die Rolle von Myc in der Stimulation von autokrinen Rückkopplungs-Mechanismen in P493-6-Zellen.

Für die meisten der gefundenen Rezeptoren muß allerdings noch gezeigt werden, ob sie in B-Zellen exprimiert werden. Ephrin-Rezeptoren beispielsweise wurden bislang meist in Zusammenhang mit Angiogenese und Nervenzellentwicklung beschrieben (Frisén *et al*., 1999). Auch die Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptors FGF3 muss für B-Zellen noch gezeigt werden.

Als Regulatoren von Proteinkinasen wurden AKAP149 und PAC-1 gefunden. AKAPs (A-Kinase-Anker-Proteine) vermitteln die zelluläre Lokalisation von PKA und spielen eine Rolle bei der Vermittlung der Substratspezifität von PKA (Colledge und Scott, 1999). AKAP149 (Tabelle 4) bindet Protein-Phosphatase Typ1 (PP1) und vermittelt den Kontakt zur Kernmembran am Ende der Mitose (Steen *et al*, 2000). PAC-1 ist eine Phosphatase, die an der Regulation der Aktivität von ERK, JNK und p38-Kinasen beteiligt ist (Rohan *et al.*, 1993; Chu *et al*., 1996).

Eine Rolle bei der Vermittlung der Tumorigenität von Myc könnte der Thyroid-Hormon-Rezeptor (THRA-1, c-ERBA) spielen (Tabelle 3 und Abb. 30). Ebenso wie Myc kann THRA1 Differenzierungsprozesse unterbinden und Transformation induzieren (Bauer *et al*., 1998). In Tumoren findet man häufig mutierte, onkogene Formen von THRA1 (Stunnenberg *et al.*, 1999). Zusätzlich wurde auch für THRA1 beschrieben, daß es Apoptose auslösen kann (Gandrillon et al., 1994; Llanos *et al.*, 1998). THRA-1 kann also offensichtlich ähnliche Phänotypen wie Myc selbst erzeugen und könnte daher ein wichtiges Zielgen bei der Entstehung von Tumoren sein.

3.3.6. Myc-regulierte Gene in der Apoptose

In einem Modell nach Evan und Harrington (1994) induziert Myc gleichzeitig Gene, die für Proliferation und Apoptose benötigt werden. Je nachdem, welche Signale eine Zelle bekommt, bzw. wenn Überlebenssignale fehlen, wird der Apoptoseweg aktiviert (vgl. Abschnitt I, 2.4.). Die Analysen dieser Arbeit brachten auf den ersten Blick keine Gene, die unmittelbar mit der Regulation von Apoptose im Zusammenhang stehen. Bei der Literatursuche fiel aber doch ein Gen auf, das bei der Aktivierung von p53 mitwirkt, VRK1 (Tabelle 4). VRK1 phosphoryliert p53 an Threonin 18, einer Aminosäure, die für die Bindung von p53 an Mdm-2 benötigt wird (Lopez-Borges und Lazo, 2000).
Die Aktivität von p53 hängt von der Komplexierung mit seinem Inhibitor Mdm-2 ab. Bindet Mdm-2 an p53, kommt es zur raschen Degradation des Proteins (Kamijo *et al*., 1998; Sherr und Weber, 2000). Myc kann über die Stabilisierung von p53 Apoptose induzieren (Hermeking und Eick, 1994; Wagner *et al*., 1994). Diese Stabilisierung wird wahrscheinlich durch die Inaktivierung von Mdm-2 vermittelt.

3.3.7. Myc-reprimierte Gene

Die Identifikation von Myc-reprimierten Genen hängt von der Stabilität der Kandidatengen-RNA ab. Mit der Run-On-Methode kann man die Repression eines Gens auf der Ebene der Transkription einfach detektieren (Abb. 28). Über die Funktion der bereits identifizierten Myc-reprimierten Gene ist bislang wenig bekannt (Übersicht in Claassen und Hann, 1999). Einige, wie *gadd*45 oder MCC, können Zellzyklusarrest induzieren (Matsumine *et al*., 1996).

Gadd45 verhindert beispielsweise den Eintritt in die Mitose durch die Bindung an die cdc2-Kinase (Zhan *et al*., 1999). Myc reprimiert diese Gene mit unterschiedlichen Mechanismen. In den meisten Fällen bindet Myc an einen Transkriptionsfaktor und unterdrückt dadurch dessen Aktivität (Übersicht in Claassen und Hann, 1999).

4. Bedeutung der Ergebnisse für die Biologie von Myc

Myc-Funktionen wurden bisher auf einer zellbiologischen- und einer molekularbiologischen Ebene beschrieben: Zellbiologisch hat die Myc-Expression komplexe Phänotypen zur Folge. Diese Phänotypen, die bei Myc-Überexpression auftreten, sind Zellzyklus-Induktion und Zellwachstum (was zur Zellteilung und zur Immortalisierung von Zellen führt), sowie Induktion von Apoptose und Hemmung von Differenzierung.
Andererseits ist die molekularbiologische Funktion von Myc wahrscheinlich beschränkt auf die Regulation von Genen durch Einfluß auf die Transkription[5]. Können die komplexen Funktionen von Myc nur mit der Funktion als Transkriptionsfaktor erklärt werden? Im folgenden Abschnitt wird versucht, ein Modell für Myc-Funktionen aufzustellen, in dem Myc ausschließlich als Transkriptionsfaktor fungiert.

Wie beeinflußt Myc das Wachstum von Zellen ?
In dieser Arbeit wurde eine große Liste von Genen identifiziert, die von Myc reguliert werden. Ob alle diese Gene direkte Myc-Zielgene sind, muß im einzelnen noch geklärt werden. Nach der Interpretation der Induktionskinetiken (Abb. 24, Abb. 28) folgen die Gene unmittelbar der *myc*-Induktion und sind daher gute Kandidaten für direkte Myc-Zielgene. Myc reguliert also sehr viele Gene gleichzeitig und ist damit ein übergeordneter Regulator für die Transkription von Genen, die für die Proliferation wichtig sind.

[5] In dieser Arbeit wurde bisher die Interaktion von Myc mit anderen Proteinen nicht besprochen. Letztlich führen diese Interaktionen aber auch wieder zu Induktion und Repression von Genen (Übersicht in Lemaitre, 1996).

Es wurde lange vermutet, daß Myc einen oder wenige wichtige Regulatoren der Zellzyklus-Progression induziert und so die Tumorentstehung fördert. Wahrscheinlicher ist aber, daß eine Vielzahl Myc-regulierter Gene an der Tumorentstehung beteiligt ist und somit Myc selbst der entscheidende Faktor ist. Arbeiten in $Myc^{-/-}$-Fibroblasten bestätigen diese Annahme. $Myc^{-/-}$-Fibroblasten proliferieren aufgrund von Stoffwechseldefekten nur sehr langsam (Mateyak *et al*., 1997). Um diesen Phänotyp zu komplementieren, wurden cDNA-Banken in die Zellen transfiziert. cDNA-Klone, die für c-*myc* oder N-*myc* codieren, konnten als einzige den Phänotyp revertieren (Berns *et al*., 2000; Nikiforov *et al*., 2000).

