Zielgene des Proto-Onkogens c-*myc*: Von der genomweiten Analyse zur ribosomalen RNA-Prozessierung

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Isabel Schlosser

Dezember 2003

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

München, Dezember 2003

Isabel Schlosser

Erstgutachter:	Prof. Dr. Dirk Eick
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Charles David
Tag der mündlichen Prüfung:	19. April 2004

Diese Arbeit ist meinem Großvater gewidmet.

1. EINLEITUNG 6

1.1 Vorwort 6

1.2 Das c-*myc*-Gen 7

1.2.1 Die *myc*-Genfamilie 7

1.3 Die Struktur und funktionelle Domänen des Myc-Proteins 8

1.3.1 Myc-Isoformen 9

1.4 Das Myc/Max/Mad Netzwerk 9

1.4.1 Myc als Transkriptionsfaktor 10

1.4.2 Weitere Myc-Interaktions-Proteine 13

1.5 Die Zielgene von Myc 14

1.6 Myc und Zellzyklus 16

1.7 Myc und Zellwachstum 19

1.8 Ribosomenbiogenese 20

1.9 Zielsetzung der Arbeit 23

2. MATERIAL 25

2.1. Chemikalien 25

2.2 Radioaktive Isotope 26

2.3 Enzyme 26

2.4 Antikörper 26

2.5 Hybridisierungsproben für Northern-Blot-Analysen 27

2.6 siRNA 27

2.7 Allgemeine Lösungen und Puffer 28

2.8 Spezielle Lösungen für Affymetrix-Microarrays 29

2.9 Verbrauchsmaterialien und Kits 30

2.10 Geräte 31

3. METHODEN 32

3.1 Standardmethoden der Molekularbiologie 32

3.2 Zellkultur 32

3.3 Northern-Blot-Analyse 33

3.4 Nukleärer „Run-On“ 34

3.4.1 Isolierung von Zellkernen 34

3.4.2 „Run-On“-Reaktion 34

3.4.3 Herstellung von Oligonukleotid-Filter 35

3.5 „Pulse-Chase“-Markierung mit ^{3}H-Uridin 35

3.6 Synthese von cDNA 35

3.6.1 Erststrangsynthese 35

3.6.2 Zweitstrangsynthese 36

3.7 Western-Blot-Analyse 36

3.8 Affymetrix Oligonukleotid-Microarrays 37

3.8.1 Synthese und Fragmentierung der Biotin-markierten cRNA 39

3.8.2 Kontroll-cRNA-Präparation 39

3.8.3 Hybridisierung, Waschen, und Scannen der Genchips 39

3.8.4 Statistische Algorithmen für die Auswertung der Genchips 41

3.9 RNA-Interferenz 43

3.10 Immunfluoreszenz 44

3.10.1 Cyto-Spin 44

3.10.2 Immunfärbung fixierter Zellen 44

4. ERGEBNISSE 45

4.1 Identifizierung von Myc-Zielgenen mit Oligonukleotid-Genchips 45

4.1.1 Expressionsprofile von P493-6 Zellen 47

4.1.2 Expressionsprofile von Smoxi-4 Zellen 69

4.1.3 Zusammenfassung der Genchip-Ergebnisse 72

4.1.4 Gemeinsame Myc-Zielgene von P493-6 und Smoxi-4 Zellen 73

4.2 Der Einfluss von Myc auf die ribosomale RNA-Prozessierung 73

4.2.1 Nukleoläre Zielgene von Myc 74

4.2.2 Bestätigung der Genchip-Ergebnisse durch Northern-Blot-Analysen 76

4.2.3 Ribosomale RNA-Prozessierung in P493-6 Zellen 77

4.3 Regulation der Expression des 47S rRNA-Vorläufers in P493-6 Zellen ... 79

4.3.1 Dichte der RNA-Polymerase I auf ribosomalen Genen 81

4.4 Die Struktur des Nukleolus 85

4.4.1 Der nukleoläre Proliferationsmarker Ki-67 und die rRNA-Prozessierung . 85

4.4.2 Ribosomale RNA-Prozessierung und Cdk-Aktivität 87

4.5 Detaillierte Analyse von Zielgenen mit siRNA 88

5. DISKUSSION 93

5.1 Identifizierung von Myc-Zielgenen in P493-6 und Smoxi-4 Zellen 93

5.2 Die Rolle von Myc in der ribosomalen RNA-Prozessierung 98

5.3 Zusammenfassung 108

Abkürzungen 110

Literatur 112

Veröffentlichungen 121

Danksagung 122

Curriculum Vitae 123

Anhang.....CD

1. EINLEITUNG

1.1 Vorwort

Die Entwicklung und die Homöostase eines vielzelligen Organismus erfordert ein exaktes Gleichgewicht von Proliferation, Differenzierung und Zelltod. Diesen zellulären Erscheinungsformen liegen genau definierte genetische Instruktionen zugrunde. Eine Fehlregulation der genetischen Informationen führt zu einer Störung der Homöostase. Proliferation, Differenzierung und Zelltod sind nicht mehr im Gleichgewicht, was zu abnormalem Verhalten der Zellen bis hin zur Tumorentwicklung führen kann. Gene, die durch eine Fehlregulation (Mutation) die Entartung der Zellen bewirken können, bezeichnet man als Proto-Onkogene.

Ein solches Proto-Onkogen ist c-*myc*. Die Aktivität des c-*myc*-Gens beeinflusst Zellzyklus, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose in Vertebratenzellen. Die Transkription des c-*myc*-Gens, das für einen Transkriptionsfaktor (c-Myc) kodiert, ist streng reguliert. In ruhenden, differenzierten Zellen ist die c-*myc*-Expression fast nicht detektierbar. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wird c-*myc* jedoch innerhalb von Minuten stark induziert. In proliferierenden Zellen wird c-*myc* auf niedrigem Niveau exprimiert. Eine mutationsbedingte, fehlerhafte Regulation des Gens führt zu einer konstitutiven, hohen Expression des c-*myc*-Gens und somit zu einer ständigen Aktivität von c-Myc. Infolge der Fehlregulation des Gens kommt es zur Entstehung verschiedener Krebsarten. Somit wird aus dem Proto-Onkogen c-*myc* ein Onkogen.

Was hat die Expression des Proto-Onkogens bzw. des Onkogens c-*myc* für unterschiedliche Folgen für die Zellen? Um diese Frage zu beantworten, wurden in den letzten Jahren so genannte Genchip-Analysen durchgeführt. Bei diesen Analysen können Tausende von Genen gleichzeitig auf ihre Regulation durch c-Myc untersucht werden. So wurden viele potentielle c-Myc-Zielgene identifiziert, was bis jetzt aber noch nicht zufriedenstellend zur Aufklärung der verschiedenen Funktionen von c-Myc in gesunden Zellen und seiner Rolle bei der Tumorgenese führte. Diese Arbeit, in der eine genomweite Analyse von c-Myc-Zielgenen durchgeführt wurde, soll dazu beitragen, aus der Vielzahl der potentiellen Zielgene funktionelle Gruppen von Genen herauszufiltern. Letztendlich können diese Gruppen zur Aufklärung der Wirkungsweise von c-Myc führen.

1.2 Das c-*myc*-Gen

Das Proto-Onkogen c-*myc* kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein (c-Myc) und wurde ursprünglich als das virale Onkogen (v-*myc*) des MC29 Stammes des „avian leukemia virus (ALV)“ identifiziert (Sheiness et al., 1978). Dieses Retrovirus induziert neben Karzinomen und Sarkomen die *My*elo*c*ytomatose in Vögeln, von der das Gen seinen Namen trägt. C-*myc* wurde zuerst 1982 als das zelluläre Homolog von v-*myc* im Huhn isoliert (Vennstrom et al., 1982). Kurz darauf wurden die c-*myc*-Gene der Ratte, des Menschen und der Maus kloniert und charakterisiert (Dalla-Favera et al., 1982).

1.2.1 Die *myc*-Genfamilie

Gene, die aufgrund ihres gemeinsamen Ursprungs eine ähnliche Struktur aufweisen, werden in einer so genannten Genfamilie zusammengefasst. Die *myc*-Genfamilie ist sehr wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden. Außer c-*myc* besteht sie aus den zwei gut beschriebenen Mitgliedern N-*myc*- und L-*myc*- und den nur in Nagern vorkommenden B-*myc*- und S-*myc*-Genen. Die Familienmitglieder sind evolutionär hoch konserviert, werden jedoch zu unterschiedlichen Zeiten in der Entwicklung und in unterschiedlichen Geweben und Organen exprimiert. Funktionell gesehen können sich die einzelnen Familienmitglieder teilweise ersetzen (DePinho et al., 1991; Morgenbesser und DePinho, 1994; Bull et al., 2001).

N-*myc* und L-*myc* wurden ursprünglich als amplifizierte c-*myc*-verwandte Gene im humanen Neuroblastom bzw. im kleinzelligen Lungenkarzinom identifiziert (Kohl et al., 1983; Nau et al., 1985). N-*myc* ist auch in verschiedenen Arten pädiatrischer Tumore amplifiziert. S- und B-*myc* sind weniger gut charakterisierte Mitglieder der *myc*-Familie. Die Expression von S-*myc* wurde bisher nur in embryonalen Ratten-Knorpelzellen beobachtet, während B-*myc* in verschiedenen Geweben der Ratte exprimiert wird (Ingvarsson et al., 1988; Asai et al., 1994). Während die Proteine der c-, N- und L-*myc* Familienmitglieder transformierende Aktivitäten zeigen, wirken S- und B-Myc inhibitorisch. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird mit Myc das c-Myc-Protein bzw. das Gen (*myc*) bezeichnet.

1.3 Die Struktur und funktionelle Domänen des Myc-Proteins

Das Myc-Protein ist durch verschiedene Domänen charakterisiert (Abb. 1). Die N-terminale Domäne (NTD) beinhaltet die beiden hoch konservierten Myc-Boxen (MB1 und MB2), die man nur in der *myc*-Genfamilie findet. Die MB1- und MB2-Sequenzen sind essentiell für die Funktion von Myc als Transkriptionsfaktor. In der C-terminalen Domäne (CTD) befindet sich das ebenfalls hoch konservierte basische Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Motiv (bHLHLZ). Die basische Region ermöglicht eine sequenzspezifische DNA-Bindung, während das HLHLZ-Motiv für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich ist. Zusätzlich trägt das Myc-Protein ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS), das die Lokalisation in den Zellkern dirigiert (Henriksson und Luscher, 1996).

Das Phosphoprotein Myc weist über seine gesamte Länge mehr als zehn Phosphorylierungstellen auf (Abb. 1, Sterne). Die Auswirkungen dieser post-translationalen Modifikationen sind noch nicht vollständig bekannt. Myc-Proteine mit Mutationen an oder in unmittelbarer Nähe der AS Threonin 58 (Thr58), die die Phosphorylierung an dieser Stelle verhindern, werden häufig in Burkitt-Lymphom-zellen gefunden und zeigen in *in vitro*-Experimenten ein erhöhtes Transformations-potential (Henriksson et al., 1993; Albert et al., 1994). Man vermutet, dass Mutationen an Thr58 zu einer ineffizienten Ubiquitinylierung führen, was eine Stabilisierung und Akkumulation des Proteins zur Folge hat (Bahram et al., 2000; Gregory und Hann, 2000; Niklinski et al., 2000). Die Akkumulation des Proteins könnte zur Transformation der Zellen beitragen.

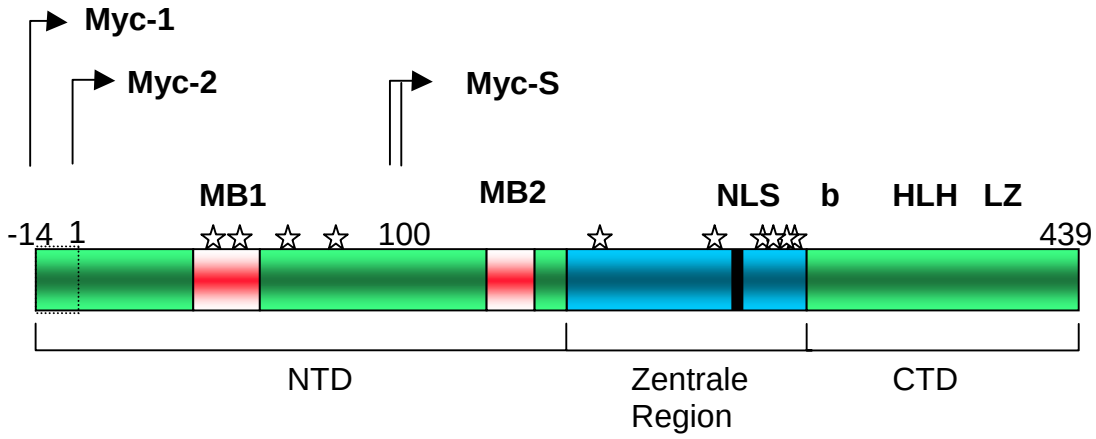


Abb. 1 Struktur und Isoformen von Myc. Myc-1 (67 kDa) und Myc-2 (64 kDa) unterscheiden sich durch 14 Aminosäuren (AS) in der N-terminalen Domäne (NTD), die die beiden hoch konservierten Myc-Boxen MB1 und MB2 enthält. In der zentralen Region des Proteins liegt das nukleäre Lokalisationssignal (NLS). Die C-terminale Domäne (CTD) ist durch das basische Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper-Motiv (bHLHLZ) charakterisiert. Sterne geben die bekannten Phospho-rylierungsstellen von Myc an (Abbildung ist nicht maßstabsgetreu).

1.3.1 Myc-Isoformen

Das humane *myc*-Gen trägt drei Exons und kodiert für drei Myc-Isoformen, die durch alternative Translationsstartpunkte entstehen (Abb. 1). Die Translation von Myc-1 (67 kDa) startet an dem kryptischen Startkodon CUG am Ende von Exon 1, während Myc-S stromabwärts an zwei internen AUGs initiiert wird. Die hauptsächlich exprimierte Isoform Myc-2 (64 kDa) wird von einem AUG Startkodon in Exon 2 produziert. Diese Isoform besteht aus 439 Aminosäuren (AS) und ist am N-Terminus 14 AS kürzer als Myc-1 (Hann et al., 1988).

1.4 Das Myc/Max/Mad Netzwerk

Die Entdeckung des bHLHLZ Proteins Max als Dimerisierungspartner von Myc vor mehr als zehn Jahren war ein Durchbruch für das Verständnis der molekularen Funktion von Myc. Für die verschiedenen biologischen Aktivitäten von Myc wie Transformation, Apoptose und transkriptionelle Aktivierung von Genen ist die Dimerisierung von Myc mit Max essentiell. Max wurde aufgrund seiner Bindung an den C-Terminus von Myc aus einer humanen cDNA-Expressionsbibliothek isoliert. Das Max-Protein bildet über die HLHLZ-Domäne Heterodimere mit c-, N- und L-Myc, kann aber auch mit sich selbst homodimerisieren (Blackwood und Eisenman, 1991). Für die transkriptionelle Regulation von Zielgenen muss Myc gemeinsam mit Max an die DNA binden. Die basische Region des Myc/Max-Heterodimers vermittelt dabei die spezifische DNA-Bindung an die kanonische E-Box-Sequenz 5'-CACGTG-3' und ähnliche Sequenzen (Blackwell et al., 1993). Die Regulation der Aktivität von Genen durch Myc wird unter 1.4.1 erklärt. Die Halbwertszeit von Max ist im Gegensatz zu Myc sehr lang. Das hoch konservierte Protein ist konstitutiv in proliferierenden und differenzierten Zellen exprimiert (Blackwood et al., 1992).

Mit der Beschreibung der weiteren Max-Bindungsspartner Mxi1, Mad1, Mad3 und Mad4 sowie Mnt und Mga wurde das Myc/Max/Mad-Netzwerk erweitert (Abb. 2). Es ist wahrscheinlich, dass sich das Netzwerk noch auf weitere Mitglieder erstreckt. Allen Mitgliedern ist gemeinsam, dass sie ein bHLHLZ-Motiv tragen, das ihnen DNA-Bindung und Dimerisierung ermöglicht. Dimere aus Max und einem der Myc-Partner funktionieren als transkriptionelle Regulatoren, die Proliferation, Wachstum und Apoptose induzieren, während die Bindung von Max an einen der anderen Partner

antagonistische Funktionen, wie Differenzierung und Wachstumsarrest, auslöst. Mad-Proteine sind hauptsächlich in nicht-proliferierenden Zellen exprimiert. Sie inhibieren die Expression von Reportergenen, die durch Myc aktiviert werden, verhindern die Transformation von Ratten-Fibroblasten, blockieren Wachstum und induzieren Differenzierung (Henriksson und Luscher, 1996).

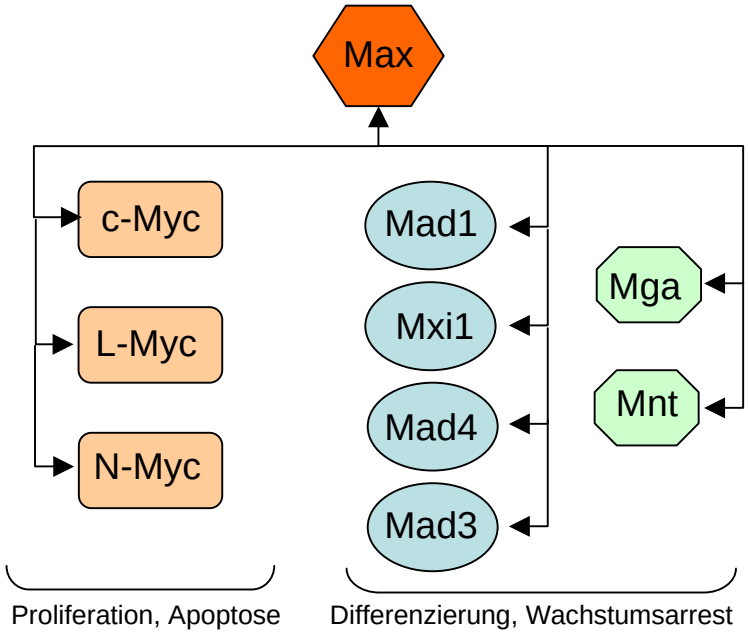


Abb. 2 Das Myc/Max/Mad-Netzwerk. Pfeile beschreiben Interaktionen zwischen den einzelnen Mitgliedern. Alle Mitglieder tragen ein bHLHLZ-Motiv, das ihnen DNA-Bindung und Dimerisierung ermöglicht.

1.4.1 Myc als Transkriptionsfaktor

Myc übt seine verschiedenen biologischen Aktivitäten wie Proliferation, Wachstum oder Apoptose wahrscheinlich durch die Regulation von spezifischen Zielgenen aus. Dazu bindet das Myc/Max-Heterodimer spezifisch an E-Box-Sequenzen innerhalb der DNA, die hauptsächlich im Promotor, im ersten Exon oder ersten Intron eines Gens lokalisiert sind und aktiviert dadurch die Expression von Genen. Myc/Max-Dimere induzieren aber auch Gene, die keine E-Box oder nur E-Box-ähnliche Sequenzen tragen. Durch die Bindung von Mad/Max-Dimeren werden Gene hingegen reprimiert. Die Repression von Genen durch Myc erfolgt indirekt über einen anderen Mechanismus. Dabei inhibiert Myc die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die an so genannten Initiator-Elementen (Inr) innerhalb des Promotors binden (Oster et al., 2002). Die Inhibition erfolgt durch funktionelle Interferenz mit den

Transkriptionsfaktoren. Das folgende Modell schlägt vor, wie das Myc/Max/Mad-Netzwerks die Promotor-Aktivität von Genen kontrolliert (Abb. 3).

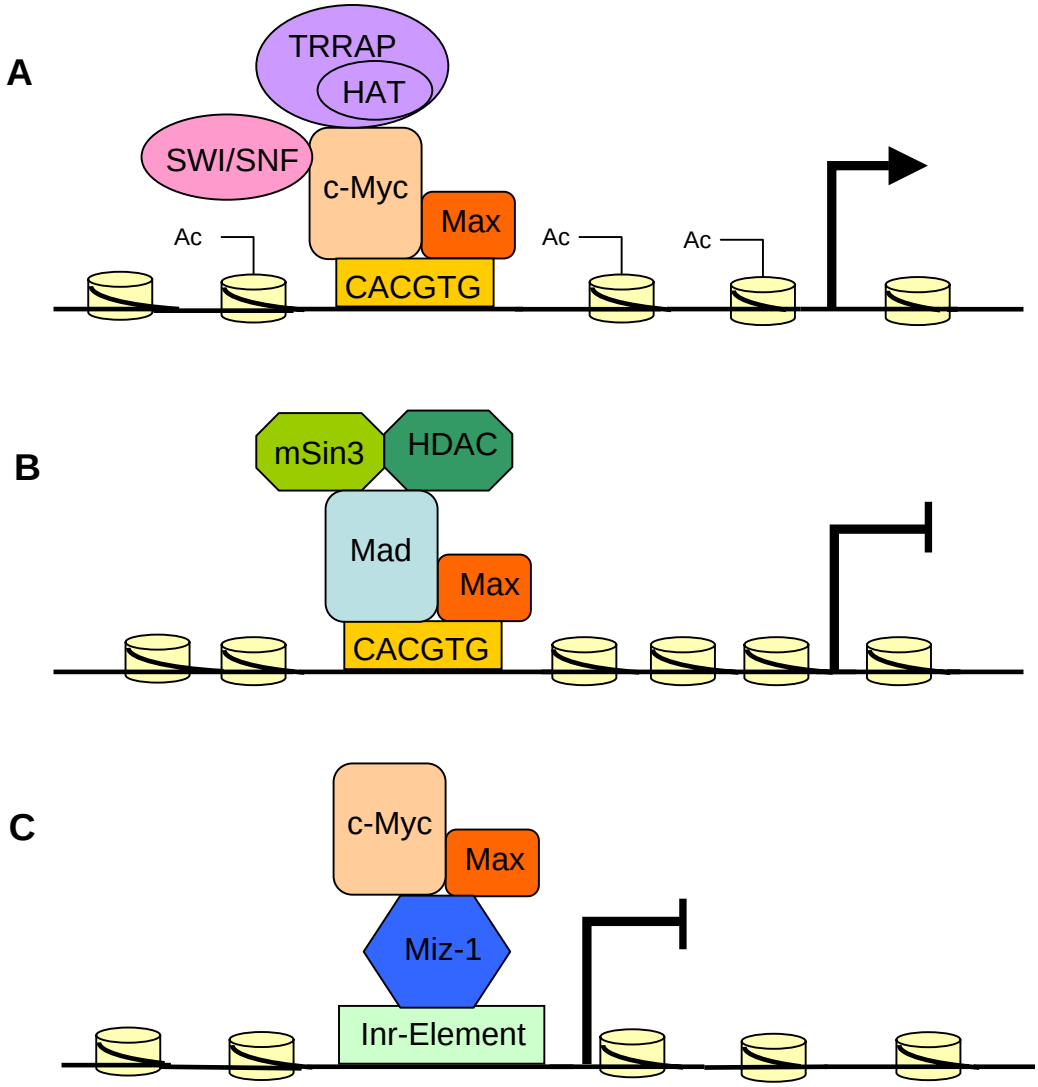


Abb. 3 Modell für die Kontrolle der Promotor-Aktivität durch Myc/Max/Mad-Netzwerk-Mitglieder. (A) Aktivierung der Genexpression durch Myc/Max-Bindung an die E-Box-Sequenz oder verwandte Sequenzen. **(B)** Mad/Max-vermittelte Repression von Genen durch Bindung an die E-Box. **(C)** Myc/Max-vermittelte Repression von Genen, die ein Initiator-Element (Inr-Element) tragen.

(A) Aktivierung der Genexpression durch Myc/Max: Myc und Max bilden ein Dimer, der an die E-Box-Sequenz oder ähnliche Sequenzen bindet. Dabei rekrutiert Myc eine Komponente des SWI/SNF-Komplexes. Diese Komponente besitzt eine ATPase-Aktivität, die Veränderungen des Chromatins bewirkt (Chromatin-Remodelling). Dadurch erfolgt eine Lockerung des sonst dicht gepackten Chromatins am Promotor. Dieses „Öffnen“ des Chromatins ermöglicht den Zugang für weitere transkriptionelle Regulatoren und die RNA-Polymerase-II (Pol-II). Zusätzlich

interagiert Myc mit TRRAP-Komplexen (transformation/transcription domain-associated protein), die eine Histon-Acetyl-Transferase (HAT)-Aktivität besitzen. Diese Aktivität ist wichtig für die Modulierung des Acetylierungsstatus der Histone. Gene, die stark transkribiert werden, haben häufig stark acetylierte Histone (Gregory et al., 2001). Verstärkte Histon-Acetylierung ermöglicht die Bindung des Präinitiations-Komplexes an den aktiven Promotor. Durch diese Bindung wird der Start der Transkription eingeleitet.

Im Gegensatz zu diesem Modell wurde an dem Myc-Zielgen *cad* schon vor Myc-Aktivierung eine Hyper-Acetylierung des Promotors gefunden, die durch Myc auch nicht verstärkt werden konnte (Eberhardy et al., 2000). Wahrscheinlich ließ sich dadurch schon vor der Aktivierung von Myc eine Bindung des Pol-II-Komplexes an den *cad*-Promotor beobachten (Eberhardy und Farnham, 2001). Weitere Analysen von Eberhardy und Kollegen bestätigten ein Modell, bei dem Myc die Elongation des Pol-II-Komplexes induziert. In diesem Modell aktiviert Myc die Transkription nach der Rekrutierung der Pol-II durch Interaktion mit mehreren Cdk-Cyclin-Komplexen. Die Rekrutierung dieser Komplexe durch Myc spielt bei der Aktivierung der Elongation eine wesentliche Rolle (Eberhardy und Farnham, 2002).

(B) Mad/Max-vermittelte Repression von Genen: Mad-Proteine, die mit Max an eine E-Box-Sequenz binden, rekrutieren einen Sin3–abhängigen Repressor-Komplex, der mit einer Histon-Deacetylierungsaktivität (HDAC) assoziiert ist. Die Deacetylierung der Histone durch diesen Komplex führt zu einer Verdichtung des Chromatins. Diese Veränderung des Chromatins erschwert möglicherweise den Zugang der Transkriptionsmaschinerie an den Promotor, so dass die Expression des Gens unterbunden wird.

(C) Myc/Max-vermittelte Repression von Genen: Der Mechanismus der Myc-vermittelten Gen-Repression ist weit weniger gut verstanden als der der Aktivierung. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob die Repression eine direkte Funktion von Myc ist oder eher eine indirekte Konsequenz der Aktivität von Myc z.B. durch die Aktivierung eines Repressors darstellt. Die Lokalisation von Myc wurde an Promotoren von reprimierten Zielgenen beschrieben (Staller et al., 2001), was für eine direkte Beteiligung von Myc an der Repression von Genen spricht. Viele der Gene, die durch Myc reprimiert werden, tragen ein Inr-Element. Myc/Max-Komplexe binden an dieses regulatorische Element im Promotor und verhindern so die Bindung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren wie z.B. Miz-1 (Gartel und Shchors, 2003).

Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die Repression des $p15^{INK4b}$-Gens. Die $p15^{INK4b}$-Expression wird durch die Bindung von Miz-1 an das Inr-Element des $p15^{INK4b}$-Promotors aktiviert. Myc und Max bilden einen Komplex mit Miz-1 und inhibieren so die Aktivierung des $p15^{INK4b}$-Gens (Staller et al., 2001).

Eine Inr-unabhängige Repression durch Myc ist ebenfalls beschrieben worden. Dabei bindet Myc an Transkriptionsfaktoren (z.B. Sp1) in so genannten Enhancer-Elementen innerhalb des Promotor-Bereichs und verhindert so die Aktivierung des betreffenden Gens. Die Bindung von Myc an die DNA bzw. die Dimerisierung mit Max ist dabei nicht notwendig (Gartel und Shchors, 2003). Die genauen molekularen Abläufe dieser Myc-vermittelten Repression sind noch nicht vollständig geklärt.

1.4.2 Weitere Myc-Interaktions-Proteine

Neben dem wichtigsten Bindungspartner Max wurde noch eine Reihe weiterer zellulärer Faktoren identifiziert, die sowohl mit der NTD als auch der CTD von Myc interagieren. Die Bindung von Myc an den TRRAP- bzw. SWI/SNF-Komplex wurde schon unter 1.4.1 beschrieben, weitere Ko-Aktivatoren von Myc sind z.B. Tip48 und Tip49 (Wood et al., 2000), ORC1 (Takayama et al., 2000b) und CDC6 (Takayama et al., 2000a). Weiterhin bindet Myc an Komponenten der basalen Transkriptions-maschinerie, wie z.B. TBP (TATA-Box binding protein) (Hateboer et al., 1993) und TFII-I (Roy et al., 1993).

Während die Interaktion zwischen dem Tumorsuppressor Rb und Myc nicht bestätigt werden konnte, wurde eine *in vivo*-Interaktion zwischen Myc und p107, einem Mitglied der pRb-Tumorsuppressorfamilie, nachgewiesen (Hoang et al., 1995). Diese Interaktion wirkt inhibierend auf die Myc-Aktivität (Beijersbergen et al., 1994). Verstärkte Transformationseigenschaften mutanter Myc-Allele, die aus Burkitt-Lymphomzellen isoliert wurden und einen Defekt in der Thr58-Phosphorylierung tragen, können durch p107 jedoch nicht mehr inhibiert werden (Hoang et al., 1995). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Thr58-Phosphorylierung ein kritischer Punkt bei der Myc-induzierten Transformation von Zellen ist.

Die Interaktion von Myc mit einem anderen Zellzyklus-Regulator, dem Cdk-Inhibitor $p21^{Cip1}$, wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben (Kitaura et al., 2000). Durch die Bindung an $p21^{Cip1}$ wird Myc inaktiviert, da wahrscheinlich dessen

Dimerisierung mit Max verhindert wird. Der genaue Mechanismus dieser negativen Kontrolle ist noch nicht geklärt.

Ein anderes Tumorsuppressorprotein, dass die Myc-Funktion bzw. die Kotransformation von Myc und dem Proto-Onkoprotein Ras inhibiert, ist BRCA1 (breast cancer susceptibility gene 1). BRCA1 interagiert mit der CTD von Myc und interferiert so wahrscheinlich auch mit der Myc/Max-Dimerisierung (Wang et al., 1998). Die Inaktivierung von BRCA1 hat ein erhöhtes Risiko für Brust- und Eierstockkrebs zur Folge und wird in Verbindung mit der familiären Vererbung dieser Krebsarten gebracht (Arver et al., 2000). Ob die Inaktivierung von BRCA1 die Tumorenstehung durch Myc, das bei der Progression dieser Tumoren eine signifikante Rolle spielt, fördert, bleibt zu untersuchen.

Das Myc-Protein ist normalerweise im Zellkern lokalisiert. Allerdings findet man es in bestimmten Zelllinien und Tumorproben auch im Zytoplasma (Henriksson und Luscher, 1996). Die Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen während dieser Situationen könnte dazu dienen, Myc im Zytoplasma zurückzuhalten, wo das Protein einem schnellen Abbau zugänglich ist. Myc-Interaktionen mit α-Tubulin wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt (Alexandrova et al., 1995). Die Thr58-Mutationen, die man bei Myc-Mutanten im Burkitt-Lymphomzellen findet, führen zu einer konstitutive Phosphorylierung an Ser62. Diese Phosphorylierung führt zur Auflösung der Bindung an α-Tubulin. Auch die Hyperphosphorylierung von Myc während der Mitose führt zur Unterbrechung der Myc-Tubulin-Interaktion. Aufgrund der fehlenden Bindung an α-Tubulin wird Myc nicht mehr im Zytoplasma sequestriert und kann somit auch nicht abgebaut werden. Folglich weisen mutante Myc-Proteine, die α-Tubulin nicht mehr binden, eine erhöhte Stabilität auf, die wohlmöglich zu einer agressiveren Transformation durch Myc beiträgt (Niklinski et al., 2000).

1.5 Die Zielgene von Myc

Myc übt seine biologische Funktion wahrscheinlich durch die Regulation der Expression von spezifischen Zielgenen aus. Vor dem Einsatz so genannter Hochdurchsatz-Screens waren nur wenige Zielgene von Myc bekannt. Die Genchip-, SAGE- (serial analysis of gene expression)- und ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation)-Analysen der letzten Jahre ergaben über 1000 potentielle Myc-

Zielgene, die an vielen verschiedenen zellulären Stoffwechselprozessen und Signalwegen beteiligt sind: z.B. Aminosäure- und Proteinsynthese, Fettstoffwechsel, Nukleotid-/DNA-Synthese, Apoptose, Adhäsion und Zytoskelett, Transporter und Kanäle, Signaltransduktion und DNA-Reparatur. Überraschenderweise ist die Veränderung in der Genexpression der meisten Myc-Zielgene eher gering (3- bis 5-fach).

Die Ergebnisse der durchgeführten Hochdurchsatz-Analysen sind aber aufgrund folgender Beschränkungen nur teilweise identisch: (i) Verschiedene Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Zellsysteme für die Suche nach Myc-Zielgenen benutzt. (ii) Artifiziell hohe, unphysiologische Myc-Level können Zielgene aktivieren, die durch physiologische Mengen nicht aktiviert würden. (iii) Weiterhin können durch die ständigen zu hohen oder zu niedrigen Myc-Mengen in den Zellsystemen adaptive Effekte bezüglich der mRNA-Mengen entstehen. Daher werden Kriterien für „echte“ Myc-Zielgene diskutiert: Reicht es aus, wenn ein potentieller Kandidat nur in einem Zellsystem identifiziert wird? Spielt die Höhe der Proteinmenge von Myc bei der Aktivierung des Zielgens eine Rolle? Bindet Myc am Genlocus?

Ein weiterer Aspekt ist die Unterscheidung von direkten und indirekten Myc-Zielgenen. Als direktes Zielgen von Myc wird ein Gen definiert, dessen Expression unmittelbar durch die Aktivität von Myc reguliert wird. Gene, die durch Myc-Zielgene (nach *de novo*-Proteinsynthese) bzw. als Konsequenz von Myc-induzierten Vorgängen wie z.B. Zellzyklus-Progression reguliert werden, bezeichnet man als indirekte Zielgene. Neuere Arbeiten ergaben, dass Myc ungefähr 10% der Gene innerhalb des Genoms von Mensch und Fliege (*Drosophila melanogaster*) bindet und möglicherweise direkt deren Expression beeinflusst (Fernandez et al., 2003; Orian et al., 2003). Wie groß die Anzahl der indirekt regulierten Zielgene ist, kann man nur abschätzen.

Bisher wurden mehr als 1000 Gene als mögliche Myc-Zielgene beschrieben. Die Darstellung der einzelnen Gene ist sehr umfangreich. Ausführliche Genlisten sind beispielhaft in folgenden Arbeiten (Coller et al., 2000; Guo et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001; Fernandez et al., 2003) und auf der Datenbank der Webseite www.myccancergene.org beschrieben. In dieser Datenbank werden Myc-Zielgene aufgrund experimenteller Beweise gelistet. Weiterhin wird für die Zielgene eine funktionelle Gruppierung und ein phylogenetischer Sequenzvergleich beschrieben.

Im nächsten Abschnitt wird daher nur auf einige Kandidaten, die wesentlich für die Funktionen von Myc sind, eingegangen.

1.6 Myc und Zellzyklus

Eine der Hauptfunktionen von Myc ist es, die Progression durch den Zellzyklus zu fördern (Dang, 1999; Amati, 2001). In ruhenden Zellen ist die Expression von *myc* kaum nachweisbar. Nach Stimulation mit Serum oder Mitogenen jedoch werden die *myc*-mRNA und das Myc-Protein sofort stark induziert und die Zellen treten in die G1-Phase des Zyklus ein. In proliferierenden Zellen verringert sich die Menge von Myc dann auf ein niedrigeres, gleichbleibendes Niveau. Nach Entzug von Serum bzw. Wachstumsfaktoren sind die *myc*-mRNA und das Protein nicht mehr detektierbar und die Zellen arretieren. Myc-*knock-out*-Mäuse sterben am Tag 9.5 – 10.5 der embryonalen Entwicklung, was die entscheidende Rolle von Myc für das Überleben des Embryos ab dieser Zeit beschreibt. Auch die sehr kurze Halbwertszeit der mRNA und des Proteins weisen auf eine bedeutende Funktion von Myc in der Regulation des Zellzyklus hin. Jedoch scheint Myc für die frühe embryonale Entwicklung und die Proliferation von ES-Zelllinien ersetzbar zu sein (Davis et al., 1993). Letzter Punkt ist jedoch unklar, da in der frühen Entwicklung des Embryos auch N-Myc exprimiert wird.

Viele direkte und indirekte Zielgene von Myc sind an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Bis jetzt wurde aber noch kein Zielgen identifiziert, das die Fähigkeit von Myc, Zellproliferation zu induzieren, ersetzen kann (Berns et al., 2000; Nikiforov et al., 2000). Die Zielgene von Myc beeinflussen die Regulation der Zell-Matrix Interaktionen, die DNA-Synthese, besonders aber den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus (Coller et al., 2000; Guo et al., 2000; Schuhmacher et al., 2001; Fernandez et al., 2003). Dieser Übergang wird durch den so genannten Restriktionspunkt (R) kontrolliert. Um diesen Checkpunkt zu überwinden, muss das Tumorsuppressorprotein Rb inaktiviert und zwei Cyclin/Cdk (Cyklin abhängige Kinase)-Komplexe Cyclin D/Cdk4/6 und Cyclin E/Cdk2 aktiviert werden (Sherr und Roberts, 1999). In Abbildung 4 ist graphisch dargestellt, wie Myc diesen Übergang von der G1- in die S-Phase ermöglicht.

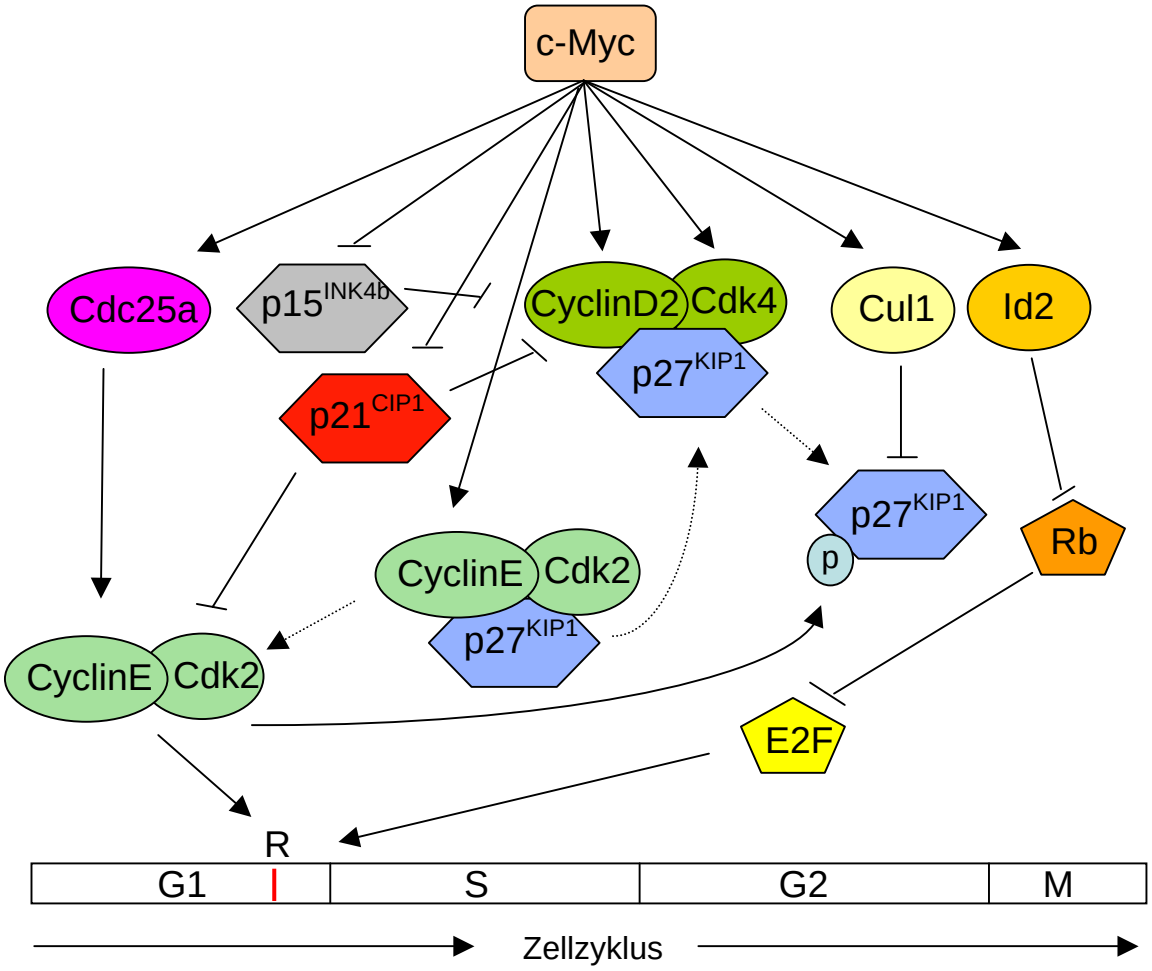


Abb. 4 Die Rolle von Myc in der Zellzyklus-Regulation. Die Kinasen Cdk4 und Cdk2 werden durch Assoziation mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen aktiviert. Die Inhibition erfolgt durch Proteine der INK-Familie (p15) oder der KIP-Familie (p21, p27). CyclinD/Cdk4 und CyclinE/Cdk2 phosphorylieren das Retinoblastomaprotein (Rb). Die Rb-Phosphorylierung führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F. E2F wiederum induziert die Expression von Faktoren, die für die DNA-Synthese benötigt werden.

Myc induziert direkt die Zielgene Cdk4 und Cyclin D2 (Bouchard et al., 1999; Hermeking et al., 2000; Bouchard et al., 2001), die zusammen einen aktiven Komplex bilden. Cyclin D/Cdk4/6 sequestriert dann den Cyclin/Cdk-Inhibitor (CKI) $p27^{KIP1}$, der an dem Cyclin E/Cdk2-Komplex gebunden ist. Durch die Sequestrierung des Inhibitors wird eine kleine Menge CyclinE/Cdk2 aktiviert. Dieser aktive Kinase-Komplex phosphoryliert dann $p27^{KIP1}$, das daraufhin von einem E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der Cul1 enthält, erkannt und abgebaut wird (Bouchard et al., 1999; Bouchard et al., 2001). Cul1 ist ein weiteres Zielgen von Myc (O'Hagan et al., 2000; Coller et al., 2000). Zusätzlich reprimiert Myc den Cyclin/Cdk-Inhibitor $p15^{INK4b}$

(Gartel et al., 2001), der den CyclinD/Cdk4/6-Komplex inaktiviert. Die Substrate des CyclinD/Cdk4/6-Kinase-Komplexes sind die so genannten „Pocket-Proteine“, zu denen auch Rb gehört. Rb ist häufig in Tumoren mutiert und ist essentiell für die Regulation des G1-S-Checkpunktes. Rb reguliert in negativer Weise die Aktivität der E2F-Transkriptionsfaktoren, die wichtig für die Progression in die S-Phase ist (Bartek et al., 1997). Myc induziert außerdem die Expression des Id2-Gens, das für ein HLH-Protein kodiert und die Funktion von Rb inhibiert (Lasorella et al., 2000).

Myc aktiviert auch den zweiten Cyclin/Cdk-Komplex (Cyclin E/Cdk2), dessen Aktivität für den Eintritt in die S-Phase nötig ist. Cyclin E ist als Zielgen von Myc beschrieben, und auch die Phosphatase Cdc25a, die die Aktivität von Cyclin E/Cdk2 stimuliert (Blomberg und Hoffmann, 1999), wird durch Myc induziert (Galaktionov et al., 1996). Zusätzlich reprimiert Myc die Expression von $p21^{CIP1}$ (Claassen und Hann, 2000), ein CKI, der Cyclin E/Cdk2 inaktiviert und durch den Tumorsuppressor p53 als Teil eines antiproliferativen Programms hoch reguliert wird (Sherr und Roberts, 1999). Zusammengefasst ist das Ergebnis dieser Myc-abhängigen Regulations-schritte die Aktivierung der Cyclin D- und Cyclin E-abhängigen Kinasen und die Inaktivierung des Rb-Proteins. Diese Schritte fördern den Eintritt in die S-Phase und erklären somit die Effekte von Myc auf den Zellzyklus.

Der Übergang von der G1- in die S-Phase bei der Zellzyklusprogression ist ein kritischer Punkt in der Tumorentstehung (Reed, 1997). Viele Tumorzellen tragen Mutationen, die den G1-S-Restriktionspunkt betreffen und DNA-Synthese auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren erlauben. Hat eine Zelle einmal den Restriktionspunkt überschritten, durchläuft sie den Zellzyklus auch unter limitierenden Bedingungen. Myc allein kann den Restriktionspunkt auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren überwinden und so die S-Phase des Zellzyklus induzieren (Eilers et al., 1991). Diese Zellzyklusprogression wird durch die oben beschriebene Myc-abhängige Aktivierung des Cyclin E/Cdk2 Komplexes und der E2F-abhängigen Transkription induziert. Auch die Aktivierung von Zellwachstum (Zunahme von Masse) ist dabei ein wichtiger Faktor.

1.7 Myc und Zellwachstum

Zellwachstum ist definiert als die Zunahme von Zellmasse bzw. –volumen. Bevor sich eine Zelle teilt, muss sie eine bestimmte Größe erreichen, damit sie genügend Zellmasse an beide Tochterzellen weitergeben kann. Zellwachstum und Proliferation sind also eng miteinander gekoppelt. Die Expression von *myc* fördert das Wachstum von Zellen und könnte so auch die Zellproliferation induzieren.

Die Regulation des Zellwachstums durch Myc ist jedoch noch ungegeklärt. B-Zellen aus transgenen Mäusen, die *myc* unter der Kontrolle des Immunglobulin-Enhancers überexprimieren sind in allen Stadien der B-Zell-Entwicklung wie auch des Zellzyklus größer als Kontrollzellen (Iritani und Eisenman, 1999). In ähnlicher Weise induziert die Aktivierung eines konditionalen *myc*-Gens in einer humanen B-Zelllinie Zellwachstum, auch dann, wenn der Zellzyklus durch den Cdk-Inhibitor Roscovitin blockiert wird (Schuhmacher et al., 1999). Die Expression eines exogenen *myc*-Gens in primären Leberzellen der Maus fördert das Wachstum von Hepatozyten, ohne jedoch Proliferation oder Apoptose auszulösen (Kim et al., 2000). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Myc ein Wachstumsprogramm in Zellen induzieren kann, das unabhängig von der Aktivierung des Zellzyklus abläuft. Der konditionale *knock-out* von *myc* in Mäusen erzeugt jedoch keinen Defekt im Wachstum sondern in der Proliferation von aktivierten T-Zellen (Trumpp et al., 2001). In *Drosophila* lösen reduzierte Mengen von dMyc (Ortholog des Vertebraten-Myc) Hypotrophie (Reduktion der Zellgröße) aus (Johnston et al., 1999), während in Mäusen die Reduktion der Myc-Mengen Hypoplasie (Reduktion der Zellanzahl) auslöst (Trumpp et al., 2001).

Zwar ist der genaue Mechanismus der Regulation des Zellwachstums durch Myc noch ungenügend erforscht, jedoch wurden schon einige Zielgene von Myc identifiziert, die in der Proteinsynthese, in der Ribosomenbiogenese und im allgemeinen zellulären Stoffwechsel involviert sind und somit zu Wachstum beitragen können. Dazu gehören u.a. die Gene eIF4E, eIF2a, RNA Helicase MrDb, IRP-2, Nucleolin, Fibrillarin, H-Ferritin (www.myccancergene.org). Auf den Zusammenhang zwischen Myc und Zellwachstum und die Bedeutung für die Tumorentstehung wird in der Diskussion ausführlich eingegangen.

1.8 Ribosomenbiogenese

In dieser Arbeit wurde bei der genomweiten Analyse von Myc-Zielgenen eine funktionelle Gruppe von Genen identifiziert, die in der Prozessierung der ribosomalen RNA (rRNA) und der Synthese von Ribosomen involviert ist. Daher wird in diesem Abschnitt ein kurzer Überblick über die Biogenese von Ribosomen gegeben.

Die Synthese von Ribosomen, die die Translation der mRNA in Proteine katalysieren, ist in allen Organismen evolutionär hoch konserviert. Ein Großteil der Energie einer Zelle wird in diese Herstellung investiert. So benötigt eine proliferierende Säugerzelle ca. 10 Millionen Ribosomen, um den enormen Bedarf für die zelluläre Translationsmaschinerie zu decken. Ribosomen bestehen aus mehr als 80 ribosomalen Proteinen, die um eine hoch modifizierte rRNA organisiert sind. Jedes Ribosom enthält jeweils eine Kopie der reifen 18S, 28S und 5.8S rRNA (s. unten). Die rRNA macht dabei ca. 80% der gesamt-RNA einer Zelle aus. Adäquate Mengen an rRNA können nur produziert werden, da die rDNA-Gene in ca. 400 Kopien auf den Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 von humanen Zellen vorliegen. Das eukaryotische 80S Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten, der großen 60S-Untereinheit und der kleinen 40S-Untereinheit. Die rRNAs und Untereinheiten sind anhand ihrer Sedimentationsrate (S) in der Ultrazentrifuge benannt (Übersicht in Leary und Huang, 2001; Fatica und Tollervey, 2002).

Die Synthese eines vollständigen Ribosoms ist durch komplexe Vorgänge charakterisiert, die vor allem im Nukleolus der Zelle stattfinden (Abb. 5). Alle drei RNA-Polymerasen sind an diesem Prozess beteiligt: Die RNA-Polymerase-I transkribiert von der rDNA-Transkriptionseinheit den 47S rRNA-Vorläufer (prä-rRNA) (Abb. 6, A). In einem komplexen Prozess werden aus dem 47S rRNA-Vorläufer die reifen Formen der 18S, 5.8S und 28S rRNA prozessiert (Abb. 6, B). Die RNA-Polymerase-II synthetisiert die mRNAs für die ribosomalen Proteine, von denen viele mit der rRNA zu prä-ribosomalen Partikeln assoziieren, einige wiederum erst bei der abschließenden Reifung des Ribosoms hinzugefügt werden. Die RNA-Polymerase-III ist verantwortlich für die Transkription der 5S rRNA und verschiedener kleiner RNAs (snoRNAs), die wichtige Schritte der Prozessierung dirigieren.

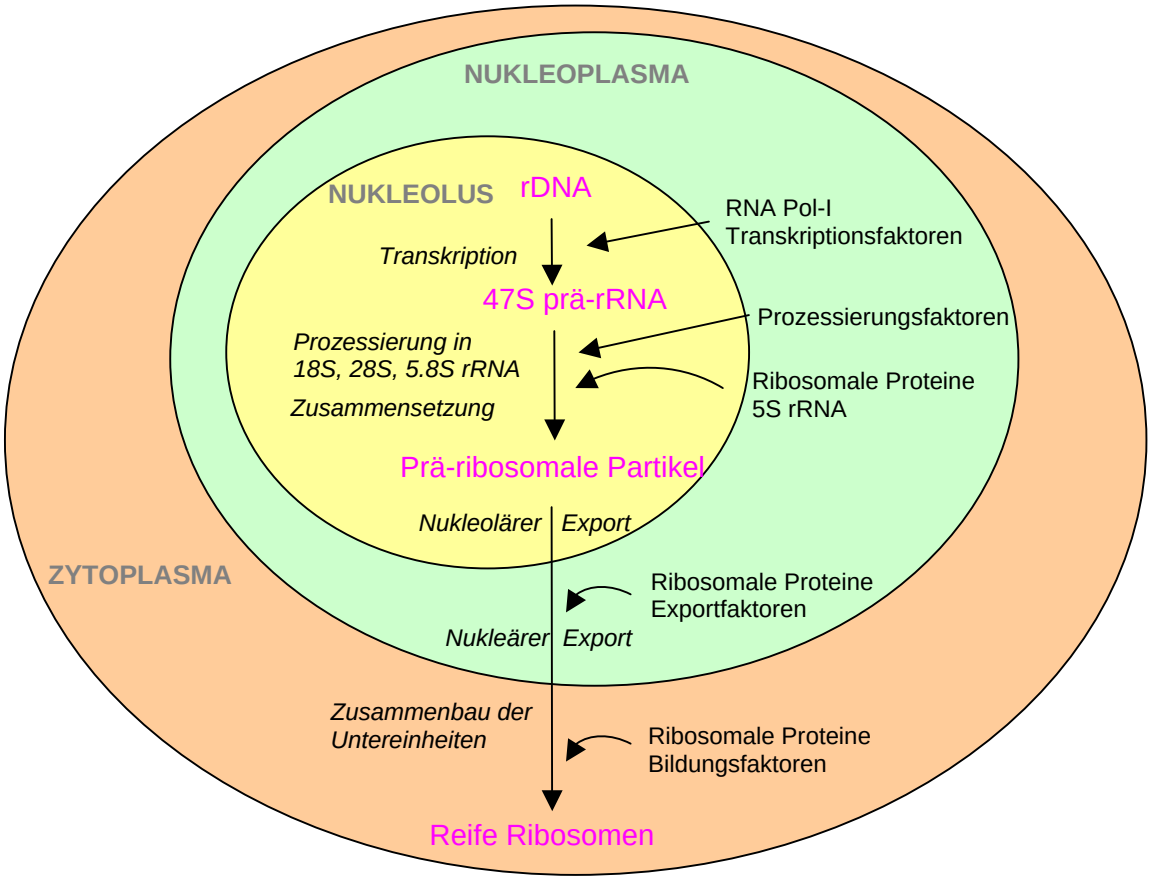


Abb. 5 Überblick über die verschiedenen Schritte der Ribosomenbiogenese. Der 47S rRNA-Vorläufer (prä-rRNA) wird im Nukleolus von der rDNA transkribiert und anschließend in vielfältigen Modifizierungsschritten in die 18S, 28S und 5.8S rRNA prozessiert. Die modifizierten rRNAs werden mit den ribosomalen Proteinen und der 5S rRNA schrittweise zu Ribosomen zusammengesetzt und ins Zytoplasma transportiert.

Die vielfältigen Prozessierungsschritte nach der Synthese des Vorläufers beinhalten verschiedene chemische Modifikationen und schrittweisen Abbau des Transkripts (Abb. 6, B). Bevor der 13000 Nukleotid-lange 47S rRNA-Vorläufer in die reifen rRNAs prozessiert wird, werden ca. 100 Uridin-Nukleotide zu Pseudo-Uridinen isomerisiert und genauso viele Nukleotide an der 2'-OH-Position methyliert (Eichler und Craig, 1994). Die Funktionen dieser Modifikationen sind noch nicht im Detail verstanden, aber wahrscheinlich unterstützen sie die korrekte Faltung der reifen rRNAs und beeinflussen so auch die Funktion der Ribosomen. Jede Modifikation erfolgt an einer bestimmten Stelle im Vorläufer. So genannte snoRNAs (small nucleolar RNAs) lokalisieren die jeweilige Modifikationsstelle durch Basenpaarung mit der komplementären Sequenz des Vorläufers.

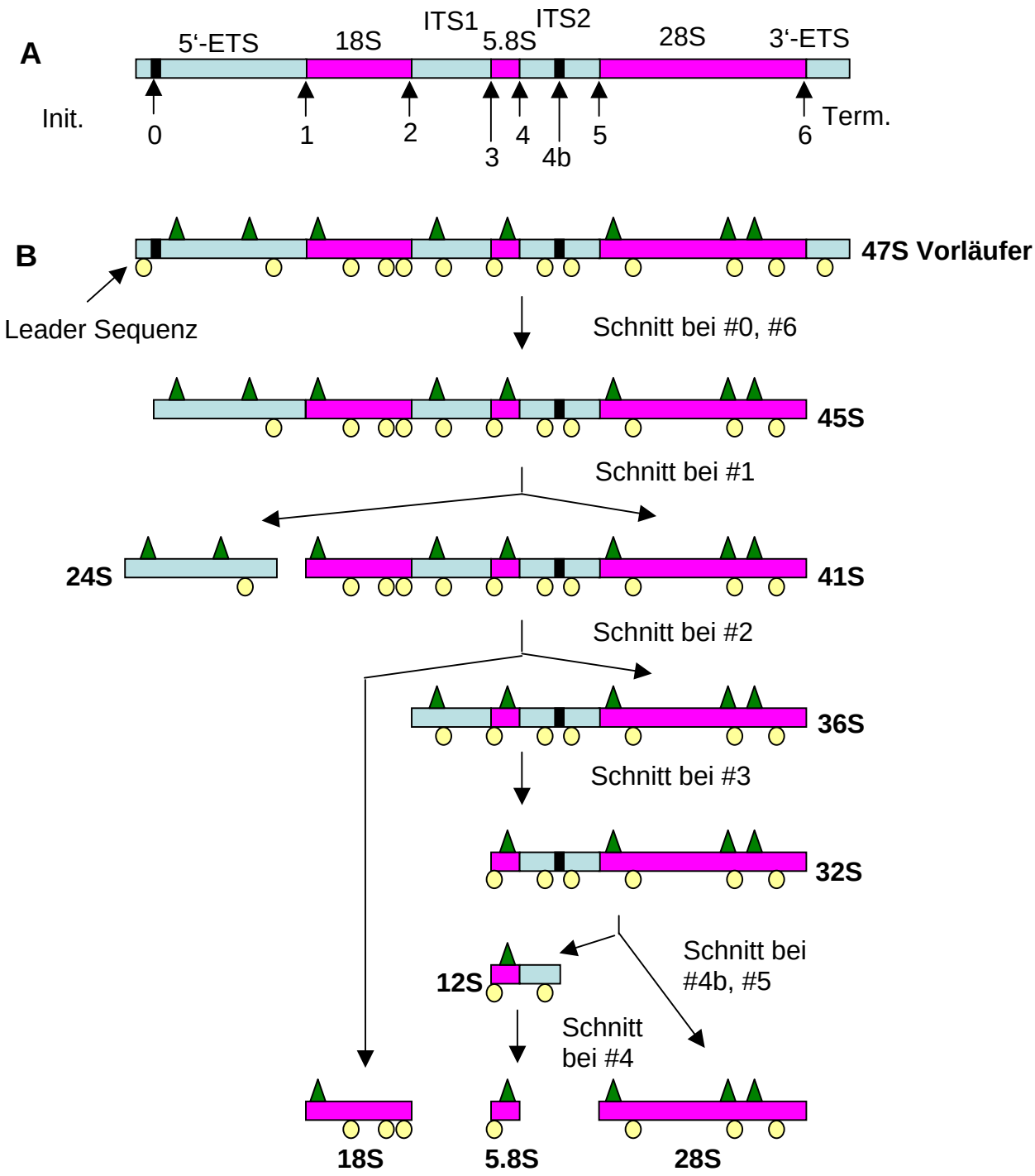


Abb. 6 Prä-rRNA-Prozessierung in Säugerzellen. **(A)** Die rDNA-Transkriptionseinheit besteht aus den reifen rRNAs 18S, 5.8S und 28S und den ITS- und ETS-Bereichen. Die Nummern geben die Positionen der Prozessierungsstellen an. Init. =Transkriptionsinitiationsstelle, Term. =Transkriptionsterminationsstelle. **(B)** Flussdiagramm der Prozessierung. Schnittstellen sind durch Nummern beschrieben und beziehen sich auf die in (A) beschriebenen Stellen. Die Abspaltung der Leader-Sequenz des 5’-ETS-Bereichs ist der erste Schritt der Prozessierung. ITS1 und 2 = internal transcribed spacer1 und 2, 5’-ETS und 3’-ETS = 5’- und 3’-external transcribed spacer. ○ = Pseudouridinylierung, ▲ = Methylierung (Modifikationsstellen sind nicht vollständig dargestellt).

Die snoRNAs sind mit RNA-modifizierenden Enzymen in snoRNPs (small nucleolar ribonucleotide particles) assoziert. Die Modifizierungsaktivität der snoRNPs kommt wahrscheinlich durch die Proteine, vielleicht aber auch durch die snoRNAs selber. Die Modifikationen schließen auch die externen und internen transkribierten „Spacer" 5'-ETS, 3'-ETS, ITS1 und ITS2 mit ein, die mehr als die Hälfte des Vorläufers ausmachen und während der Prozessierung abgebaut werden (Lafontaine und Tollervey, 2001). Die Prozessierung und fast die gesamte Ribosomenbiogenese findet im Nukleolus statt. Die dort entstehenden prä-ribosomalen Partikel werden dann durch das Nukleoplasma in das Zytoplasma der Zelle geschleust, wo sie zu reifen Ribosomen zusammengefügt werden. Die Rate der Ribosomen-Produktion ist während Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung streng reguliert und mit den unterschiedlichen Bedürfnissen während des Zellzyklus koordiniert (Grummt, 1999).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Proto-Onkogen *myc* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der an der zentralen Regulation von Zellzyklus, Wachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist. Überexpression von Myc dereguliert diese Prozesse und führt zur malignen Transformation (Oster et al., 2002). Zum Verständnis dieser Prozesse wurde in den letzten Jahren verstärkt an der Identifizierung von Myc-Zielgenen gearbeitet.

Zu Beginn dieser Arbeit sollte eine genomweite Analyse von Myc-Zielgenen mit Hilfe von Oligonukleotid-Genchips erfolgen. Als Zellsystem wurde die Burkitt-Lymphom Modellzelllinie P493-6, die konditional ein Tetrazyklin-reguliertes *myc*-Gen exprimiert, verwendet (Pajic et al., 2000). Proliferation von P493-6 Zellen hängt von der Expression des Transgens und der Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS) ab. Bei der Identifizierung von Myc-Zielgenen sollte daher auch der Einfluss von FKS auf das Expressionsprofil der P493-6 Zellen untersucht werden. Diese Analyse erfolgte im Anschluss an einen schon zuvor durchgeführten Versuch, bei dem ca. 6800 Gene untersucht wurden (Schuhmacher et al., 2001). Für die weitere Identifizierung von Myc-Zielgenen sollte auch die Zelllinie Smoxi-4 (Hölzel et al., 2001) für die Genchip-Analyse verwendet werden. Diese Ratten-Fibroblasten tragen durch einen somatischen *knock-out* kein *myc*-Gen mehr. Sie sind jedoch durch ein konditional regulierbares MycER-Protein charakterisiert.

Die Verwendung zweier konditionaler Zellsysteme verschiedener Herkunft sollte zur Identifizierung von Myc-Zielgenen führen, die wesentlich für die Kontrolle von Wachstum und Zellzyklus sind. In dieser Arbeit wurden unter anderem viele nukleoläre Gene, die in die Ribosomenbiogenese involviert sind, als Myc-Zielgene identifiziert. Daher wurde die Rolle von Myc in der Ribosomenbiogenese genauer untersucht.

2. MATERIAL

2.1. Chemikalien

Acrylamid	*Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe*
Agarose Elektrophorese Reinheitsgrad	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Ammoniumpersulfat	*Merk Eurolab GmbH, Darmstadt*
Antifoam O-30	*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*
Amphotericin B	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Ampicillin	*Merk Eurolab GmbH, Darmstadt*
Bromphenolblau	*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	*Molecular Probes, Leiden, Niederlande*
Dimethylsulfonat (DMSO)	*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*
DNA-Größenstandards	*Promega GmbH, Mannheim*
dNTPs	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Dithiothreitol (DTT)	*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
En^{3}Hance Spray	*PerkinElmer, Belgien*
Ethidiumbromid	*Promega GmbH, Mannheim*
Fötales Kälberserum (FKS)	*Bioser, Buenos Aires, Argentinien*
Hering-Spermien-DNA, sonifiziert	*Promega GmbH, Mannheim*
Hygromycin B	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Kälberserum	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
L-Glutamin	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Lipofektamin	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS	*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*
NP40	*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*
NTPs	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*
Opti-MEM I-Medium	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Penicillin-Streptomycin	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Qiashredder	*Qiagen GmbH, Hilden*
Protein-Molekulargewichtsstandards	*Bio-Rad Laboratories GmbH, München*
Roscovitin	*ICN Biomedicals GmbH, Eschwege*
RPMI 1640-Medium	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Sephadex-G25, DNA grade	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
Trypsin-EDTA	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	*Merk Eurolab GmbH, Darmstadt*

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in reinster Form (zur Analyse) bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

2.2 Radioaktive Isotope

(^{32}P)-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
(^{32}P)-ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
(^{32}P)-CTP (800 Ci/mmol)	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
(5,6-^{3}H)-Uridin (1 mCi/ml)	*ICN Biomedicals GmbH, Eschwege*

2.3 Enzyme

Die Enzymreaktionen wurden nach den entsprechenden Firmenprotokollen durchgeführt.

DNase I, RNase-frei (10 U/µl)	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*
E.coli DNA-Polymerase I (10 U/µl)	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Proteinase K (20 U/mg)	*Merk Eurolab GmbH, Darmstadt*
Restriktionsendonukleasen	*New England Biolabs GmbH, Schwalbach*
RNase A (50 U/mg)	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*
RNase H (2 U/µl)	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
SuperScript II Reverse Transkriptase, (200 U/µl)	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl)	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
T4-DNA-Ligase (400 U/µl)	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
T7-RNA-Polymerase (20 U/µl)	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*

2.4 Antikörper

3F10 Anti-HA (WB 1:1000)	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*
Maus Anti-Ki-67 MIB-1 (1 µg/ml)	*Zur Verfügung gestellt von J. Gerdes*
Alexa488 goat anti-mouse IgG	*Molecular Probes, Leiden, Niederlande*
HRP-gekoppelt anti-rabbit	*Bio-Rad Laboratories GmbH, München*

Streptavidin und Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) wurden von Roche, Penzberg zur Verfügung gestellt.

2.5 Hybridisierungsproben für Northern-Blot-Analysen

Für die Herstellung von Northern-Proben aus cDNA (humane Sonden: P493-6 cDNA; Ratten-Sonden: Smoxi-4 cDNA) wurde der PCR-Master-Mix (Promega) verwendet. Folgende PCR-Produkte wurden verwendet:

Humane Sonden	**Acession Nr.**	**Größe**	**Position**
7SK	X05490	100	231-330
Bop1	D50914	739	160-899
Nop56	V12065	1027	199-1226
Fibrillarin	X56597	595	245-840
Cbf5p	U59151	663	724-1387
Spermidin-Synthase	M64231	698	163-861
Cdk4	M14505	199	286-487

Ratten Sonden	**Acession Nr.**	**Größe**	**Position**
Bop1	U77415	295	1951-2246
Nop56	BI295000	486	93-579
Fibrillarin	AI171263	411	97-508
Transferrin-Rezeptor	M58040	987	1504-2491
ODC	M19157	1165	453-1618
Ssecks	RNU 23146	885	4-889
Gadd45	L32591	672	19-691

Als Probe für c-*myc* und GAPDH wurden jeweils die cDNAs verwendet, für die 5`-ETS-Sequenzen dienten die ersten 50 Nukleotide der Sequenzen U13369 bzw. V01270. Die Primer und Oligo-Nukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

2.6 siRNA

Folgende siRNAs (50 µM) wurden von der Firma Ribopharma zur Verfügung gestellt:

MYC1: 5’-CUAUGACCUCGACUACGACUC-3’
3’-UUGAUACUGGAGCUGAUGCUG-5’
MYC2: 5’-CAACGACAGCAGCUCGCCCAA-3’
3’-GAGUUGCUGUCGUCGAGCGGG-5’

2.7 Allgemeine Lösungen und Puffer

1x MOPS-Puffer	*20 mM MOPS (pH 7,0)*
	0,5 mM Natrium-Acetat
	1 mM EDTA
4x Run-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
Church-Puffer:	*0,4 M Na_2HPO_4*
	0,1 M NaH_2PO_4
	1 mM EDTA
	7% SDS
Elektrophoresepuffer (SDS-PAGE)	*25 mM Tris*
	92 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS
Laemmli-Probenpuffer (2x)	*100 mM Tris/HCl pH 6,8*
	200 mM Dithiothreitol (DTT)
	20% (w/v) Glycerin
	4% (w/v) SDS
	0,02% (w/v) Bromphenolblau
Lysis-Puffer	*10 mM NaCl*
	10 mM $MgCl_2$
	10 mM Tris, pH 7,5
	0,5% NP40
PBS (Phosphate-buffered saline)	*0,14 M NaCl*
	2,7 mM KCl
	10,1 mM Na_2HPO_4
	1,8 mM KH_2PO_4
RNA-Ladepuffer	*50 % Formamid*
	2,2 M Formaldehyd
	1x MOPS-Puffer
	0,2% Bromphenolblau (w/v)
	50 mg/ml Ethidiumbromid; 10% (w/v)
20x SSC, pH7.0	*3 M NaCl*
	0,3 M Nacitrat

Storage-Puffer	*50 mM Tris/HCl pH 8,3*
	5 mM $MgCl_2$
	0,1 mM EDTA/NaOH pH 8,0
	40% (v/v) Glyzerin
TAE-Puffer	*40 mM Tris/Essigsäure pH 7,8*
(DNA-Gelelektrophorese)	*10 mM Natriumacetat*
	1 mM Na-EDTA
TE-Puffer	*10 mM Tris/HCl pH 8,0*
	1 mM Na-EDTA
Tetracyclin-Stammlösung	*100 µg/ml Tetracyclin in Wasser, sterilfiltriert*
Transferpuffer	*25 mM Tris*
	20 mM Glycin
	20% (w/v) Methanol
Waschpuffer I	*1% (w/v) SDS*
	2xSSC
Waschpuffer II	*0,5% (w/v) SDS*
	0,1xSSC
Waschpuffer III	*1 mM EDTA*
	2x SSC
	+ 2 µg/ml RNase A

2.8 Spezielle Lösungen für Affymetrix-Microarrays

5% Antifoam-Stocklösung	*10 g Antifoam ad 200 ml A.dest*
Antikörperlösung 1	*6 µg Streptavidin (rekombinant)*
	1x Färbepuffer
	1,2 mg acetyliertes BSA
Antikörperlösung 2	*60 µg Ziegen-IgG*
	1,8 µg biotinylierter Antikörper
	1x Färbepuffer
	1,2 mg acetyliertes BSA
Antikörperlösung 3	*6 µg Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)*
	1x Färbepuffer
	1,2 mg acetyliertes BSA
5x Fragmentierungspuffer	*200 mM Tris-Acetat (pH 8,1)*
	1,5 mM Kaliumacetat
	150 mM Magnesiumacetat

Hybridisierungscocktail	*15 µg fragmentierte cRNA* *Kontroll-cRNA: BioB, BioC, BioD und Cre (1,5; 5; 25 und 100 pM)* *50 pM Kontroll-Oligonukleotide* *0.1 µg/µl sonifizierte Hering-Spermien-DNA* *0.5 µg/µl acetyliertes BSA* *1x MES Hybridisierungspuffer*
100x Kontroll-cRNA-Stock	*Kontroll-cRNA: BioB, BioC, BioD und Cre (150; 500 pM; 2,5 und 10 nM)* *0.1 mg/ml sonifizierte Hering-Spermien-DNA* *1x MES-Stock* *0,925 M NaCl* *0,01% Tween 20*
2x MES Hybridisierungspuffer	*2x MES-Stock* *2 M NaCl* *40 mM EDTA* *0,02% Tween 20*
12x MES-Stock	*1,22 M MES Natrium-Salz* *0,89 M MES freie Säure*
2x Färbepuffer	*2x MES-Stock* *1,85 M NaCl* *0,1% Tween 20* *0,01% Antifoam O-30*
Waschpuffer, nicht-stringent	*0,9 M NaCl* *60 mM NaH2PO4* *6 mM EDTA* *0,01% Tween 20* *0,005% Antifoam O-30*
Waschpuffer, stringent	*1x MES Stock* *26 mM NaCl* *0,01% Tween20*

2.9 Verbrauchsmaterialien und Kits

BioArray High Yield RNA Labeling Kit	*Enzo Diagnostic, Farmindale USA*
cDNA Synthesis System	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*
Cryo freezing container	*Nalgene, Belgien*
ECL™ Kit	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
High Prime DNA Labeling Kit	*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*
Genchip Satz HU95 und RG34	*Affymetrix, Santa Clara, CA*

Hybond-N+ Nylonmembran	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
Immobilon-P PVDF-Membran	*Millipore GmbH, Eschborn*
NICK Column, DNA Grade, G-50	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
PCR MasterMix	*Promega GmbH, Mannheim*
peqGOLD TriFast	*PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen*
Qiagen Gel Extraction Kit 50	*Qiagen GmbH, Hilden*
Qiagen Plasmid Maxi Kit 100	*Qiagen GmbH, Hilden*
RNeasy Mini und Midi Kit	*Qiagen GmbH, Hilden*
Röntgenfilm Kodak XAR-5/ MS	*Eastman Kodak Company, Rochester, New York*
Zellkulturgefäße	*Greiner GmbH, Frickenhausen*

2.10 Geräte

Bakterien-Brutschrank	*Heraeus Sepatech GmbH, Osterode*
Benchtop Radioisotop Counter QC-4000	*Bioscan Inc., Washington, D.C., USA*
CO_2-Inkubator für Zellkultur, Heraeus 6000	*Heraeus Sepatech GmbH, Osterode*
DNA-Thermal-Cycler	*Perkin-Elmer GmbH, Überlingen*
Expositionskassetten mit Verstärker-folie Kodak Lanex fast screen	*Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA*
Flow-Hood-Werkbank	*Bio-Flow Technik, Meckenheim*
Gelelektrophoresekammer Horizon	*Invitrogen GmbH, Karlsruhe*
Heiz- und Schüttelblock Thermomixer 5436	*Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg*
Hybridisierungsofen Mini 10, Minioven MKII	*MWG-Biotech GmbH, Ebersberg*
Mikroskop Axiovert 200-M	*Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen*
Phosphoimager Fuji BAS 1000	*Fuji Photo Film CO. Ltd., Japan*
Proteingelelektrophorese SE250 Mighty Small II	*Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg*
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	*DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg*

3. METHODEN

3.1 Standardmethoden der Molekularbiologie

Die folgenden Standardmethoden wurden gemäß den in Sambrook et al., (Sambrook et al., 1989) nachzulesenden Protokollen oder nach den Angaben der Hersteller durchgeführt: Polymerasekettenreaktion (PCR), Restriktionsverdau, Ligation, Gelelektrophorese, Gelextraktion, Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren, Transformation kompetenter Bakterien sowie Isolierung von Plasmiden aus Bakterien (Miniprep, Maxiprep).

3.2 Zellkultur

Die Zelllinien P493-6 (Pajic et al., 2000) und EREB2-5 (Kempkes et al., 1995) wurden als Suspensionskultur bei 37°C und 5% CO_2 Partialdruck in RPMI 1640-Medium kultiviert. Das Medium enthielt 10% (v/v) fötales Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 750 ng/ml Amphotericin B. Die Kulturen wurden regelmäßig im Verhältnis 1:3 oder 1:4 gesplittet, um die Zellen in der Proliferations-Phase zu erhalten. Durch Zugabe von Tetrazyklin (Tet) (0,1 µg/ml Endkonzentration) erfolgte die Reprimierung des *myc*-Gens in P493-6-Zellen. Um das *myc*-Gen wieder zu induzieren, wurde durch dreimaliges Waschen im gleichen Volumen PBS/10% FKS das Tet ausgewaschen. Schließlich wurden die Zellen in frischem, tet-freiem Medium so aufgenommen, dass die Zelldichte derjenigen vor dem Waschen entsprach. Zu beliebigen Zeitpunkten nach *myc*-Induktion erfolgten die verschiedenen Analysen der Zellen. Bei Experimenten, bei denen Zellen unter Serumentzug inkubiert wurden, wurden die Zellen nach dem Waschen in RPMI/ 0,25% FKS aufgenommen.

Die Zellinien Smoxi-4 (Hölzel et al., 2001), TGR-1, Ho15.19, (Mateyak et al., 1997) und TGR-1/MycER wurden als Adhäsionskultur in DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) mit 8% Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 8% CO_2 Partialdruck gehalten. Die Zellen wurden in entsprechenden Abständen passagiert, um ein konfluentes Wachstum der weiterführenden Kultur zu vermeiden. Die Kultur der HeLa Zellen und der humanen primären Fibroblasten erfolgte in DMEM mit 10% FKS, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin bei 8% CO_2 Partialdruck.

Nach ca. einem Monat in Kultur wurden alle Zelllinien durch frische, aufgetaute Zellen ersetzt. Zum Einfrieren wurden $5x10^7$ Zellen pelletiert (1200 U/min, 5min) und in 1 ml Medium (mit 50% Serum, 10% DMSO) resuspendiert. Die Kultur wurde in Einfrier-Ampullen überführt und schrittweise (-1°C/min) im Nalgene Cryo Freezing Container abgekühlt und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung wurde die Ampulle bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 10 ml 37°C warmes RPMI-Medium überführt. Das DMSO wurde durch einmaliges Zentrifugieren ausgewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium kultiviert.

3.3 Northern-Blot-Analyse

Kleinere Mengen gesamtzellulärer RNA wurden mit PeqLab TriFast™ (Phenol-Extraktion) isoliert. Für größere Mengen (>150 µg) wurde der „RNeasy Midi-Kit" der Firma Qiagen verwendet. Alle Puffer und Lösungen sind Bestandteil der Kits und die Präparation erfolgte nach den Angaben der Hersteller.

10 µg gesamtzelluläre RNA wurden in 20 µl RNA-Ladepuffer aufgenommen. Die Proben wurden 5 min bei 55 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Elektrophorese erfolgte in einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel in 1x MOPS-Puffer bei 90 V. Die anschließende Übertragung auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) erfolgte über Nacht als Saugtransfer in 10x SSC. Nach dem Transfer wurde die RNA im Stratalinker durch UV-Licht fixiert und der Filter 10 min in 0,1x SSC/1%SDS gewaschen und 30 min in Church-Puffer bei 65°C prä-hybridisiert. Zur Markierung der Northern-Proben wurde das „High Prime Kit“ (Roche) verwendet. Dabei wurden 25ng PCR-Produkt (2.5) mit (^{32}P)-dCTP (Amersham) radioaktiv markiert. Die markierten Proben wurden mit „Sephadex Nick Columns G50“ (Amersham) anschließend gereinigt und in 400µl TE gesammelt. Die Proben wurden hitzedenaturiert und die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C in frischem Church-Puffer. Danach wurde der Filter 2x 15 min mit 0,1% SSC/1% SDS-Lösung bei 65°C gewaschen, luftgetrocknet und bei –80°C autoradiographiert bzw. mit einem Phosphoimager quantitativ ausgewertet. Falls der Blot mit einer weiteren Sonde hybrisiert wurde, erfolgte zuvor eine Behandlung für 5 min mit kochendem 0.25%igen SDS.