Viele der Myc-regulierten Gene sind essentiell und eine minimale Expression muß auch in arretierten Zellen erhalten bleiben, um den Grundbedarf an Energie, Metabolismus und Translation zu decken. Dies bedeutet aber, daß die Abschaltung von Myc nicht die komplette Abschaltung dieser Gene bewirkt. Solche Gene müssen also auch von anderen Faktoren reguliert werden. Diese Annahme ist auch aus einem anderen Gesichtspunkt sinnvoll: Ein komplexer Organismus wie der des Menschen könnte es sich nicht leisten, wichtige Gene nur durch einen einzigen Faktor zu regulieren. Die Anfälligkeit für Defekte, die z.B. zu Tumorzellen führen, wäre zu groß. Diese Theorie unterstützen Arbeiten, die zeigen, daß Myc-regulierte Gene in $Myc^{-/-}$-Fibroblasten auch durch Serum stimuliert werden (Bush *et al*., 1998). Welchen Einfluß hat dann Myc noch auf die Expression dieser Gene? Abb. 31 zeigt eine mögliche Antwort. Myc ist demnach nicht der Regulator, der über die absolute Expression eines Gens entscheidet. Myc steigert vielmehr die Expression bestimmter Gene. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß viele Myc-regulierte Gene in Northern-Blot-Analysen immer noch ein detektierbares Signal zeigen, auch wenn Myc abgeschaltet ist (Abb. 24, Abb. 30, Bush *et al*., 1998). Zusätzlich erklärt es den Befund, daß ein Großteil der Gene nur um den Faktor 2 bis 4 induziert wird (Tabelle 4 und Coller *et al*., 2000). Die Erhöhung der Transkriptionsrate um einen geringen Faktor reicht aus, um die Menge eines Proteins über den Grundbedarf hinaus zu steigern (Abb. 31). Diese Produktion über den Grundbedarf hinaus führt letztlich zur Ansammlung von Zellmasse, die Zelle hat „zugenommen".

Die Rolle des Translationsfaktors eIF4E in diesem Modell wurde bereits im ersten Abschnitt erwähnt (Abschnitt I, 2.6.2.). Myc induziert die Transkription von eIF4E (Rosenwald *et al*., 1995). Die CAP-abhängige, effiziente Translation wird durch die Aktivierung von eIF4E induziert (Raught und Gingras, 1999). Damit ist eIF4E ein übergeordneter Regulator der Initiation der Translation und kann dadurch zur Tumorentstehung beitragen (Clemens und Bommer, 1999; DeBenedetti und Harris, 1999).

Myc und eIF4E könnten gemeinsam die Genexpression koordinieren, wie es in Abschnitt I (2.6.2.) bereits beschrieben wurde: Myc könnte den Eintritt in G1 durch gesteigerte Transkription bestimmter Gene steuern, während eIF4E die Translation dieser Gene reguliert.

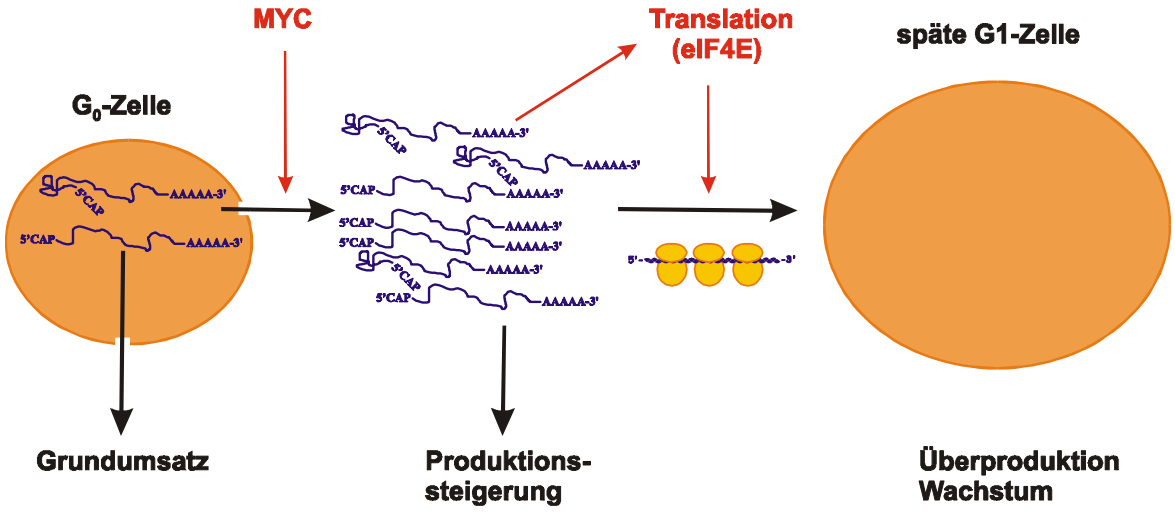

Abb. 31: Modell der Wachstumsregulation durch Myc. Myc führt bei einem großen Spektrum von Genen zur erhöhten Transkription. Die zunehmende Zahl der Transkripte führt zu gesteigerter Synthese der jeweiligen Produkte. Die meisten dieser Gene werden auch in arretierten Zellen (G0) transkribiert, aber nur um den Grundbedarf an dem jeweiligen Protein zu decken. Steigert man die Produktion über den Grundbedarf hinaus, dann kann der Überschuß zur Ansammlung und Speicherung von Zellmasse dienen.

Kontrolliert Myc komplexe Funktionen wie Zellwachstum, Zellzyklus und Apoptose?

Da Myc eine Vielzahl von Genen reguliert, die in diesen Prozessen eine Rolle spielen, drängt sich ein erweitertes Modell für die Myc-Funktion auf. Darin trifft Myc nicht die Entscheidung, ob ein Programm abläuft oder nicht, es stellt vielmehr die dafür nötigen Faktoren, durch Induktion der entsprechenden Gene, zur Verfügung. Ob die Produkte dieser Gene dann aktiv werden, hängt davon ab, ob deren mRNA stabilisiert und translatiert wird und ob die Produkte auf Proteinebene aktiviert werden. Diese Aktivität wird durch das Vorhandensein zytostatischer Faktoren oder Wachstumsfaktoren bestimmt (Abb. 32). Die Kombination verschiedener Faktoren wirkt unterschiedlich in verschiedenen Zelltypen.

Im B-Zellsystem, das in dieser Arbeit verwendet wurde, führt die Myc-Expression im Gegensatz zu Fibroblastensystemen bei Serum-Mangel nicht zu Apoptose. FKS wird aber

benötigt, um Zellzyklusregulatoren zu aktivieren. Der FKS-Mangel führt wahrscheinlich dazu, daß einige Signalwege nicht aktiviert werden, die in Synergie mit Myc zur Rb-Phosphorylierung führen.

TGF-β-Behandlung verhindert in P493-6-Zellen die Proliferation (Bettina Kempkes, persönliche Mitteilung) und das Zellwachstum (nicht gezeigt). Die Abhängigkeit von TGF-β wird in dieser Arbeit z.B. durch die cdk4-Expression dokumentiert. Myc induziert cdk4 direkt, was in Anwesenheit von FKS zur Hyperphosphorylierung von Rb führt. Auch in Abwesenheit von FKS wird cdk4 durch Myc induziert (Daten nicht gezeigt), die Rb-Phosphorylierung bleibt aber aus (Abb. 16). Myc-Expression bei gleichzeitiger TGF-β-Behandlung führt zur Repression von cdk4.

Myc-Expression ist ausreichend, um Zellwachstum zu ermöglichen. Außerdem wurde gezeigt, daß Zellzyklusregulation und Zellwachstum entkoppelbar sind. Die Aktivierung der Zellzyklusregulation ist oftmals vom Erreichen einer bestimmten Zellgröße abhängig (Übersicht in Neufeld und Edgar, 1998). Die Identifikation von Sensoren für Zellgröße und Wachstum ist ein weiteres interessantes Thema, das in P493-6-Zellen untersucht werden könnte.

Eine Zelle kann proliferieren, differenzieren oder in den programmierten Zelltod eintreten. Für einen Zellverband ist es wichtig, daß die Entscheidung für diese Programme nicht unkontrolliert abläuft. Die Programme werden daher nicht von der Expression eines Gens wie *myc* alleine kontrolliert. Die Entscheidung hängt von Faktoren im Inneren der Zelle ab und von Signalen, die von der Umgebung aus auf die Zelle wirken.