3.4 Nukleärer „Run-On“

Bei diesem Transkriptionsassay werden Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt lysiert, die intakten Zellkerne isoliert und eingefroren. Aufgrund der fehlenden Nukleotide arretieren die Transkriptionskomplexe auf ihrem DNA-Template. Nach Auftauen und Inkubation in Gegenwart von radioaktiv-markierten Nukleotiden, wird die Transkription fortgesetzt. Die gereinigten RNAs werden dann auf Oligonukleotid-Filtern hybridisiert. Mittels Autoradiographie kann dann ermittelt werden, welche RNA-Transkripte produziert wurden. Dies gibt Aufschluß darüber, welche Gene zum Zeitpunkt der Lyse transkribiert wurden.

3.4.1 Isolierung von Zellkernen

Zur Präparation von Kernen wurden $4x10^7$ Zellen pelletiert (7 min, 1200 U/min, 4°C), in 40 ml kaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 5 ml kaltem Lysis-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden erneut abzentrifugiert (7 min, 1500 U/min, 4°C) und vorsichtig in 200 µl Storage-Puffer resuspendiert. Daraus wurden 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.2 „Run-On“-Reaktion

Pro „Run-On“-Reaktion wurde folgender 2x „Run-on“ Puffer hergestellt: 55 µl 4x „Run-on“-Puffer, 55 µl H_2O und 5 µl ^{32}P-CTP (800 Ci/mmol). Ein Aliquot (100 µl) Zellkernpräparation (3.4.1) wurde auf Eis aufgetaut und mit 100 µl 2x „Run-On“-Puffer versetzt, mit der Pipettenspitze gut durchmischt und für 15 min bei 28°C inkubiert. Es erfolgte eine DNase-Behandlung (5 µl, 10 U/µl, RNase-frei) für 10 min bei RT. Der Ansatz wurde nun mit 20 µl Proteinase K/SDS Gemisch (3 Teile Proteinase K (10 mg/ml), 1 Teil 10%iges SDS) versetzt und für mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Die nukleären Transkripte wurden mit 500 µl TE-Puffer von einer Sephadex G50-Säule eluiert. Der radioaktive Einbau wurde in einem Benchtop-Radioisotop Counter in cpm/ml bestimmt. Zur längeren Lagerung wurden die markierten RNAs bei -20°C eingefroren. Die Hybridisierung (65°C in 5 ml Church-Puffer) der Transkripte erfolgte mit selbst gespotteten Oligonukleotid-Filtern, die zuvor mit 5 ml Church-Puffer für 1h prä-hybridisiert wurden. Nach 36h wurden die

Filter zweimal für je 20 min bei 45°C mit Waschpuffer I und anschließend zweimal für je 20 min mit Waschpuffer II gewaschen. Um das SDS zu entfernen wurden die Filter kurz in Waschpuffer III (ohne RNase) geschwenkt. Danach erfolge eine RNase A-Behandlung für 15 min bei RT in Waschpuffer III. Abschließend wurde zweimal mit Waschpuffer II bei 45°C so lange gewaschen, bis die Radioaktivität auf den Filtern signifikant reduziert wurde. Die Filter wurden dann feucht autoradiographiert oder quantitativ mit einem PhosphoImager ausgewertet. Bei zu hohem, unspezifischen Hintergrund kann die RNase-Behandlung wiederholt werden.

3.4.3 Herstellung von Oligonukleotid-Filter

Für die Herstellung der Oligonukleotid-Filter wurde das Mehrfachfiltrationsgerät für Mikroproben (Minifold II, Schleicher & Schuell) verwendet. Aufbau und Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.5 „Pulse-Chase“-Markierung mit ^{3}H-Uridin

5x10^{6} Zellen wurden für 30 min in Medium, dass 2.5 µCi/ml ^{3}H-Uridin (ICN) enthielt, puls-markiert. Danach wurden die Zellen kurz mit Medium gewaschen und für die entsprechende Zeit in radioaktiv-freiem Medium, das 0.5 mM Uridin enthielt, inkubiert (Chase). Die gesamtzelluläre RNA wurde isoliert (Rneasy Mini Kit, Qiagen), auf einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit En^{3}Hance (New England Nuclear) besprüht und bei -80°C exponiert (Kodak X-Omat AR Film). Die Quantifizierung erfolgte mit dem NIH-Image-Programm (http://rsb.info.nih.gov/nih-image/).

3.6 Synthese von cDNA

Für die Synthese von cDNA aus gesamt-RNA wurde das „cDNA Synthesis System“ von Roche verwendet.

3.6.1 Erststrangsynthese

1- 20 µg gesamtzellulärer RNA in 19 µl A.dest wurden mit 400 pmol Oligo $(dT)_{15}$ Primer für Standard cDNA-Synthese (RT-Ansatz) bzw mit 200 pmol

$\{(dT)_{24}T7promotor\}_{65}$ für doppelsträngige cDNA-Synthese für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dann wurden 8 µl 5x RT-Puffer, 4 µl 0,1 M DTT, 4 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (25 U/µl) und 2 µl AMV Reverse Transkriptase (25 U/µl) hinzugefügt und die Reaktion 60 min lang bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Eis gestoppt. Die Zweitstrangsynthese erfolgte direkt im Anschluss oder die cDNA wurde für RT-PCR verwendet.

3.6.2 Zweitstrangsynthese

40 µl cDNA aus dem RT-Ansatz wurden mit 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 1,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 6,5 µl Zweitstrang-Enzymmix und 72 µl A.dest für 2 h bei 16°C inkubiert. Danach wurden 20 µl T4 DNA-Polymerase (20 U) hinzugefügt und für 5 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 17 µl EDTA (0,2 M, pH 8) gestoppt. Wurde gesamtzelluläre RNA als Startmaterial verwendet, erfolgte eine RNase-Behandlung (1,5 µl RNase I, 15 U) für 30 min bei 37°C. Abschließend wurde der Ansatz noch mit 5 µl Proteinase K (3 U) versetzt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert.

Die anschließende Phenol/Chloroform-Aufreinigung der cDNA über Phase Lock-Gel ist wichtig für die nachfolgenden Anwendungen. Der Ansatz wurde mit 100 µl DEPC-H_2O auf ein Volumen von 300 µl gebracht, mit der gleichen Menge Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und für 30 Sek gevortext. Nach Zentrifugation (30 Sek, max. U/min) wurde die cDNA-Phenol-Mischung in ein Phase Lock-Gel-Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und es erfolgte ein weiter Reinigungsschritt. Anschließend wurden 250 µl der wässrigen Phase mit 125 µl 7,5 M NH_4OAc und 940 µl EtOH bei – 20°C über Nacht gefällt, zweimal mit 80%igem EtOH gewaschen und in 22 µl DEPC-H_2O gelöst.

3.7 Western-Blot-Analyse

Der Zellaufschluß für die Protein-Analyse erfolgte in Schindler-Puffer. Suspensionszellen wurden dazu pelletiert, adhärente Zellen in dem Zellkulturgefäß lysiert. Adhärente Zellen wurden zuvor zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (15 min, 12000 Upm, 4°C) abgetrennt.

Die Lysate wurden bei -20°C aufbewahrt oder anschließend nach Hitzedenaturierung (5 min 95°C) in einem diskontinuierlichen 7%-15%igen SDS-PAGE Gel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Nachdem die Bromphenolblaufront das Trenngel erreicht hatte, wurde auf 200 V erhöht. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-C extra, Amersham Life Science) erfolgte für 90 min in TRIS/Methanol-Transferpuffer. Zur Ladekontrolle wurde die Membran 1-2 min in Ponceau S-Lösung gefärbt und zweimal in Wasser gewaschen.

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurde durch Behandlung mit 5% Milchpulver/PBS für mindestens 1h (besser über Nacht) abgeblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1h in PBS/0,1% Tween/5% BSA. Dieser Ansatz konnte duch Zugabe von 0,02% Natriumacid bei 4°C aufbewahrt und wiederverwendet werden. Die Membran wurde dreimal mit PBS/0,1% Tween gewaschen und danach mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper in PBS/0,1% Tween/5% MP für 1h inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit PBS/0,1% Tween und abschließend einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Western-Blotting-Kit der Firma Amersham nach Angaben des Herstellers.

3.8 Affymetrix Oligonukleotid-Microarrays

Mit Hilfe von „high-density“ Oligonukleotid-Microarrays (Genchips) kann die Expression von Tausenden von Transkripten gleichzeitig analysiert werden. Dabei werden Biotin-markierte cRNAs mit einem Genchip hybridisiert, der aus einem Glas-Substrat (1,28 x 1,28 cm), auf dem jedes einzelne Gen durch ein Probenset repräsentiert wird, besteht (Abb. 7). Ein Probenset besteht aus 16 Probenpaaren, die wiederum aus 2 Probenzellen bestehen: Einer „Perfect Mach“ (PM)- und einer „Mismatch“ (MM)-Probenzelle. Jede Probenzelle (24 x 24 µm) enthält ca 10^7 Kopien einer bestimmten DNA-Oligonukleotid-Probe (25mer). Das PM-Oligomer ist identisch zu der Sequenz des Gens, das durch das Probenset repräsentiert wird. Das MM-Oligomer enthält eine Basentransversion in der Mitte der Sequenz und dient der Kontrolle von unspezifischen Bindungen.

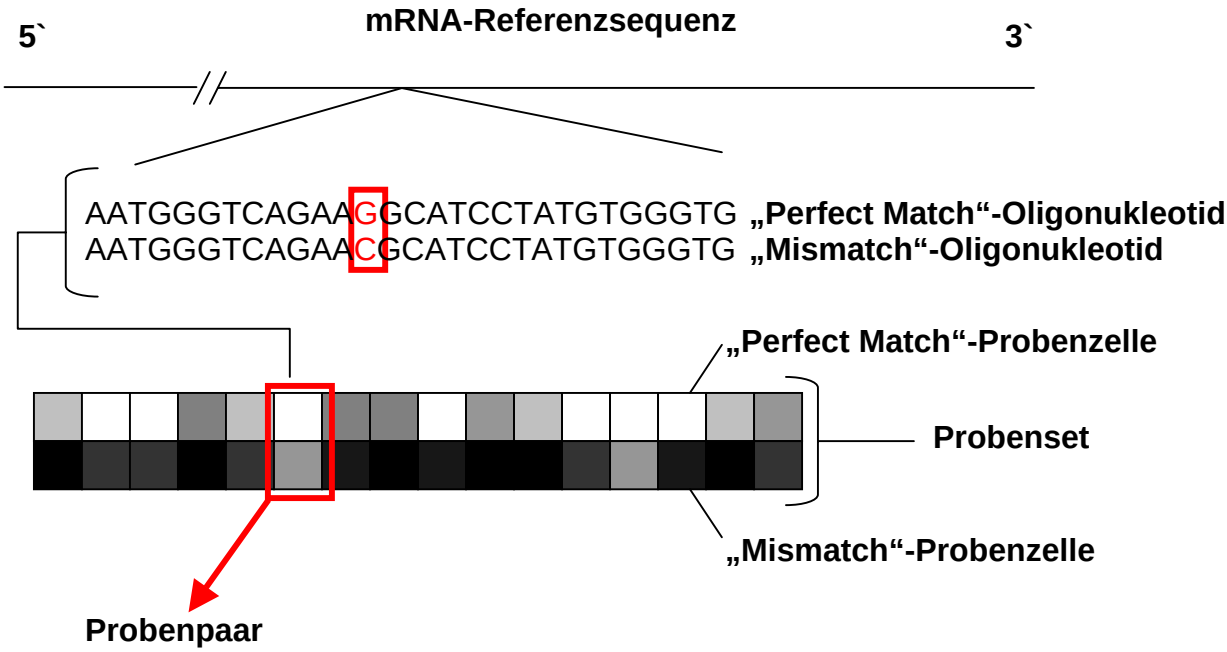


Abb. 7 Schematische Darstellung zum Aufbau eines Probensets eines Affymetrix-Oligonukleotid-Genchips. Ein Probenset setzt sich aus 16 verschiedenen Probenpaaren zusammen, die jeweils aus einer „Perfect Match“- und einer „Mismatch“-Probenzelle bestehen.

Die Intensitäten jedes einzelnen Probenpaares werden dazu verwendet, eine qualitative und quantitative Expressionsmessung durchzuführen. Weiterhin kann die Expressionsanalyse verglichen mit der eines Kontroll-Chips Auskunft über die relative Abundanz eines Transkripts geben. Die Oligonukleotid-Proben werden auf der Basis von Standard-Hybridisierungskriterien ausgewählt, wobei jedoch die 3`-Bereiche eines Gens bevorzugt werden. Die Anordnung der Probenpaare eines Probensets erfolgt aus statistischen Gründen über den Genchip verteilt.

In dieser Arbeit wurden der humane Genchip-Satz HU95 (Chip A-E) und der Ratten-Genchip-Satz RG34 (Chip A-C) der Firma Affymetrix (Santa Clara, CA) verwendet. Der A-Chip des humanen Genchip-Satzes enthält Probensets von ca. 12 000 bekannten Genen, während die sogenannten EST-Chips (Chip B-E) durch ca. 50 000 ESTs bestimmt sind. Der RG34 Genchip-Satz besteht aus dem A-Chip (8 000 bekannte Ratten-Gene) und den beiden EST-Chips (Chip B-C, 20 000 ESTs).

3.8.1 Synthese und Fragmentierung der Biotin-markierten cRNA

Für die Synthese von Biotin-markierter cRNA wurde doppelsträngige cDNA (3.6.2) als Ausgangsmaterial verwendet. Mit dem "BioArray RNA Transcript Labeling Kit", das für den Gebrauch für Affymetrix Microarrays optimiert ist, wurde eine *in vitro*-Transkription durchgeführt. Dabei produziert die T7-RNA-Polymerase in Gegenwart von biotinylierten Ribonukleotiden einzelsträngige RNA-Moleküle (cRNA). Die Biotin-markierte cRNA wurde mit dem RNeasyMini Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 42 µl eluiert. Für die Hybridisierung mit den Genchips muss die cRNA eine Konzentration von mindestens 0,6 µg/µl haben. War dies nicht der Fall, wurde im Anschluss eine Ethanol-Fällung durchgeführt und die cRNA in einem kleineren Volumen aufgenommen. Anschließend wurden 20 µg cRNA in Fragmentierungspuffer für 35 min bei 95°C fragmentiert. Der Ansatz wurde bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert.

3.8.2 Kontroll-cRNA-Präparation

Die markierten Kontroll-cRNAs BioB, BioC, BioD und Cre dienen als Hybridisierungs-Standard zur Abschätzung der Expressionshöhe der RNA-Transkripte. Weiterhin werden sie zur Normalisierung der Expressionshöhe verschiedener Experimente während der Vergleichsanalyse benutzt. Zur Herstellung der Kontroll-cRNAs wurden die Kontroll-Plasmide (von Roche, Penzberg, zur Verfügung gestellt) durch *XhoI*-Verdau linearisiert. Nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung wurden ca. 0,75 µg Plasmid-DNA in die cRNA-Synthese eingesetzt. Für die *in-vitro* Transkription (2.2.8.1) tragen die Kontroll-Plasmide den T7-Promotor. Nach Aufreinigung erfolgte die Fragmentierung der Kontroll-cRNAs und die Verdünnung der individuellen Kontroll-Stocklösungen: BioB (15 nM), BioC (50 nM), BioD (250 nM) und Cre (1 µM). Aus diesen Lösungen wurde dann der 100x Kontroll-cRNA-Stock hergestellt.

3.8.3 Hybridisierung, Waschen, und Scannen der Genchips

15 µg fragmentierte cRNA und der 100x Kontroll-cRNA Stock wurden für 5 min bei 65°C denaturiert und in den Hybridisierungscocktail (2.8) eingesetzt. Der Cocktail wurde für 5 min bei 99°C denaturiert und anschließend für 5 min auf 45°C abgekühlt und abzentrifugiert. Die Prä-Hybridisierung des verwendeten Genchips erfolgte für 10

min bei 45°C mit 1x MES Puffer. 200 µl des abzentrifugierten Hybridisierungs-cocktails wurden dann für 16 h bei 45°C unter Rotation mit dem Genchip hybridisiert. Anschließend wurde der Chip in einer Waschstation (Affymetrix Fluidics Station 400) computergesteuert unter Verwendung des nicht-stringenten Waschpuffers (10x 2 mixes/25°C) und des stringenten Waschpuffers (4x 15 mixes/50°C) nach dem Programm EukGE-WS2-v3 gewaschen. Zur Detektion und Verstärkung der Fluoreszenzsignale wurde der Chip nacheinander mit den Antikörperlösungen 1-3 behandelt und abschließend gewaschen. Das Scannen des Chips erfolgte dann mit einer Auflösung von 3 µm/Pixel mit dem HP GeneArray-Scanner (Affymetrix). Zur Identifizierung der einzelnen Probenzellen wurde ein Gitter über den gesamten Chip positioniert (Grid-Alignment, Abb. 8). Die Orientierung des Gitters erfolgt anhand der Kontroll-Oligonukleotide, die am Rand des Chips hybridisieren.

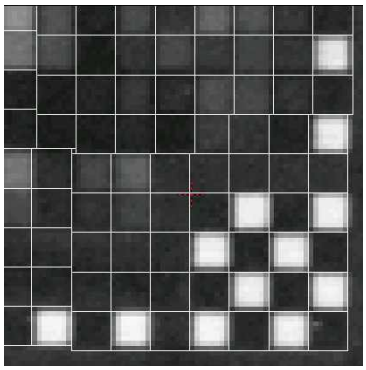


Abb. 8 Grid-Alignment. Nach dem Scannen wird ein Gitter über den gesamten Chip positioniert. Die Kontroll-Oligonukleotide, die am Rand des Chips hybridisieren, geben die Orientierung des Gitters an. Anhand des Gitters können die einzelnen Probenzellen identifiziert werden.

Der gescannte Chip wird in einer sogenannten DAT-Datei gespeichert, bei der jede Probenzelle aus 64 Pixeln (8x8 Pixel) definiert ist. Aus diesen 64 Pixeln wird ein einzelner Intensitätswert für jede Probenzelle berechnet, der das Hybridisierungslevel für diese Probenzelle repräsentiert. Dazu werden die begrenzenden 28 Pixel ausgeschlossen und die Intensitätsverteilung für die verbleibenden 36 Pixel berechnet. Der Intensitätswert, der mit der 75% Perzentile der Verteilung assoziiert ist, wird als Durchschnittswert (Average Intensity) für die Probenzelle benutzt. Diese Information wird dann in der CEL-Datei gespeichert.

3.8.4 Statistische Algorithmen für die Auswertung der Genchips

Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte bei der Auswertung der Chips beschrieben. Die englischen Originalbezeichnungen und Abkürzungen wurden weitgehend beibehalten, um Ungenauigkeiten bei der Übersetzung zu vermeiden. Zusätzlich zur Microarray Suite 5.0 von Affymetrix (Beschreibung der Algorithmen www.affymetrix.com/products/statistical_algorithms_reference_guide_content.html) wurden die Programme „Significance Analysis of Microarrays (SAM) (Tusher et al., 2001) und „dChip“ (http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/) für die Datenanalyse eingesetzt.

3.8.4.1 „Single Array“-Analyse

Die „Single Array“-Analyse ermittelt die Daten des Expressionsprofiles der verwendeten RNA. Sie ist die Grundlage, um Vergleiche zwischen „experiment“- und „baseline“-Chips (Kontroll-Chip) durchzuführen. Diese Analyse erzeugt einen „detection p-value“, einen „detection call“ und ein „signal“.

Der „detection p-value“ wurde folgendermaßen bestimmt: Für jedes Probenpaar wurde der „discrimination score“ (R) ermittelt {R = (PM – MM) / (PM + (MM)}, der das Verhältnis der spezifischen Intensität (PM-MM) zur Gesamtintensität (PM+MM) angibt. Die Berechnung des „detection p-values“ basiert auf der nicht-parametrischen Methode nach Wilcoxon. Dabei wird der „discrimination score“ für jedes Probenpaar gegen einen benutzerdefinierten Grenzwert τ (empfohlener Wert: 0,015) getestet und ein Rang bestimmt, wie weit R von τ entfernt ist. Je größer dabei die Differenz ist, desto kleiner wird der „detection p-value“. Dieser Parameter wird dann für den „detection call“ verwendet, der „present“, „marginal“ und „absent calls“ definiert, indem er mit den benutzerdefinierten Grenzwerten α_1 und α_2 verglichen wird. „detection p-values“ < α_1 (empfohlener Wert 0,04) definieren einen „present call“, Werte zwischen α_1 und α_2 (empfohlener Wert 0,06) einen „marginal call“ und „p-values“ < α_2 einen „absent call“.

Die „signal“-Werte repräsentieren die relative Expressionshöhe eines Transkripts auf dem jeweiligen Probenset. Die Berechnung beruht auf dem „One StepTukey`s Biweight Estimate“ (http//mathworld.wolfram.com/TukeysBiweight.html). In einem Probenpaar wird mit Hilfe von „signal rules“ aus der MM-Intensität ein sogenanntes Streusignal ermittelt, das von der Intensität des PM substrahiert wird.

Diese „echte“ Intensität wird dann logarithmiert (Basis 2) und entsprechend ihres Abstandes zum Durchschnitt aller Probenpaaare gewichtet. Damit vermeidet man, dass Ausreißer das „signal“ verfälschen. Der Durchschnitt der gewichteten Intensitätswerte entspricht dann dem metrischen „signal“, das in der CHP-Datei angegeben wird.

3.8.4.2 Vergleichsanalyse und lineare Normalisierung

In der Vergleichsanalyse werden zwei Genchips desselben Typs miteinander verglichen, um Änderungen in der Genexpression zwischen „experiment“ und „baseline“ zu detektieren und quantifizieren. Die verwendeten Algorithmen ermitteln einen „change p-value“, einen „change call“ und eine „signal log ratio“.

Bevor die Vergleichsanalyse durchgeführt wird, müssen die biologischen und technischen Variationen zwischen den zu vergleichenden Chips korrigiert werden. Die Intensitäten der Probensets des „experiment“ Chips werden mit einem Faktor linear auf die Intensitäten des „baseline“ Chips normalisiert. Analog zu der „single array“ Analyse wird in der Vergleichsanalyse auch der Wilcoxon`s Test angewandt. Jedes Probenset des „baseline“-Genchips wird mit dem entsprechenden Probenset des „experiment“-Chips verglichen. Es wird ein „change p-value“ berechnet, der ein Ansteigen (p-values nahe 0), ein Abfallen (p-values nahe 1) oder keine Änderung (p-values um 0,5) in der Genexpression angibt. Die Werte werden mit benutzerdefinierten Grenzwerten γ_1 und γ_2 verglichen und es werden folgende „change calls“ ermittelt: „increase“, „marginal increase“, „no change“, „decrease“ oder „marginal decrease“. Die „signal log ratio“ gibt die Größe und Änderungsrichtung eines Transkripts in der Vergleichsanalyse an. Wie bei der „single array“-Analyse wird die „Tukey`s Biweight“-Methode angewandt, um „Ausreißer“ zu eliminieren. Die Probenpaar-Intensitäten der beiden Chips werden miteinander verglichen und die „signal log ratios“ werden entsprechend ihres Abstandes zum Durchschnitt aller „Probenpaar-Ratios“ gewichtet. In der CHP-Datei werden zusätzlich zu der „signal log ratio“ noch die niedrigste („signal log ratio low“) bzw. größte („signal log ratio high“) Ratio eines Probenpaars angegeben.

3.8.4.3 Cluster-Analyse und nicht-lineare Normalisierung

Für die Cluster-Analyse wurde das Programm „dCHIP“, das unter http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/ frei erhältlich ist, verwendet. Nach der

„model-based expression“-Analyse aller Chips erfolgt die Normalisierung der Daten nach der „invariant set“-Normalisierung. Die beruht auf der Annahme, dass in jedem Datensatz ein Set von Genen existiert, deren Expressionsniveau sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht signifikant ändert. Zunächst werden alle Fluoreszenzdaten, d.h. alle „signal“-Werte auf dem einzelnen Chip nach ihrer Intensität sortiert („ranking“). Anschließend werden die Gene, die in den verschiedenen Chips ähnliche „ranks“ haben, als „invariant“ definiert. Dieser Datensatz („invariant set“) bildet dann die Grundlage für eine nicht lineare Normalisierung. Nach erfolgter Normalisierung der verschiedenen Chips wurde für die Detektion von differentiell exprimierten Genen die permutationsbasierte Methode „SAM“ (Significance Analysis of Microarrays) nach Tusher angewandt (Tusher et al., 2001). Das Programm ist als Add-In für MS Excel unter http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM frei erhältlich. Als erster Schritt wird die relative Differenz der Gen-Expression bei verschiedenen Versuchsbedingungen unter Berücksichtigung der Variabilität in den verschiedenen Replikaten berechnet. Der Datensatz wird dann mehrfach permutiert und die relativen Differenzen auf Basis der permutierten Daten neu kalkuliert. Für die Mehrzahl der Gene sind die Werte aus original- und permutierten Datensätzen ungefähr gleich. Gene, bei denen sich diese Werte um mehr als einen bestimmten Grenzwert unterscheiden, werden als differentiell exprimiert definiert. Basierend auf der Anzahl der Gene, die bei einem bestimmten Grenzwert definiert wurde, wird eine Fehlerquote (false detection rate, FDR) errechnet. Anschließend wurde mit den differentiell regulierten Genen ein hierarchisches Clustern nach Eisen (Eisen et al., 1998) durchgeführt, d.h. es wurden Gene aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression zusammen gruppiert.

3.9 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) beruht auf dem sequenz-spezifischen, post-transkriptionalen „gene-silencing“, das durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die homolog zu der Sequenz des entsprechenden Gens ist, ausgelöst wird. Der Mediator der sequenz-spezifischen mRNA Degradierung sind „small interfering“ RNAs (siRNAs), die aus den dsRNAs durch Prozessierung durch den sogenannten „Dicer“-Komplex generiert werden. Diese RNA-Segmente sind 21-23 Nukleotide lang und haben einen kurzen Überhang auf jeder Seite (Elbashir et al., 2001). Von der Firma Ribopharma wurden

für die RNA-Interferenz-Versuche synthetische, 21-Nukleotid-lange RNAs mit einem 3`-Überhang zur Verfügung gestellt. Adhärente Zellen wurden 24h vorher bei 50%iger Konfluenz in Sechs-Lochplatten ausgesät. Die Transfektion der siRNAs erfolgte mit Lipofectamine (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Es wurden zwischen 0,5 und 2 µg siRNA transfiziert. 24-48 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Zellen mit Western- und Northern-Blots. Phänotypische Veränderungen der Zellen wurden mit digitaler Fotografie dokumentiert.

3.10 Immunfluoreszenz

3.10.1 Cyto-Spin

Suspensionszellen wurden für die Immunfluoreszenz in der Cyto-Spin-Zentrifuge auf Objektträgern als Zellspot immobilisiert. 6 x 10^4 Zellen in 300 µl Medium wurden dazu in speziellen Cyto-Spin-Kammern bei 500 U/min 8 min lang zentrifugiert. Überschüssiges Medium wurde durch ein Filterpapier aufgefangen.

3.10.2 Immunfärbung fixierter Zellen

Adhärente Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen, Suspensionszellen durch Cyto-Spin-Zentrifugation immobilisiert und mit 4% Paraformaldehyd in PBS (oder eiskaltem Aceton) für 10 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min in 0,25% Triton X in PBS permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen für 1 h in 5% BSA in PBS/0,1% Triton geblockt. In einer dunklen, feuchten Kammer erfolgte für 30 min die Inkubation des primäre Antikörper anti-Ki-67 (1 µg/ml). Nicht-gebundener Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS/0,1% Triton entfernt. Der sekundäre Antikörper anti-Maus IgG Alexa 488 wurde 1:200 verdünnt und für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte für 10 min eine Kernfärbung mit dem Nukleinsäurefarbstoff DAPI. Nach abschließendem Waschen mit PBS/0,1% Triton wurden die Präparate mit Mounting Solution (Sigma) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Zur Analyse der gefärbten Zellen wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200-M, Zeiss) mit dem geeigneten Filtersatz verwendet. Eine digitale CCD-Kamera vom Typ Hamamatsu ORCA C-4795 gab die Bildinformationen an das Program Openlab 3.8 von der Firma Improvision weiter.

4. ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung von Myc-Zielgenen mit Oligonukleotid-Genchips

Zu Beginn der Arbeit wurde in zwei verschiedenen Zellsystemen ein genomweiter Screen nach Myc-Zielgenen durchgeführt. Dazu wurden die beiden Zelllinien P493-6 und Smoxi-4 verwendet, in denen Myc jeweils konditional aktiviert werden kann.

In diesem Kapitel werden zuerst die Ergebnisse für die P493-6 Zellen beschrieben. Diese Zellen entstanden durch stabile Transfektion von EREB2-5 Zellen (Kempkes et al., 1995) mit dem Tetrazyklin (Tet)-regulierbaren Konstrukt p*myc*-Tet. Dieses Tet-off-System erlaubt die Expression des *myc*-Transgens nur in Abwesenheit von Tetrazyklin. Die parentalen EREB2-5 Zellen sind primäre, periphere B-Lymphozyten aus Nabelschnurblut, die mit dem EBV-Stamm P3HR1 infiziert wurden, bei dem das EBNA2-Gen deletiert ist. EREB2-5 Zellen tragen zusätzlich ein „Mini-EBV“-Plasmid, das für ein EBNA2/Östrogen-Rezeptor-Fusionsprotein (EBNA2-ER) kodiert. In Gegenwart von Östrogen wird das EBNA2-ER-Fusionsprotein aktiviert und die Proliferation der Zellen induziert (Kempkes et al., 1995). Die Zelllinie P493-6 stellt also eine Burkitt-Lymphom-Modellzelllinie mit einem doppelt konditionalen System für EBNA2 und *myc* dar. P493-6 Zellen können sowohl unter dem EBNA2-ER- als auch unter dem *myc*-Transkriptionsprogramm proliferieren. Alle Versuche mit P493-6 Zellen in dieser Arbeit erfolgten in Abwesenheit von Östrogen.

Die Proliferation von P493-6 Zellen ist nicht nur strikt abhängig von der Expression des *myc*-Transgens sondern auch von der Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS). Das Serum versorgt die Zellen in Kultur mit den benötigten Wachstumsfaktoren. Wird der Zellkultur entweder das Serum und damit die Wachstumsfaktoren entzogen oder *myc* durch Zugabe von Tet reprimiert, kommt es zu einem Arretieren der Zellen im Zyklus.

Die Induktion von *myc* in Abwesenheit von FKS hat ein Wachstum der P493-6 Zellen (Zunahme der Masse) zu Folge, ohne jedoch die Zellteilung oder Apoptose zu aktivieren (Schuhmacher et al., 1999). Im Gegensatz dazu induziert Myc in murinen Fibroblasten in Abwesenheit von Serum die S-Phase. Daher konnten in Maus-fibroblasten Zellwachstum und Zellzyklusregulation durch Myc nicht unabhängig voneinander untersucht werden. Dies war erstmals mit der Zellinie P493-6 möglich, in der Myc nach Serum-Entzug keine S-Phase induziert.

Myc kann also in Anwesenheit von FKS Wachstum und Proliferation in P493-6 Zellen induzieren, während die Aktivierung von Myc in Abwesenheit von FKS nur zu einem Wachstum der Zellen führt. Ohne FKS erfolgt keine Proliferation der Zellen.

Myc reguliert als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Genen und beeinflusst so das Verhalten der Zellen. Es stellte sich die Frage, welche Zielgene in P493-6 Zellen durch Myc reguliert werden und wie diese Regulation durch Serum moduliert wird. Ist die Modulation von Serum eher qualitativ, d.h. es werden ganz andere Gene reguliert oder eher quantitativ, d.h. die gleichen Gene werden nur stärker oder schwächer exprimiert? Um diese Fragen zu beantworten, wurde eine genomweite Suche nach Myc-Zielgenen in P493-6 Zellen in Abhängigkeit von Serum durchgeführt.

Für diesen globalen Screen wurden Oligonukleotid-Genchips der Firma Affymetrix verwendet. Der Vorteil von Genchips gegenüber anderen Methoden wie z.B. RT-PCR oder Northern-Blot-Analyse ist, dass eine sehr große Anzahl von Genen gleichzeitig bezüglich ihrer Expressionshöhe untersucht werden kann. Die hier verwendeten Genchips bestehen aus einem Glassubstrat, auf dem pro Chip Sequenzen von bis zu 12 000 Genen bzw. ESTs (expressed sequence tags) in Form von Oligonukleotiden synthetisiert sind, die mit markierter cRNA hybridisiert werden können.

Für die Analysen in der P493-6 Zelllinie wurde gesamt-RNA aus Zellen isoliert, in denen das konditionale *myc*-Gen für 8h aktiviert wurde. Nicht induzierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Poly-A^+-RNA wurde in doppelsträngige cDNA transkribiert. In einer *in vitro* Transkription diente die cDNA als Template für die Synthese von biotinylierter, einzelsträngiger cRNA. Die fragmentierte cRNA wurde dann für die Hybridisierung mit den Genchips eingesetzt. Das anschließende Waschen und die Signalverstärkung der Biotin-Moleküle mit Streptavidin in Kombination mit IgG, biotinylierten αIgG-Antikörper und einem Streptavidin-Phycoerythrin erfolgte weitgehend automatisiert. Die Fluoreszenz des Phycoerythrins wurde mit einem speziellen Scanner detektiert und die Signale wurde computergestützt ausgewertet.

Genchips von Affymetrix tragen pro Gen bzw. EST ein so genanntes Probenset, das aus 16 verschiedenen Probenpaaren besteht, die sich aus je einer „Perfect Match“ (PM)- und einer „Mismatch“ (MM)-Probenzelle zusammensetzen (Abb. 7). Jede „Perfect Match“-Probenzelle trägt 10^7 Kopien eines 25mer Oligonukleotids, das homolog zu dem 3´-Bereich der mRNA-Referenzsequenz des

betreffenden Gens ist. Die „Mismatch“-Probenzelle ist dadurch charakterisiert, dass sie die gleiche Sequenz trägt wie die PM-Probenzellen, jedoch mit einem singulären Basenaustausch in der Mitte der Sequenz. Dies dient der Bestimmung von unspezifischen Hybridisierungen innerhalb des Probensets. Aufgrund der Signalintensitäten der PM- und MM-Probenzellen jedes Probenpaars wird bestimmt, ob ein Transkript als „present“ gewertet wird, d.h. ob das Signal spezifisch ist und somit das Gen als exprimiert definiert werden kann. Als Basis für die Höhe des Expressionslevels wird die Differenz zwischen PM- und MM-Probenzellen benutzt. Der so genannte „Signal“-Wert ist dann das gewichtete Mittel dieser Differenzen.

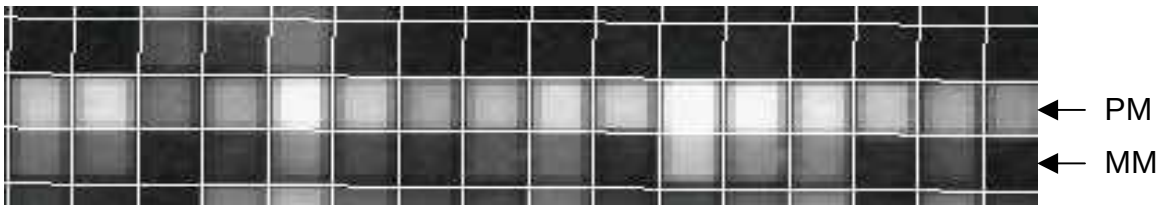


Abb. 9 Affymetrix HU95 A Genchip nach Hybridisierung mit biotinmarkierter cRNA. Dargestellt ist ein Probenset aus einem Hybridisierungsexperiment in P493-6 Zellen nach 8h Myc-Aktivierung in der DAT-Datei. Die stärkere Hybridisierung der „Perfect Match“-Probenzellen (PM) gegenüber den entsprechenden „Mismatch“-Probenzellen (MM) ist deutlich sichtbar. Das Transkript, das durch dieses Probenset mit seinen 16 Probenpaaren charakterisiert ist, wurde aufgrund der Unterschiede zwischen PM- und MM-Probenzellen als „present“ gewertet.

Vergleicht man die „Signal“-Werte eines Gens auf verschiedenen Chips, die mit cRNA aus Kontrollzellen (Kontroll-Chip) bzw. mit cRNA aus induzierten Zellen (Experiment-Chip) hybridisiert wurden, kann man über die Regulation dieses Gens eine Aussage machen. Zuvor erfolgt noch eine Normalisierung beider Chips, um Unterschiede in der Signalstärke, die aus Probenmarkierung, Hybridisierungseffekte und anderen Faktoren resultieren, zu korrigieren. Die lineare Normalisierung und die weitere Analyse der hier untersuchten Chips erfolgte zunächst mit dem Programm „Microarray Suite 5“ von Affymetrix.

4.1.1 Expressionsprofile von P493-6 Zellen

Die hier durchgeführte genomweite Analyse von Myc-Zielgenen in P493-6 Zellen stellt die Erweiterung eines zuvor durchgeführten Screens dar, bei dem ca. 6800 bekannte Gene mit der Affymetrix Chip-Technologie untersucht wurden

(Schuhmacher et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde der Screen nicht nur auf das gesamte menschliche Genom ausgeweitet, sondern es sollte auch der Einfluss von Serum auf die Myc-induzierte Gen-Expression untersucht werden. Wie schon oben beschrieben, erfolgt die Proliferation von P493-6 Zellen nur, wenn Myc in Anwesenheit von FKS exprimiert wird. Wird Myc dagegen in Abwesenheit von FKS aktiviert, induziert es Wachstum der Zellen, ohne die Zellteilung zu aktivieren (Schuhmacher et al., 1999). Kann die Induktion von Wachstum bzw. Proliferation durch Myc in P493-6 Zellen mit der Expression bestimmter Zielgene von Myc korreliert werden? Um diese Frage zu untersuchen, wurde das Genexpressions-muster in P493-6 Zellen in An- bzw. Abwesenheit von FKS untersucht.

4.1.1.1 Myc-Zielgene in Abhängigkeit von Serum

Für diesen Versuch wurden P493-6 Zellen 72h in Anwesenheit von Tet (ohne Myc) arretiert. Das Myc-Protein hat eine Halbwertszeit von ca. 30 min und ist 72h nach Repression des Gens nicht mehr im Western-Blot nachweisbar (Schuhmacher et al., 1999). Die Zellen wurden anschließend 3x mit PBS, das 10% FKS enthielt, gewaschen. Damit wurde das Tet vollständig entfernt und die Expression von *myc* induziert. Anschließend wurden sie in frischem Medium mit 10% FKS ohne Tet aufgenommen und nach 8h *myc*-Induktion für die RNA-Isolierung lysiert. Kontrollzellen wurden genauso behandelt, mit dem Unterschied, dass während der Waschschritte und der Induktionszeit Tet im PBS bzw. Medium enthalten war und somit die *myc*-Expression unterdrückt wurde. Die erfolgreiche *myc*-Aktivierung wurde durch eine Northern-Blot-Analyse kontrolliert (Abb. 10).