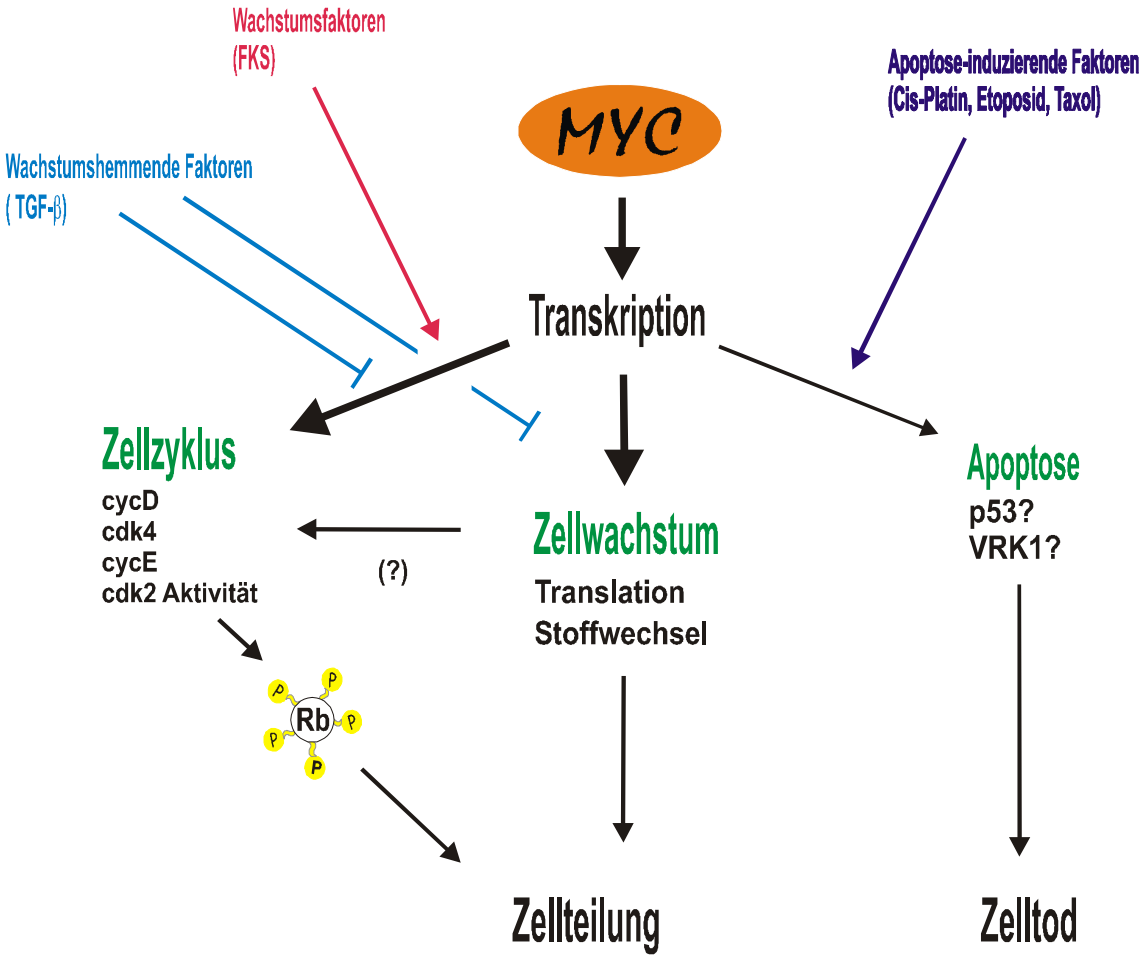

Abb. 32: Myc-vermittelte Funktionen in P493-6-Zellen. Myc induziert Proliferation, Zellwachstum und Apoptose wahrscheinlich über Transkription von Myc-Zielgenen. Myc ist aber nicht dominant in der Regulation dieser Programme. Extrazelluläre Signale entscheiden in Kombination mit Myc darüber, welches Programm induziert wird. In P493-6-Zellen führt die Myc-Expression alleine zwar zu Zellwachstum, aber erst die Anwesenheit von FKS führt zur Aktivierung von Zellzyklusregulatoren. TGF-β hemmt in P493-6-Zellen das Wachstum und die Proliferation. Bei Behandlung mit Apoptose-induzierenden Verbindungen (Cis-Platin, Etoposid, Taxol) kann Myc-Expression in P493-6-Zellen zu Apoptose führen. FKS-Mangel löst dagegen keine Myc-induzierte Apoptose in P493-6-Zellen aus. Möglicherweise spielt dabei die Induktion von VRK1 und p53 eine Rolle (vgl. 1.1. und 3.3.6.).

5. Ausblick

Die Weiterentwicklung der Sequenzierungstechniken führte zu wichtigen Informationen über exprimierte Gene und komplette Genome. Daraus entwickelten sich in den letzten Jahren neue Disziplinen der Biologie, wie die Genomanalyse und die Bioinformatik. Damit verbunden war auch die Entwicklung neuer Techniken zur Untersuchung differentieller Genexpression mit Hilfe von Genchips. Diese Techniken liefern eine große Menge an Daten, die in Bezug auf die jeweilige biologische Fragestellung interpretiert werden müssen.

Mit der Zellinie P493-6 hat man die Möglichkeit, mehrere Genexpressionsmuster eines Systems (einer Zellinie) zu vergleichen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß dabei interresante Korrelationen bestehen, wie die gegensätzliche Regulation von Genen durch Myc und TGF-β.

Der Vergleich von Expressionsmustern könnte Hinweise auf eine weitere wichtige Frage geben: Ist die Ursache einer Tumorentstehung die Folge der Deregulation des *myc*-Gens, oder die Folge einer daraus resultierenden Überexpression des Myc-Proteins? Erste Ergebnisse in der P493-6-Zellinie zeigen, daß das Myc-Protein durch verschiedene Tetracyclinmengen im Kulturmedium titriert werden kann. Eine Folge der Reduzierung der Myc-Expression ist zum Beispiel eine Reduzierung der Proliferationsgeschwindigkeit von P493-6-Zellen (Franz Kohlhuber, persönliche Mitteilung). In weiteren Arbeiten soll gezeigt werden, ob die Titration von Myc-Protein auch Einfluß auf die Genregulation hat. Diese Untersuchungen könnten zeigen, ob eine Überexpression von Myc zu einer Induktion oder Repression von Genen führt, die unter physiologischen Umständen nicht von Myc reguliert werden. Wäre dies der Fall, könnten solche deregulierten Gene die eigentliche Ursache der Tumorentstehung durch Myc sein.

Neue Techniken der differentiellen Genexpression und geeignete Zellsysteme, wie das vorliegende, werden daher in der Zukunft entscheidend zu der Frage beitragen können, welche molekularen Ursachen zur Krebsentstehung beitragen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Überproduktion des Myc-Proteins ist eine Ursache für die Entstehung einer großen Anzahl von humanen Tumoren. Die Erforschung der Myc-Funktionen ist daher ein wichtiges Ziel der Tumorbiologie.
Mit einem neuartigen Zellsystem wurde in dieser Arbeit die Rolle von Myc für das Wachstum von Zellen untersucht. Das Zellsystem P493-6 ist eine B-Zellinie, in der die *myc*-Expression durch ein Tetrazyklin-Vektorsystem regulierbar ist und das erste menschliche Zellsystem, in dem Myc konditional untersucht werden konnte. Diese Linie exprimiert kein endogenes *myc*, so daß Myc-Funktionen nur von der Expression des exogenen, konditionalen Myc abhängen. Der Zusatz von Tetrazyklin (Tc) im Kulturmedium bewirkt die Repression von *myc* und den Zellzyklusarrest. Durch Auswaschen von Tc kann *myc* wieder induziert werden und die Zellen treten wieder in die Zellzyklusprogression ein. In früheren Arbeiten wurde in dieser Zellinie bereits der Einfluß von Myc auf die Zellzyklusregulation untersucht (Pajic *et al*. 2000). Diese Untersuchungen wurden in dieser Arbeit erweitert, mit Augenmerk auf die Myc-Funktion im Zellwachstum. Myc löste in P493-6 keine Apoptose aus, wenn dem Kultivierungsmedium Serum entzogen wurde. Myc konnte bei Serum-Entzug nicht den Eintritt in die DNA-Synthesephase induzieren. Stattdessen wurden Myc-Funktionen im Zellwachstum beobachtet. Myc steigerte bei Serum-Entzug die Proteinsynthese, die Aktivität von Stoffwechselenzymen und bewirkte so die Zunahme an Zellmasse und -Größe. Zum ersten Mal wurde damit gezeigt, daß Myc-Expression Zellwachstum induziert, ohne daß die Aktivierung des Zellzyklus erfolgen muß. Zellwachstum kann also durch Myc über einen eigenen, Zellzyklus-unabhängigen Weg reguliert werden.
Diese Ergebnisse wurden durch andere Arbeiten über Maus- und Drosophila-Myc bestätigt.