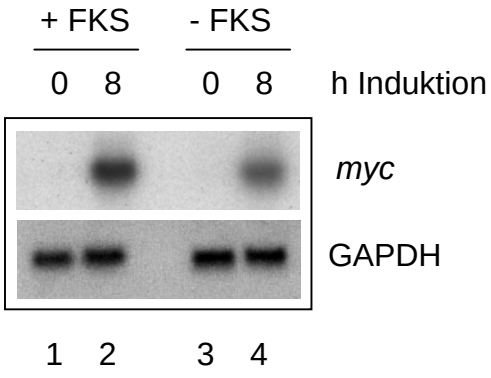
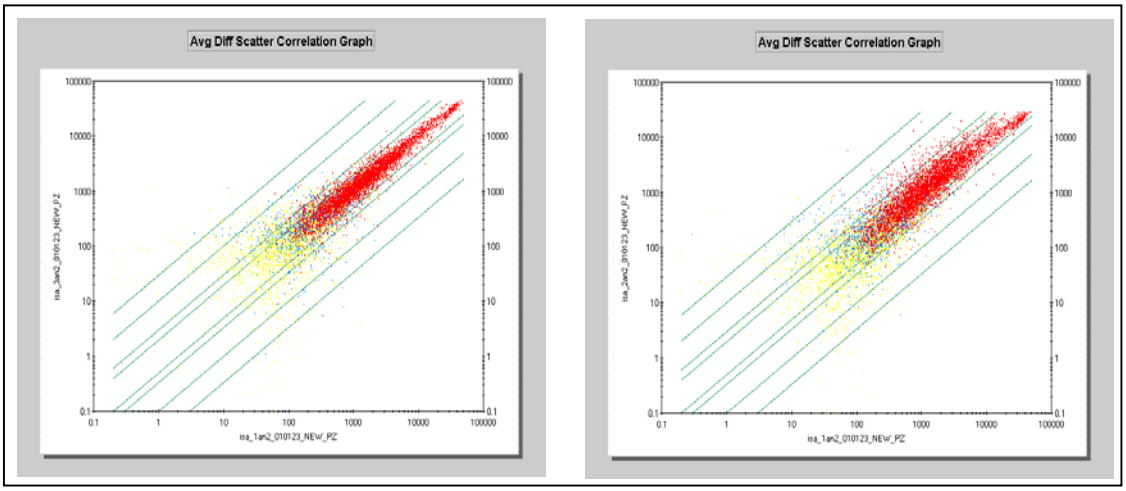


Abb. 10 Northern-Analyse der *myc*-mRNA in P493-6 Zellen 8h nach *myc*-Induktion in An- und Abwesenheit von Serum (FKS). Der Blot wurde mit einer Sonde für *myc* und als Ladungskontrolle für GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) hybridisiert. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis der verschiedenen Replikate.

Der Zeitpunkt 8h nach *myc*-Induktion wurde aufgrund vorheriger Ergebnisse gewählt, die zeigten, dass 4h nach *myc*-Aktivierung nur eine sehr geringe Anzahl von Zielgenen in P493-6 Zellen identifiziert werden konnte (Schuhmacher et al., 2001). Es wurden drei unabhängige Experimente jeweils mit dem kompletten Chipsatz HU95 A-E durchgeführt. Dieser Satz besteht aus 5 Genchips, bei dem der A-Chip Probensets von ca. 12 000 bekannten Genen trägt, während die so genannten EST-Chips (Chips B-E) durch insgesamt ca. 50 000 EST-Proben charakterisiert sind.

Für die Identifikation von Myc-regulierten Genen wurden die „Signal“-Werte aller Kontroll- und Experiment-Chips analysiert. Die „Signal“-Werte von Genchips desselben Typs (z.B. alle A-Chips) wurden bezüglich ihrer Expressionshöhe normalisiert und für die paarweise Vergleichsanalyse verwendet. Dabei wurden die „Signal“-werte jedes einzeln Gens auf allen drei Kontroll-Chips (-Myc) mit den Werten aller drei Experiment-Chips (+Myc) verglichen. Folgende Kriterien wurden in der Vergleichsanalyse angewandt, um induzierte bzw. reprimierte Gene zu definieren: Ein induziertes Gen musste auf jedem Experiment-Chip als „present“ gewertet werden, wobei es auf den Kontroll-Chips „absent“ oder „present“ sein konnte und es musste in allen Vergleichsanalysen einen „Change Call“ „Increase“ haben. Ein reprimiertes Gen musste auf jedem Kontroll-Chip als „present“ gewertet werden und konnte entweder „absent“ oder „present“ auf den Experiment-Chips sein. In allen Vergleichsanalysen musste das Gen einen „Decrease Call“ haben. Die Höhe der Veränderung des Signals (Ratio) wurde als Mittelwert aus allen möglichen Vergleichen berechnet. Da der p-Wert des „Change Calls“ mit 0,998 für induzierte Gene bzw. 0,002 (1-0,998) für reprimierte Gene eine extrem hohe statistische Signifikanz aufweist, wurden Gene, deren Ratio nur sehr gering war, auch als reguliert erkannt.

Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Datensätze jedes Chips wurde durch eine so genannte Scatter-Analyse überprüft. Dabei werden alle „Signal“-Werte eines Chips (z.B. eines Kontroll-Chips) gegen die entsprechenden „Signal“-Werte eines Replikats aufgetragen (Abb. 11). Je enger die Korrelation dieser Punkte auf einer Geraden ist, desto besser ist die Reproduzierbarkeit der Daten. Zum Vergleich ist ein Scatter-Plot von einem Kontroll-Chip und einem Experiment-Chip gezeigt. Hier beschreibt die Streuung der Datenwolke die unterschiedlich exprimierten Gene.



A Kontrolle gegen Kontrolle **B** Kontrolle gegen Experiment

Abb. 11 Scatter-Analyse in P493-6 Zellen. Die „Signal"-Werte der einzelnen Gene aus einer Kontrolle (x-Achse) werden in einem Koordinatensystem gegen die Werte einer anderen Kontrolle bzw. eines Experiments (y-Achse) aufgetragen. (A) Liegt die Datenwolke relativ eng auf einer Geraden mit der Steigung 1, dann korrelieren die beiden Datensätze sehr gut miteinander, d.h. die durchgeführten Kontrollen sind reproduzierbar. (B) Der Scatter-Plot von Kontrolle und Experiment zeigt eine sehr viel breitere Streuung der Datenwolke. Alle Punkte, die über einen bestimmten Grenzwert liegen (grüne Geraden) werden dann als reguliert beschrieben.

Nach Normalisierung und Vergleichsanalyse ergaben sich für den A-Chip folgende Resultate: 471 Gene wurden nach 8h *myc*-Induktion in P493-6 Zellen induziert, 224 davon um mindestens den Faktor 2 (Tabelle 1). Weiterhin wurden 60 Gene identifiziert, deren Expression nach *myc*-Aktivierung reprimiert wurde, 25 dieser Genen waren mindestens 2-fach reprimiert (Tabelle 2). Der Übersicht wegen wurden in Tabelle 1 und 2 nur induzierte bzw. reprimierte Gene des A-Chips aufgelistet, die um mindestens den Faktor 2 reguliert wurden. In P493-6 Zellen wurden mit dem gesamten Chipsatz 1067 induzierte und 137 reprimierte Gene nach 8h *myc*-Induktion identifiziert. Die Ergebnisse für die EST-Chips (Chips B-E) und eine genaue Beschreibung und Klassifizierung aller identifizierten Gene befinden sich im Anhang.

Der oben beschriebene Versuch wurde unter Serumentzug wiederholt, um zu untersuchen, welche Gene auch in Abwesenheit von Serum durch Myc reguliert werden. Da Myc P493-6 Zellen in serumfreien Medium nicht in den Zyklus treiben kann, sondern nur Zellwachstum induziert, wurde hier ein verändertes Expressionsmuster erwartet. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Auch hier wurde die Induktion der *myc*-mRNA in der Northern-Blot-

Analyse bestätigt (Abb. 10). Aufgrund von Materialbeschränkungen wurde in diesem Versuch nur der Chip A und B des HU95 Chipsatzes benutzt.

Nach Durchführung der Normalisierung und der Vergleichsanalysen aller Kontroll-Chips mit allen Experiment-Chips (s. oben) wurden 356 Gene des A-Chips gefunden, die nach 8h *myc-Induktion* in serumfreien Medium induziert wurden, 62 Gene wurden 2-fach oder stärker induziert. Bei diesem Versuch wurden 125 Gene des A-Chips als reprimiert identifiziert, nur 11 davon waren mindestens 2-fach reprimiert. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 1 und 2, jeweils in der Spalte „Ratio ohne FKS“ dargestellt. Die 315 induzierten Gene und 67 reprimierten Gene des B-Chips sind im Anhang aufgelistet.

In den Tabellen 1 und 2 sind die identifizierten Gene in folgende Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 enthält Gene, die unabhängig von FKS durch Myc reguliert werden, Gruppe 2 beschreibt Gene, die von Myc nur in Gegenwart von FKS reguliert werden und Gruppe 3 enthält Gene, die von Myc nur in Abwesenheit von FKS reguliert werden.

Tabelle 1: Induzierte Gene in P493-6 Zellen

Accession Nr	Gen	Ratio mit FKS	Ratio ohne FKS
	Gruppe 1		
V00568	c-myc	23,21	13,64
V00568	c-myc	23,21	13,98
	Proto-Oncogene c-Myc	12,13	11,35
L31801	solute carrier family 16	8,96	4,11
X53793	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	8,35	5,96
U00238	phosphoribosyl amidotransferase	8,3	6,59
D21262	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	6,53	4,01
U63824	TEA domain family member 4	6,36	1,91
L29254	sorbitol dehydrogenase	6,13	5,67
AF038660	betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase	5,72	5,16
D90239	glycine dehydrogenase	5,69	1,78
AL038662	NM23A	5,31	5,15
D80001	KIAA0179 protein	5,24	3,56
X17620	NM23A	5,22	5,3
AB014564	KIAA0664 protein	5,09	2,56
D50914	block of proliferation 1	5	3,28
D49490	protein disulfide isomerase	4,98	5,86
X73066	NM23-H1	4,92	4,87
U25182	peroxiredoxin 4	4,66	2,93
AL050021	cDNA DKFZp564D016	4,64	2,52
AC002073	PAC clone DJ515N1	4,62	1,96
D00723	glycine cleavage system protein H	4,57	5,13
D25218	RRS1 ribosome biogenesis regulator	4,57	4,3
AI553745	hypothetical protein HSPC111	4,55	3,5

Tabelle 1: Induzierte Gene in P493-6 Zellen (Fortsetzung)

Accession Nr	Gen	Ratio mit FKS	Ratio ohne FKS
M64231	spermidine synthase	4,5	3,25
U41387	DEAD/H box polypeptide 21	4,4	2,94
X15306	neurofilament, heavy polypeptide	4,05	3,79
Y10805	methyltransferase-like 2	4,02	2,66
D31887	KIAA0062 protein	4	2,9
L35035	ribose 5-phosphate isomerase A	3,97	3,46
AA926957	hypothetical protein FLJ10534	3,92	3,01
U59435	proliferation-associated 2G4	3,9	3,14
Z97074	Rab9 effector p40	3,83	4,08
AF043250	translocase of outer mitochondrial membrane	3,77	1,85
U28042	DEAD/H box polypeptide 10	3,76	2,6
AJ006291	Down syndrome critical region gene 2	3,74	4,49
AB002359	phosphoribosylformylglycinamidine synthase	3,66	3,46
AF008442	RNA polymerase I subunit	3,66	2,94
M24069	cold shock domain protein A	3,66	1,83
U12595	heat shock protein 75	3,63	3,07
AL049943	DKFZP564F0522 protein	3,56	2,88
AJ002309	synaptogyrin 3	3,56	2,21
U59151	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	3,53	2,98
D29958	KIAA0116 protein	3,52	3,45
AB018330	calcium/calmodulin-dependent protein kinase	3,51	3,49
M80244	solute carrier family 7	3,48	2,16
AB011167	KIAA0595 protein	3,45	5,99
L48692	putatative 28 kDa protein	3,43	3,15
U09564	SFRS protein kinase 1	3,41	2,94
AF059531	protein arginine N-methyltransferase 3	3,41	3,43
AL079283	cDNA clone EUROIMAGE 39515.	3,38	1,83
X79865	mitochondrial ribosomal protein L12	3,34	6,66
Y12065	nucleolar protein hNop56	3,32	3,51
U86602	nucleolar protein p40	3,28	3,4
X06323	mitochondrial ribosomal protein L3	3,27	2,36
D13645	minor histocompatibility antigen HA-8	3,18	2,98
L36529	THO complex 1	3,17	1,81
AF039022	exportin	3,16	2,63
S73885	transcription factor AP-4	3,15	2,5
D38076	RAN binding protein 1	3,15	3,06
D26488	KIAA0007 protein	3,08	3,05
Z22555	scavenger receptor class B	3,07	1,77
W28186	lysosomal associated protein	3,04	2,49
U29185	prion protein (p27-30)	3,03	2,46
M69039	q subcomponent binding protein	3	2,3
U24169	JTV1 gene	3	2,42
U24183	phosphofructokinase, muscle	2,99	1,87
L18960	eukaryotic translation initiation factor 1A	2,99	1,98
U51478	ATPase, Na+/K+ transporting	2,97	2,34
X17644	G1 to S phase transition 1	2,96	2,76
D00265	cytochrome c, somatic	2,95	2,22
Y08890	karyopherin (importin) beta 3	2,94	2,45

Tabelle 1: Induzierte Gene in P493-6 Zellen (Fortsetzung)

Accession Nr	Gen	Ratio mit FKS	Ratio ohne FKS
AI912041	heat shock protein 1 (chaperonin 10)	2,92	2,38
AF098799	importin 7	2,9	3,08
W63793	S-adenosylmethionine decarboxylase 1	2,9	2,4
D82348	ATIC	2,9	2,05
AI816034	nucleolar protein family A	2,89	2,9
AF054186	eukaryotic translation elongation factor 1	2,86	2,41
X16396	methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	2,81	2,35
M22382	heat shock 60kDa protein 1	2,77	2,68
AL050287	BCL2-associated athanogene 2	2,74	1,73
Y09008	uracil-DNA glycosylase	2,73	2,66
AI582831	zinc finger protein	2,72	3,26
AJ005892	FtsJ homolog 1 (E. coli)	2,72	1,61
M64497	nuclear receptor subfamily 2	2,69	2,56
AI653621	thioredoxin	2,67	2,05
AF049460	deformed epidermal autoregulatory factor	2,65	1,99
AF038186	hypothetical protein MGC4276	2,64	2,39
L18960	eukaryotic translation initiation factor 1A	2,64	1,81
AB015633	transmembrane protein 5	2,63	2,1
U78310	pescadillo	2,62	2,31
J04031	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	2,61	2,16
X55504	nucleolar protein 1, 120kDa	2,59	2,96
M21154	S-adenosylmethionine decarboxylase 1	2,56	2,13
AB018274	ortholog of mouse la related protein	2,53	1,82
AB002299	MDN1, midasin homolog	2,52	2,87
U21090	polymerase delta 2, regulatory subunit	2,49	2,51
U19765	zinc finger protein 9	2,49	1,72
X75252	prostatic binding protein	2,49	1,83
Z35491	BCL2-associated athanogene	2,49	1,91
AF037448	NS1-associated protein 1	2,48	2,31
U18321	death associated protein 3	2,45	1,41
U43747	Friedreich ataxia	2,43	2,48
AF026166	TCP-1 beta subunit	2,43	2,07
D32257	general transcription factor IIIA	2,42	1,74
D43950	chaperonin containing TCP1	2,39	1,78
U37022	cyclin-dependent kinase 4	2,38	2,12
X96401	MAX binding protein	2,37	2,28
AL050306	hypothetical protein FLJ12525	2,37	1,89
AC003038	hypothetical gene MGC19595	2,37	1,89
AI140114	CGI-48 protein	2,36	1,75
D25328	phosphofructokinase, platelet	2,35	2,72
X74801	TCP1, subunit 3	2,34	1,91
D13641	translocase of outer mitochondrial membrane 20	2,33	1,71
AI130910	translocase of outer mitochondrial membrane 34	2,33	1,8
X02152	lactate dehydrogenase A	2,31	2,61
M88279	FK506 binding protein 4	2,3	1,61
D42084	methionyl aminopeptidase 1	2,29	2,07
AL008583	chromobox homolog 6	2,29	1,94
AF054996	PROTEIN ZK795.3	2,28	1,92

Tabelle 1: Induzierte Gene in P493-6 Zellen (Fortsetzung)

Accession Nr	Gen	Ratio mit FKS	Ratio ohne FKS
L19183	hypothetical protein MAC30	2,27	2,53
AF017789	transcription elongation regulator	2,27	1,81
AB018262	translocase of outer mitochondrial membrane 70	2,27	1,75
U35113	metastasis associated 1	2,27	1,69
AL050205	c-Mpl binding protein	2,27	1,98
L06132	voltage-dependent anion channel 1	2,26	2,48
L24521	hepatoma-derived growth factor	2,26	1,78
AF032456	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2	2,23	1,7
X69804	Sjogren syndrome antigen B	2,22	2,28
W27666	myc-induced nuclear antigen	2,22	1,72
U37689	RNA polymerase II polypeptide H	2,21	2,15
U54645	adenylate kinase 2	2,21	2,17
AB019408	nuclear distribution gene C homolog	2,21	1,54
M60858	nucleolin	2,2	2,36
U31814	histone deacetylase 2	2,2	1,54
U35113	metastasis associated 1	2,19	1,64
U78525	eukaryotic translation initiation factor 3	2,17	2,17
X16277	ornithine decarboxylase 1	2,17	2,39
W27152	hypothetical protein FLJ10569	2,17	1,78
AA310786	hypothetical protein MGC5178	2,17	1,8
L41887	splicing factor, arginine/serine-rich 7	2,16	2,11
AA746355	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3	2,16	2,02
AB028969	KIAA1046 protein	2,16	2,1
X75755	splicing factor, arginine/serine-rich 2	2,16	1,71
Y15227	deleted in lymphocytic leukemia, 1	2,15	1,69
X81625	eukaryotic translation termination factor 1	2,14	1,84
AJ002428	VDAC1 pseudogene	2,12	2,11
AL022316	CGI-96 protein	2,12	2,33
Z83840	NHP2 non-histone chromosome protein	2,1	1,87
AL050282	like mouse brain protein E46	2,1	1,77
AB024301	RuvB-like 2 (E. coli)	2,1	1,63
X85116	Stomatin	2,09	2,21
AB020713	nucleoporin 210	2,08	2,17
J05272	inosine monophosphate dehydrogenase 1	2,08	1,79
AB002330	U2-associated SR140 protein	2,08	1,87
Y18418	RuvB-like 1	2,08	1,77
AJ006591	nucleolar cysteine-rich protein	2,08	1,69
AJ007398	DKFZP564M182 protein	2,07	1,79
AJ001340	U3 snoRNP-associated 55-kDa protein	2,07	1,6
AF038182	clone 23860 sequence	2,06	1,69
AB002345	period homolog 2 (Drosophila)	2,04	2,11
AL031228	chromosome 6 open reading frame 11	2,04	1,82
AI032612	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	2,04	1,9
U80017	survival of motor neuron 1	2,03	1,57
AW024285	hypothetical protein FLJ12443	2,03	1,55
Y18314	AFG3 ATPase family gene 3-like 2	2,03	1,53
D13627	TCP1, subunit 8 (theta)	2,03	1,55
AL050073	cDNA DKFZp566E2346	2,03	1,9

Tabelle 1: Induzierte Gene in P493-6 Zellen (Fortsetzung)

Accession Nr	Gen	Ratio mit FKS	Ratio ohne FKS
AL109672	integral type I protein	2,03	1,64
AL080119	PAI-1 mRNA-binding protein	2,02	2,07
L05425	nucleolar GTPase	2,02	1,57
U49844	ataxia telangiectasia and Rad3 related	2,02	1,71
X79536	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	2,02	1,59
L12711	Transketolase	2,02	1,66
AF041474	BAF53	2,02	1,73
	Ras-Like Protein Tc4	2,01	2,24
U81554	signal recognition particle	2,01	1,68
X52882	t-complex 1	2,01	1,65
	Ras-Like Protein Tc4	2	2,33
L15189	heat shock protein 9B (mortalin-2)	2	1,9

	Gruppe 2		
AB014590	KIAA0690 protein	17,33	k.V.
X89602	rTS beta protein	10,97	k.V.
J03798	small nuclear ribonucleoprotein D1	5,84	k.V.
S75168	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	5,66	k.V.
U95006	hypothetical protein MGC14480	4,76	k.V.
X97335	A kinase anchor protein 1	4,43	k.V.
M94065	dihydroorotate dehydrogenase	4,42	k.V.
U29344	fatty acid synthase	4,37	k.V.
M77836	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	3,83	k.V.
U79274	protein predicted by clone 23733	3,63	k.V.
U04953	isoleucine-tRNA synthetase	3,07	k.V.
AB028974	paternally expressed 10	2,94	k.V.
U41060	LIV-1 protein, estrogen regulated	2,88	k.V.
U63825	hepatitis delta antigen-interacting protein A	2,85	k.V.
D80007	programmed cell death 11	2,79	k.V.
AB007938	KIAA0469 gene product	2,73	k.V.
X60673	adenylate kinase 3	2,69	k.V.
D42073	reticulocalbin 1	2,64	k.V.
L07648	MAX interacting protein 1	2,62	k.V.
X00737	nucleoside phosphorylase	2,61	k.V.
AF030555	fatty-acid-Coenzyme A ligase	2,41	k.V.
W28948	cDNA YH77E09	2,37	k.V.
AB028069	activator of S phase kinase	2,35	k.V.
U10860	guanine monphosphate synthetase	2,28	k.V.
AL080150	gem associated protein 4	2,26	k.V.
AJ000186	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	2,25	k.V.
AF040965	chromosome 4 open reading frame 9	2,25	k.V.
U88153	proline/glutamic acid rich nuclear protein	2,23	k.V.
AF069765	signal recognition particle	2,22	k.V.
Y11681	mitochondrial ribosomal protein S12	2,20	k.V.
D80012	ubiquitin specific protease 10	2,17	k.V.
X79888	enoyl-Coenzyme A hydratase	2,16	k.V.
U38847	TAR (HIV) RNA binding protein 1	2,16	k.V.
M14630	prothymosin, alpha	2,16	k.V.

Tabelle 1: Induzierte Gene in P493-6 Zellen (Fortsetzung)

Accession Nr	Gen	Ratio mit FKS	Ratio ohne FKS
L07648	MAX interacting protein 1	2,16	k.V.
AB012130	solute carrier family 4 member 7	2,13	k.V.
M62810	transcription factor A, mitochondrial	2,12	k.V.
M15353	eukaryotic translation initiation factor 4E	2,11	k.V.
M69023	tetraspan 3	2,05	k.V.
U07681	isocitrate dehydrogenase 3	2,03	k.V.
Z24724	hypothetical protein FLJ20986	2,03	k.V.
AC004940	TWIST neighbor	2,03	k.V.
AA149428	nuclear cap binding protein subunit 2	2,01	k.V.
U29175	SWI/SNF related	2,00	k.V.
	Gruppe 3		
M37712	cell division cycle 2-like 2	k.V.	11,42
AF081280	nucleoplasmin, 3	k.V.	4,95
X52142	CTP synthase	k.V.	4,18
AL049382	cDNA DKFZp586K1318	k.V.	2,77
AB014460	nth endonuclease III-like	k.V.	2,67
U79528	type I sigma receptor	k.V.	2,20
M94856	Fatty acid binding protein	k.V.	2,10

Tabelle 1 Induzierte Gene des HU95 A-Chips nach 8h *myc*-Induktion in P493-6 Zellen. Ratio mit FKS: x-fache Höhe der Induktion in Anwesenheit von FKS, Ratio ohne FKS: x-fache Höhe der Induktion in Abwesenheit von FKS. Gelb markierte Gene (179 Gene, Gruppe 1) werden sowohl mit als auch ohne FKS von Myc induziert, grün markierte Gene (45 Gene, Gruppe 2) werden nur unter FKS von Myc induziert und rosa markierte Gene (7 Gene, Gruppe 3) werden nur nach *myc*-Induktion in Abwesenheit von FKS induziert (k.V. = keine detektierbare Veränderung, d.h. das Gen wird entweder auf Kontroll- und Experimentchip gleich hoch exprimiert oder auf beiden Chips überhaupt nicht). Einige Gene sind mit derselben Accession-Nummer mehrmals in den Listen beschrieben. In diesem Fall befinden sich unterschiedliche Probensets desselben Gens auf dem Chip.

Insgesamt wurden von den in Anwesenheit von Serum induzierten 471 Genen 283 Gene durch Myc auch in Abwesenheit von Serum induziert. Bei den 125 reprimierten Genen, die in Abwesenheit von Serum identifiziert wurden, werden 15 auch durch Myc und Serum reprimiert (Abb. 12).

Tabelle 1 enthält insgesamt 231 Gene. Davon sind 179 Gene in Gruppe 1, 45 Gene in Gruppe 2 und 7 Gene in Gruppe 3. Die Induktionsraten aller Gene reichen von maximal 23-fach bis minimal 1,4-fach in beiden Versuchen (s. auch Anhang), wobei die 23-fache Induktion für das konditionale Myc gemessen wurde. Die höchste Induktion eines Zielgens in Abwesenheit von FKS war 11,5-fach, in Gegenwart von FKS ca. 17-fach. Folglich ist eine hohe Induktion der Genexpression durch Myc auch in Abwesenheit von Serum möglich. Insgesamt gesehen werden die induzierten Gene in Anwesenheit von FKS jedoch höher exprimiert als ohne FKS.

Es stellte sich die Frage, ob die geringere Expressionshöhe eine Folge von fehlenden Ko-Faktoren aus dem Serum ist, oder durch das niedrigere Expressionsniveau von *myc* in Abwesenheit von Serum bedingt wird. Der A-Chip trägt drei Probensets für *myc* (Gruppe 1), die alle in beiden Versuchen als sehr hoch reguliert identifiziert wurden (12- bis 23-fach). Vergleicht man diese Induktionsraten in den beiden Versuchen, so fällt auf, dass die *myc*-Induktion unter Serum höher ausfällt als in Abwesenheit von Serum. Anscheinend unterstützen Faktoren im Serum die Expression des Transgens oder das Serum reprimiert inhibierenden Faktoren für die *myc*-Aktivierung. Dieser Unterschied wird auch sichtbar, wenn man die Expression der *myc*-mRNA im Northern-Blot analysiert (Abb. 10). Die drei Probensets für *myc* auf dem Chip dienten neben dem Northern-Blot als weitere Kontrolle für die erfolgreiche *myc* Aktivierung in P493-6 Zellen.

Neben *myc* sind auch andere Gene durch mehrere Probensets auf dem Chip repräsentiert (z.B. Ras-like Protein Tc4), was auf eine gewisse Redundanz des Chips hinweist. Um ein vollständiges Ergebnis zu gewährleisten werden aber alle Probensets dargestellt, auch wenn diese dasselbe Gen repräsentieren.

Es ist bekannt, dass Myc ein relativ schwacher transkriptioneller Aktivator ist (Henriksson und Luscher, 1996). Auch in P493-6 Zellen sind die meisten Gene, unabhängig von FKS, nur um den Faktor 2-5 oder weniger reguliert. Viele Gene in Tabelle 1 sind schon vorher als Myc-Zielgene identifiziert worden oder wurden im Laufe dieser Arbeit auch durch andere Genchip-Versuche beschrieben z.B. Nm23A, Spermidin-Synthase, Nucleolin, ODC, Lactat-Dehydrogenase-A, Cdk4, alpha-Prothymosin und andere (www.myccancergene.org). Folglich konnten mit dem P493-6 Zellsystem bekannte Gene bestätigt und potentiell neue Myc-Zielgene identifiziert werden.

Ein bekanntes Myc-Zielgen, das in Gruppe 1 durch drei verschiedene Probensets repräsentiert wird, ist Nm23. Die Induktion dieses Gens durch Myc ist in beiden Versuchen nahezu gleich (Ratio mit FKS bzw. ohne: 5,31 und 5,15; 5,22 und 5,30; 4,92 und 4,87). Dieses Gen, das für eine Nukleotiddiphosphatkinase kodiert, bietet ein gutes Beispiel dafür, dass die Höhe der Myc-induzierten Expression unabhängig von FKS erfolgen kann. Generell sind die Induktionsraten in Gruppe 1 ohne FKS jedoch geringer als mit FKS. Ein Beispiel dafür ist das Gen „solute carrier family 16“, das mit FKS fast 9-fach und ohne FKS nur ca. 4-fach durch Myc induziert wird.

In Gruppe 1 werden nur Gene dargestellt, deren Induktion in Gegenwart von FKS mindestens 2-fach war. Gene, die geringer als der Faktor 2 induziert wurden, sind im Anhang dargestellt. Die allgemeine Verwendung des Schwellenwerts 2 als minimale Induktions- bzw. Repressionsrate in anderen Genchip-Analysen führte häufig zu einer willkürlichen Bestimmung der regulierten Gene. Die Auswahl des Faktors 2 ist biologisch nicht begründbar, da auch die 1,5- oder 1,8-fache Änderung der Genexpression eine wichtige Bedeutung haben kann. In dieser Arbeit wurde deswegen der Schwellenwert 2 nur zur übersichtlicheren Darstellung definiert.

Die Induktion der Gene in Gruppe 2 erfolgte nur, wenn Myc in Anwesenheit von FKS aktiviert wurde. In Abwesenheit von FKS konnte nach *Myc*-Induktion entweder keine Expression oder keine Induktion des Gens beschrieben werden (k.V. = keine detektierbare Veränderung). Die Induktionsraten der Gene KIAA0690 und rTS beta in dieser Gruppe sind annähernd so hoch wie die der drei Myc Proben (ca. 17- und 11-fach). Das Genprodukt, für das das Gen KIAA0690 kodiert, ist noch nicht identifiziert worden. Für das Gen rTS beta wurde nach Selektion für 5-Fluorouracil Resistenz in einer Kolonkarzinom-Zelllinie eine sehr starke Induktion beschrieben (Dolnick und Black, 1996).

Auch in Gruppe 3 wird ein Gen vergleichbar hoch wie Myc induziert. Es ist das Gen cell division cycle 2-like 2 (Ratio: 11,42), das auch Protein Kinase p58 genannt wird und für einen möglichen Tumorsuppressor kodiert. Die anderen sechs Gene dieser Gruppe Nucleoplasmin 3, CTP-Synthase, cDNA DKFZp586K1318, Nth-Endonuclease III-like, Typ I Sigma-Rezeptor und Fatty acid binding Protein werden 2-5-fach durch Myc in Abwesenheit von Serum induziert. Die Induktionswerte dieser Gene bestätigen, dass Myc auch in Abwesenheit von FKS zu relativ hoher Aktivierung von Genen führen kann.

Bei der Analyse der Genchip-Experimente wurden in P493-6 Zellen auch Gene identifiziert, die durch Myc negativ reguliert werden. In Tabelle 2 sind die 25 Gene dargestellt, deren Expression nach 8h *myc*-Induktion in Anwesenheit von FKS in den P493-6 Zellen mindestens zweifach reprimiert wurde. Insgesamt wurden 60 Gene reprimiert. Die Farbmarkierung und die Gruppierung der Gene ist analog zu Tabelle 1. Zusätzlich sind für diese Gene auch die Repressionsraten aus dem Serumentzugs-Versuch dargestellt. Bei diesem Versuch wurden insgesamt 125 Gene negativ reguliert, nur 11 davon um mindestens den Faktor 2. Dieser Anteil ist mit ca. 10% der Gene sehr gering. Es scheint, als ob Serum die Höhe der Myc-

vermittelte Repression moduliert bzw. dass ohne Serum eine ganz andere und größere Menge von Genen durch Myc reprimiert wird.

Tabelle 2: Reprimierte Gene in P493-6 Zellen

Accession Nr	Gen	Ratio mit FKS	Ratio ohne FKS
	Gruppe 1		
Z48541	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	0,34	0,52
M97935	transcription factor ISGF-3	0,35	0,62
Y00638	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	0,39	0,51
Z35102	serine/threonine kinase 38	0,40	0,70
M35416	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B	0,41	0,57
Y00638	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	0,42	0,47
L42324	G protein-coupled receptor 18	0,43	0,38
L42324	G protein-coupled receptor 18	0,44	0,49
D29642	KIAA0053 gene product	0,45	0,45
U28964	tyrosine 3-monooxygenase	0,47	0,71
U63717	osteoclast stimulating factor 1	0,47	0,65
M16591	hemopoietic cell kinase	0,49	0,65
AJ010059	SHP2 interacting transmembrane adaptor	0,50	0,59
	Gruppe 2		
L49229	retinoblastoma 1	0,28	k.V.
Z48579	a disintegrin and metalloproteinase domain 10	0,32	k.V.
L07261	adducin 1 (alpha)	0,34	k.V.
W28170	W28170:43a12 cDNA	0,39	k.V.
M33684	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	0,40	k.V.
HG3236	Neurofibromatosis 2 Tumor Suppressor	0,41	k.V.
Y10659	interleukin 13 receptor, alpha 1	0,41	k.V.
S79325	synovial sarcoma translocation, chromosome 18	0,46	k.V.
Z82244	heme oxygenase (decycling) 1	0,46	k.V.
L22473	BCL2-associated X protein	0,48	k.V.
AB014545	KIAA0645 gene product	0,49	k.V.
AB023152	KIAA0935 protein	0,50	k.V.
	Gruppe 3		
L42324	G protein-coupled receptor 18	k.V.	0,38
M81750	myeloid cell nuclear differentiation antigen	k.V.	0,46
Y00638	protein tyrosine phosphatase, receptor type	k.V.	0,47
M20681	solute carrier family 2 member 3	k.V.	0,49
L42324	G protein-coupled receptor 18	k.V.	0,49
AL049471	Modulator recognition factor 2	k.V.	0,50

Tabelle 2 Reprimierte Gene des HU95 A-Chips nach 8h *myc*-Induktion in P493-6 Zellen. Ratio mit FKS: x-fache Höhe der Repression in Anwesenheit von FKS, Ratio ohne FKS: x-fache Höhe der Repression in Abwesenheit von FKS. Gelb markierte Gene (13 Gene, Gruppe 1) werden von Myc sowohl unter FKS als auch ohne FKS reprimiert, grün markierte Gene (12 Gene, Gruppe 2) werden nur in Anwesenheit von FKS reprimiert und rosa markierte Gene (6 Gene, Gruppe 3) werden nur nach *myc*-Induktion in Abwesenheit von FKS reprimiert (k.V. = keine detektierbare Veränderung).

Die geringe Anzahl der Gene in Tabelle 2 spiegelt die Tatsache wieder, dass Myc eher ein transkriptioneller Aktivator als ein Repressor ist. Am auffälligsten an dieser Tabelle ist die Repression des Retinoblastoma Tumorsuppressor-Gens (Rb), das nur in Anwesenheit von FKS stark reprimiert wurde (0,28fach). Dies korreliert mit einer transienten Abnahme des Rb-Proteins zwischen 4 und 12 h nach *myc*-Induktion in P493-6 Zellen im Vergleich zu proliferierenden Zellen (Pajic et al., 2000). Interessanterweise wird in Abwesenheit von FKS das Rb-Gen nicht reprimiert, obwohl es in ähnlicher Höhe exprimiert wird. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, warum die P493-6 Zellen in Abwesenheit von Serum nicht proliferieren.

3.1.1.2 Zusammenfassung der Genchip-Vergleichsanalysen in P493-6 Zellen

Das Genom der Zelllinie P493-6 wurde mit Hilfe von Affymetrix Genchips (HU95 Chips A-E) nach Myc-Zielgenen durchsucht. Dazu wurden zwei Versuche durchgeführt: Beim ersten Versuch wurde *myc* für 8h in Anwesenheit von 10% FKS induziert. Dabei wurden insgesamt 1067 Gene, 471 Gene des A-Chips und 696 Gene der EST-Chips (Chips B-E) induziert. 137 Gene, 60 Gene des A-Chips und 77 Gene der EST-Chips, wurden reprimiert.

Im zweiten Versuch, bei dem nur der A- und B-Chip verwendet wurde, erfolgte die Induktion von *myc* für 8h in Abwesenheit von Serum. Insgesamt wurden hier 670 Gene induziert, davon 356 Gene des A-Chips und 314 Gene des B-Chips. Reprimiert wurden 192 Gene, davon 125 Gene des A-Chips und 67 Gene des B-Chips. Die Ergebnisse aus beiden Versuchen sind für den A-Chip zusammen gefasst (Abb. 12). Auf eine graphische Darstellung der Ergebnisse der EST-Chips wurde verzichtet, da hier unterschiedliche Sub-Chips des HU95-Chipsets verwendet wurden. Eine Auflistung und Klassifizierung aller Gene befindet sich im Anhang. Die Ergebnisse der Genchip-Analysen wurden für mehrere Gene im Northern-Blot untersucht und konnten bestätigt werden (Abb. 16).

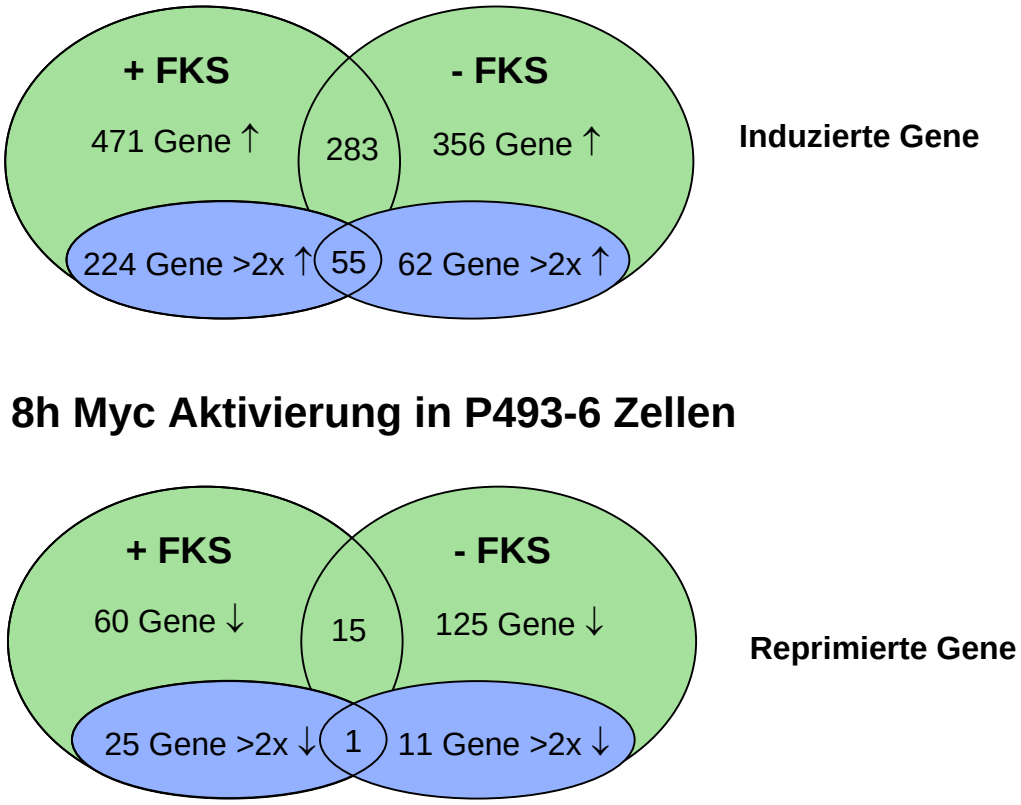


Abb. 12 Zusammenfassung der Ergebnisse für P493-6 Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse des A-Chips. Mindestens 2-fach regulierte Gene sind extra in den blauen Diagrammen dargestellt (↑ = induziert, ↓ = reprimiert).