Da Myc als Transkriptionsfaktor beschrieben wurde, wurden in der vorliegenden Arbeit neue Myc-regulierte Gene mit modernen Array- und Genchip-Analysen identifiziert. Insgesamt konnten 108 Gene identifiziert werden, die neue Kandidatengene für direkte Regulation durch Myc sind. Viele dieser Gene sind am Ablauf von Stoffwechselwegen beteiligt, wie Aminosäure- und Proteinsynthese, Lipid-Metabolismus, Proteinfaltung und –umsatz,

Nukleotid- und DNA-Synthese, Transport, Nukleolus-Funktion, Transkription, Spleissen und oxidativem Stress, was die Beobachtungen der Zellwachstumsregulation bestätigt.
Die Identifikation von Myc-Zielgenen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, war eine neue Beobachtung. Neben Komponenten der Signaltransduktion wurden auch Wachstumsfaktoren-, und Wachstumsfaktorrezeptoren als Myc-Zielgene identifiziert. Damit ist Myc an der Regulation von autokrinen und parakrinen Stimulierungs-Signalwegen beteiligt, die die Proliferation entscheidend beeinflussen. Die Ergebnisse des Genexpressionsprofils ist außerdem von Bedeutung für das Verständnis der Zellzyklusaktivierung in B-Zellen.

LITERATUR

A

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

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

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

Ando, K., und J. D. Griffin (1995). **Cdk4 integrates growth stimulatory and inhibitory signals during G1 phase of hematopoietic cells**. Oncogene *10*, 751-755.

Askew, D. S., R. A. Ashmun, B. C. Simmons, und J. L. Cleveland (1991). **Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis**. Oncogene *6*, 1915-1922.

Ayer, D. E., L. Kretzner, und R. N. Eisenman (1993). **Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity**. Cell *72*, 211-222.

B

Banchereau, J., P. de Paoli, A. Valle, E. Garcia, und F. Rousset (1991). **Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40**. Science *251*, 70-72.

Bauer, A., W. Mikulits, G. Lagger, G. Stengl, G. Brosch, und H. Beug (1998). **The thyroid hormone receptor functions as a ligand-operated developmental switch between proliferation and differentiation of erythroid progenitors**. Embo J *17*, 4291-4303.

Beier, R., A. Burgin, A. Kiermaier, M. Fero, H. Karsunky, R. Saffrich, T. Moroy, W. Ansorge, J. Roberts, und M. Eilers (2000). **Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by myc are genetically separable events**. Embo J *19*, 5813-5823.

Bello-Fernandez, C., und J. L. Cleveland (1992).
c-myc transactivates the ornithine decarboxylase gene.
Curr Top Microbiol Immunol *182*, 445-452.

Bello-Fernandez, C., G. Packham, und J. L. Cleveland (1993).
The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc.
Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 7804-7808.

Benvenisty, N., A. Leder, A. Kuo, und P. Leder (1992).
An embryonically expressed gene is a target for c-Myc regulation via the c-Myc-binding sequence. Genes Dev *6*, 2513-2523.

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

Blackwood, E. M., B. Luscher, und R. N. Eisenman (1992).
Myc and Max associate in vivo. Genes Dev *6*, 71-80.

Borer, R. A., C. F. Lehner, H. M. Eppenberger, und E. A. Nigg (1989).
Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell *56*, 379-390.

Bornkamm, G. W., H. Delius, U. Zimber, J. Hudewentz, und M. A. Epstein (1980).
Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. J Virol *35*, 603-618.

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

Bush, A., M. Mateyak, K. Dugan, A. Obaya, S. Adachi, J. Sedivy, und M. Cole (1998).
c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed cMyc targets.
Genes Dev *12*, 3797-3802.

C

Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares, und I. Campos (2000).
To be or not to be in the nucleolus. Nat Cell Biol *2*, E107-112.

Cavanaugh, A. H., W. M. Hempel, L. J. Taylor, V. Rogalsky, G. Todorov, und L. I. Rothblum (1995).
Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product Nature *374*, 177-180.

Chen, C., A. Nussenzweig, M. Guo, D. Kim, G. C. Li, und C. C. Ling (1996).
Down-regulation of gadd153 by c-myc in rat fibroblasts and its effect on cell growth and radiation-induced apoptosis. Oncogene *13*, 1659-1665.

Chu, Y., P. A. Solski, R. Khosravi-Far, C. J. Der, und K. Kelly (1996).
The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. J Biol Chem *271*, 6497-6501.

Claassen, G. F., und S. R. Hann (1999).
Myc-mediated transformation: the repression connection. Oncogene *18*, 2925-2933.

Clemens, M. J., und U. A. Bommer (1999).
Translational control: the cancer connection. Int J Biochem Cell Biol *31*, 1-23.

Coats, S., P. Whyte, M. L. Fero, S. Lacy, G. Chung, E. Randel, E. Firpo, und J. M. Roberts (1999).
A new pathway for mitogen-dependent cdk2 regulation uncovered in p27(Kip1)-deficient cells. Curr Biol *9*, 163-173.

Cole, M. D., und S. B. McMahon (1999).
The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. Oncogene *18*, 2916-2924.

Colledge, M., und J. D. Scott (1999).
AKAPs: from structure to function. Trends Cell Biol *9*, 216-221.

Coller, H. A., C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E. S. Lander, R. N. Eisenman, und T. R. Golub (2000).
Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion.
Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 3260-3265.

Constance, C. M., J. I. t. Morgan, und R. M. Umek (1996).
C/EBPalpha regulation of the growth-arrest-associated gene gadd45.
Mol Cell Biol *16*, 3878-3883.

Craxton, A., K. L. Otipoby, A. Jiang, und E. A. Clark (1999).
Signal transduction pathways that regulate the fate of B lymphocytes.
Adv Immunol *73*, 79-152.

𝒟

Dang, C. V. (1999). **c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism**. Mol Cell Biol *19*, 1-11.

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

Datar, S. A., H. W. Jacobs, A. F. de La Cruz, C. F. Lehner, und B. A. Edgar (2000).
The drosophila cyclin D-cdk4 complex promotes cellular growth. Embo J *19*, 4543-4554.

Davis, A. C., M. Wims, G. D. Spotts, S. R. Hann, und A. Bradley (1993).
A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. Genes Dev *7*, 671-682.

De Azevedo, W. F., S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, und S. H. Kim (1997).
Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. Eur J Biochem *243*, 518-526.

De Benedetti, A., und A. L. Harris (1999).
eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies.
Int J Biochem Cell Biol *31*, 59-72.

Dennis, P. B., S. Fumagalli, und G. Thomas (1999).
Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. Curr Opin Genet Dev *9*, 49-54.

𝐸

Eilers, M., D. Picard, K. R. Yamamoto, und J. M. Bishop (1989).
Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormonedependent transformation of cells. Nature *340*, 66-68.

Eilers, M., S. Schirm, und J. M. Bishop (1991).
The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene.
Embo J *10*, 133-141.

Elend, M., und M. Eilers (1999).
Cell growth: downstream of Myc to grow or to cycle? Curr Biol *9*, R936-938.

Evan, G., und T. Littlewood (1998).
A matter of life and cell death. Science *281*, 1317-1322.

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

Ewen, M. E., C. J. Oliver, H. K. Sluss, S. J. Miller, und D. S. Peeper (1995).
p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. Genes Dev *9*, 204-217.

Ewen, M. E., H. K. Sluss, L. L. Whitehouse, und D. M. Livingston (1993).
TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. Cell *74*, 1009-1020.