Ein Aspekt der Analyse von Genchip-Daten ist die Bestimmung funktioneller Gruppen innerhalb der identifizierten Gene. Bei den in P493-6 Zellen induzierten Genen (Tabelle 1) konnten funktionell zusammen gehörende Gruppen von Genen identifiziert werden. Es gibt Genklassen, denen sich Gene aus allen drei Gruppen zuordnen lassen. Hierfür werden einige Beispiele gegeben: Fettstoffwechsel (z.B. Gruppe 1: prostatic binding protein, Gruppe 2: fatty acid synthase, fatty-acid-Coenzyme A ligase, enoyl-Coenzyme A hydratase, Gruppe 3: fatty acid binding protein); Zellzykluskontrolle (z.B. Gruppe 1: cdk4, G1 to S phase transition 1, Gruppe 2: α-prothymosin, activator of S phase, Gruppe 3: cell division cycle 2-like 2); Nukleotidstoffwechsel (z.B. Gruppe 1: Nm23-h1, phosphoribosyl amidotransferase, ribose-5-phosphate isomerase A, Gruppe 2: dihydroorotate dehydrogenase, adenylate kinase 3, Gruppe 3: CTP synthase).

Beispiele für weitere Genklassen, die aber nicht in allen Gruppen vertreten sind, sind: Transport, Protein-/Aminosäuresynthese, Transkription, Eisenstoff-

wechsel, Apoptose, Proteinfaltung und andere. So ist z.B. die funktionelle Gruppe, die an der Polyamin-Biosynthese beteiligt ist, nur in Gruppe 1 vertreten. Zu dieser Gruppe gehören die Gene Ornithin-Decarboxylase, S-Adenosylmethionin-Decarboxylase 1 und Spermidin-Synthase. Damit werden drei der vier an der Polyamin-Synthese beteiligten Enzyme durch Myc sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von FKS induziert (Abb. 13).

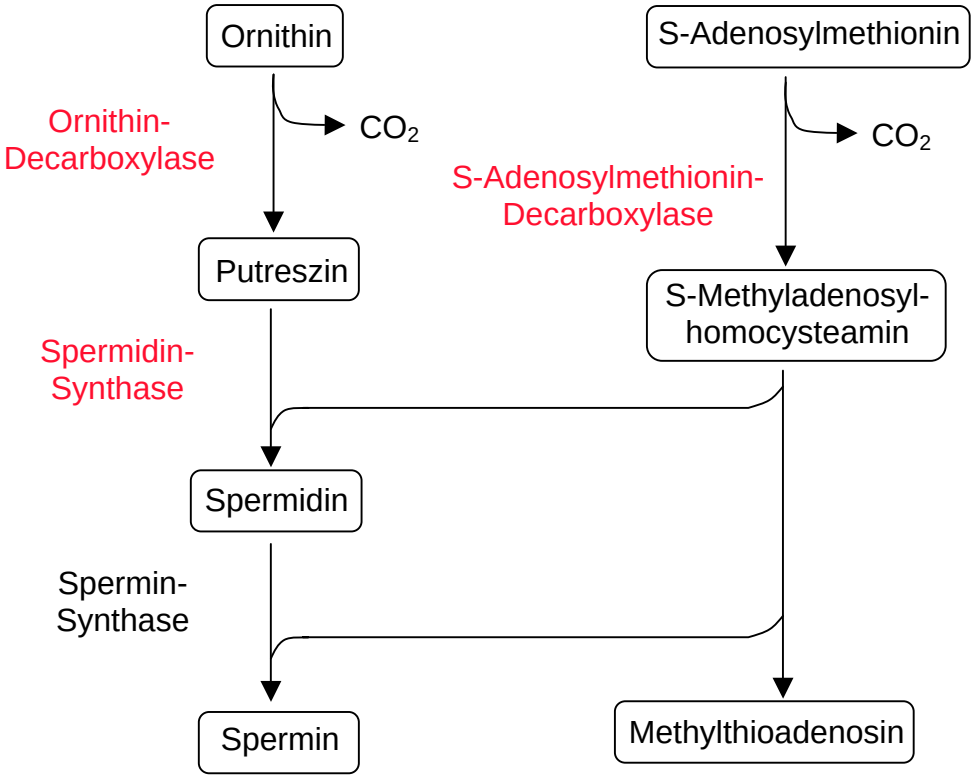


Abb. 13 Biosynthese natürlich vorkommender Polyamine. Die durch Myc induzierten Enzyme sind rot dargestellt.

Polyamine sind ubiquitär vorkommende aliphatische Kationen, die essentiell für Wachstumsprozesse sind. Wahrscheinlich spielen Polyamine auch eine Rolle bei der Tumorentstehung. Der limitierende Schritt bei der Polyamin-Synthese ist die Umwandlung von Ornithin in Putreszin, der durch die Ornithin-Decarboxylase (ODC) katalysiert wird (Thomas und Thomas, 2001). ODC war zuvor schon als Myc-Zielgen bekannt und wurde von Auvinen et al. 1992 als Onkogen beschrieben (Auvinen et al., 1992). Da Polyamine das Wachstum von normalen Zellen und Krebszellen beeinflussen, kann die Aktivierung des Polyamin-Stoffwechsels einen Hinweis auf die biologische Aktivität von Myc geben.

Die Suche nach funktionellen Gen-Gruppen ergab weiterhin eine sehr große Anzahl von Genen, deren Produkte eine Rolle in der Ribosomenbiogenese spielen (Tabelle 3). Der Umfang dieser Gruppe war Anlass, die weiteren Untersuchungen auf diese Gene zu fokussieren und die Rolle von Myc in der ribosomalen RNA-Prozessierung genauer zu untersuchen (s. Kapitel 4.2). Selbstverständlich ist das Potential der Genchip-Ergebnisse damit noch lange nicht ausgeschöpft. Die Genlisten geben noch ausreichende Hinweise für die Fokussierung auf andere funktionelle Gruppen. In dieser Arbeit wurde die Priorität jedoch auf die Experimente zur Prozessierung der ribosomalen RNA gelegt.

Die quantitativen und qualitativen Unterschiede bei den Myc-Zielgenen in dieser Analyse bestätigte die Hypothese, dass Myc unter verschiedenen Bedingungen (z.B. mit Serum oder ohne Serum) nur bestimmte Subgruppen von Zielgenen reguliert. Eine detaillierte Analyse der Ergebnisse der Genchip-Analysen könnte somit zur Aufklärung der Frage führen, warum Myc Proliferation von P493-6 Zellen nur in Anwesenheit von Serum induzieren kann.

4.1.1.3 Cluster-Analyse von Expressionsprofilen in P493-6 Zellen

Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob das unterschiedliche Expressionsprofil, das P493-6 Zellen nach *myc*-Induktion in Abwesenheit von FKS zeigen, einen Hinweis auf die ausbleibende Proliferation gibt? Für diese Fragestellung wurde eine weitere Analyse aller primären Expressionsdaten, die mit dem A-Chip des HU95 Chipsatzes generiert wurden, durchgeführt. Die Primärdaten der Genchips von unstimulierten Zellen (-FKS/-Myc), sowie Zellen nach Myc-, FKS- oder Myc/FKS-Stimulierung, wurden in einer so genannten Cluster-Analyse verwendet (Eisen et al., 1998).

In einer Cluster-Analyse werden die Expressionsprofile von Genen bei bestimmten Bedingungen, z.B verschiedenen Zeitpunkten oder Behandlungen ermittelt. Gene mit ähnlichen Expressionsmustern werden zusammen in „Cluster“ gruppiert und in einem „Clusterbaum“ graphisch dargestellt. Studien in Hefen und höheren Zellen beschreiben eine Korrelation zwischen der Gruppierung von Genen in Cluster und einer ähnlichen Funktion (Eisen et al., 1998). So kann die Koexpression von Genen bekannter Funktion mit neuen oder kaum charakterisierten Genen auch zu neuen Erkenntnissen für unbekannte Gene führen.

Die unter 4.1.1.1 beschriebene Vergleichsanalyse der Genchip-Daten erfolgte nur paarweise, d.h. es wurde gefragt, wie die Induktion von *myc* das Expressionsprofil der Zellen unter Serum bzw. ohne Serum verändert. Die beiden Analysen wurden dann in einer Liste kombiniert (Tabellen 1 und 2) (Abb. 14, A). Die Cluster-Analyse dagegen erlaubt es, Aussagen darüber zu treffen, wie die Regulation von Genen durch Myc, Serum oder beidem bezogen auf alle Ansätze moduliert wird (Abb. 14, B). Daher ist die Cluster-Analyse, die auch noch eine anschauliche graphische Darstellung der Ergebnisse bietet, eine weitere Option, die oben beschriebene Fragestellung zu untersuchen.

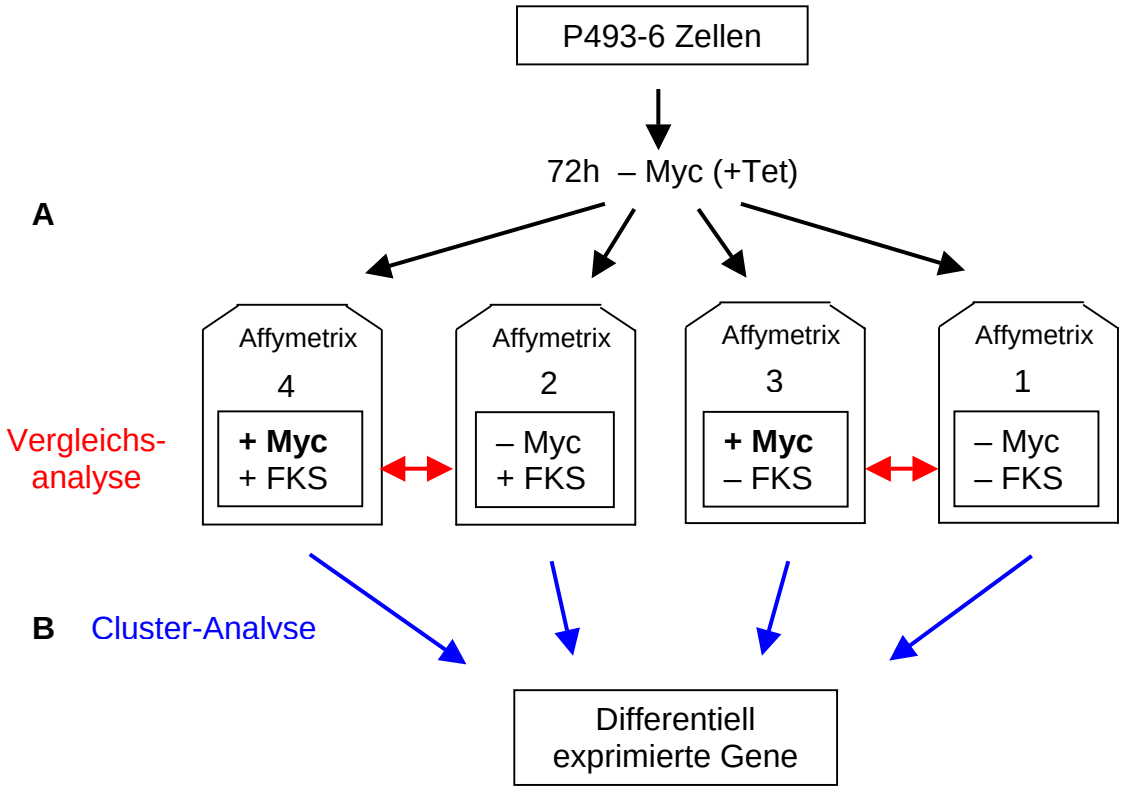


Abb.14 Überblick über die durchgeführten Analysen der Affymetrix Genchip-Daten. (A) In der Vergleichsanalyse wurden jeweils die Daten der Chips 2 und 4 und die der Chips 3 und 1 miteinander verglichen. Die Ergebnisse wurden dann in einer Liste kombiniert. Die Nummern der Chips beziehen sich auf die Bezeichnung der Spuren bei der Cluster-Analyse. **(B)** Für die Cluster-Analyse wurden alle Chipdaten nach der permutations-basierte Methode „SAM“ analysiert und die differentiell exprimierten Gene in einem Cluster-Baum dargestellt.

Die Algorithmen für die Normalisierung der Daten und die Bestimmung der Expressionshöhe sind anders als bei der unter 4.1.1.1 beschriebenen Vergleichs-analyse, so dass Gene, die eventuell durch die dort verwendete Normalisierungs-strategie nicht detektiert wurden, in der Cluster-Analyse beschrieben werden können.

Für die Detektion von differentiell exprimierten Genen auf den verschiedenen Chips wurde die permutationsbasierte Methode „SAM“ (Significance Analysis of Microarrays) nach Tusher (Tusher et al., 2001) angewandt. Als erster Schritt wird die relative Differenz der Expression von Genen bei verschiedenen Versuchsbedingungen unter Berücksichtigung der Variabilität in den durchgeführten Replikaten berechnet. Der Datensatz wird dann mehrfach permutiert und die relativen Differenzen auf Basis der permutierten Daten neu kalkuliert. Für die Mehrzahl der Gene sind die Werte aus original- und permutierten Datensätzen ungefähr gleich. Gene, bei denen sich diese Werte um mehr als einen bestimmten Grenzwert unterscheiden, werden als differentiell exprimiert definiert. Basierend auf der Anzahl der Gene, die bei einem bestimmten Grenzwert definiert wurde, wird eine Fehlerquote (false detection rate, FDR) errechnet. Anschließend wurde mit den differentiell regulierten Genen ein hierarchisches Clustern nach Eisen (Eisen et al., 1998) durchgeführt, d.h. es erfolgte eine Gruppierung von Genen (Clustern) aufgrund ihrer ähnlichen Expression in den verschiedenen Situationen. Die Cluster-Analyse und ihre graphische Darstellung erfolgte in dem Programm dCHIP.

Insgesamt stellten sich 1801 Gene der ca. 12 000 Gene des A-Chips in den 4 verschiedenen Stimulationsbedingungen als differenziell reguliert dar. Bei dieser Anzahl wurde eine FDR von 0,76 errechnet, d.h. 0,76 % der 1801 Gene (ca. 14 Gene) sind fälschlicherweise als reguliert identifiziert worden. Dies entspricht einem Konfidenzwert von >99%. Die differenziell regulierten Genen mussten noch zwei weitere Kriterien erfüllen: Die Expressionhöhe musste sich mindestens um den Wert 100 unterscheiden, damit Gene, deren Signalhöhe nur sehr gering ist und sie somit leicht als induziert bzw. reprimiert beschrieben werden (z.B. 3-fache Induktion von 10 auf 30), nicht in der Analyse berücksichtigt werden. Weiterhin mussten die Gene mindestens 2-fach reguliert werden. Nach Anwendung dieser beiden zusätzlichen Kriterien blieben noch 1380 Gene übrig, deren Clustering in Abbildung 15 dargestellt ist.

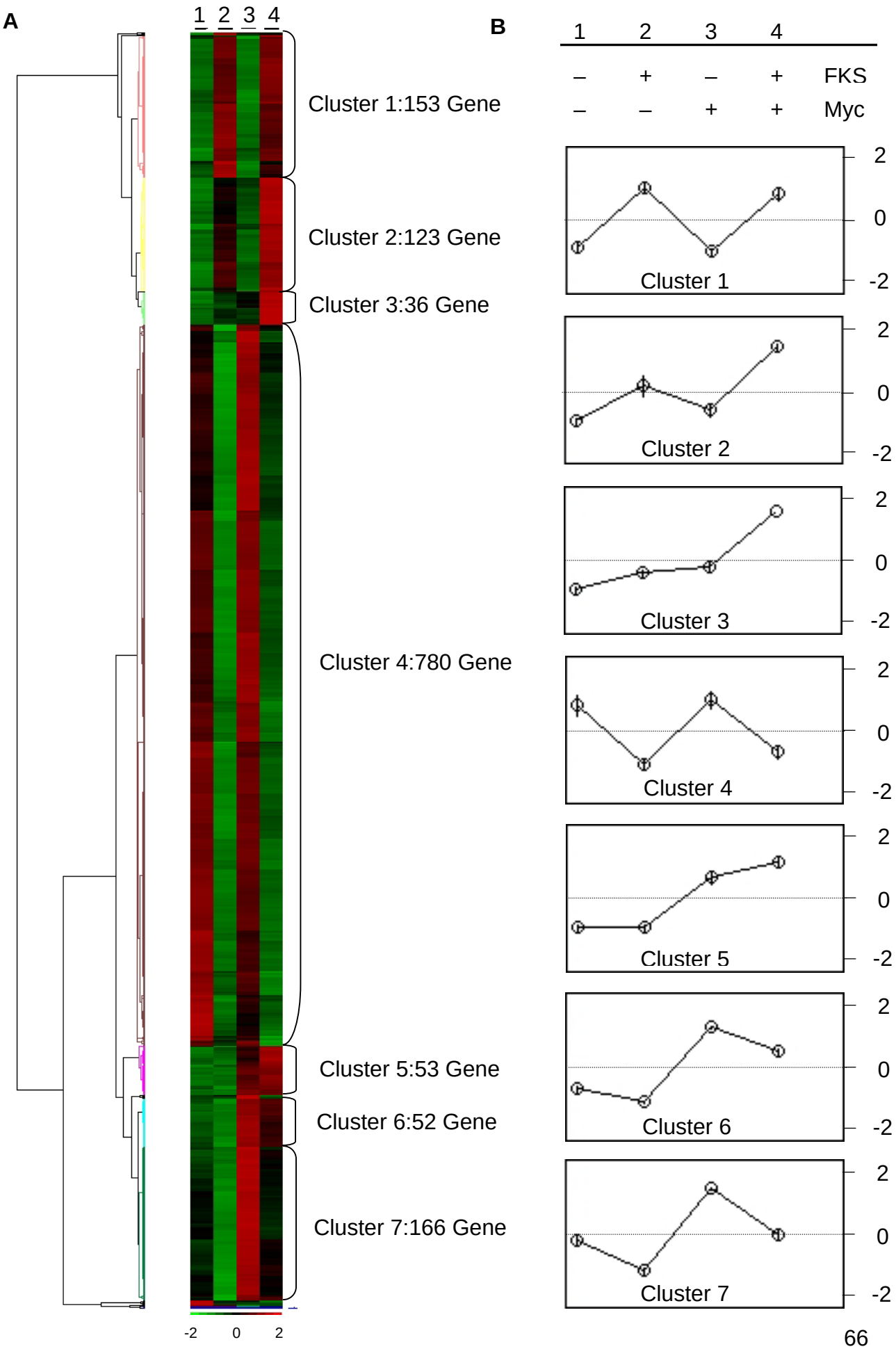

A
1 2 3 4
Cluster 1:153 Gene
Cluster 2:123 Gene
Cluster 3:36 Gene
Cluster 4:780 Gene
Cluster 5:53 Gene
Cluster 6:52 Gene
Cluster 7:166 Gene
-2 0 2
B
1 2 3 4
– + – + FKS
– – + + Myc
Cluster 1
Cluster 2
Cluster 3
Cluster 4
Cluster 5
Cluster 6
Cluster 7
2
0
-2

Abb. 15 Cluster-Analyse von Expressionsprofilen in P493-6 Zellen. (**A**) Spalten geben unterschiedliche Bedingungen an, Reihen einzelne Gene. Die Darstellung ist aufgrund ihrer Größe stark komprimiert. Arretierte P493-6 Zellen (-FKS/-Myc) (1) wurden für 8h mit FKS (2), mit Myc (3) oder mit FKS und Myc (4) stimuliert. Gene, die unter diesen vier Bedingungen differentiell reguliert sind, wurden in der Cluster-Analyse aufgrund ihrer Ähnlichkeit in der Genexpression zusammen gruppiert. Rot beschreibt Gen-Expression, die über dem Mittelwert aller Bedingungen liegt, Grün beschreibt Gen-Expression, die unter dem Mittelwert liegt. Schwarz steht für Expression in Höhe des Mittelwerts. (**B**) Die durchschnittlichen Expressionsmuster der einzelnen Cluster sind mit Standardabweichungen angegeben. Die Y-Achse umfasst den gleichen Bereich wie die Farbtafel (-2, 2) am unteren Ende des Clusterbildes. Die Werte jeder einzelnen Bedingung, die die Kurve des Expressionsprofils beschreiben, ist der Mittelwert der standardisierten Expressionwerte aller ausgewählten Gene in dieser Bedingung (Standardisierung ist eine lineare Skalierung für jedes Gen so dass die Expressionwerte aller Bedingungen den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1 haben). Die Fehlerbalken beschreiben zu jeder Seite eine Standardabweichung von 1 (von allen standardisierten Expressionswerten in einer Bedingung). Ein kürzerer Fehlerbalken zeigt ein engeres Clustering von Genen in der entsprechenden Bedingung.

In der Cluster-Analyse werden die Expressionswerte der einzelnen Gene standardisiert, um Gene aufgrund ihrer Veränderung in der Expression, unabhängig von der absoluten Höhe der Expression, vergleichen zu können. Bei der Standardisierung wird zunächst für jedes Gen der Mittelwert der Expressionswerte aller Bedingungen berechnet. Zusätzlich wird auch noch die Standardabweichung ermittelt. Dann wird der Mittelwert von dem Expressionswert jeder Bedingung subtrahiert und das Ergebnis durch die Standardabweichung dividiert. Diesen Vorgang nennt man Standardisierung bzw. Zentralisierung. Die standardisierten Werte liegen dann normalerweise in einem Bereich von –2 bis 2, der durch eine Farbskala repräsentiert wird. Die Skala reicht von hellgrün (-2) über schwarz (0) bis zu tiefrot (2). Diese Werte sind jedoch nicht mit den Ratio-Werten aus Tabelle 1 und 2 zu vergleichen.

Die identifizierten Gene lassen sich sehr gut in 7 Cluster verschiedener Größe darstellen, die alle durch ein unterschiedliches Expressionsprofil charakterisiert sind (Abb. 15, B). Eine komplette Liste der Gene, die durch die einzelnen Cluster bestimmt sind, wie auch eine Klassifizierung der Gene und weitere statistische Analysen befinden sich im Anhang.

Cluster 1 ist durch reprimierte Gene in Spalte 1 und 3 und induzierte Gene in Spalte 2 und 4 gekennzeichnet. Alle 153 Gene in diesem Cluster sind durch FKS bzw. FKS/Myc im Vergleich zu den arretierten Zellen induziert. Die Unterschiede in der Genexpression sind auch in dem durchschnittlichen Expressionsprofil des Clusters in der Box auf der rechten Seite dargestellt. Die Stimulation mit Myc alleine (Spalte 3) hatte fast keinen Einfluss auf die Expression der Gene. Daraus kann man

schließen, dass Myc bei der Stimulation mit FKS/Myc wahrscheinlich keine Rolle spielt und die Induktion der Gene allein auf das Serum zurückzuführen ist. Diese Gene sind möglicherweise wichtig, aber nicht ausreichend für die Proliferation von P493-6 Zellen, da sie ja auch in Abwesenheit von Myc durch Serum stimuliert werden und die Zellen sich unter diesen Bedingungen nicht teilen.

Auf den ersten Blick erscheint Cluster 2 ähnlich wie Cluster 1, jedoch ist allen 123 Genen gemeinsam, dass Myc und FKS hier synergistisch die Induktion der Gene bewirken. Die Spalten 1 und 3 sind durchgehend grün, d.h. die Expression dieser Gene kann durch Myc alleine im Vergleich zu arretierten Zellen nicht induziert werden. Nach Stimulation mit FKS (Spalte 2) sieht man einen leichten Anstieg in der Expression, der sich verstärkt, wenn die Zellen mit FKS und Myc (Spalte 4) stimuliert wurden. Es ist offensichtlich, dass Myc die Wirkung von FKS auf die Gen-Expression verstärkt. Myc stellt für Gene in diesem Cluster vielleicht einen Permissivitätsfaktor dar, der selbst nicht induziert, aber die Induktionshöhe reguliert.

Das Cluster 3 ist mit nur 36 Genen das kleinste, aber möglicherweise das interessanteste Cluster in dieser Analyse. Die Expression dieser Gene wird durch Stimulation mit FKS (Spalte 2) bzw. Myc (Spalte 3) nur sehr gering oder gar nicht stimuliert, steigt jedoch stark an, wenn die Zellen mit FKS und Myc zusammen stimuliert werden (Spalte 4). Hier stellt sich also eine Gruppe von Genen dar, die nur exprimiert wird, wenn die Zellen proliferieren. Die genaue Analyse dieser Gene könnte somit möglicherweise die Frage beantworten, warum die Proliferation der P493-6 Zellen strikt abhängig von beiden Parametern - nämlich *myc*-Expression und FKS – ist. Es bleibt weiterhin zu untersuchen, wie Myc und FKS bei der Aktivierung dieser Gene kooperieren.

Das Cluster 4 stellt mit 780 Genen das größte Cluster dar. Dieses Cluster stellt ein Negativ von Cluster 1 dar, da hier die Wirkung von FKS nicht aktivierend, sondern reprimierend erfolgt. Die in arretierten Zellen exprimierten Gene werden durch FKS (Spalte 2) und FKS/Myc (Spalte 4) in ihrer Expression reprimiert. Die Stimulation mit Myc (Spalte 3) hat nur geringe Auswirkungen auf die Expressionshöhe. Myc spielt daher bei der Repression durch FKS/Myc wahrscheinlich keine Rolle. Die umfangreichen, repressiven Effekte von Serum auf die Gen-Expression waren nicht unerwartet. Genchip-Experimente in serum-stimulierten humanen Fibroblasten hatten bereits gezeigt, dass mehr als die Hälfte der durch FKS regulierten Gene reprimiert wurden (Iyer et al., 1999).

Cluster 5 und 6 haben nicht nur fast die gleiche Anzahl an Genen (53 und 52 Gene), sie zeichnen sich auch beide durch ein ähnliches Expressionsprofil aus und werden daher zusammen beschrieben. In diesen Clustern wird die Expression der Gene nur durch Myc bzw. FKS/Myc beeinflusst (Spalten 3 und 4). FKS zeigt nur wenig Wirkung auf die Expressionshöhe. Somit ist Myc überwiegend oder ausschließlich für die Induktion verantwortlich. In Cluster 5 ist die Induktion stärker, wenn die Zellen auch mit FKS stimuliert wurden, in Cluster 6 werden die Gene durch Myc alleine höher induziert. In diesen beiden Clustern sind auch die meisten Myc-Zielgene aus der in Kapitel 4.1.1.1 beschriebenen Analyse zu finden. Bekannte Zielgene wie ODC, LDH-A, NM23 und auch viele der unter 4.2.1 induzierten nukleolären Gene wie z.B. Fibrillarin, Nucleolin, Dyskerin p38-2G4, RRS1, DDX21 sind in Cluster 5 und 6 enthalten. Zielgene „verstecken“ sich allerdings auch in anderen Clustern (z.B. oberes Drittel von Cluster 4). Auch die drei Probensets für Myc werden in diesen beiden Clustern beschrieben.

Das letzte Cluster (Cluster 7) beschreibt 166 Gene, auf die FKS und Myc einen antagonistischen Effekt haben. Im Vergleich zu arretierten Zellen (Spalte 1) wird die Expression der Gene durch FKS reprimiert (Spalte 2), durch Myc jedoch induziert (Spalte 3). Werden die Zellen mit FKS und Myc stimuliert (Spalte 4), liegt die Höhe der Expression wieder auf dem Niveau der arretierten Zellen. Es scheint, dass sich die reprimierenden Effekte des Serums und die induzierende Wirkung von Myc aufheben.

4.1.2 Expressionsprofile von Smoxi-4 Zellen

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, die Suche nach Myc-Zielgenen in einem anderen Zellsystem fortzuführen. Der Screen nach Zielgenen wurde daher auch in der Zelllinie Smoxi-4 durchgeführt. Smoxi-4 Zellen wurden aus *myc-knock-out*-Rattenfibroblasten (Ho15.19 Zellen) (Mateyak et al., 1997) durch stabile Transfektion mit einem retroviralen LXSH-MycER-Konstrukt etabliert (Hölzel et al., 2001). Das MycER-Fragment kodiert für ein virales C3-Epitop, humanes Myc Exon 2 und 3, ein Hämagglutinin-Epitop sowie die Hormonbindungsdomäne des Östrogenrezeptors. Die Hormonbindungsdomäne ist so verändert worden, dass sie sich nur durch 4-

Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) aktivieren lässt. Durch die Interaktion von 4-OHT mit der Hormonbindungsdomäne wird deren Konformation verändert. Dadurch wird die Bindung des Hitzeschockproteins Hsp90 mit der Hormonbindungsdomäne aufgehoben und die Translokation des MycER-Fusionsproteins in den Zellkern ermöglicht. Smoxi-4 Zellen sind sehr sensitiv gegenüber Kontaktinhibition und arretieren im Zellzyklus schon bei geringer Dichte. Die Aktivierung des konditionalen MycERs überkommt diesen Zellzyklus-Arrest und führt zu anhaltender Proliferation der Zellen, der schließlich bei hoher Zelldichte eine vermehrte Apoptose gegenüber steht (Hölzel et al., 2001).

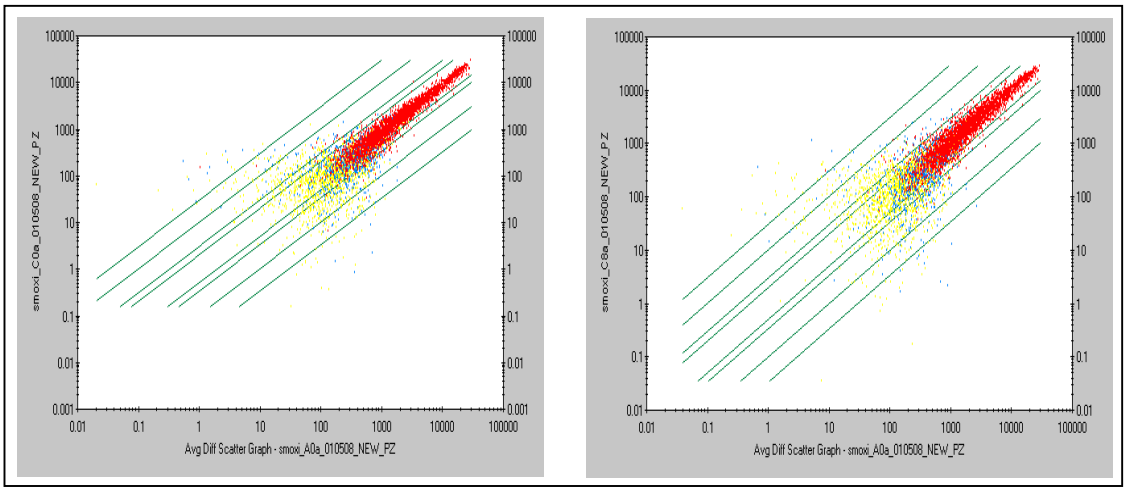
In dieser Situation sollte das Expressionsprofil der Zellen bestimmt werden. Ziel war es festzustellen, welche Gene durch Myc reguliert werden müssen, damit arretierte Zellen wieder in die Teilung gehen. Für diesen Versuch wurden Smoxi-4 Zellen durch Kontaktinhibition arretiert. Zwei Tage nach Erreichen der Konfluenz wurde Myc in den arretierten Zellen für 8h induziert. Kontrollzellen blieben während der Induktionszeit unbehandelt. Es wurden drei voneinander unabhängige Versuche mit den Smoxi-4 Zellen durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde der Genchipsatz RG34 A-C verwendet. Er besteht aus dem A-Chip, der Probensets von ca. 8000 bekannten Genen trägt und den beiden EST-Chips B und C, die durch ca. 18000 EST-Proben charakterisiert sind. Die Hybridisierung der Genchips und die Auswertung der Daten erfolgten wie oben beschrieben.

Da in diesem Zellsystem das MycER konstitutiv exprimiert wird, kann seine Aktivität nur indirekt über die Regulation bekannter Zielgene nachgewiesen werden, und nicht, wie bei den P493-6 Zellen, durch die Kontrolle der Expression der *myc*-mRNA. In Abbildung 18 ist ein Northern-Blot dargestellt bei dem 8h nach Zugabe von 4-OHT die Expression der bekannten Zielgene Gadd45 und ODC analysiert wurde. Demzufolge war die Myc-Aktivierung erfolgreich, da erwartungsgemäß Gadd45 nach 8h reprimiert und ODC induziert wurde.

Nach erfolgreicher Hybridisierung und Analyse der Genchips ergaben sich folgende Ergebnisse: Auf dem A-Chip wurden nach 8h Myc-Induktion 22 Gene induziert, nur 4 davon mindestens 2-fach. Auf den EST-Chips wurden 76 Gene induziert, darunter waren 24 Gene, die mindestens um den Faktor 2 reguliert wurden. Bei den reprimierten Genen wurden für den A-Chip 9 Gene identifiziert und bei den EST-Chips 12 Gene, wobei nur je ein Gen davon mehr als 2-fach reprimiert wurde. Die Kriterien für die Induktion bzw. Repression sind wie unter 4.1.1.1 beschrieben.

Die kompletten Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

Generell sind die Induktionswerte der Zielgene in Smoxi-4 Zellen geringer als in P493-6 Zellen. Auch ist die Anzahl der induzierten Gene sehr viel niedriger als in den P493-6 Zellen. Ein Hinweis auf diese Diskrepanz könnten die Aussagen der Scatter-Analysen geben. Diese wurden wie schon bei den P493-6 Zellen beschrieben durchgeführt (Abb. 16).



A Kontrolle gegen Kontrolle **B** Kontrolle gegen Experiment

Abb. 16 Scatter-Analyse in Smoxi-4 Zellen. Die Signal-Werte der einzelnen Gene sind wie in Abb. 11 in einem Koordinatensystem aufgetragen. **(A)** Die zwei Replikate der Kontrolle korrelieren nicht gut miteinander. **(B)** Die Streuung der Datenwolke ist verglichen mit A eher gering. Die Scatter-Analysen lassen darauf schließen, dass Smoxi-4 Zellen bezüglich ihres Expressionsprofiles sehr heterogen sind.

Die schlechte Korrelation der Signal-Werte aus den Kontroll-Replikaten (Abb. 16, A) weist auf ein heterogenes Expressionsprofil der einzelnen Zellen hin. Anscheinend reichen zwei Tage unter Konfluenz nicht aus, die Zellen zu arretieren, bzw. nach Stimulation mit Myc gehen die Zellen nicht synchron in die Teilung. Diese Beobachtung wurde auch schon mit mikroskopischen Time-Lapse Videoaufnahmen von Smoxi-4 Zellen gemacht (Hölzel, 2001 #167). Die Tatsache, dass die Smoxi-4 Zellen ein so unterschiedliches Expressionsprofil bei den Kontrollen zeigten, führte dazu, dass viele potentielle Myc-Zielgene in der Analyse nicht gewertet wurden. Die Kriterien bei der Vergleichsanalyse forderen, dass ein Gen erst als Zielgen gewertet wird, wenn es beim Vergleich aus allen Kontrollen mit allen Experimenten als reguliert identifiziert wird.

Die Funktionalität des Systems konnte aber eindeutig belegt werden, da bekannte Zielgene wie Ornithin-Decarboxylase, Spermidin-Synthase, Transferrin-Rezeptor, oder Fibrillarin durch 4-OHT induziert wurden. Dies bestätigte, dass auch in dem Smoxi-4 Zellsystem Myc-Zielgene identifiziert werden konnten.

4.1.3 Zusammenfassung der Genchip-Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird abschließend eine graphische Zusammenfassung der unter 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen Ergebnisse gegeben. Da der Serumentzugs-Versuch in den P493-6 Zellen nur mit einem unvollständigem Chip-Satz durchgeführt wurde, wird auf dessen Darstellung verzichtet. In den Diagrammen ist die Anzahl der gesamt regulierten Gene in P493-6 Zellen und Smoxi-4 Zellen dargestellt. Die mindestens 2-fach regulierten Gene sind gesondert dargestellt (Abb. 17).

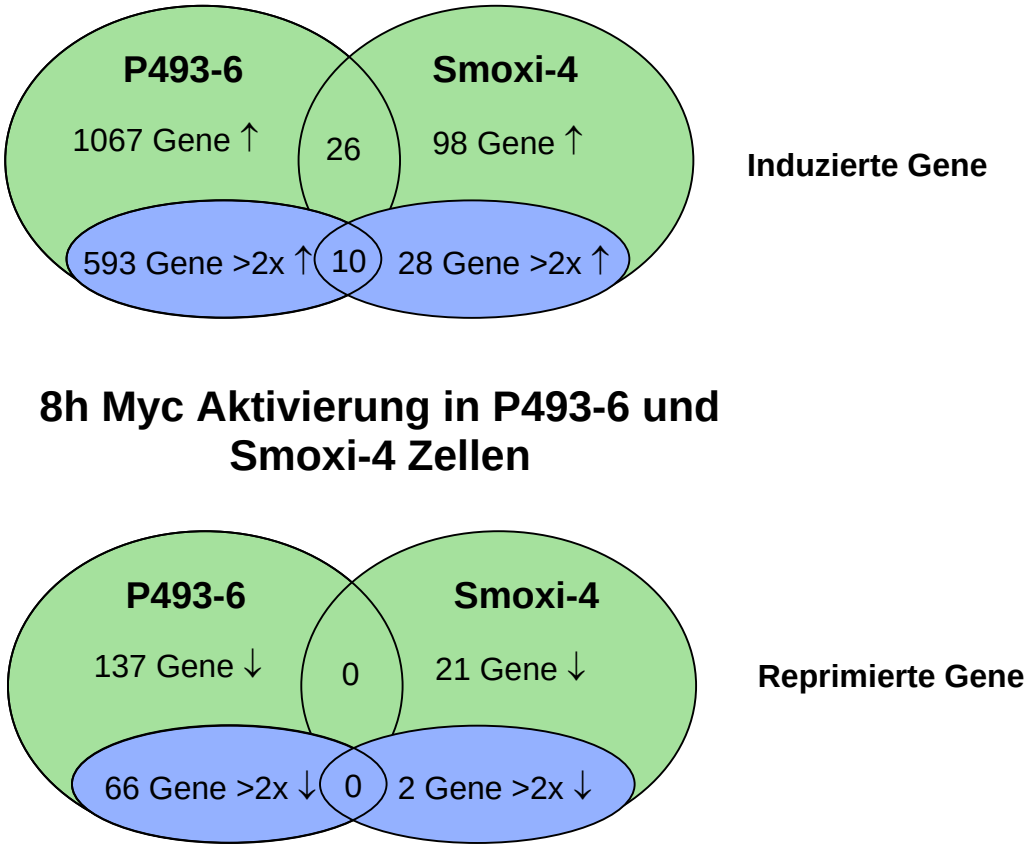


Abb. 17 Zusammenfassung der Ergebnisse der Genchip-Experimente in P493-6 und Smoxi-4 Zellen. Dargestellt sind die Ergebnisse der gesamten Chipsätze HU95 A-E (P493-6 Zellen, + FKS) bzw. RG34 A-C (Smoxi-4 Zellen). Mindestens 2-fach regulierte Gene sind gesondert dargestellt (↑ = induziert, ↓ = reprimiert).

4.1.4 Gemeinsame Myc-Zielgene von P493-6 und Smoxi-4 Zellen

Die Verwendung von zwei unterschiedlichen, konditionalen Zellsystemen aus verschiedenen Geweben und Spezies sollte die Identifizierung von evolutionär konservierten Myc-Zielgenen unterstützen. Insgesamt wurden 26 Gene in P493-6 Zellen und Smoxi-4 Zellen gemeinsam reguliert (s. Anhang). Jedoch wurde diese Übereinstimmung nur bei den induzierten Genen gefunden. Bei den reprimierten Genen gab es in beiden Zelllinien keine Gemeinsamkeiten. Somit wurden fast 24% aller Myc-induzierten Gene in Smoxi-4 Zellen auch in P493-6 Zellen gefunden. Die Übereinstimmung wird wahrscheinlich noch größer werden, wenn das Ratten-Genom vollständig sequenziert ist bzw. viele der ESTs auf den Chips annotiert sind. Mit der fortschreitenden Identifizierung der ESTs könnte diese Liste also noch wachsen. Dies gilt auch für die Gruppe von Genen, die aufgrund ihrer funktionellen Gemeinsamkeit aus dieser Liste extrahiert werden konnte. Diese Gene (Tabelle 3) sind alle an dem Prozess der ribosomalen RNA (rRNA)-Prozessierung beteiligt. Die funktionelle Gruppe dieser Gene und die Auswirkungen von Myc auf die rRNA-Prozessierung sind Thema des Kapitel.

4.2 Der Einfluss von Myc auf die ribosomale RNA-Prozessierung

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass Myc viele, funktionell unterschiedliche Klassen von Genen abhängig von Bedingungen und Zellsystem regulieren kann. Es konnten nicht nur bekannte Myc-Zielgene bestätigt, sondern auch viele Zielgene neu identifiziert werden.

In diesem Abschnitt wird speziell auf eine Genklasse und deren Funktion eingegangen, die für Faktoren der rRNA-Prozessierung kodieren (Tabelle 3). Diese Gene wurden sowohl in den P493-6 Zellen als auch in den Smoxi-4 Zellen nach 8h *myc*-Induktion verstärkt exprimiert. Der Anteil dieser Gene war dabei in den P493-6 Zellen deutlich höher als in den Smoxi-4 Zellen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden von mehreren Gruppen ebenfalls Screens nach Myc-Zielgenen veröffentlicht, die zeigten, dass sowohl ribosomale Proteine als auch Faktoren für die Ribosomenbiogenese von Myc reguliert werden (Coller et al., 2000; Boon et al., 2001; Menssen und Hermeking, 2002). Es scheint also, dass die Induktion der „nukleolären“ Zielgene durch Myc in vielen Zellsystem erfolgt und nicht an bestimmte Bedingungen gebunden ist. Somit

dienten die nächsten Versuche zur Aufklärung der Funktion von nukleolären Prozessen.

4.2.1 Nukleoläre Zielgene von Myc

Die rRNA-Prozessierung findet ausschließlich im Nukleolus statt, während der Zusammenbau mit ribosomalen Proteinen bzw. das Zusammensetzen der beiden Ribosomen-Untereinheiten im Nukleolus, Nukleus und im Zytoplasma erfolgt (Abb. 5). Unter den in 4.1.4 beschriebenen gemeinsamen Zielgenen in Smoxi-4 Zellen und P493-6 Zellen gab es 8 Gene, deren Produkte im Nukleolus lokalisiert sind (Andersen et al., 2002) (Tabelle 3). Eine Analyse der Myc-Zielgene in P493-6 Zellen in dieser Arbeit ergab weitere 56 nukleoläre Gene. Von den in Tabelle 3 aufgelisteten Genen, wurden schon 26 Gene zuvor als Myc-Zielgene beschrieben, z.B. Nucleolin, Fibrillarin, Nucleophosmin, Bop1, Nop56 und andere.

Tabelle 3: Nukleoläre Zielgene von Myc

P493-6 Zellen

Accession Nr		Name	Hefe	Funktion	Ratio
X56597	a,b	fibrillarin	Nop1	component of snRNP, associated with U3, U8, U13 snoRNAs	1.8
M60858	a,b	nucleolin	Nsr1p	ribosome biogenesis	2.2
AA191576	a,b	nucleophosmin B23		ribosomal protein assembly	2.4
AI144254	b	EST	Rrp4	3'-> 5' exoribonuclease, subunit of the exosome complex	2.1
AL039469	b	exosome component Rrp41	Rrp41	3'-> 5' exoribonuclease, subunit of the exosome complex	2.1
AI971527	b	exosome component Rrp46	Rrp46	3'-> 5' exoribonuclease, subunit of the exosome complex	5.5
U41387	a,b	nucleolar protein GU alpha		RNA helicase II/Gu (DDX21), a DEAD-box enzyme	4.4
AI623176	b	nucleolar protein GU beta		paralogue of GU alpha	1.4
AI742046	b	nucleolar phosphoprotein Nopp34		interacts with Ki-67 antigen (MKI67)	2.4
U86602	a,b	nucleolar protein p40	Ebp2	ribosomal RNA processing in yeast, EBNA1 binding 2	3.3
AI860822	b	nucleolar antigen Nop52	Rrp1	pre-rRNA processing	3.2
Y12065	a,b	nucleolar protein hNop56	Nop56	component of C/D-box snoRNPs	3.3
AI983332	a,b	nucleolar protein Nop5/Nop58	Nop58	component of C/D-box snoRNPs	2.9
X55504	b	nucleolar protein 1/P120 antigen	Nop2p	putative methyltransferase	2.6
AA837495	b	nucleolar protein Gar1	Gar1	component of the H/ACA-box snoRNPs	3.1
L05425	b	nucleolar GTPase	Nog2	found in pre-60S ribosomal particles	2.0
AJ006591	b	nucleolar cysteine-rich protein		localization to the nucleolus, associates with centromeres	2.1
AF023612	b	Dim1p homolog	Dim1p	adenine-dimethyltransferase	1.8
U59151	b	dyskerin	Cbf5p	pseudouridine-synthase of H/ACA-box snoRNPs	3.5
D21262	a,b	KIAA0035 (rat Nopp140)	Srp40p	nucleologenesis and nucleolar integrity	6.5
D25218	a,b	KIAA0112	Rrs1	regulatory proptein required for ribosome biogenesis	4.6
AI206221	b	KIAA0185	Rrp5	putative bridging protein, ribosomal RNA processing	3.0
D50914	a,b	KIAA0124 (Bop1)	Erb1p	ribosomal RNA processing	5.0
AJ001340	b	U3 snoRNP associated protein		component of snoRNPs	2.1
U78310	b	pescadillo	Nop7	processing, nuclear export, interacts with ORC	2.6
U59435		Cell cycle protein p38-2G4		proliferation-associated, 38kD	3.9
D49490		PDIR		protein disulfide isomerase-related protein	5.0
D21853		KIAA0111	Fal1	initiation factor, Protein biosynthesis, Helicase	1.9
U07231	a	G-rich sequence factor-1		RNA-binding	1.9

Tabelle 3: Nukleoläre Zielgene von Myc (Fortsetzung)

Accession Nr		Name	Hefe	Funktion	Ratio
AW001374	a	prohibitin	Phb1	unknown	2.2
T96408		bystin		homolog to drosophila bys	7.9
R20554		glucose regulated protein	Pdi1	has protein disulfide isomerase activity	1.4
AW023676	a	mortalin-2		heat shock 70kD protein 9B	2.3
AW001281	a	LPS-associated protein 1		heat shock 70kD protein 8	1.7
AI832665		DKFZP586M0122	Rpa190	likely ortholog of mouse RNA polymerase 1-4 (194 kDa subunit)	2.8
AI682973	a	EIF4A, isoform 1	Tif2	binding of mRNA to 40S ribosomal subunit	1.4
W07032	a	ribosomal protein S19		ribosome biogenesis	2.3
H45858	a	ribosomal protein S17		ribosome biogenesis	2.0
AW043742	a	ribosomal protein S11		ribosome biogenesis	2.0
AI037949		ribosomal protein S24		ribosome biogenesis	3.1
AI553745		hypothetical protein HSPC111		unknown	4.5
AI989533	b	C2f protein	Mra1	ribosomal RNA processing	2.2
D29958	ab	KIAA0116 protein	Rrp45	Exosome complex exonuclease	3.5
AW004842	b	RNA processing factor 1	Rpf1	ribosome biogenesis	1.5
AI985787	a	hypothetical protein FLJ10439		contains three WD domains (WD-40 repeat)	4.4
AI417099		WD repeat domain 12 protein	YOR272	unknown	8.7
AI458823	b	DKFZP564O0463 protein	Sof1	18S rRNA processing	2.2
AI140114		CGI-48 protein	YJL069	unknown	2.4
D13645	a	KIAA0020 gene	YDR496	minor histocompatibility antigen HA-8	3.2
AJ007398	b	PBK1 protein	YKR060	ribosome biogenesis	2.1
AL040968	ab	nucleostemin	Nug1	putative nucleotide binding protein	4.0
AW008363	b	G protein-binding protein CRFG	Nog1	essentiell nucleolar G protein-binding protein	2.7
AI638620		hypothetical protein FLJ14075	YGR145	unknown	2.4
AA251235		KIAA0007 protein	YDR398	contains WD domains (WD-40 repeat)	2.9
D80001	a	KIAA0179 gene	Rrp1	unknown	5.2
U28042	ab	DEAD/H box polypeptide 10	Hca4	ribosomal RNA processing	3.8
AI880771	b	WD repeat-containing protein 3	Dip2	U3 snoRNP protein	4.0
U88153		PELP1	Spt7	plays a permissive role in E2-mediated cell cycle progression	2.2
U49844		ataxia telangiectasia/Rad3 related	Rad3	cell cycle checkpoint and DNA damage repair	2.0
AL040581	a	MYB binding protein (P160) 1a		nucleolar protein that binds MYB	2.6
AA194366		DEAD box helicase 97 Kda	Dbp10	ATP-dependent RNA helicase	1.8
AF054996	b	U3 snoRNP protein 4 homolog	YNL075	ribosome biogenesis	2.3
AA877527		CGI-115 protein	YPR143	unknown	2.5
AA523292	a	surfeit 6		novel nucleolar protein	2.2

Smoxi-4 Zellen

Accession Nr		Name	Hefe	Funktion	Ratio
M55015	a,b	nucleolin	Nsr1p	ribosome biogenesis	1.6
M94287	a,b	Nopp140	Srp40p	nucleologenesis and nucleolar integrity	2.2
AF069782	b	Nap65	Nop5/58	component of C/D-box snoRNPs	1.8
AI169617	a,b	EST, KIAA0124 (Bop1)	Erb1p	ribosomal RNA processing	2.4
AA997726	b	EST, RRP5 homolog	Rrp5	ribosomal RNA processing	2.2
AI171263	a,b	EST, mouse fibrillarin	Nop1	component of small nucleolar ribonucleoprotein (snRNP)	2.7
AI104979	a,b	EST, nucleolar protein p40	Ebp2	ribosomal RNA processing	2.3
AA963703		EST, P38-2G4		proliferation associated, 38kD	2.3

Tabelle 3 Nukleoläre Zielgene von Myc in P493-6 und Smoxi-4 Zellen. Alle Gene wurden mit Hilfe der Proteom-Analyse des Nukleolus identifiziert (Andersen et al., 2002). Homologe in der Hefe sind ebenfalls angegeben. a = Bekannte Myc-Zielgene, b = Gene, die in die Ribosomenbiogenese involviert sind.

Fast alle diese Gene wurden in P493-6 Zellen von Myc auch unter Serumentzug induziert. Viele der hier identifizierten neuen und bekannten Gene haben Homologe in der Hefe, die eine wichtige Rolle in der Prozessierung von rRNA haben (Kressler et al., 1999).

4.2.2 Bestätigung der Genchip-Ergebnisse durch Northern-Blot-Analysen

Die Ergebnisse der Genchip-Analysen für bekannte und neu identifizierte, nukleoläre Zielgene wurden durch Northern-Blot-Analysen bestätigt. Als Kontrolle wurden auch die Gene Cdk4, SSecks, Transferrin-Rezeptor und Gadd45 getestet. Die nukleolären Gene Bop1, Nop56, Fibrillarin und Dyskerin wurden nach *myc*-Aktivierung in P493-6 Zellen mit derselben Kinetik induziert, wie das schon als direktes Zielgen beschriebene Cdk4 (Abb. 18, A). Die Myc-abhängige Regulation von nukleolären und anderen Zielgenen konnte auch in Smoxi-4 Zellen bestätigt werden (Abb. 18, B).

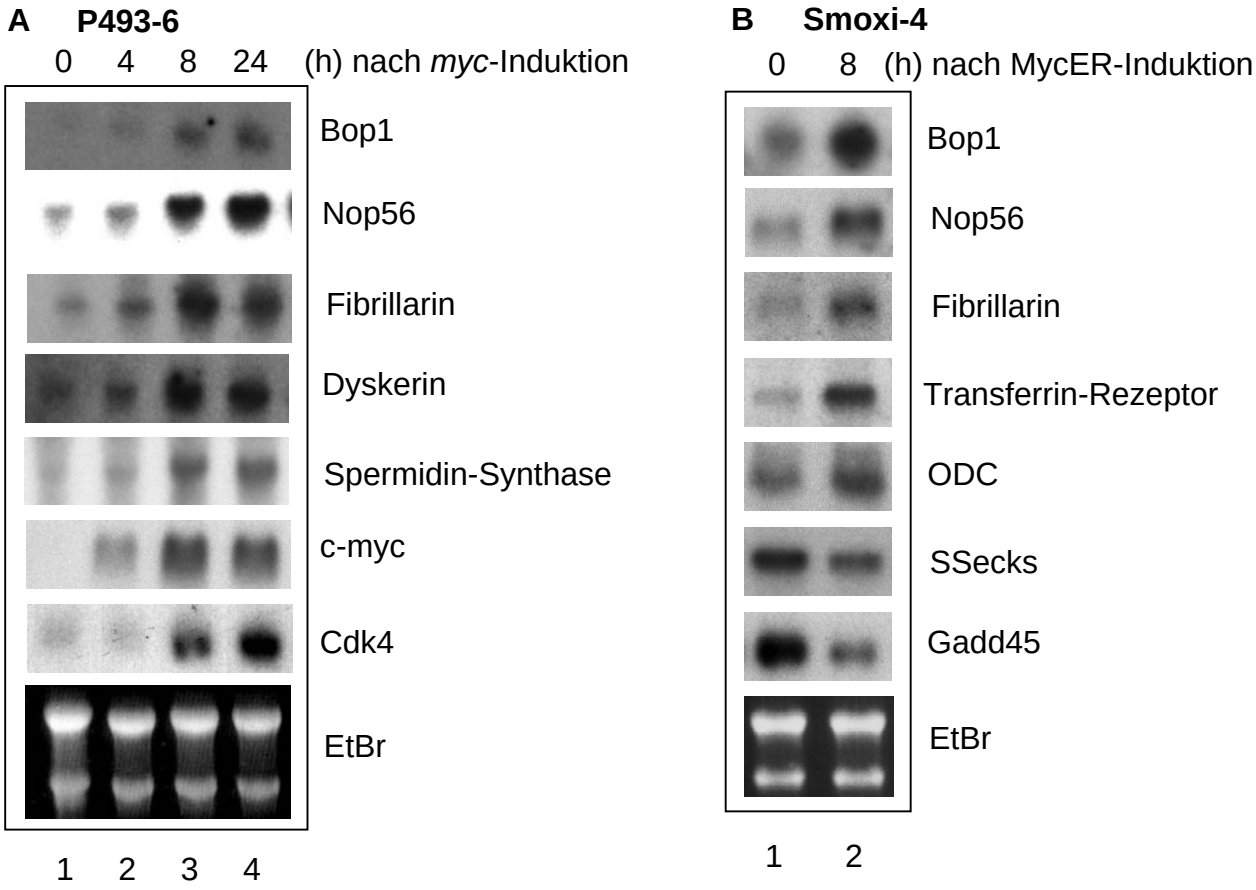


Abb. 18 Northern-Blot-Analyse von bekannten und neu identifizierten Myc-Zielgenen. (**A**) P493-6 Zellen wurden für 72h arretiert (0h) und für 4, 8 und 24h mit Myc stimuliert. (**B**) Smoxi-4 Zellen wurden für zwei Tage kontaktinhibiert und MycER wurde für 8h durch Zugabe von 0,1 µM 4-OHT aktiviert. Nicht-induzierte Zellen dienten als Kontrolle (0h). Die RNAs wurden mit Proben spezifisch für die angezeigten Gene hybridisiert. EtBr: Ethidiumbromid gefärbte RNA.

4.2.3 Ribosomale RNA-Prozessierung in P493-6 Zellen

Eine große Anzahl der nukleolären Gene in Tabelle 3 ist direkt an der Prozessierung von rRNA beteiligt. Um zu überprüfen, ob die Prozessierung des 47S rRNA-Vorläufers in P493-6 Zellen von Myc reguliert wird, wurden „Pulse-chase“-Markierungs-Experimente durchgeführt (Abb.19).

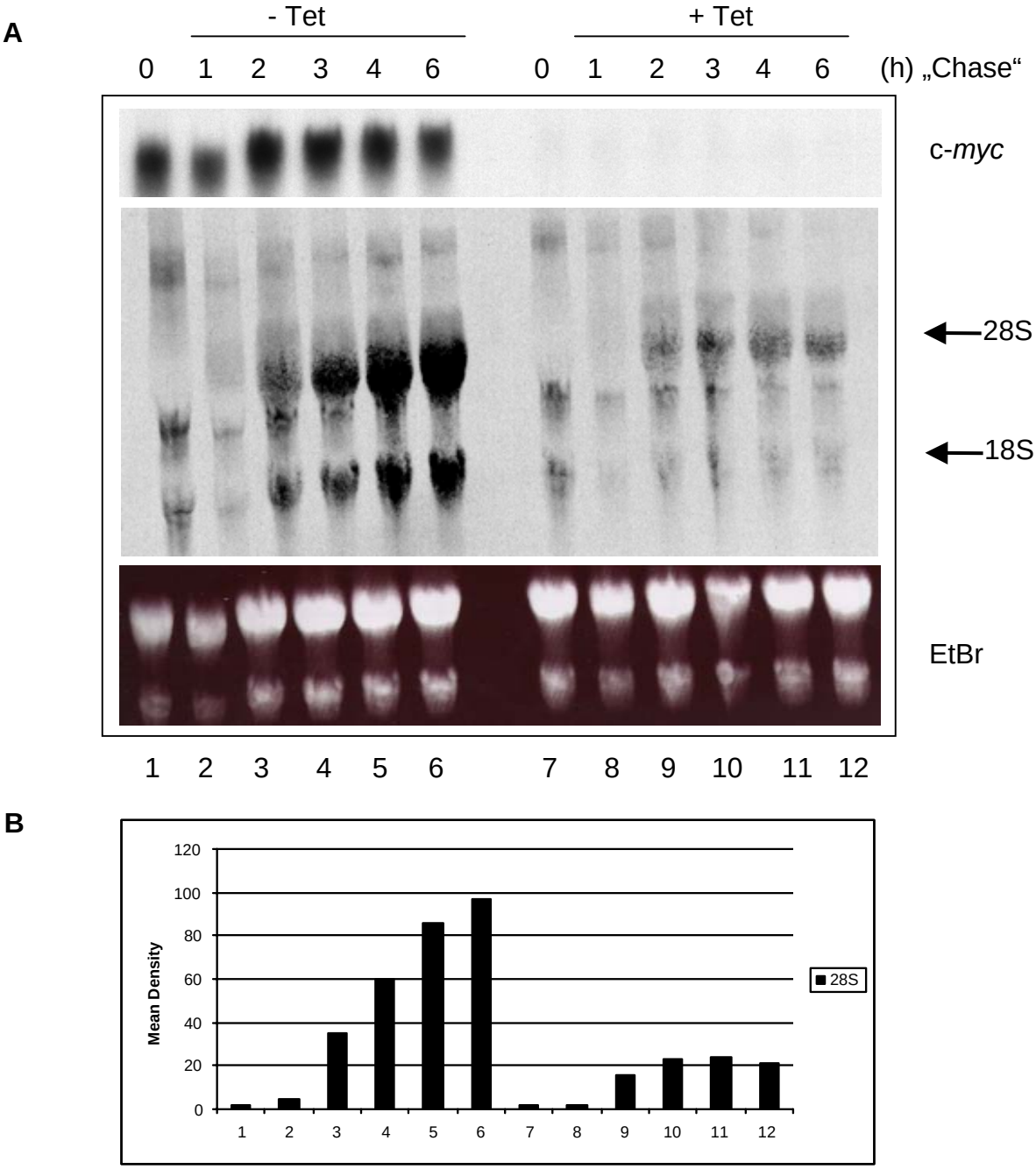


Abb. 19 Myc-abhängige rRNA-Reifung in P493-6 Zellen. (**A**) Zellen wurden für 72h arretiert und anschließend in der An- oder Abwesenheit von Tet mit Serum stimuliert. Nach 12h wurden die Zellen mit 2.5µCi/ml ^{3}H-Uridin für 30 min puls-markiert. Anschließend erfolgte ein „Chase“ für die angegebenen Zeiten. Markierte RNAs wurden isoliert, auf einem 1%igen Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferriert und fluorographisch visualisiert. Derselbe Blot wurde mit einer Probe spezifisch für *myc* hybridisiert. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs ist gezeigt. (**B**) Quantifizierung der Signale des inkorporierten ^{3}H-Uridins in die 28S rRNA.

Dazu wurden die Zellen für 72h unter Serumentzug (0.25% FKS) in Anwesenheit von Tet arretiert und anschließend für 12h mit 10% Serum in An- oder Abwesenheit von Tet stimuliert. Die Zellen wurden dann für 30 min mit ^{3}H-Uridin puls-markiert, gefolgt von einem „Chase“ für die angegebenen Zeitpunkte (Abb. 19, A). In Abwesenheit von Tet akkumulierten während der „Chase“-Kinetik große Mengen an reifer 18S und 28S rRNA. Im Gegensatz dazu war der Anstieg der reifen rRNA-Formen in Anwesenheit von Tet nur gering. Nach 6h „Chase“ war die Menge der prozessierten 28S rRNA ungefähr 5-fach höher in Zellen, die *myc* exprimierten (Abb. 19, B; vgl. Spur 6 und 12).

Um herauszufinden, ob Myc rRNA-Prozessierung auch unter Serumentzug induziert, wurde der Markierungs-Versuch in 0,25% FKS wiederholt. Die Prozessierung des 47S Vorläufers war hier fast genauso effizient wie unter hohem Serum (Abb. 20).

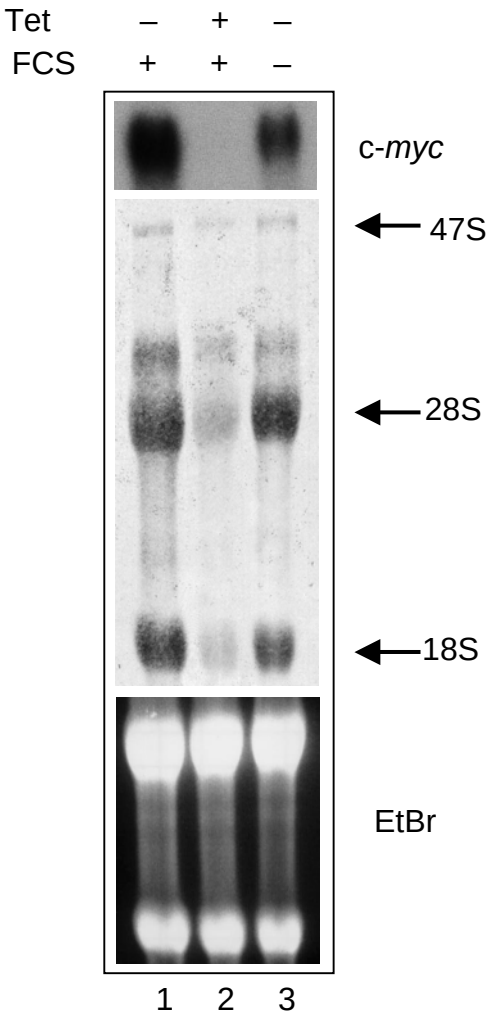


Abb. 20 Prozessierung der rRNA in P493-6 Zellen. Zellen wurden für 72h arretiert und für 12h in An- oder Abwesenheit von Tet mit FKS oder nur mit Myc (-Tet) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit ^{3}H-Uridin markiert. Nach einem „Chase“ von 4h wurde die RNA aus den Zellen isoliert und analysiert (s. Abb. 19).

Es scheint, dass P493-6 Zellen einen Defekt in der Produktion von reifer 18S und 28S rRNA haben, wenn die Expression von *myc* durch die Zugabe von Tet reprimiert wird. Dieser Defekt ist unabhängig davon, ob die Zellen in hohem (10%) oder niedrigem Serum (0,25%) kultiviert wurden. Die Entstehung der ribosomalen RNA beinhaltet zum einen die Transkription des 47S Vorläufers und zum anderen die vielfältigen Schritte der Prozessierung (Abb. 6). Dem hier beschriebenen Prozessierungsdefekt in P493-6 Zellen könnte sowohl eine verminderte Transkription des 47S Vorläufers als auch eine reduzierte Prozessierung desselbigen zugrunde liegen. In den nächsten beiden Abschnitten wird beschrieben, auf welcher Ebene Myc die Enstehung reifer rRNA reguliert.

4.3 Regulation der Expression des 47S rRNA-Vorläufers in P493-6 Zellen

Myc zeigt einen starken, positiven Effekt auf die Bildung der reifen 18S und 28S rRNAs. Dagegen scheint die Menge des 47S Vorläufers in P493-6 Zellen durch Myc nicht verändert zu werden. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Myc nur die Prozessierung des 47S Vorläufers reguliert, nicht aber seine Synthese. Diese Annahme wird im Folgenden näher untersucht. Mit Hilfe der Northern-Blot-Analyse konnte tatsächlich bestätigt werden, dass der 47S Vorläufer in ruhenden Zellen deutlich nachweisbar ist und nach Aktivierung von *myc* in Serum-stimulierten Zellen in seiner Menge nicht zunimmt (Abb. 21, 5'-ETS, Spur 1-8). Der 47S Vorläufer wurde mit einer 5'-ETS Leader-Probe im Northern-Blot nachgewiesen. Diese Leader-Sequenz des 47S Vorläufers wird als erster Schritt des gesamten Prozessierungs-prozesses entfernt (Abb. 6), so dass nur neu transkribierter, unprozessierter Vorläufer mit dieser Probe hybridisiert. Folglich wird die Menge des 47S Vorläufer oft als Maß für Transkription von rDNA-Genen verwendet. Insofern war der Nachweis des 47S Vorläufers in arretierten Zellen unerwartet. Auch die Serumstimulation der Zellen in Abwesenheit von Myc änderte die Menge des 47S Vorläufers nicht signifikant (Abb. 21, 5'-ETS, Spur 9-16).

Jedoch zeigte ein „Pulse-Chase"-Experiment in dieser Situation, dass die Umsatzrate des 47S rRNA-Vorläufers in P493-6 Zellen sehr wohl von Serum und Myc beeinflusst wird. Arretierte Zellen inkorporierten kein ^{3}H-Uridin in den 47S Vorläufer, während die radioaktive Markierung des 47S Vorläufers schon 2h nach

Serumstimulation von P493-6 Zellen (Abb. 20, Spur 2 und 10) nachweisbar war. Die Inkorporation des ^{3}H-Uridins in den 47S Vorläufer wurde durch Myc auch in Abwesenheit von Serum induziert (Abb. 20, Spur 3). Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sowohl Serum als auch Myc die Synthese des 47S rRNA-Vorläufers unabhängig stimulieren können.

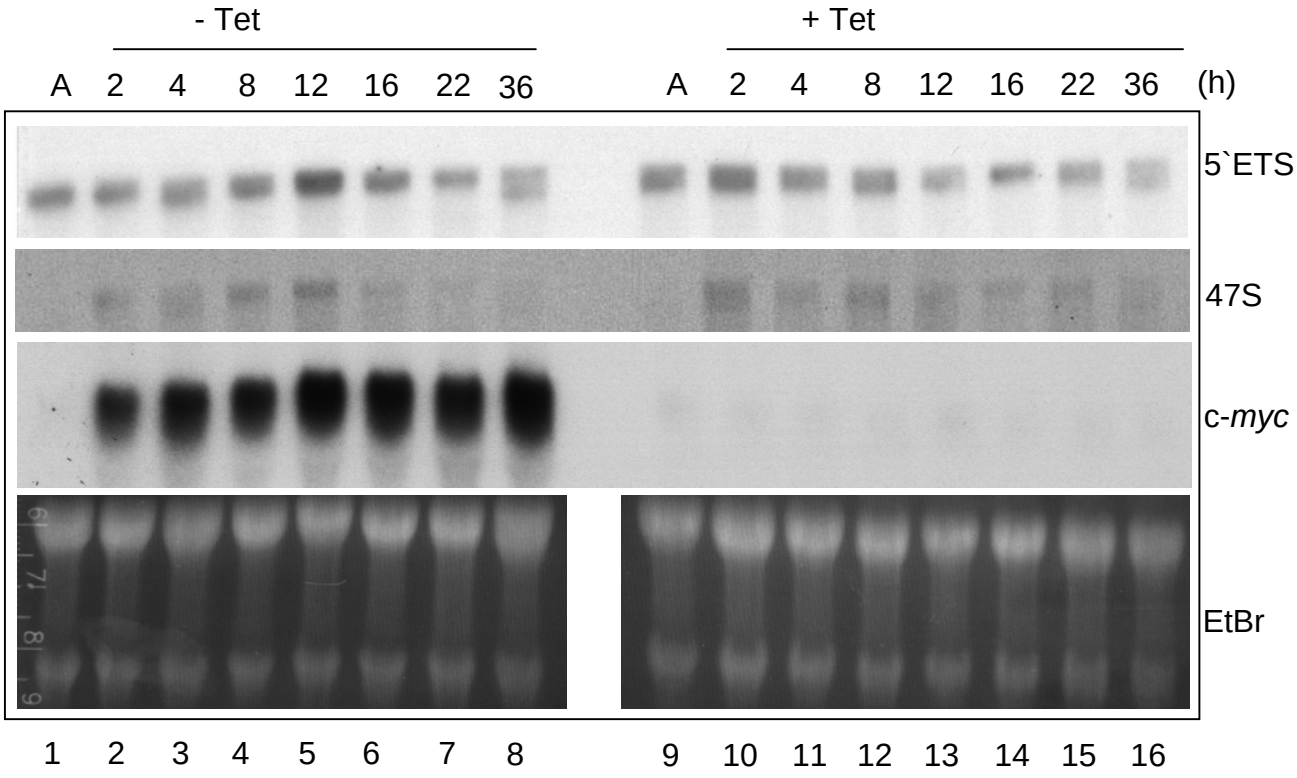


Abb. 21 Kinetik der 47S rRNA-Produktion. P493-6 Zellen wurden für 72h arretiert (A) und anschließend in der Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Tet für die angegebene Zeit Serum-stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit ^{3}H-Uridin für 30min puls-markiert und nach einer Stunde „Chase" wurden die RNAs wie beschrieben fluorographisch visualisiert (47S). Derselbe Blot wurde mit einer Probe spezifisch für c-*myc* und die 5`ETS-Sequenz des 47S Vorläufers hybridisiert.

Der Nachweis des 47S Vorläufers in unstimulierten Zellen war überraschend. Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung spezifisch für P493-6 Zellen ist, wurde die parentale Zelllinie EREB2-5 (Kempkes et al., 1995) getestet. EREB2-5 Zellen sind primäre B-Lymphozyten, die mit einer EBV-Mutante, die konditional EBNA2-ER exprimiert, immortalisiert wurden. Die Abwesenheit von Östrogen versetzt EREB2-5 Zellen in einen Ruhezustand. Arretierte Zellen, die für 72h in Abwesenheit von Östrogen und Serum gehalten wurden, zeigten in der Northern-Blot-Analyse kein Signal für den 47S Vorläufer. Nach Stimulation mit Serum in An- und Abwesenheit

von Östrogen war die Expression des 47S Vorläufers deutlich nachweisbar (Abb. 22, 5`-ETS).

Folglich ist die hohe Expression des 47S Vorläufers spezifisch für arretierte P493-6 Zellen. Die Expression des 47S rRNA-Vorläufers in arretierten P493-6 Zellen könnte auf einer undichten Regulation des Tet-regulierten *myc*-Konstruktes beruhen (s. Diskussion).

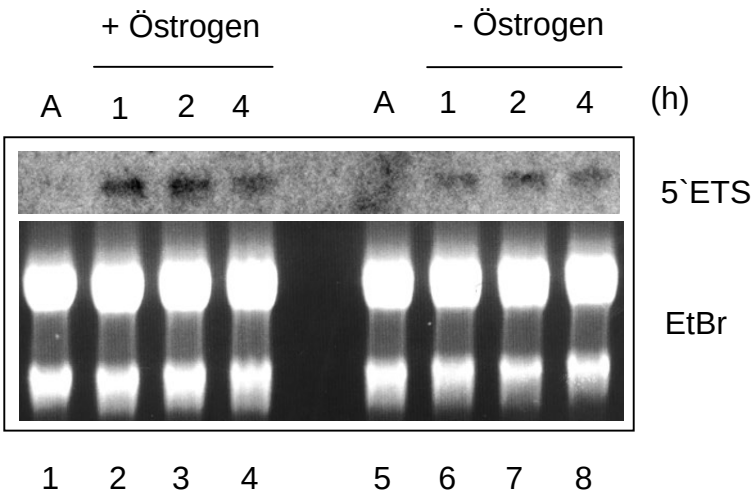


Abb. 22 Expression des 47S rRNA-Vorläufers in EREB2-5 Zellen. Den Zellen wurde für 72h Serum und Östrogen entzogen (A). Anschließend wurden sie für die angegebene Zeit in Anwesenheit oder Abwesenheit von Östrogen mit Serum stimuliert. Der 47S Vorläufer wurde in der Northern-Blot-Analyse mit einer 5`-ETS-Probe analysiert.

4.3.1 Dichte der RNA-Polymerase I auf ribosomalen Genen

In dem unter 4.2.3 beschriebenen „Pulse-Chase“-Experiment wurde gezeigt, dass die radioaktive Markierung des 47S Vorläufers nur nach Serumstimulation der P493-6 Zellen erfolgt. In Northern-Blot-Analysen war der 47S Vorläufer jedoch auch in arretierten Zellen nachweisbar. Da unter diesen Bedingungen keine Transkription des 47S Vorläufers stattfindet, könnte sein Nachweis durch eine Stabilisierung eines bereits transkribierten Vorläufers erklärt werden. Eine detailliertere Analyse der Transkription des 47S Vorläufers sollte nun in nukleären „Run-On“-Experimenten erfolgen. Bei der „Run-On“-Methode werden aus Zellen intakte Kerne isoliert und eingefroren. Bei diesem Prozess werden bereits initiierte RNA-Polymerase-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 mit Filtern, die bestimmte Oligonukleotid-Proben tragen, hybridisiert. Da im „Run-On“ nur naszierende, also gerade transkribierte RNA markiert wird, findet diese Methode häufig Verwendung, um die Veränderung der Transkriptionsrate eines Gens unmittelbar zu messen.

Um die Dichte der RNA-Polymerase-I-Moleküle auf den rDNA-Genen zu bestimmen, wurden vor und nach Stimulation von P493-6 Zellen nukleäre „Run-on“-Experimente durchgeführt. In arretierten P493-6 Zellen wurden starke Transkriptions-signale für die Oligonukleotid-Proben, die den Sequenzen der 5.8S, 18S, und 28S rDNA entsprechen, gemessen (Abb. 23, A; Spur 1). Diese Signale erhöhten sich nur unwesentlich, wenn die Zellen für 12h mit Myc und Serum (Spur 2) oder mit Serum alleine (Spur 3) stimuliert wurden.

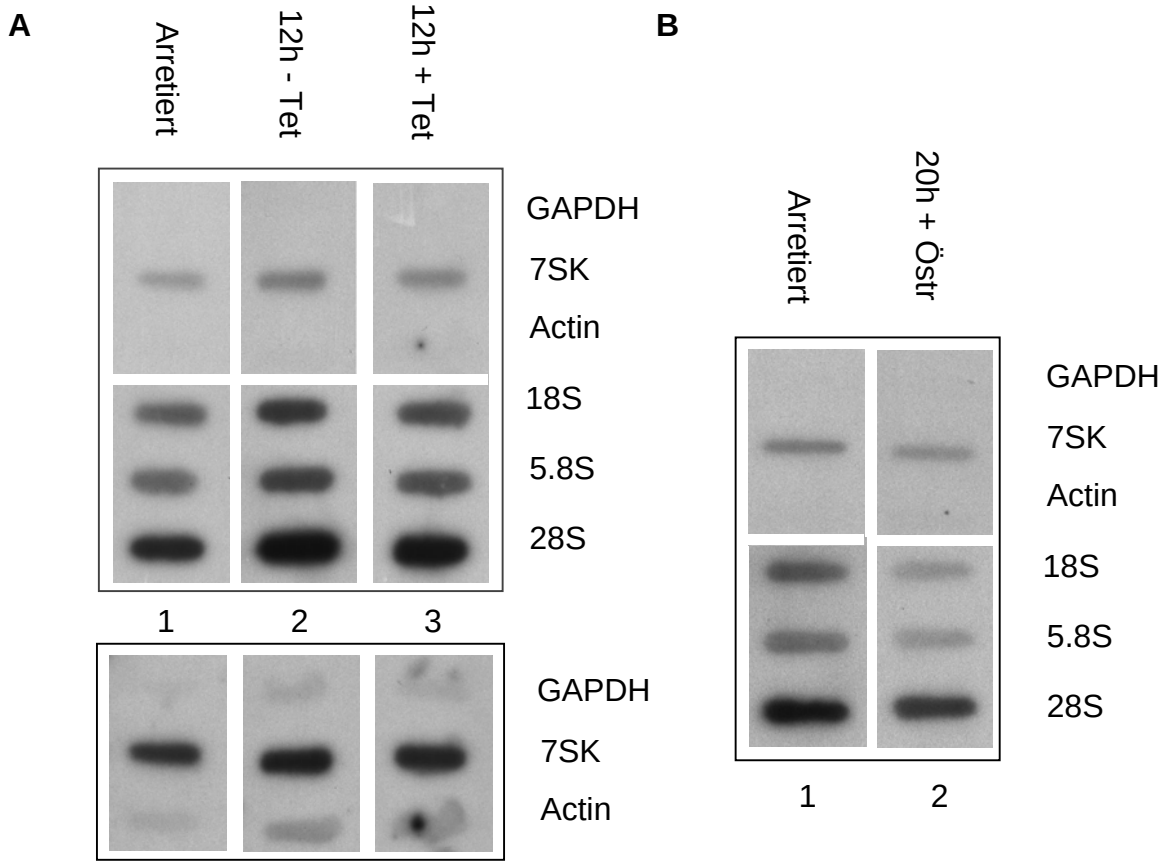


Abb. 23 Dichte von Pol-I-Komplexen auf ribsomalen Genen. (**A**) Zellkerne von arretierten P493-6 Zellen und von Zellen 12h nach Serumstimulation in Ab- bzw. Anwesenheit von Tet wurden für die nukleäre „Run-on“-Reaktion isoliert. Nach erfolgter Markierung wurden die RNAs mit Proben, die spezifisch für die angegebenen Gene sind, hybridisiert. Eine sechs-fach längere Exposition für die Proben GAPDH, 7SK und Actin ist unten gezeigt. (**B**) Arretierte EREB2-5 Zellen wurden für 20h mit Östrogen stimuliert und die „Run-on“-Reaktion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Signale für die Pol-II-transkribierten Gene GAPDH und Actin konnten erst nach einer sechs-fach längeren Expositionszeit detektiert werden. Alle Signale wurden >95% unterdrückt, wenn die Zellen 1h zuvor mit 2µg/ml Actinomycin-D, einem Transkriptionsinhibitor, behandelt wurden (nicht gezeigte Daten).