F

Feinberg, A. P., und B. Vogelstein (1983).
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem *132*, 6-13.

Ferre-D'Amare, A. R., G. C. Prendergast, E. B. Ziff, und S. K. Burley (1993).
Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain.
Nature *363*, 38-45.

Frisen, J., J. Holmberg, und M. Barbacid (1999).
Ephrins and their Eph receptors: multitalented directors of embryonic development. Embo J *18*, 5159-5165.

G

Galaktionov, K., X. Chen, und D. Beach (1996).
Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. Nature *382*, 511-517.

Gallant, P., Y. Shiio, P. F. Cheng, S. M. Parkhurst, und R. N. Eisenman (1996).
Myc and Max homologs in Drosophila. Science *274*, 1523-1527.

Gandrillon, O., N. Ferrand, J. J. Michaille, L. Roze, M. H. Zile, und J. Samarut (1994).
c-erbA alpha/T3R and RARs control commitment of hematopoietic selfrenewing progenitor cells to apoptosis or differentiation and are antagonized by the v-erbA oncogene. Oncogene *9*, 749-758.

Garcia, C. K., X. Li, J. Luna, und U. Francke (1994).
cDNA cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2-p12. Genomics *23*, 500-503.

Ginisty, H., F. Amalric, und P. Bouvet (1998).
Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. Embo J *17*, 1476-1486.

Gossen, M., und H. Bujard (1992).
Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracyclineresponsive promoters. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 5547-5551.

Grandori, C., und R. N. Eisenman (1997).
Myc target genes. Trends Biochem Sci *22*, 177-181.

Grandori, C., J. Mac, F. Siebelt, D. E. Ayer, und R. N. Eisenman (1996).
Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites in vivo. Embo J *15*, 4344-4357.

Greasley, P. J., C. Bonnard, und B. Amati (2000).
Myc induces the nucleolin and BN51 genes: possible implications in ribosome biogenesis. Nucleic Acids Res *28*, 446-453.

H

Hammerschmidt, W., und B. Sugden (1989).
Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. Nature *340*, 393-397.

Harrington, E. A., M. R. Bennett, A. Fanidi, und G. I. Evan (1994).
c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines.
Embo J *13*, 3286-3295.

Hassig, C. A., T. C. Fleischer, A. N. Billin, S. L. Schreiber, und D. E. Ayer (1997).
Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. Cell *89*, 341-347.

Hayward, W. S., B. G. Neel, und S. M. Astrin (1981).
Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. Nature *290*, 475-480.

Heinzel, T., R. M. Lavinsky, T. M. Mullen, M. Soderstrom, C. D. Laherty, J. Torchia, W. M. Yang, G. Brard, S. D. Ngo, J. R. Davie, E. Seto, R. N. Eisenman, D. W. Rose, C. K. Glass, und M. G. Rosenfeld (1997).
A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. Nature *387*, 43-48.

Henriksson, M., und B. Luscher (1996).
Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation.
Adv Cancer Res *68*, 109-182.

Hermeking, H., und D. Eick (1994).
Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. Science *265*, 2091-2093.

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

Herrera, R. E., V. P. Sah, B. O. Williams, T. P. Makela, R. A. Weinberg, und T. Jacks (1996).
Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. Mol Cell Biol *16*, 2402-2407.

Hiebert, S. W., G. Packham, D. K. Strom, R. Haffner, M. Oren, G. Zambetti, und J. L. Cleveland (1995).
E2F-1:DP-1 induces p53 and overrides survival factors to trigger apoptosis.
Mol Cell Biol *15*, 6864-6874.

I

Iavarone, A., und J. Massague (1997).
Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. Nature *387*, 417-422.

Iritani, B. M., und R. N. Eisenman (1999).
c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development.
Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 13180-13185.

Izumi, Y., M. Hirata, H. Hasuwa, R. Iwamoto, T. Umata, K. Miyado, Y. Tamai, T. Kurisaki, A. Sehara-Fujisawa, S. Ohno, und E. Mekada (1998).
A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. Embo J *17*, 7260-7272.

J

Jansen-Durr, P., A. Meichle, P. Steiner, M. Pagano, K. Finke, J. Botz, J. Wessbecher, G. Draetta, und M. Eilers (1993).
Differential modulation of cyclin gene expression by MYC.
Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 3685-3689.

Johnston, L. A., D. A. Prober, B. A. Edgar, R. N. Eisenman, und P. Gallant (1999). **Drosophila myc regulates cellular growth during development**. Cell *98*, 779-790.

Johnston, L. H., und J. C. Game (1978).
Mutants of yeast with depressed DNA synthesis. Mol Gen Genet *161*, 205-214.

Jones, R. M., J. Branda, K. A. Johnston, M. Polymenis, M. Gadd, A. Rustgi, L. Callanan, und E. V. Schmidt (1996).
An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA capbinding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc.
Mol Cell Biol *16*, 4754-4764.

K

Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G. W. Bornkamm, und B. Kempkes (1999).
The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen2.
J Virol *73*, 4481-4484.

Kamijo, T., J. D. Weber, G. Zambetti, F. Zindy, M. F. Roussel, und C. J. Sherr (1998). **Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2**. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 8292-8297.

Kasibhatla, S., H. M. Beere, T. Brunner, F. Echeverri, und D. R. Green (2000).
A 'non-canonical' DNA-binding element mediates the response of the fasligand promoter to c-Myc. Curr Biol *10*, 1205-1208.

Kato, G. J., J. Barrett, M. Villa-Garcia, und C. V. Dang (1990).
An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. Mol Cell Biol *10*, 5914-5920.

Kavanaugh, M. P., D. G. Miller, W. Zhang, W. Law, S. L. Kozak, D. Kabat, und A. D. Miller (1994).
Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters.
Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 7071-7075.

Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen-Durr, J. W. Ellwart, E. Kremmer, H. J. Delecluse, C. Rottenberger, G. W. Bornkamm, und W. Hammerschmidt (1995).
B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. Embo J *14*, 88-96.

Kieff, E. (1996).
Epstein-Barr virus and its replication. In Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Monath, T.P., Melnick, J.L., Roizman, B., Straus, S.E. (eds.). Virology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2343-2396.

Klein, G. (1999).
Immunoglobulin gene associated chromosomal translocations in B-cell derived tumors. Curr Top Microbiol Immunol *246*, 161-167.

Kretzner, L., E. M. Blackwood, und R. N. Eisenman (1992).
Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities. Nature *359*, 426-429.

L

Laux, G., M. Perricaudet, und P. J. Farrell (1988).
A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. Embo J *7*, 769-774.

Lavia, P., und P. Jansen-Durr (1999).
E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. Bioessays *21*, 221-230.

Lee, D. G., und S. P. Bell (2000).
ATPase switches controlling DNA replication initiation. Curr Opin Cell Biol *12*, 280-285.

Lee, T. C., L. Li, L. Philipson, und E. B. Ziff (1997).
Myc represses transcription of the growth arrest gene gas1.
Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 12886-12891.

Lemaitre, J. M., R. S. Buckle, und M. Mechali (1996).
c-Myc in the control of cell proliferation and embryonic development.
Adv Cancer Res *70*, 95-144.

Levine, A. J. (1993).
The tumor suppressor genes. Annu Rev Biochem *62*, 623-651.

Lewis, B. C., H. Shim, Q. Li, C. S. Wu, L. A. Lee, A. Maity, und C. V. Dang (1997).
Identification of putative c-Myc-responsive genes: characterization of rcl, a novel growth-related gene. Mol Cell Biol *17*, 4967-4978.

Lewis, J. D., und D. Tollervey (2000).
Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus.
Science *288*, 1385-1389.

Li, L. H., C. Nerlov, G. Prendergast, D. MacGregor, und E. B. Ziff (1994).
c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. Embo J *13*, 4070-4079.

Llanos, S., C. Caelles, I. Azorin, J. Renau-Piqueras, J. L. Fernandez-Luna, L. Bosca, und A. Munoz (1998).
The c-erbA alpha protooncogene induces apoptosis in glial cells via a protein kinase Cand bcl-2-suppressible mechanism. J Neurochem *70*, 2315-2326.