Die hohe Dichte der Pol-I-Komplexe auf den ribosomalen Genen in arretierten P493-6 Zellen war ein überraschendes Ergebnis, da normalerweise die rRNA-Synthese abgeschaltet wird, wenn Zellen Nährstoffe bzw. Wachstumsfaktoren entzogen werden (Grummt, 1999). Diese hohe Dichte an Pol-I-Komplexen könnte eine Erklärung für die starken Signale des 47S Vorläufers im Northern-Blot in arretierten P493-6 Zellen sein. Um dieses unerwartete Ergebnis auch in anderen Zellen zu untersuchen, wurden arretierte EREB2-5 Zellen, Smoxi-4 Zellen und humane primäre Fibroblasten analysiert (Abb. 23, B und Abb. 24 A, B). In allen Experimenten wurden in arretierten Zellen hohe Level an Pol-I-Komplexen auf ribosomalen Genen gefunden, die auch nach Stimulation nicht signifikant anstiegen.

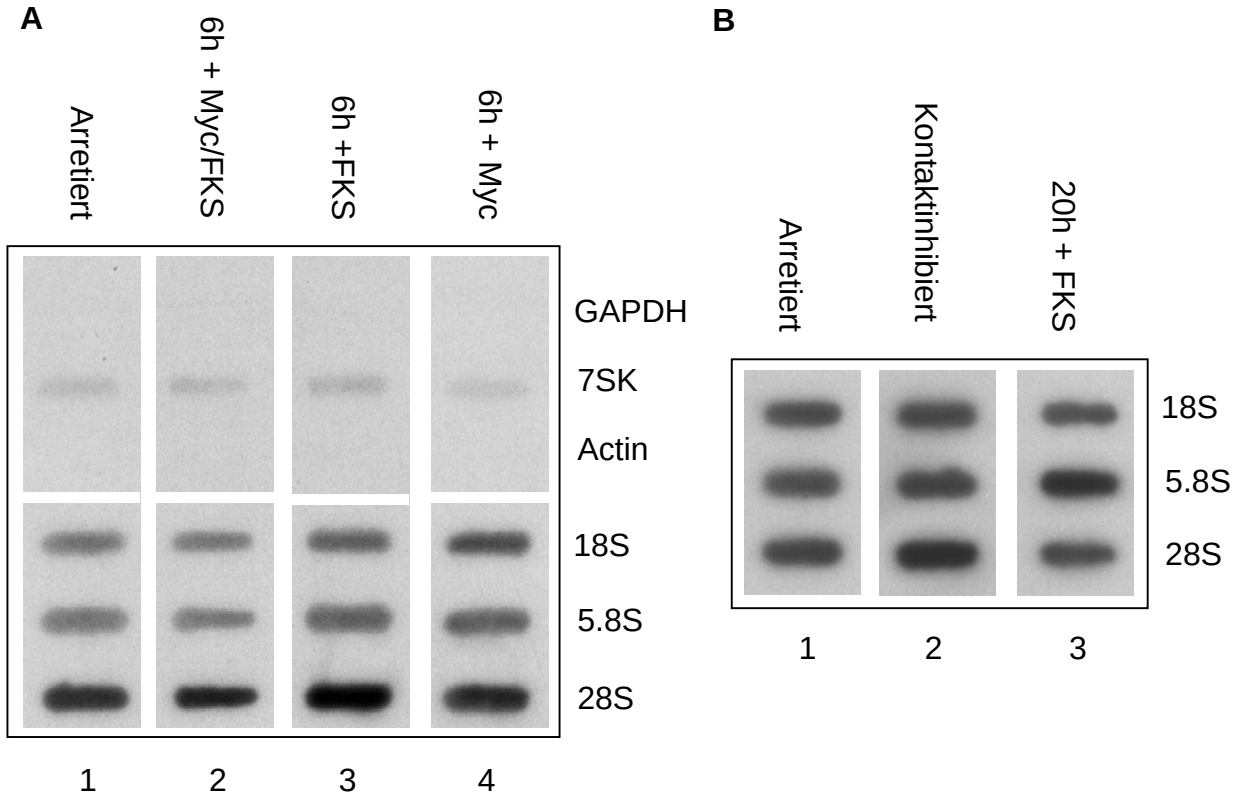


Abb. 24 „Run-on“ Versuch in Smoxi-4 Zellen und humanen Fibroblasten. (**A**) Durch Serumentzug arretierte Smoxi-4 Zellen wurden für 6h mit Myc/FKS, FKS oder Myc stimuliert. (**B**) Humane primäre Fibroblasten wurden für 72h in 0.25% FKS arretiert, kontaktinhibiert oder für 20h Serum-stimuliert.

Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass in arretierten Zellen die Pol-I-Komplexe an zahlreichen Positionen auf den ribosomalen Genen pausieren. Isoliert man Zellkerne aus diesen arretierten Zellen und führt eine „Run-on“-Reaktion durch, so werden die pausierenden Pol-I-Komplexe aktiviert und die Transkription erfolgt. Die Ergebnisse der „Run-on“-Experimente lassen darauf schließen, dass die Transkription der rDNA-Gene hauptsächlich auf der Ebene der RNA-Elongation reguliert ist.

Myc wurde kürzlich in der Regulation einiger RNA-Polymerase-III-spezifischer Gene beschrieben (Gomez-Roman et al., 2003). Jedoch wurden in dieser Arbeit keine Unterschiede des Transkriptionssignals des Pol-III-spezifischen 7SK Gens in P493-6 und Smoxi-4 Zellen nach *myc*-Aktivierung beobachtet. (Abb. 23 und 24, A). Zur Kontrolle wurde ein Northern-Blot mit einer 7SK-Probe, mit den unter 4.2.2 beschriebenen RNAs durchgeführt (Abb. 25). Es konnte kein Unterschied in der Menge der 7SK-mRNA vor und nach *myc*-Induktion festgestellt werden. Es scheint, als ob 7SK ein Beispiel für ein nicht durch Myc reguliertes Pol-III-Transkript ist.

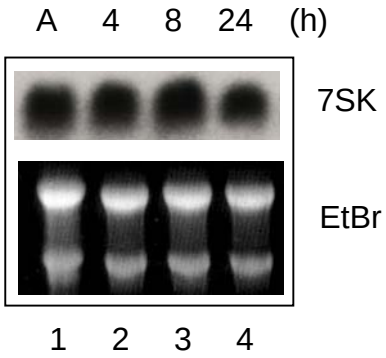


Abb. 25 Regulation des Pol-III-spezifischen Transkripts 7SK durch Myc. Northern-Blot-Analyse in P493-6 Zellen mit einer 7SK Probe. Zellen wurden für 72h arretiert (A) und für 4, 8 und 24 h mit Myc stimuliert. Die Regulation des Gens wird durch Myc nicht beeinflusst.

4.4 Die Struktur des Nukleolus

Die oben beschriebene Transkription und Prozessierung der rRNA findet ausschließlich im Nukleolus statt. Dieser unterteilt sich in die drei unterschiedlichen Bereiche fibrilläres Zentrum (FC), dichte, fibrilläre Komponente (DFC) und granuläre Komponente (GC). Diese Bereiche sind durch verschiedene Profile von nukleolären Proteinen charakterisiert und für die unterschiedlichen Aspekte während der Ribosomenbiogenese spezialisiert. Aufgrund dieser räumlichen Spezialisierung erfolgen frühe Schritte der rRNA-Prozessierung im FC, mittlere im DFC und späte im GC.

4.4.1 Der nukleoläre Proliferationsmarker Ki-67 und die rRNA-Prozessierung

Eine genaue Untersuchung mit hoch auflösenden, konfokalen Lasermikroskopen zeigte, dass das Protein Ki-67 unter anderem in der dichten, fibrillären Komponente (DFC) des Nukleolus lokalisiert ist (MacCallum und Hall, 2000). Die Expression des Ki-67 Proteins ist sehr eng mit Zellproliferation verbunden, d.h. es wird nur in Zellen, die sich im Zyklus befinden, exprimiert. Daher wurde das Ki-67 Protein in der diagnostischen Pathologie als so genannter Proliferationsmarker etabliert (Gerdes, 1988). Lokalisationsstudien haben gezeigt, dass in der frühen G1-Phase des Zellzyklus Ki-67 sowohl nukleolär als auch nukleär zu finden ist. Dies bezeichnet man als Typ I-Färbung. Die Typ II-Färbung, die während der Progression von der G1- in die S-Phase auftritt, ist ausschließlich nukleolär.

Als Element des DFC könnte Ki-67 in die Prozessierung der ribosomalen RNA involviert sein. Ki-67 wurde erst kürzlich als „Effizienzfaktor“ in der Ribosomenbiogenese vorgeschlagen (MacCallum und Hall, 2000). Ein „Yeast Two-Hybrid Screen“ ergab die Interaktion von Ki-67 mit mehreren ribosomalen Proteinen, Fibrillarin und der S6-Kinase (Schmidt et al., 2003). Auch die Identifizierung des Ki-67 interagierenden Phospho-Proteins Nopp34 als Myc-Zielgen in P493-6 Zellen (Tabelle 3) unterstützt die Annahme, dass Ki-67 eine potentielle Rolle in der Myc-induzierten rRNA-Prozessierung spielt. Daher wurde die Regulation von Ki-67 durch Myc genauer untersucht.

Ki-67 wird den Genchip-Experimenten zufolge in P493-6 Zellen exprimiert, jedoch scheint die Regulation des Gens nicht von Myc beeinflusst zu werden. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Analysen sollte daher untersucht werden, ob eine

Regulation eventuell auf der Protein-Ebene oder der zellulären Lokalisation vorliegt. Dafür wurde zuerst der Maus-Antikörper anti-Ki-67 (MIB9) in proliferierenden P493-6 Zellen getestet. In Abbildung 26 sind sehr gut die nukleär-nukleoläre Typ I Färbung (Pfeil) und die ausschließlich nukleoläre Typ II Färbung (Pfeilkopf) von Ki-67 zu sehen. In der Hellfeld-Aufnahme und nach Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI stellen sich die Nukleoli als diskrete Formen im Zellkern dar. Wie erwartet waren fast alle der untersuchten Zellen Ki-67-positiv. Proliferierende P493-6 Zellen lassen sich folglich sehr gut mit dem Ki-67-Antikörper MIB9 anfärben.

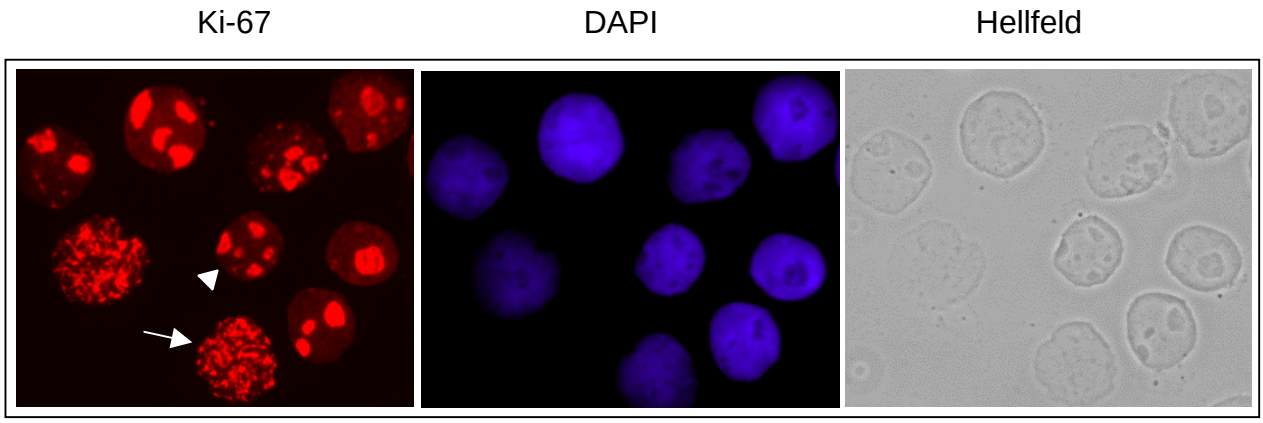


Abb. 26 Ki-67-Färbung in proliferierenden P493-6 Zellen. 400-fache Vergrößerung der Ki-67- und DAPI-Färbung. Außerdem ist eine Hellfeld-Aufnahme dargestellt. Deutlich ist die Typ I-Färbung (Pfeil) und die Typ II-Färbung (Pfeilkopf) von Ki-67 zu sehen. Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt.

Myc induziert in P493-6 Zellen die Prozessierung der rRNA. Diese Induktion erfolgt sowohl in An- wie auch in Abwesenheit von Serum. Arretierte Zellen zeigen gar keine, serum-stimulierte Zellen nur eine sehr geringe rRNA-Prozessierung. Es stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Ki-67-Färbung bezogen auf die Quantität und die Qualität (Typ I- und/oder Typ II-Färbung) und der Myc-induzierten rRNA-Prozessierung gibt. Um diese Frage zu beantworten, wurden arretierte P493-6 Zellen für 24h jeweils mit Myc, mit FKS oder mit Myc/FKS stimuliert, fixiert und anschließend mit dem Ki-67-Antikörper gefärbt (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise gab es keinen Unterschied in der Anzahl an Ki-67-positiven Zellen. In allen vier Ansätzen wurden im Durchschnitt ca. 25% positive Ki-67-Zellen beobachtet. Auch war keine Änderung im Verhältnis von Typ I- zu Typ II-Färbung sichtbar. Das Verhältnis bliebt durchschnittlich bei 1 : 5 (Typ I : Typ II).

Es scheint also, dass Ki-67 bei der Myc-induzierten rRNA-Prozessierung in P493-6 Zellen keine Rolle als „Effizienzfaktor“ spielt, da es weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene reguliert wird. Wahrscheinlich ist auch die unterschiedliche Verteilung des Proteins (Typ I/Typ II-Färbung) unwichtig für diese Prozesse. Es bleibt abzuwarten, ob Ki-67 in anderen Zellsystemen die rRNA-Prozessierung beeinflusst.

4.4.2 Ribosomale RNA-Prozessierung und Cdk-Aktivität

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass Myc die Prozessierung der ribosomalen RNA in P493-6 Zellen induziert und dass Myc die Menge und Lokalisation von Ki-67 nicht beeinflusst. Die Prozessierung der rRNA wird auch durch die Aktivität Zellzyklus-abhängiger Kinasen (Cdks) reguliert. Sirri und Kollegen zeigten, dass die Prozessierung der rRNA reversibel durch Cdk-Inhibitoren gehemmt wird. Die Cdk-Aktivität ist auch unerlässlich für die Bildung eines funktionalen Nukleolus (Sirri et al., 2002).

Welchen Einfluss hat die Cdk-Aktivität auf die Myc-induzierte rRNA-Prozessierung? Um diese Frage zu beantworten, wurde die rRNA-Prozessierung in P493-6 Zellen in Anwesenheit des Cdk2-Inhibitors Roscovitin analysiert (Abb. 27). „Pulse-chase“-Experimente mit ^{3}H-Uridin zeigten, dass die Prozessierung der 47S rRNA nach 6 h Roscovitin-Behandlung fast komplett gehemmt wurde, während der Effekt auf die 47S rRNA-Transkription nur gering war (Abb. 27, A). Es scheint also, dass die rRNA-Prozessierung in P493-6 Zellen auch von der Cdk-Aktivität abhängt.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Roscovitin eine schnelle Auflösung der Struktur des Interphase-Nukleolus bewirkt (Sirri et al., 2002). Diese Disintegration wurde auch in proliferierenden P493-6 Zellen beobachtet, die für 16h mit Roscovitin behandelt wurden. Die Auflösung der Nukleoli begann schon nach ca. 4h, gezeigt wird ein Bild der Nukleoli nach 16h (Abb. 27, B). Kontrollzellen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt, das keine Wirkung auf die Nukleoli zeigte. In vorherigen Versuchen mit P493-6 Zellen wurde gezeigt, dass Myc auch in Anwesenheit von Roscovitin noch Wachstum induzieren kann, obwohl der Cdk-Inhibitor zu einem Arrest des Zellzyklus führt (Schuhmacher et al., 1999). Diese vorherigen Beobachtungen und die hier gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass Myc in P493-6 Zellen Wachstum induziert, sogar wenn Cdk2-Aktivität und *de novo* rRNA-Synthese und damit die Ribosomenbiogenese gehemmt sind.

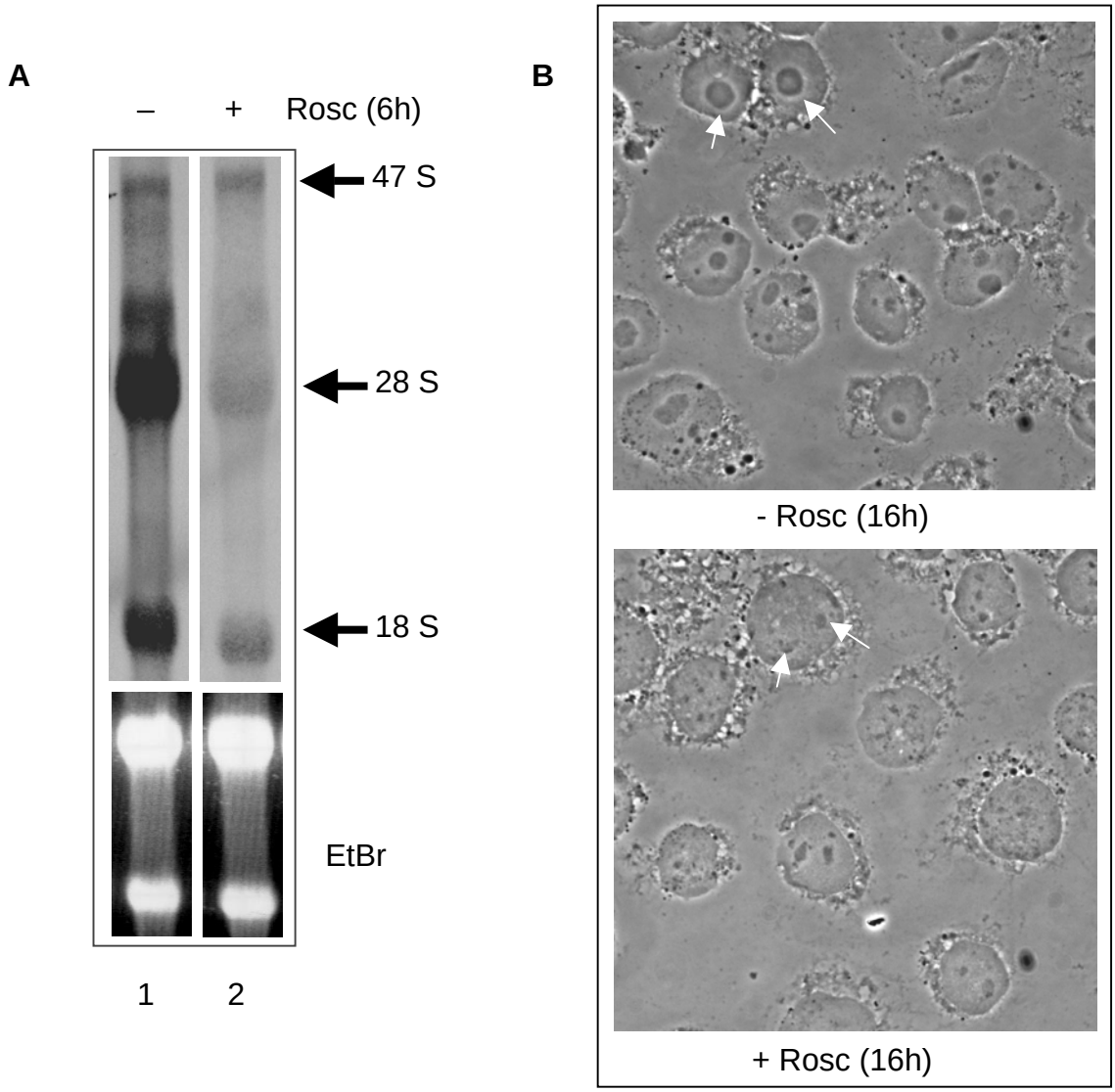


Abb. 27 Hemmung der rRNA-Prozessierung durch Roscovitin. (**A**) Proliferierende P493-6 Zellen wurden mit ^{3}H-Uridin für 6h in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) von 30 µM Roscovitin (Rosc) markiert. Die rRNA wurde wie schon beschrieben analysiert. (**B**) Proliferierende P493-6 Zellen wurden für 16h in Anwesenheit von 30 µM Roscovitin kultiviert. Pfeile markieren in DMSO-behandelten Kontrollzellen intakte Nukleoli bzw. pre-nukleoläre “Bodies” nach Behandlung mit Roscovitin.

4.5 Detaillierte Analyse von Zielgenen mit siRNA

P493-6 Zellen zeigen nach Aktivierung von Myc eine stark induzierte Prozessierung der ribosomalen RNA. Die Genchip-Ergebnisse ergaben, dass Myc eine große Anzahl von nukleolären Genen, die in die rRNA-Prozessierung involviert sind, induziert. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass Myc über seine nukeolären Zielgene die rRNA-Prozessierung reguliert. Was ist der Beitrag der einzelnen Zielgene zu dieser Regulation? Für die Beantwortung dieser Frage bieten sich

verschiedene Methoden an. In dieser Arbeit wurde hierfür die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) etabliert. RNAi beruht auf dem sequenz-spezifischen, post-transkriptionalen „gene-silencing“, das durch doppelsträngige RNA (dsRNA), die homolog zu der Sequenz des entsprechenden Gens ist, ausgelöst wird. Der Mediator des sequenz-spezifischen mRNA-Abbaus sind „small interfering“ RNAs (siRNAs), die aus den dsRNAs durch Prozessierung durch den sogenannten „Dicer“-Komplex generiert werden. Bei der RNAi wird nicht immer ein vollständiger Abbau aller Transkripte eines Gens erreicht, weswegen man auch von einem „*knock-down“* in Analogie zu einem „*knock-out*“ spricht.

Die RNAi-Methode wurde zunächst am Beispiel *myc* etabliert. Die Etablierung der Technik erfolgte in den TGR-1/MycER Zellen. TGR-1/MycER Zellen tragen analog zu den Smoxi-4 Zellen das LXSH-MycER-Konstrukt. Während Smoxi-4 Zellen jedoch durch einen *myc-knock-out* charakterisiert sind, tragen die TGR-1/MycER Zellen zusätzlich noch das endogene *myc*-Wildtypgen. *Myc-knock-out* Zellen zeigen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten und einen anderen Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (s. unten). In TGR-1/MycER Zellen kann man den erfolgreichen Abbau der *myc*-mRNA und des Myc-Proteins im Northern- und Western-Blot kontrollieren. Zusätzlich stellt die Induktion des *myc-knock-out*-Phänotyps in den TGR-1/MycER Zellen eine weitere Kontrolle für eine erfolgreiche RNAi dar.

Für die RNAi-Methode standen in dieser Arbeit synthetische 21 Nukleotid-lange siRNAs zur Verfügung. Die Auswahl der Sequenzen für die siRNAs Myc1 und Myc2 erfolgte aufgrund von Homologien zu verschiedenen, in Mensch, Maus und Ratte konservierten Bereichen von *myc*. Ein Abgleich der Sequenzen mit EST-Datenbanken bestätigte eine ausschließliche Homologie der siRNAs zu *myc*.

Die Transfektion der TGR-1/MycER Zellen mit 0,1 µg und 0,5 µg siRNA Myc1 und Myc2 erfolgte für 5h mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen wurden auch siRNAs homolog zu Sequenzen des Kanamycin-Resistenzgens (Ka) verwendet. Die Zellen wurden 48h nach der Transfektion lysiert und die Proteinmenge von Myc wurde im Western-Blot analysiert (Abb. 28, A). Der Western-Blot zeigt, dass die Myc-Mengen nach Transfektion mit der siRNA Myc1 im Vergleich zu den Puffer- und Kanamycin-Kontrollen stark reduziert wurden. Der *knock-down* von *myc* war schon bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml sichtbar, er wurde jedoch bei einer höheren Konzentration (1 µg/ml) noch

deutlicher. Im Gegensatz dazu war der *knock-down* durch die Myc2 siRNA nicht erfolgreich. Wahrscheinlich war die ausgewählte Sequenz nicht geeignet für die RNAi.

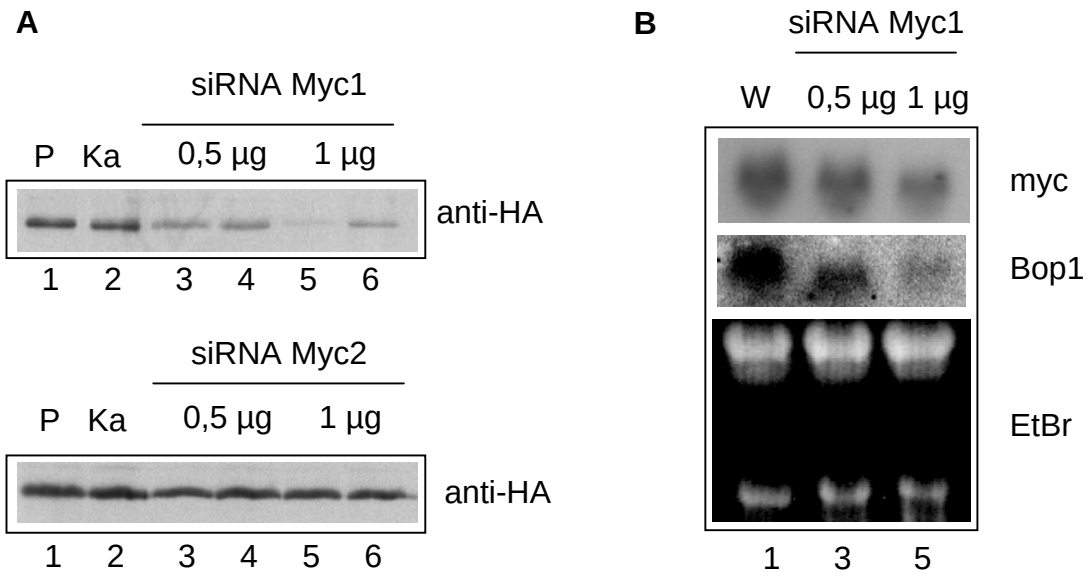


Abb. 28 *Knock-down* von Myc durch siRNA. TGR-1/MycER Zellen wurden für 5h mit Myc1 und Myc2 siRNA transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen im Western Blot **(A)** mit einem anti-HA Antikörper und im Northern Blot **(B)** mit Proben für *myc* und dem Myc-Zielgen Bop1 analysiert. 1: Kontroll-Transfektion mit Puffer (P), 2: 0,5 µg Kanamycin siRNA, 3 und 4: 0,5 µg siRNA, 5 und 6: 1 µg siRNA

Da das MycER-Protein ein Hämagglutinin-Epitop (HA-Tag) trägt ist es mit einem anti-HA Antikörper im Western-Blot detektierbar ist. Die Auswirkungen der RNAi auf das endogene Myc konnten nicht analysiert werden, da zur Zeit kein guter Antikörper für murines Myc verfügbar ist.

Auch die Northern-Blot-Analyse (Abb. 28, B) bestätigte den *knock-down* von *myc*. Die Reduktion der *myc*-mRNA erscheint im Northern-Blot eher gering. Eine Analyse des Myc-Zielgens Bop1 ergab jedoch, dass die Expression dieses Gens nach Transfektion mit Myc1 siRNA stark reprimiert wurde, was dafür spricht, dass die Menge an Myc sowohl des exo- als auch des endogenen Proteins in ausreichendem Maß reduziert wurde.

Myc-knock-out-Fibroblasten zeichnen sich durch einen besonderen Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp aus (Hölzel et al., 2001). In dem Smoxi-4 Zellsystem, bei dem in *myc*-/- Fibroblasten konditional MycER aktiviert werden kann, lässt sich dieser Unterschied gut darstellen (Abb. 29 A). Zum Zeitpunkt 0h wurde jeweils eine kleine Zellkolonie von gleicher Größe ausgesucht. 50h nach Myc-Aktivierung

beanspruchten die Zellen kaum mehr neue Fläche, d.h. die Zelldichte hatte deutlich zugenommen. Die Form der anfänglichen Zellkolonie war weitgehend erhalten geblieben und die Zellen waren klein und spindelförmig. Im Vergleich dazu zeigten Zellen ohne Myc-Aktivierung eine flache, gespreizte Form, bei der der Zellkern von viel Zytoplasma umgeben ist. Die Zellen breiteten sich ohne besondere Orientierung in der Peripherie aus und die hier entstandene Zelldichte war deutlich geringer als unter Myc-Aktivierung.

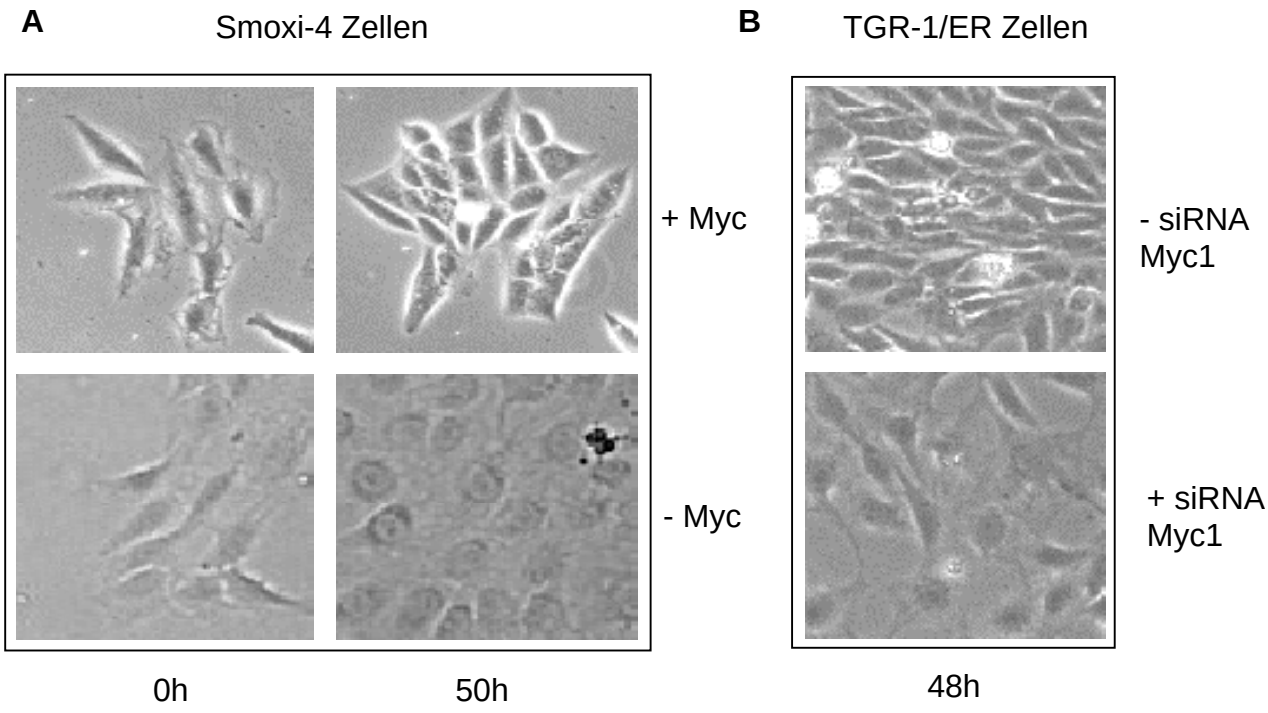


Abb. 29 *Myc-knock-out*-Phänotyp in Smoxi-4 und siRNA-transfizierten TGR-1/ER Zellen. (**A**) Smoxi-4 Zellen 0h und 50h nach (+ Myc) bzw ohne (-Myc) Zugabe von 4-OHT. Der Unterschied im Phänotyp ist klar zu erkennen. (**B**) TGR-1/ER Zellen 48h nach Transfektion mit 0,5 µg/ml siRNA Myc1 bzw. nach leer Transfektion. Der *myc-knock-out*-Phänotyp konnte deutlich induziert werden. Phasenkontrastaufnahmen in 400-facher Vergrößerung.

Kann die oben beschriebene erfolgreiche RNAi von *myc* auch den *myc-knock-out*-Phänotyp bei den transfizierten Zellen induzieren? In Abbildung 29 B sind TGR-1/ER Zellen 48h nach Transfektion mit siRNA Myc1 bzw. nach Kontroll-Transfektion mit dem Puffer dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die leer-transfizierten Zellen eine sehr viel höhere Dichte aufweisen bzw. kleiner und spindelförmig erscheinen. Nach Transfektion mit Myc1 siRNA stellen sich die Zellen ausgebreitet mit einem großen Zytoplasmasaum um den Zellkern herum dar. Auch scheint es, dass diese

Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen eine gewisse Orientierung zeigen. Vergleicht man nun diese beiden Bilder mit denen des zuvor beschriebenen Smoxi-4 Zellsystems, so kann abschließend fest gehalten werden, dass durch die Transfektion mit Myc1 siRNA eine erfolgreiche RNAi des *myc*-Gens möglich wurde, die durch einen induzierbaren *myc-knock-out*-Phänotyp charakterisiert war.

Nachdem die RNAi von *myc* erfolgreich in TGR-1/ER Zellen beschrieben werden konnte, wurden anschließend die nukleolären Gene Bop1, Nop56 und Fibrillarin untersucht werden. Jeweils zwei verschiedene siRNA-Sequenzen wurden in dem TGR-1/ER-Zellsystem auf ihre siRNA-Aktivität getestet. Es stellte sich heraus, dass keine der getesteten siRNAs einen *knock-down* des betreffenden Gens induzieren konnte (Daten nicht gezeigt). Die Weiterentwicklung der RNAi-Technik, speziell der Vektorsysteme, wird in Zukunft eine gute Alternative sein, Gene und deren Funktionen zu analysieren. Auch für die Untersuchung der Funktionen der einzelnen Myc-Zielgene, die in die rRNA-Prozessierung involviert sind, wird die RNAi-Methode sicherlich einen wichtigen Beitrag leisten, auch wenn erste *knock-downs* von Zielgenen, wie hier beschrieben, noch nicht erfolgreich waren.

5. DISKUSSION

5.1 Identifizierung von Myc-Zielgenen in P493-6 und Smoxi-4 Zellen

Die Grundlage dieser Arbeit war die zu Beginn durchgeführte Hochdurchsatz-Suche nach Zielgenen des Proto-Onkoproteins Myc. Dazu wurde die Affymetrix Chip-Technologie in den zwei konditionalen Zellsystemen P493-6 und Smoxi-4 angewandt. Der genomweite Screen nach Myc-Zielgenen in P493-6 Zellen beschreibt die Erweiterung einer zuvor durchgeführten Genchip-Analyse von ca. 6800 bekannten Genen (Schuhmacher et al., 2001). Die Suche nach Myc-Zielgenen wurde in dieser Arbeit auf ca. 60 000 Gen- und EST-Proben (Chip-Satz HU95 A-E) ausgeweitet.

Die Proliferation von P493-6 Zellen erfolgt nur, wenn *myc* in Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS) exprimiert wird. Wird *myc* in Abwesenheit von FKS aktiviert, induziert es Zellwachstum. Die Proliferation der Zellen bleibt jedoch aus (Schuhmacher et al., 1999). Die Annahme war, dass sowohl das Wachstum der Zellen als auch die Proliferation durch genetische Instruktionen reguliert wird. Daher wurde untersucht, ob und wie Serum die Regulation bestimmter Myc-Zielgene moduliert bzw. ob es unterschiedliche Expressionsprofile gibt, die jeweils mit Wachstum bzw. Proliferation korrelieren. Die Analyse der Expressionsprofile erfolgte in den P493-6 Zellen in An- und Abwesenheit von Serum.

In Anwesenheit von FKS wurden insgesamt 1067 induzierte und 137 reprimierte Gene (Chips A-E) nach 8h *myc*-Induktion identifiziert. In Abwesenheit von FKS wurden insgesamt 668 induzierte und 160 reprimierte Gene (Chips A-B) beschrieben. In beiden Versuchen wurden bekannte Myc-Zielgene bestätigt und neue Zielgene identifiziert. Für einige Gene wurde die Regulation durch Myc in Northern-Blots bestätigt.

Ein Vergleich beider Expressionsprofile zeigte erwartungsgemäß quantitative wie auch qualitative Unterschiede. Die Einteilung der identifizierten Zielgene aus beiden Versuchen in drei verschiedene Gruppen verhalf zu einer anschaulicheren Struktur der Ergebnisse. Gene, die in Ab- wie auch in Anwesenheit von Serum fast gleich stark induziert wurden, wie z.B. Nm23, Rab9 effector p40 oder KIAA0116 (Tab. 1, Gruppe 1) werden wahrscheinlich keine Hinweise auf die ausbleibende Proliferation der P493-6 Zellen in Abwesenheit von Serum geben. Dies ist eher der

Fall für Gene, die ohne FKS schwächer induziert bzw. reprimiert werden. Es könnte sein, dass für die Aktivierung des Zellzyklus durch Myc die Expression bestimmter Gene einen Schwellenwert überschreiten muss, der nur in Anwesenheit von Serum erreicht wird. Potentielle Kandidaten dafür könnten eukaryotic translation initiation factor 1A, FK506 binding protein 4, ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 oder histone deacetylase 2 sein (Tab. 1, Gruppe 1). Für Gene, die ohne FKS schwächer reprimiert werden als mit FKS, ist vorstellbar, dass ihre Repression nicht stark genug ist und ihre inhibierende Funktion noch ausreicht, die Proliferation der Zellen zu verhindern.

Ein interessantes Ergebnis ist die Repression des Retinoblastoma-Tumorsuppressorgens (Rb) durch Myc. Rb wird nur in Anwesenheit von FKS stark reprimiert (Tab. 2, Gruppe 2). In Abwesenheit von Serum wird das Gen exprimiert, aber nicht durch Myc reprimiert. Die Repression des Rb-Gens in Serum-haltigem Medium korreliert mit einer transienten Abnahme des Rb-Proteins zwischen 4h und 12h nach *myc*-Induktion in P493-6 Zellen (Pajic et al., 2000). Da das Myc-Protein 4h nach Induktion im Western Blot detektierbar ist, ist diese Repression wahrscheinlich eine direkte Folge der Myc-Aktivität. Nach 16h liegt die Proteinmenge von Rb wieder auf dem Level von proliferierenden Zellen (Pajic et al., 2000).

Das Rb-Protein liegt in proliferierenden Zellen in der aktiven, hypophosphorylierten und der inaktiven, hyperphosphorylierten Form vor. Die Inaktivierung des Rb-Proteins durch die Hyperphosphorylierung führt zur Zellzyklus-progression. Die Repression von *myc* führt zu einer signifikanten Reduktion des inaktiven, hyperphosphorylierten Rb-Proteins. Die Zellen arretieren im Zyklus. Erst 12h nach *myc*-Induktion ist die hyperphosphorylierte Form von Rb wieder nachweisbar (Pajic et al., 2000). Die transiente Repression des Rb-Proteins und die Induktion der Hyperphosphorylierung durch Myc wurden wie die Repression des Rb-Gens in serum-haltigen Medium beobachtet. Die Repression des Proteins und Gens sowie die Hyperphosphorylierung tragen zur Inaktivierung von Rb und damit zur Progression durch den Zellzyklus bei.

In Abwesenheit von Serum erfolgt keine Repression des Rb-Gens durch Myc. Dies könnte ein Hinweis auf die Frage sein, warum die P493-6 Zellen nach Myc-Aktivierung in Abwesenheit von Serum nicht proliferieren. Ob diese Annahme zutrifft, müssen weitergehende Untersuchungen zeigen.