Lopez-Borges, S., und P. A. Lazo (2000).
The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein. Oncogene *19*, 3656-3664.

Lutterbach, B., und S. R. Hann (1997).
Overexpression of c-Myc and cell immortalization alters c-Myc phosphorylation. Oncogene *14*, 967-975.

M

Marhin, W. W., S. Chen, L. M. Facchini, A. J. Fornace, Jr., und L. Z. Penn (1997).
Myc represses the growth arrest gene gadd45. Oncogene *14*, 2825-2834.
Massague, J., und D. Wotton (2000a).
Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. Embo J *19*, 1745-1754.

Massague, J., und Y. G. Chen (2000b).
Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev *14*, 627-644.

Mastroberardino, L., B. Spindler, R. Pfeiffer, P. J. Skelly, J. Loffing, C. B. Shoemaker, und F. Verrey (1998).
Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. Nature *395*, 288-291.

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

Matsumine, A., T. Senda, G. H. Baeg, B. C. Roy, Y. Nakamura, M. Noda, K. Toyoshima, und T. Akiyama (1996).
MCC, a cytoplasmic protein that blocks cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. J Biol Chem *271*, 10341-10346.

Mauras, N. (1999).
Growth hormone, insulin-like growth factor I and sex hormones: effects on protein and calcium metabolism. Acta Paediatr Suppl *88*, 81-83.

McMahon, S. B., H. A. Van Buskirk, K. A. Dugan, T. D. Copeland, und M. D. Cole (1998).
The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the cMyc and E2F oncoproteins. Cell *94*, 363-374.

Meijer, L., und S. H. Kim (1997).
Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. Methods Enzymol *283*, 113-128.

Meyer, C. A., H. W. Jacobs, S. A. Datar, W. Du, B. A. Edgar, und C. F. Lehner (2000).
Drosophila cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. Embo J *19*, 4533-4542.

Miltenberger, R. J., K. A. Sukow, und P. J. Farnham (1995).
An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. Mol Cell Biol *15*, 2527-2535.

Mink, S., B. Mutschler, R. Weiskirchen, K. Bister, und K. H. Klempnauer (1996).
A novel function for Myc: inhibition of C/EBP-dependent gene activation.
Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 6635-6640.

Mittnacht, S. (1998).
Control of pRB phosphorylation. Curr Opin Genet Dev *8*, 21-27.

Montagne, J., M. J. Stewart, H. Stocker, E. Hafen, S. C. Kozma, und G. Thomas (1999).
Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. Science *285*, 2126-2129.

Moore, G. E., G. P. Murphy, B. W. Papermaster, K. Amiraian, G. M. Kenny, und R. H. Moore (1969).
Purified Roswell Park cultured antilymphocytic globulin RPMI-CALG: preparation and clinical trial. J Surg Oncol *1*, 153-166.

Morgan, D. O. (1997).
Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.
Annu Rev Cell Dev Biol *13*, 261-291.

Mossi, R., und U. Hubscher (1998).
Clamping down on clamps and clamp loaders--the eukaryotic replication factor C.
Eur J Biochem *254*, 209-216.

Muller, R. (1995).
Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. Trends Genet *11*, 173-178.

N

Nagy, L., H. Y. Kao, D. Chakravarti, R. J. Lin, C. A. Hassig, D. E. Ayer, S. L. Schreiber, und R. M. Evans (1997).
Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. Cell *89*, 373-380.

Nesbit, C. E., J. M. Tersak, und E. V. Prochownik (1999).
MYC oncogenes and human neoplastic disease. Oncogene *18*, 3004-3016.

Neufeld, T. P., A. F. de la Cruz, L. A. Johnston, und B. A. Edgar (1998).
Coordination of growth and cell division in the Drosophila wing. Cell *93*, 1183-1193.

Neufeld, T. P., und B. A. Edgar (1998).
Connections between growth and the cell cycle. Curr Opin Cell Biol *10*, 784-790.

O

Obaya, A. J., M. K. Mateyak, und J. M. Sedivy (1999).
Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. Oncogene *18*, 2934-2941.

Ohtani, K., R. Iwanaga, M. Nakamura, M. Ikeda, N. Yabuta, H. Tsuruga, und H. Nojima (1999).
Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. Oncogene *18*, 2299-2309.

Okuda, M., H. F. Horn, P. Tarapore, Y. Tokuyama, A. G. Smulian, P. K. Chan, E. S. Knudsen, I. A. Hofmann, J. D. Snyder, K. E. Bove, und K. Fukasawa (2000).
Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication.
Cell *103*, 127-140.

P

Packham, G., und J. L. Cleveland (1994).
Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis.
Mol Cell Biol *14*, 5741-5747.

Pai, C. Y., H. K. Chen, H. L. Sheu, und N. H. Yeh (1995).
Cell-cycle-dependent alterations of a highly phosphorylated nucleolar protein p130 are associated with nucleologenesis. J Cell Sci *108*, 1911-1920.

Pajic, A., D. Spitkovsky, B. Christoph, B. Kempkes, M. Schuhmacher, M. S. Staege, M. Brielmeier, J. Ellwart, F. Kohlhuber, G. W. Bornkamm, A. Polack, und D. Eick (2000).
Cell cycle activation by c-*myc* in a Burkitt lymphoma model cell line.
Int. J. Cancer, *87*, 787-793.

Penn, L. J., M. W. Brooks, E. M. Laufer, und H. Land (1990).
Negative autoregulation of c-myc transcription. Embo J *9*, 1113-1121.

Perez-Roger, I., S. H. Kim, B. Griffiths, A. Sewing, und H. Land (1999).
Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). Embo J *18*, 5310-5320.

Perez-Roger, I., D. L. Solomon, A. Sewing, und H. Land (1997).
Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes.
Oncogene *14*, 2373-2381.

Philipp, A., A. Schneider, I. Vasrik, K. Finke, Y. Xiong, D. Beach, K. Alitalo, und M. Eilers (1994).
Repression of cyclin D1: a novel function of MYC. Mol Cell Biol *14*, 4032-4043.

Planas-Silva, M. D., und R. A. Weinberg (1997).
The restriction point and control of cell proliferation. Curr Opin Cell Biol *9*, 768-772.

Polack, A., K. Hortnagel, A. Pajic, B. Christoph, B. Baier, M. Falk, J. Mautner, C. Geltinger, G. W. Bornkamm, und B. Kempkes (1996).
c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1.
Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 10411-10416.

Polunovsky, V. A., I. B. Rosenwald, A. T. Tan, J. White, L. Chiang, N. Sonenberg, und P. B. Bitterman (1996).
Translational control of programmed cell death: eukaryotic translation initiation factor 4E blocks apoptosis in growth-factor-restricted fibroblasts with physiologically expressed or deregulated Myc. Mol Cell Biol *16*, 6573-6581.

Polymenis, M., und E. V. Schmidt (1997).
Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. Genes Dev *11*, 2522-2531.

Polymenis, M., und E. V. Schmidt (1999).
Coordination of cell growth with cell division. Curr Opin Genet Dev *9*, 76-80.

Prall, O. W., E. M. Rogan, E. A. Musgrove, C. K. Watts, und R. L. Sutherland (1998).
c-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry. Mol Cell Biol *18*, 4499-4508.

Prendergast, G. C. (1999).
Mechanisms of apoptosis by c-Myc. Oncogene *18*, 2967-2987.

Prendergast, G. C., L. E. Diamond, D. Dahl, und M. D. Cole (1990).
The c-myc-regulated gene mrl encodes plasminogen activator inhibitor 1.
Mol Cell Biol *10*, 1265-1269.

Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch, und A. Ullrich (1999).
EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. Nature *402*, 884-888.

Q

Quevillon, S., J. C. Robinson, E. Berthonneau, M. Siatecka, und M. Mirande (1999).
Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. J Mol Biol *285*, 183-195.

R

Rabson, M., L. Gradoville, L. Heston, und G. Miller (1982).
Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. J Virol *44*, 834-844.

Raught, B., und A. C. Gingras (1999).
eIF4E activity is regulated at multiple levels. Int J Biochem Cell Biol *31*, 43-57.

Reisman, D., N. B. Elkind, B. Roy, J. Beamon, und V. Rotter (1993).
c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. Cell Growth Differ *4*, 57-65.

Rohan, P. J., P. Davis, C. A. Moskaluk, M. Kearns, H. Krutzsch, U. Siebenlist, und K. Kelly (1993).
PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase.
Science *259*, 1763-1766.

Rosenwald, I. B. (1996).
Upregulated expression of the genes encoding translation initiation factors eIF-4E and eIF-2alpha in transformed cells. Cancer Lett *102*, 113-123.

Rosenwald, I. B., A. Lazaris-Karatzas, N. Sonenberg, und E. V. Schmidt (1993a).
Elevated levels of cyclin D1 protein in response to increased expression of eukaryotic initiation factor 4E. Mol Cell Biol *13*, 7358-7363.

Rosenwald, I. B., D. B. Rhoads, L. D. Callanan, K. J. Isselbacher, und E. V. Schmidt (1993b).
Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 6175-6178.

Rowe, M., Rowe, D.T., Gregory, C.D., Young, L.S., Farrell, P.J., Rupani, H., Rickinson, A.B. (1987).
Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. Embo J *9,* 2743-2751

Ruf, I. K., P. W. Rhyne, H. Yang, C. M. Borza, L. M. Hutt-Fletcher, J. L. Cleveland, und J. T. Sample (1999).
Epstein-barr virus regulates c-MYC, apoptosis, and tumorigenicity in Burkitt lymphoma. Mol Cell Biol *19*, 1651-1660.

S

Sambrook, J., E. F. Fritsch, und T. Maniatis. (1989).
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Sprong Harbor, NY).

Schmidt, E. V. (1999).
The role of c-myc in cellular growth control. Oncogene *18*, 2988-2996.

Schreiber-Agus, N., D. Stein, K. Chen, J. S. Goltz, L. Stevens, und R. A. DePinho (1997).
Drosophila Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 1235-1240.

Schuhmacher, M., M. S. Staege, A. Pajic, A. Polack, U. H. Weidle, G. W. Bornkamm, D. Eick, und F. Kohlhuber (1999).
Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. Curr Biol *9*, 1255-1258.

Shan, B., und W. H. Lee (1994).
Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis.
Mol Cell Biol *14*, 8166-8173.

Sheiness, D., und J. M. Bishop (1979).
DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. J Virol *31*, 514-521.

Sherr, C. J. (1996).
Cancer cell cycles. Science *274*, 1672-1677.

Sherr, C. J., und J. D. Weber (2000).
The ARF/p53 pathway. Curr Opin Genet Dev *10*, 94-99.

Shim, H., Y. S. Chun, B. C. Lewis, und C. V. Dang (1998).
A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc.
Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 1511-1516.

Shim, H., C. Dolde, B. C. Lewis, C. S. Wu, G. Dang, R. A. Jungmann, R. Dalla-Favera, und C. V. Dang (1997).
c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth.
Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 6658-6663.

Sigvardsson, M., K. Johansson, L. G. Larsson, K. Nilsson, und T. Leanderson (1994).
Ectopic expression of myc or myn down-regulates immunoglobulin transcription. Leukemia *8*, 1157-1163.

Solomon, D. L., A. Philipp, H. Land, und M. Eilers (1995).
Expression of cyclin D1 mRNA is not upregulated by Myc in rat fibroblasts.
Oncogene *11*, 1893-1897.

Sommer, A., S. Hilfenhaus, A. Menkel, E. Kremmer, C. Seiser, P. Loidl, und B. Luscher (1997).
Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase activity. Curr Biol *7*, 357-365.

Sonenberg, N., und A. C. Gingras (1998).
The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth.
Curr Opin Cell Biol *10*, 268-275.

Spender, L. C., E. J. Cannell, M. Hollyoake, B. Wensing, J. M. Gawn, M. Brimmell, G. Packham, und P. J. Farrell (1999).
Control of cell cycle entry and apoptosis in B lymphocytes infected by Epstein-Barr virus. J Virol *73*, 4678-4688.

Stanton, B. R., A. S. Perkins, L. Tessarollo, D. A. Sassoon, und L. F. Parada (1992).
Loss of N-myc function results in embryonic lethality and failure of the epithelial component of the embryo to develop. Genes Dev *6*, 2235-2247.

Steen, R. L., S. B. Martins, K. Tasken, und P. Collas (2000).
Recruitment of protein phosphatase 1 to the nuclear envelope by Akinase anchoring protein AKAP149 is a prerequisite for nuclear lamina assembly.
J Cell Biol *150*, 1251-1262.

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

Stunnenberg, H. G., C. Garcia-Jimenez, und J. L. Betz (1999).
Leukemia: the sophisticated subversion of hematopoiesis by nuclear receptor oncoproteins. Biochim Biophys Acta *1423*, F15-33.

Suzuki, M., G. Raab, M. A. Moses, C. A. Fernandez, und M. Klagsbrun (1997).
Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. J Biol Chem *272*, 31730-31737.

T

Thomas, G., und M. N. Hall (1997).
TOR signalling and control of cell growth. Curr Opin Cell Biol *9*, 782-787.

Tikhonenko, A. T., D. J. Black, und M. L. Linial (1996).
Viral Myc oncoproteins in infected fibroblasts down-modulate thrombospondin-1, a possible tumor suppressor gene. J Biol Chem *271*, 30741-30747.

Tsuneoka, M., F. Nakano, H. Ohgusu, und E. Mekada (1997).
c-myc activates RCC1 gene expression through E-box elements. Oncogene *14*, 2301-2311.

V

Vennstrom, B., D. Sheiness, J. Zabielski, und J. M. Bishop (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.

Versteeg, R., I. A. Noordermeer, M. Kruse-Wolters, D. J. Ruiter, und P. I. Schrier (1988).
c-myc down-regulates class I HLA expression in human melanomas.
Embo J *7*, 1023-1029.

Vigo, E., H. Muller, E. Prosperini, G. Hateboer, P. Cartwright, M. C. Moroni, und K. Helin (1999).
CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2Finduced S phase. Mol Cell Biol *19*, 6379-6395.

Visintin, R., und A. Amon (2000).
The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. Curr Opin Cell Biol *12*, 372-377.

Voit, R., K. Schafer, und I. Grummt (1997).
Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. Mol Cell Biol *17*, 4230-4237.

W

Wagner, A. J., J. M. Kokontis, und N. Hay (1994).
Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. Genes Dev *8*, 2817-2830.

Walker, C. W., J. D. Boom, und A. G. Marsh (1992).
First non-vertebrate member of the myc gene family is seasonally expressed in an invertebrate testis. Oncogene *7*, 2007-2012.

Weigmann, K., S. M. Cohen, und C. F. Lehner (1997).
Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of Drosophila Cdc2 kinase. Development *124*, 3555-3563.

Weihua, X., D. J. Lindner, und D. V. Kalvakolanu (1997).
The interferon-inducible murine p48 (ISGF3gamma) gene is regulated by protooncogene c-myc. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 7227-7232.

Wensing, B., und P. J. Farrell (2000).
Regulation of cell growth and death by Epstein-Barr virus. Microbes Infect *2*, 77-84.

White, R. J., D. Trouche, K. Martin, S. P. Jackson, und T. Kouzarides (1996).
Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein.
Nature *382*, 88-90.

Willis, A. E., F. E. Paulin, M. J. West, und R. L. Whitney (1997).
Investigation of aberrant translational control of c-myc in cell lines derived from patients with multiple myeloma. Curr Top Microbiol Immunol *224*, 269-276.

Wu-Baer, F., W. S. Lane, und R. B. Gaynor (1996).
Identification of a group of cellular cofactors that stimulate the binding of RNA polymerase II and TRP-185 to human immunodeficiency virus 1 TAR RNA.
J Biol Chem *271*, 4201-4208.

Z

Zhan, Q., M. J. Antinore, X. W. Wang, F. Carrier, M. L. Smith, C. C. Harris, und A. J. Fornace, Jr. (1999).
Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. Oncogene *18*, 2892-2900.

Zhu, K., D. Henning, T. Iwakuma, B. C. Valdez, und H. Busch (1999).
Adriamycin inhibits human RH II/Gu RNA helicase activity by binding to its substrate.
Biochem Biophys Res Commun *266*, 361-365.

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AvgDiff	Average Difference
bHLH-LZ	basische, Helix-loop-Helix Leucin-Zipper Domäne
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C-	Carboxy-
cad	Carbamoyl-Phosphat Synthetase-Aspartat Transcarbamoylase-Dihydroorotase
CD	Cluster of differentiation
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Cln	Cyclin in Hefen
c-Myc	zelluläres Myc
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
Cyc	Cyclin
dh	Dehydrogenase
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol (*threo*-1,4-Dimercapto-2,4-butanol)
EBNA	EBV-nukleäres Antigen
4E-BP 1,2	eIF4E-bindendes Protein1,2
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	eukaryontischer Initiationsfaktor-4E
ER	Östrogen Rezeptor
et al.	et alii (und andere)
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
G1	Gap-Phase 1

G2/M	Gap-Phase 2/Mitose
GAPDH	Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase
h	Stunde
^{3}H	Tritium
Hyg	Hygrmycin B
Ig	Immunglobulin
kb	kilo Basepaar(e)
kd	kilo Dalton
LMP	Latentes Membranprotein
Max	Myc assoziierter Faktor X
MC29	Myelocytomatose Virusstamm 29
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
myc	Myeloblastom
N-	Amino-
N-Myc	Neuroblastom-Myc
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse-Transkriptase-PCR
S-Phase	DNA-Synthesephase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
T	Thymidin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tc	Tetracyclin
TGF-β	Tumor-Wachstumsfaktor β
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)methylamin
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheiten
UE	Untereinheit
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Marino Schuhmacher
geboren am 23.03.1968 in Garmisch-Partenkirchen

Schulbildung:

1974 - 1979	Grundschule Mittenwald
1979 - 1989	Werdenfels-Gymnasium Garmisch-Partenkirchen

Wehrdienst:

1989 - 1990	Wehrdienst in Mittenwald

Hochschulstudium

11/1990-10/1993	Grundstudium Chemie-Diplom an der Universität Bayreuth
11/1993 - 11/1994	Grundstudium Biologie-Diplom an der Universität Bayreuth
03/1995	Vordiplom in Biologie
11/1994 - 12/1996	Hauptstudium an der Universität Bayreuth
12/1996	Diplom-Prüfung in Genetik, Biochemie und Mikrobiologie.
01/1997 - 10/1997	Diplomarbeit am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München, bei PD Dr. Axel Polack. Thema: '*Suche nach Myc-regulierten Genen mit PCR Select, einem Verfahren der subtraktiven cDNA Hybridisierung, in einem neuen hämatopoetischen Zellsystem mit konditionalem Myc'*
10/1997	Diplom in Biologie

Promotion

11/1997 – 12/2000	Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, bei PD Dr. Dirk Eick über die Funktion des Onkogens c-Myc im Zellwachstum und neue Myc-regulierte Gene

Publikationsliste

Alexander Pajic, Martin S. Staege, Diana Dudziak, Marino Schuhmacher, Dimitri Spitkovsky, Günther Eissner, Barbara Christoph, Markus Brielmeier, Georg W. Bornkamm and Axel Polack. **Antagonistic effects of c-myc and Epstein-Barr virus latent genes on the phenotype of human B-cells**
Int. J. Cancer 2001, Sep15;93(6):810-6.

Marino Schuhmacher, Franz Kohlhuber, Michael Hölzel, Carmen Kaiser, Helmut Burtscher, Michael Jarsch, Georg W. Bornkamm, Gerhard Laux, Axel Polack, Ulrich H. Weidle and Dirk Eick: **The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc.**
Nucleic Acids Research 2001, 29(2): 397-406

Alexander Pajic, Dimitry Spitkowsky, Barbara Christoph, Bettina Kempkes, Marino Schuhmacher, Martin S. Staege, Markus Brielmeier, Joachim Ellwart, Franz Kohlhuber, Georg W. Bornkamm, Axel Polack and Dirk Eick. **Cell Cycle Activation by c-Myc in a Burkitt Lymphoma Model Cell Line.**
Int.J.Cancer 2000, September 15, 87 (6): 787-793

Jean Feuillard, Marino Schuhmacher, Sylvie Kohanna, Marianne Asso-Bonnet, Frédérique Ledeur, Raymonde Joubert-Caron, Philippe Bissières, Axel Polack, Georg W. Bornkamm, Martine Raphaël. **Inducible Loss of NF-kB Activity is Associated With Apoptosis and Bcl-2 Downregulation in EBV-Transformed B-Lymphocytes.**
Blood 2000, March 15, 95 (6): 2068-2075

Heiko Hermeking, Carlo Rago, Marino Schuhmacher, Qing Li, Brenda C. O'Connell, Alvaro J. Obaya, Maria K. Mateyak, Wanny Tam, Franz Kohlhuber, Chi V. Dang, John M. Sedivy, Dirk Eick, Bert Vogelstein and Kenneth W. Kinzler. **Identifikation of *CDK4* as a target of c-MYC.**
Proc Natl Acad Sci , 2000 Feb 25, 97(5): 2229-2234

Marino Schuhmacher, Martin S. Staege, Alexander Pajic, Axel Polack, Ulrich H. Weidle, Georg W. Bornkamm, Dirk Eick and Franz Kohlhuber. **Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division.**
Current Biology 1999 Nov 4;9(21):1255-1258.

Raymond Joubert-Caron, Jean Feuillard, Sylvie Kohanna, Florence Poirier, Jean-Pierre Le Caër, Marino Schuhmacher, Georg W. Bornkamm, Axel Polack, Michel Caron, Dominique Bladier, Martine Raphaël. **A computer-assisted two-dimensional gel electrophoresis approach for studying the variations in protein expression related to an induced functional repression of NFkB in lymphoblastoid cell lines.**
Electrophoresis 1999 Apr-May, 20(4-5): 1017-26

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen

Prof. Dr. Georg Bornkamm für seine Unterstützung und für musikalische Momente in seinem Institut.

Mein Dank gilt Dr. Dirk Eick, für die Betreuung der Arbeit, besonders bei der unermüdlichen Myc-Targetsuche. Ebenso für die Geduld bei den zahlreichen Diskussionen und bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ganz besonderen Dank an Dr. Franz Kohlhuber für die Zusammenarbeit, für die Vermittlung von akkurat durchgeführten wissenschaftlichen Experimenten (Mr. Control!) und für unser schönes, gemeinsames Wachstumsprojekt.

Dr. Axel Polack, der mich in die Wissenschaft einführte und mir die interessante Projekte ‚vererbte'.

Eveline Schaadt und Dr. Arnd Kieser ‚for critically reading the manuscript' und die netten Mittagsstunden.

Dr. Gerhard Laux, der immer geduldig für alle Fragen (Computer!!) offen ist, egal wie ungelegen man gerade kommt.

Marcus Conrad für die Organisation von Grillfeiern und des Doktorandenseminars, für Bowlen und Berge!

Dr. Jean Feuillard und Dr. Heiko Hermeking für die fruchtbare Kooperation. Außerdem danke ich der Firma Roche/Penzeberg für die Zusammenarbeit, speziell Dr. Ulrich Weidle, Dr. Helmut Burtscher, V. Evtimova, R. deLange, U. Bär, M. Schwirzke und N. Tarbe für ihreHilfe bei der Arbeit mit den Genchips.

Alexander Pajic für Zellzyklusdiskussionen und seine Einführung in die griechische Kultur, Michael Hölzel, Rob Chapman Dr. Peter Ruile, Dr. Martin Staege und Dr. Jean-Marie Bechet für die heitere Laboratmosphäre und allen Kollegen für die schöne Zeit am Institut.