Für die schon oben beschriebene Fragestellung, warum P493-6 Zellen nur in Anwesenheit von Myc und FKS proliferieren, wurde eine weitere Analyse aller mit dem A-Chip generierten Primärdaten durchgeführt. Eine weitere Analyse der Daten war aus verschiedenen Gründen von Vorteil. Die Vergleichsanalysen zwischen Myc-induzierten und nicht induzierten Zellen in An- bzw. Abwesenheit von Serum beschreiben sehr gut die Identifizierung von Myc-Zielgenen. Jedoch verringert sich durch die Kombination der Ergebnisse aus den beiden einzelnen Versuchen (wie in Tabelle 1 geschehen) die statistische Signifikanz der gesamten Liste; d.h. das Konfidenzintervall von 0,95, das für die Ergebnisse jedes einzelnen Versuches (+FKS bzw. –FKS) gilt, verringert sich durch Kombination der Ergebnisse in einer Liste auf 0,90 (0,95 x 0,95). Daher wurde eine Cluster-Analyse nach Eisen (Eisen et al., 1998) durchgeführt. Hierbei wurden von Anfang an alle generierten Primärdaten verwendet und es konnte somit eine höhere statistische Signifikanz erlangt werden (Konfidenzintervall von 0,99). Einen weiteren Vorteil bietet die anschauliche, graphische Darstellung der Ergebnisse.

Das hierarchische Clustern mit den 1380 differentiell regulierten Genen resultierte in 7 Cluster verschiedener Größe, die jeweils durch ein unterschiedliches Expressionsprofil charakterisiert sind (Abb. 15). Der größte Anteil der Gene wird dabei alleine durch Serum reguliert (Cluster 1 und 4, zusammen 833 Gene). Die große Anzahl der durch Serum reprimierten Gene war nicht unerwartet. Iyer und Kollegen beobachtet mit Genchip-Experimenten in humanen Fibroblasten bereits, dass mehr als die Hälfte der durch Serum regulierten Gene reprimiert wurden (Iyer et al., 1999).

Ein weiterer Teil der Gene wird synergistisch (Cluster 2) bzw. antagonistisch (Cluster 7) durch Myc und FKS reguliert. Das Zusammenwirken von Myc und Serum bei der Aktivierung von Genen wurden schon durch Frank und Kollegen beschrieben (Frank et al., 2001). Nach Serumstimulation von Rat1 Zellen konnten sie mit Chromatin-IPs zeigen, dass Myc an E-Boxen im Promotor oder im ersten Exon verschiedener Gene bindet und dort die Acetylierung von H4-Histonen induziert. Der Acetylierung des Chromatins folgte die Expression der Gene. Die Expression eines exogenen *myc*-Gens in Abwesenheit von Serum bewirkte zwar einen ähnlich hohen Acetylierungsstatus der Histone in Rat1 Zellen, jedoch war die Induktion der meisten Gene nur sehr gering. Auch war die Effizienz der Bindung von Myc an die E-Boxen geringer als in Serum-stimulierten Zellen.

Was könnte der Grund für die unterschiedliche Aktvierung von Genen durch Myc in Abhängigkeit von Serum/mitogenen Faktoren sein? In ruhenden Zellen ist das Chromatin dicht gepackt und schwer zugänglich für Transkriptionsfaktoren wie Myc. Die mitogenen Faktoren des Serums könnten hier wichtige primäre Chromatin-Remodellling-Schritte induzieren, die dann erst die Bindung von Myc erlauben. Weiterhin ist eine Acetylierung der H4-Histone nicht immer ausreichend für die Aktivierung eines Gens. Dem Modell von Frank et al. zufolge spielt die Myc-induzierte Acetylierung eine essentielle, permissive Rolle, die die Aktivierung des Gens durch weitere Signale, z.B. durch Serum ermöglicht. Diese Signale können verschiedener Art sein und sich für Myc-Zielgene und/oder Zelltypen unterscheiden. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum die in den letzten Jahren in verschiedenen Zellsystemen identifizierten Myc-Zielgene nicht immer übereinstimmen.

Weiterhin erfolgte die Induktion einiger Gene unabhängig von FKS ausschließlich durch Myc (Cluster 5 und 6). Diese Daten unterstützen die derzeitige Annahme, dass Myc essentiell für die Regulation vieler zellulärer Gene ist und nicht durch andere Serum-induzierte Transkriptionsfaktoren ersetzt werden kann.

Bei einer kleinen Anzahl von Genen (36 Gene, Cluster 3) war die Expression strikt abhängig von Myc und der Anwesenheit von Serum. Auch die Proliferation der P493-6 Zellen erfolgt nur, wenn *myc* in Anwesenheit von Serum exprimiert wird. Eine detaillierte Analyse jedes einzelnen Gens könnte zur Identifikation von Zielgenen führen, die die Funktionen von Myc bei der Induktion des Zellzyklus ersetzen können. Die Kooperation von Myc und FKS bei der Aktivierung dieser Gene könnte wie oben beschrieben erfolgen.

Die genomweite Analyse von Myc-Zielgenen wurde in einem weiteren Zellsystem, den Smoxi-4 Zellen, fortgeführt. Auch diese Analyse ergab die Identifizierung bekannter und neuer Myc Zielgene. In Smoxi-4 Zellen wurden nach 8h MycER-Aktivierung insgesamt 98 induzierte Gene und 21 reprimierte Gene identifiziert. Im Vergleich dazu wurden in P493-6 Zellen insgesamt 1067 induzierte und 137 reprimierte Gene nach 8h *myc*-Induktion identifiziert. Somit wurden in P493-6 Zellen fast zehnmal mehr Gene identifiziert als in Smoxi-4 Zellen.

Für diesen großen Unterschied in der Menge der Zielgene bei den beiden verwendeten Zelllinien kommen verschiedene Faktoren in Frage: Erstens ist der

humane Chipsatz HU95 mit seinen 62 000 Gen-Proben mehr als dreimal so groß wie der für die Smoxi-4 Zellen verwendete RG34 Chipsatz mit 18 000 Genen und ESTs. Zweitens zeigen P493-6 Zellen im Vergleich zu anderen humanen Zelllinien eine sehr hohe *myc*-Expression (Fernandez et al., 2003). In dieser Studie wurden für genomische Myc-Bindungsstellen (E-Boxen in Promotorregionen) zwei Gruppen definiert: hoch-affine und niedrig-affine Bindungsstellen. Die hoch-affine Gruppe beinhaltet geschätzte 11% aller zellulären Genloci, die unabhängig von der Höhe der Expression von Myc besetzt werden. In der niedrig-affinen Gruppe wurden die Genloci nur von überexprimiertem Myc (wie bei P493-6 Zellen) gebunden (Fernandez et al., 2003). Es scheint, dass die genomischen Bindungsstellen um die begrenzte Anzahl der Myc-Moleküle, die sich in Serum-stimulierten Zellen auf ca. 3000 – 6000 Moleküle pro Zelle (mpc) belaufen und in log-Phase-Zellen bei ca. 1000 – 3000 mpc liegt (Waters et al., 1991), konkurrieren. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass in P493-6 Zellen zehnmal mehr Zielgene identifiziert werden konnten als in Smoxi-4 Zellen, da die hoch-affinen Bindungsstellen relativ unabhänig von dem Myc-Level sind und in beiden Zelllinien gebunden werden, während die niedrig-affinen Bindungsstellen nur von Myc besetzt werden können, wenn - wie im Fall von P493-6 Zellen – die Expression von Myc extrem hoch ist.

Ein dritter Aspekt sind die unterschiedlichen Scatter-Analysen (s. Abb. 11 und Abb. 16) der beiden Zelllinien. Sie zeigen, dass die Expression der Kontroll-Smoxi-Zellen sehr viel heterogener ist und weniger mit einander korreliert als die der P493-6 Kontrollzellen. Da aber die Myc-regulierten Gene im Vergleich zu allen Kontroll-Chips induziert bzw. reprimiert sein mussten, fielen bei den Smoxi-4 Zellen viele potentielle Zielgene aufgrund der stringenten Bestimmungen weg.

Abschließend soll noch folgendes zu den Genchip-Ergebnissen erwähnt werden: Aufgrund der oben angesprochenen Unterschiede bei der Genregulation, wie hoch- und niedrig-affine Myc-Bindungsstellen, die Kooperation von Myc mit mitogenen Faktoren und anderer Aspekte, wird das maximal mögliche Expressionsprogramm von Myc, d.h. die Regulation von allen potentiellen Zielgenen wahrscheinlich nur nach Aktivierung komplexer Signalwege, wie nach multiplen onkogen Läsionen erfolgen. Unter physiologischen Bedingungen wird dem Zelltyp entsprechend vielleicht nur ein „Subprogramm“ davon exprimiert.

5.2 Die Rolle von Myc in der ribosomalen RNA-Prozessierung

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, in zwei unterschiedlichen Zelllinien gemeinsame Myc-Zielgene zu bestimmen. Bei der genomweiten Analyse von Myc-Zielgenen wurden sowohl in P493-6 als auch in Smoxi-4 Zellen Gene identifiziert, die an dem Prozess der ribosomalen RNA (rRNA)-Prozessierung und der Ribosomenbiogenese beteiligt sind (Tabelle 3). Insgesamt wurden 64 Gene, die für nukleolär lokalisierte Proteine kodieren, in P493-6 und Smoxi-4 Zellen identifiziert. 26 dieser Gene wurden schon zuvor als Myc-Zielgene beschrieben. Die Mehrzahl der Gene ist an der Ribosomenbiogenese und an der Prozessierung des 47S Vorläufers der ribosomalen RNA beteiligt.

Die Prozessierung der rRNA und die Ribosomenbiogenese sind detailliert in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben worden. Viele der an der rRNA-Prozessierung beteiligten Faktoren, die in der Hefe identifiziert wurden, haben Homologe in Menschen und anderen Eukaryoten. Ein großer Teil dieser Homologe, die in rRNA-Prozessierungs- und Ribosomen-Reifungsschritte involviert sind, konnten hier als Myc-Zielgene identifiziert werden.

Die Kenntnisse über die komplexen Prozesse der Ribosomenbiogenese sind in höheren Eukaryoten, einschließlich des Menschen, noch sehr basal (Fatica und Tollervey, 2002). Daher wird die Hefe bevorzugt als Modellorganismus für die Ribosomenbiogenese herangezogen. Die vor kurzem durchgeführten funktionellen Proteom-Analysen in Hefen haben signifikant das Verständnis über die einzelnen Schritte bei der Ribosomenbiogenese vermehrt (Ho et al., 2002; Gavin et al., 2002). Mit Hilfe einer computergestützten Meta-Analyse aller Proteom-Analysen, die auch die biologischen Daten über die einzelnen Komponenten mit einbezieht, konnten die identifizierten Faktoren bestimmten Komplexen und spezifischen Schritten während der Ribosomenbiogenese zugeschrieben werden (www.pre-ribosome.de)

In dieser Meta-Analyse wurden so genannte Markerproteine (Hauptkomponenten) für Komplexe der 40S- bzw. 60S-Biogenese definiert. Aufgrund der Verteilung dieser Markerproteine, konnten sechs Gruppen identifiziert werden, von denen jeweils drei Komplexe in die Biogenese der 40S- bzw. 60S-Untereinheit involviert sind (Abb. 30) (Milkereit et al., 2003). Ribosomale Proteine wurden bei dieser Darstellung nicht berücksichtigt.

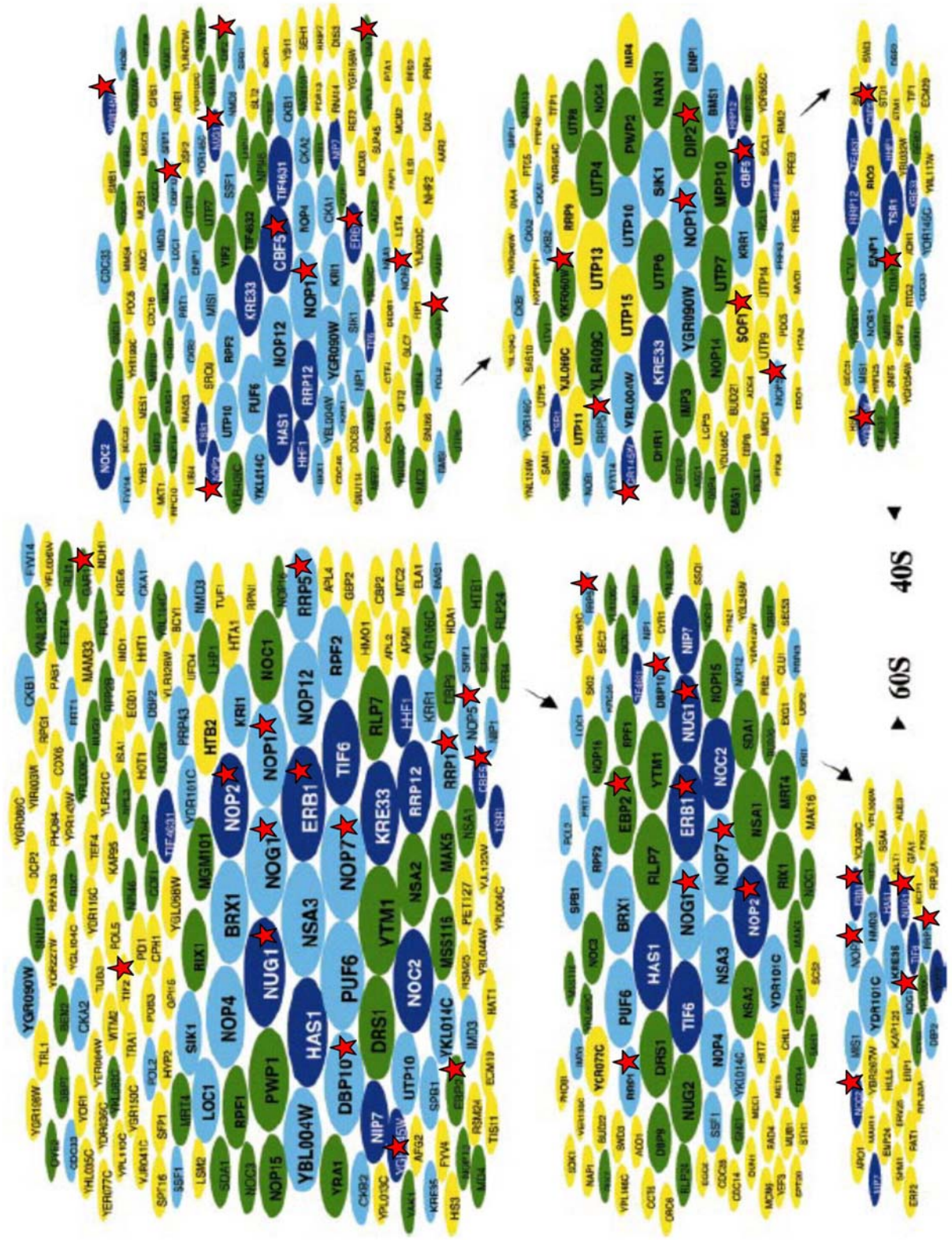


Abb. 30 Signalweg/Flussdiagramm von prä-ribosomalen Komplexen während der Biogenese 60S- und 40S-Ribosomenuntereinheiten. (Abbildung aus (Milkereit et al., 2003). Jedes Oval stellt eine Komponente des Komplexes dar, die Größe des Ovals beschreibt die Menge des Faktors innerhalb des Komplexes. Faktoren, die nur in einem Komplex vorkommen, sind in gelb dargestellt, die in zwei Komplexen vorkommen in grün, in drei Komplexen hellblau und in vier Komplexen dunkelblau. Die mit einem roten Stern markierten Faktoren sind Homologe, der in Tabelle 3 identifizierten Myc-Zielgene.

Die einzelnen Komponenten der Komplexe sind durch Ovale verschiedener Größe und Farbe charakterisiert. Je größer ein Oval, desto abundanter das Protein. Die Farben beschreiben das Vorkommen der Faktoren: Gelbe Faktoren kommen nur in einem Komplex vor, grüne in zwei, hellblaue in drei und dunkelblaue in vier. Große, blaue Ovale beschreiben also Faktoren, die in mehreren Komplexen in großer Menge vorkommen. Man nimmt daher an, dass es sich bei diesen Faktoren um so genannten „Kernproteine“, die in vielen Stadien der Ribosomenbiogenese benötigt werden, handelt. Daher könnte ihre Funktion einen eher allgemeinen Charakter haben.

Dem gegenüber stehen die Faktoren, die durch gelbe oder grüne Ovale repräsentiert werden. Sie kommen nur in einem oder zwei Komplexen vor. Wahrscheinlich üben diese Faktoren eher spezifische Schritte während der ribosomalen Reifung aus. Kleine, gelbe Ovale charakterisierten Faktoren, die nur transient an den jeweiligen Komplex gebunden sind.

Zusätzlich sind in dieser Abbildung Faktoren, deren Homologe in dieser Arbeit als Myc-Zielgene identifiziert wurden (Tabelle 3) mit einem roten Stern markiert. Auffällig ist, dass es sich dabei häufig um hell- oder dunkelblaue, große Ovale handelt, also die so genannten „Kernproteine“, die eher allgemein an der Ribosomenbiogenese beteiligt sind. Anscheinend fördert Myc durch die Induktion seiner Zielgene mehr generelle Schritte. Grüne oder gelbe Faktoren, die wahrscheinlich für spezifische Reaktionen verantwortlich sind, werden seltener durch Myc induziert.

Diese Darstellung bietet einen anschaulichen Überblick über die Funktion und Lokalisation vieler Faktoren bei der Reifung der 40S- und 60S-Ribosomenuntereinheiten in Hefen. Für einige der Myc-Zielgene aus Tabelle 3 sind noch keine Hefe-Homologe identifiziert worden, so dass diese hier auch nicht dargestellt sind. Der Fokus dieser Darstellung liegt auch nicht in der Beschreibung jedes einzelnen Faktors, sondern eher darin, einen Eindruck zu vermitteln, auf welcher Weise Myc die Produktion von Ribosomen beeinflussen kann.

Im folgenden wird noch auf einige wichtige, identifizierte Faktoren für die rRNA-Prozessierung eingegangen. Nop5/Nop58 und Nop56 sind beide Bestandteile der kleinen nukleolären C/D-Box Ribonukleopartikel (C/D-box snoRNP) (Galardi et al., 2002). GAR1 wird für die pre-rRNA-Pseudouridinylierung und für erste Prozessierungsschritte benötigt (Girard et al., 1992). Weitere nukleoläre Zielgene, die

Homologe in der Hefe haben sind aufgelistet: Nsrp1 (homolog zu Nucleolin), Nop1p (Fibrillarin) und Nop2p (p120) sind wichtige Faktoren für die Ribosomenbiogenese. Nop1p ist in allen C/D-box snoRNPs vertreten und ist an dem Großteil der post-transkriptionalen Aktivitäten der Ribosomensynthese wie Prozessierung und Modifikation der pre-rRNA und dem Zusammenbau der Ribosomen-Untereinheiten, beteiligt (Tollervey et al., 1993). Nop2p kodiert vermutlich für eine Methyltransferase und ist erforderlich für die prä-rRNA-Prozessierung und die Synthese der 60S Ribosomen-Untereinheit (Hong et al., 2001). Pescadillo ist das Homolog des Hefe-Proteins Nop7p in Mammalia. Mutationen des Proteins in der Maus resultieren in einem Entwicklungsdefekt im Morulastadium, die Nukleoli differenzieren nicht und die Akkumulation von Ribosomen wird verhindert (Lerch-Gaggl et al., 2002).

Ein Teil der nukleolären Myc-Zielgene hat anscheinend keine bzw. noch keine bekannten Homologe in der Hefe. Dazu gehören u.a. die Gene Gu-alpha und Gu-beta, zwei DEAD-Box RNA Helikasen, Nopp34 und ein Protein, das den nukleolären Proliferationsmarker Ki-67 bindet.

Aufgrund der großen Anzahl der Myc-Zielgene, die eine nukleoläre Funktion aufweisen, war es nahe liegend zu untersuchen, ob Myc die Prozessierung der rRNA reguliert. Wie „Pulse-chase“-Versuche zeigten, erfolgte die effiziente Prozessierung des 47S rRNA-Vorläufers in die reifen Formen der 18S und 28S RNA in den P493-6 Zellen nur in Abwesenheit von Tetrazyklin (Tet), also nur wenn Myc exprimiert wurde. Während der positive Effekt von Myc auf die Prozessierung der rRNA offensichtlich war, war die Auswirkung auf die rDNA-Transkription unklar.

Daher wurde die Dichte der Polymerase-I-Moleküle (Pol I) auf den rDNA-Genen in „Run-on“-Experimenten gemessen. Unabhängig davon, ob die P493-6 Zellen arretiert oder stimuliert waren, blieb die Pol-I-Dichte unverändert. Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung, dass stimulierte, nicht aber arretierte Zellen ^{3}H-Uridin in den 47S Vorläufer einbauen. Wie kann die Transkriptionsrate der rDNA-Gene ohne signifikante Veränderung der Pol-I-Dichte ansteigen? Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Transkription der rDNA-Gene hauptsächlich auf der Ebene der rRNA-Elongation reguliert wird. In diesem Fall würde die Menge der Pol-I-Komplexe auf den rDNA-Genen hoch bleiben, sogar wenn die Gene nicht transkribiert werden. Die Tatsache, dass eine hohe Pol-I-Dichte auf den rDNA-Genen in arretierten Smoxi-4 Zellen, humanen primären Fibroblasten und der parentalen Zelllinie EREB2-5 beschrieben werden konnte, bestätigt die Annahme, dass die

Kontrolle der rRNA-Elongation ein genereller Mechanismus in der Regulation der rDNA-Transkription in ruhenden Zellen ist.

Für die Regulation der rRNA-Transkription und Prozessierung in P493-6 Zellen wird daher folgendes Modell vorgeschlagen (Abb. 31): (A) Eine große Anzahl an Pol-I-Komplexen befindet sich ständig auf den rDNA-Genen. (B) Mitogene und Myc können diese Komplexe und damit die RNA-Elongation aktivieren.

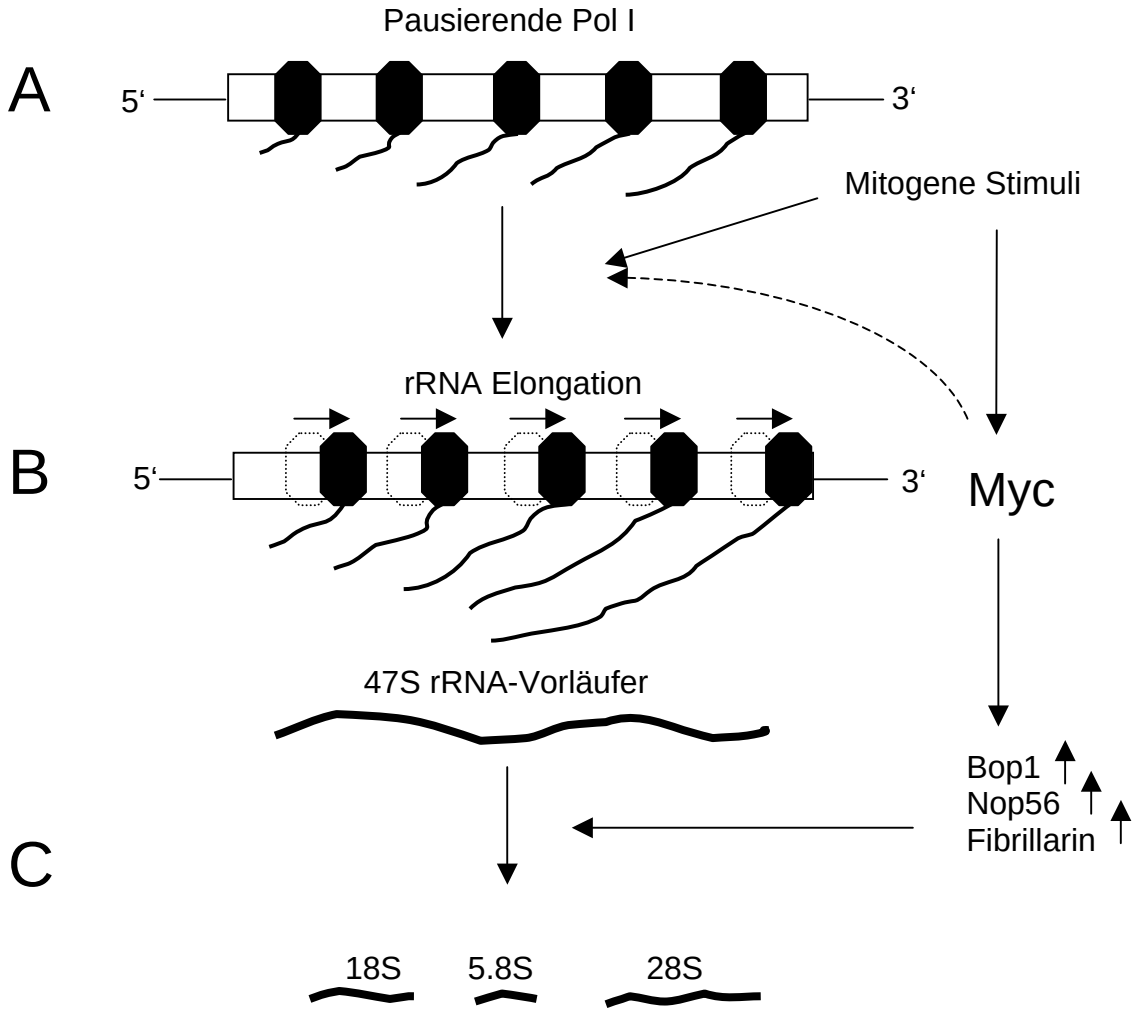


Abb. 31 Modell der Regulation der rRNA-Transkription und Prozessierung durch Myc in P493-6 Zellen. (A) Pausierende Pol I-Moleküle befinden sich in einem arretierten Zustand auf den ribosomalen Genen in ruhenden Zellen. **(B)** Mitogene Stimulierung induziert rRNA-Elongation und Produktion des 47S rRNA-Vorläufers. **(C)** Die effiziente Prozessierung des 47S rRNA-Vorläufers findet nur statt, wenn Myc-Zielgene wie z. B. Bop1, Nop56 und Fibrillarin induziert werden.

(C) Das 47S Transkript wird jedoch nur effizient in die reifen Formen prozessiert, wenn Myc exprimiert ist und die nukleolären Zielgene induziert werden.

Die Analysen zur Expression des 47S rRNA-Vorläufers in P493-6 Zellen ergaben ein unerwartetes Ergebnis. In arretierten Zellen waren große Mengen des 47S rRNA-Vorläufers nachweisbar. Der Entzug von Wachstumsfaktoren oder Aminosäuren führt normalerweise zur Repression der Transkription des Vorläufers (Grummt, 1999). In der parentalen Zelllinie EREB2-5 konnte in arretierten Zellen kein 47S rRNA-Vorläufer nachgewiesen werden. Was könnte der Grund für die unterschiedlichen Resultate in arretierten P493-6 und EREB2-5 Zellen sein? Eine eingehende Analyse der P493-6 Zellen zeigte, dass das Tet-regulierte *myc*-Konstrukt in der Anwesenheit von Tet nicht vollständig reprimiert ist (M. Schlee, persönliche Mitteilung). Geringe Mengen an Myc könnten möglicherweise für eine basale Transkription und/oder Stabilisierung des 47S Vorläufers ausreichend sein.

Für die Induktion von Genen für die nukleoläre Prozessierungsmaschinerie scheinen diese Mengen jedoch nicht zu genügen. Dies würde bedeuten, dass die alleinige Präsenz des 47S Vorläufers nicht ausreichend ist, um seine Prozessierung auszulösen. Kürzlich haben Amati und Kollegen hoch- und niedrig-affine Myc-Zielgene aufgrund genomischer Myc-Bindungsstellen definiert (Fernandez et al., 2003). Es ist möglich, dass die Transkription der rDNA-Gene abhängig von der Bindung von Myc an hoch-affine Bindungstellen ist, während die Prozessierung des rRNA-Vorläufers durch niedrig-affine Zielgene von Myc beeinflusst wird.

Die Prozessierung des 47S rRNA-Vorläufers benötigt stöchiometrische Mengen an ribosomalen Proteinen (RP). Es wurden jedoch nur einige wenige RP-mRNAs identifiziert, die nach *myc*-Induktion induziert wurden (Tabelle 3). Man könnte daher annehmen, dass der verstärkte Bedarf an RP durch eine erhöhte Translationsrate über den 5`terminalen Oligopyrimidinstrang (5`TOP) der RP-mRNAs gedeckt wird (Avni et al., 1994). Es wird interessant sein, in Zukunft herauszufinden, ob Myc zu dieser selektiven, translationalen Kontrolle der RP-mRNAs beiträgt.

Die Untersuchungen zur Relevanz der Nukleolusstruktur bei der rRNA-Prozessierung bezogen sich zuerst auf Ki-67. Unter anderem weist die spezifische Lokalisation von Ki-67 im Nukleolus auf eine mögliche Rolle in der Ribosomen-biogenese hin. Sowohl die Genchip-Analysen als auch die Untersuchung der Immun-fluoreszenz des Ki-67 Proteins ergaben keine Regulation durch Myc. Auch gab es keinen Zusammenhang zwischen der Expression von *myc* und einer Konzentration der Ki-67-Färbung auf den Nukleolus, so dass dieses nukleoläre Protein wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Myc-induzierte rRNA-Prozessierung hat.

Wie vor kurzem gezeigt wurde, ist die Prozessierung des 47S rRNA-Vorläufers und die Bildung intakter Nukleoli abhängig von der Aktivität Cyklin-abhängiger Kinasen (Cdk) (Sirri et al., 2002). In P493-6 Zellen hemmt der Cdk-Inhibitor Roscovitin sehr schnell die Prozessierung der rRNA und führt zu einer Disaggregation der Nukleoli. Wie schon zuvor in diesen Zellen gezeigt wurde, kann Myc in Anwesenheit von Roscovitin Wachstum induzieren (Schuhmacher et al., 1999). Dieses Wachstumsprogramm funktioniert entkoppelt von Cdk2-Aktivität, Zellzyklus-Eintritt und wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, unabhängig von der Synthese neuer Ribosomen.

Wachstum in Abwesenheit von der Produktion neuer Ribosomen konnte auch in Versuchen in Maus-Leberzellen gezeigt werden. In der Leber kann man sehr gut die beiden zellulären Prozesse Wachstum und Zellteilung unterscheiden. Um nur Wachstum der Zellen (Zunahme des Zellvolumens) zu beobachten, werden die Mäuse für einige Tage nicht gefüttert. Während der Fastenzeit verringert sich das Zellvolumen unter anderem durch den Abbau des Glykogens. Bekommen die Tiere anschließend wieder Nahrung, erhöht sich die Proteinsynthese und die Zellen wachsen wieder zu ihrer ursprünglichen Größe, ohne dass eine Zellteilung statt gefunden hat. Eine Analyse von Wachstum und Zellteilung erlaubt die partielle Hepatektomie. Dabei wird ein Teil eines Leberlappens operativ entfernt. Die Regeneration der Leber erfolgt anschließend durch Teilung der Zellen. Die Zellteilung geschieht so lange, bis das Organ seine ursprüngliche Größe wieder erlangt hat. Wachstum und Zellteilung wurden von Volarevic und Kollegen in Mäusen, in denen konditional das Gen für das ribosomale Protein S6 in der Leber ausgeknockt wurde, untersucht. Überraschenderweise gab es keinen Unterschied im Wachstum von *S6-knock-out*-Leberzellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, wenn die Mäuse nach einer Fastenzeit wieder gefüttert wurden. Obwohl keine Biogenese der 40S Ribosomenuntereinheit in den *knock-out*-Mäusen möglich war, war die zelluläre Translation insgesamt nicht betroffen. Nach einer partiellen Hepatektomie zeigten die *knock-out*-Leberzellen jedoch einen deutlichen Phänotyp. Während sich die Leber der Wildtyp-Mäuse wieder vollständig regenerierte, blieb die Proliferation der *knock-out*-Leberzellen aus (Volarevic et al., 2000). Folglich blockiert die Inhibition der Ribosomenbiogenese den Eintritt in die S-Phase, aber nicht notwendigerweise das Wachstum der Zellen nach einer Fastenperiode.

Die Ergebnisse aus den *S6-knock-out*-Leberzellen gehen einher mit einem Modell, dass für die Aktivierung des Zellzyklus durch Myc die Produktion neuer Ribosomen essentiell ist. Dies würde bedeuten, dass Zellwachstum nach zwei verschiedenen Wachstumsprogrammen ablaufen könnte: Erstens nach einem Programm, bei dem sich nur das Zellvolumen vergrößert. Dieses Programm ist durch eine verstärkte Translation charakterisiert, ohne jedoch die Anzahl der Ribosomen zu erhöhen. Zweitens nach einem Programm, das auch durch eine erhöhte Translation bestimmt ist, die jedoch mit einer verstärkten Cdk-Aktivität und Ribosomenbiogenese verbunden ist und Zellen schließlich in die Teilung führt. Anhand der Ergebnisse aus dieser Arbeit wird vorgeschlagen, dass das zweite Programm stark von der Aktivität von Myc abhängig ist.

Wenn durch die Cdk-Aktivität die Ribosomenbiogenese kontrolliert wird, hat die Ribosomenbiogenese vice versa dann einen Einfluss auf den Zellzyklus? Die Aktivierung von Myc induziert nicht nur die Cdk-Aktivität, sondern auch die Expression des Ink4a/ARF-Gens. Dies hat zur Folge, dass das Tumorsuppressor-protein p53 akkumuliert und der Zellzyklus angehalten wird. Diese Aktivierung von p53 durch Myc könnte auf eine Rolle von p53 in der Wachstumskontrolle hinweisen. Dabei würde p53 die Zellzyklusprogression solange in Myc-stimulierten Zellen unterdrücken, bis die Synthese neuer Ribosomen erfolgt. In dieser Arbeit wurde die Identifizierung des nukleolären Gens Bop1, das in die Prozessierung der rRNA involviert ist, als Myc-Zielgen bestätigt. Pestov et al zeigten, dass eine dominant-negative Mutante von Bop1 die Prozessierung und gleichzeitig die Progression durch die G1-Phase hemmt. Die Hemmung der G1-Progression ist abhängig von p53, was darauf hinweist, dass p53 die Zellzyklusprogression in normalen Zellen abhängig von einer korrekten Prozessierung der rRNA kontrolliert (Pestov et al., 2001). Erst kürzlich wurde auch für Ink4a/ARF gezeigt, dass es die rRNA-Prozessierung in einer p53 abhängigen Weise reguliert (Sugimoto et al., 2003).

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Zusammenhänge zwischen Myc, Cdk-Aktivität, rRNA-Prozessierung und Wachstum sind in dem folgenden Modell zusammengefasst (Abb. 32):

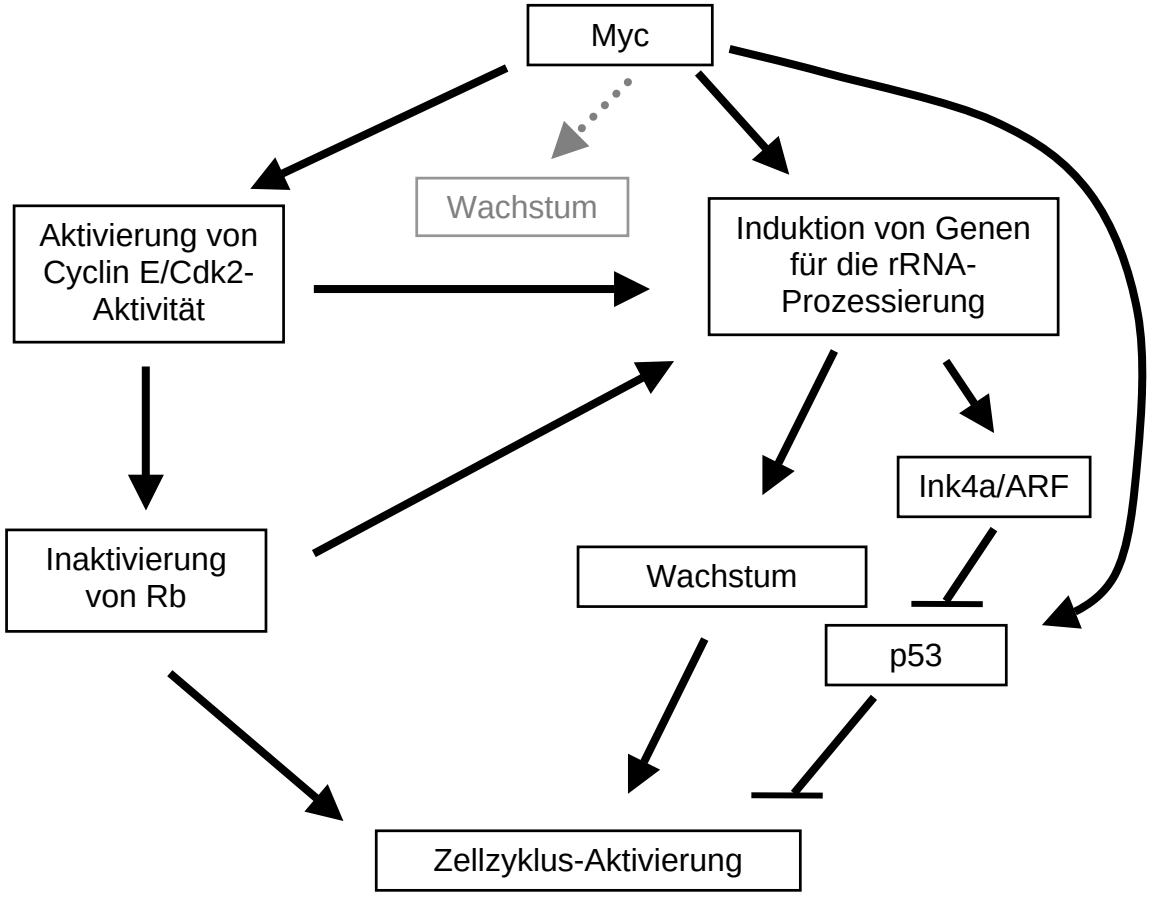


Abb. 32 Modell zur Koordination von Zellzyklus und Wachstum durch Myc-induzierte Ribosomenbiogenese in Anwesenheit von Serum. Der gestrichelte Pfeil stellt einen alternativen Signalweg für Wachstum in Abwesenheit von Cdk2-Aktivität dar.

Die Aktivität von Myc sorgt in der Zelle für die Induktion von nukleolären Genen, die in der rRNA-Prozessierung involviert sind und gleichzeitig für die Aktivierung des Cyclin E/Cdk2-Komplexes. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die Cdk-Aktivität essentiell für eine erfolgreiche rRNA-Prozessierung. Dies könnte eine Ebene sein, auf der Myc Wachstum und Zellzyklus miteinander koordiniert. Die Aktivierung des Cyclin E/Cdk2-Komplexes führt zum einen zur Zellzyklus-Aktivierung (das Rb-Protein wird inaktiviert), zum anderen treibt es Myc-induzierte Ribosomenbiogenese voran, was schließlich Zellwachstum zur Folge hat. Die Inaktivierung von Rb, die auch eine indirekte Folge der Myc-Aktivität ist, reguliert zusätzlich positiv die rRNA-Synthese (Ruggero und Pandolfi 2003). Myc induziert zu Beginn des Zellzyklus das p53 Tumorsuppressorprotein. p53 muss erst inaktiviert werden, damit die Progression durch den Zellzyklus erfolgt. Diese Inaktivierung könnte über Ink4a/ARF vermittelt

werden. Ink4a/ARF ist hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert und moduliert die Aktivität von p53. Eine Regulation des p53-Signalweges durch Ink4a/ARF in Abhängigkeit von nukleolären Funktionen wurde schon von mehreren Gruppen beschrieben (Zhang and Xiong, 1999; Weber et al., 2000; David-Pfeuty and Nouvian-Dooghe, 2002). Es ist vorstellbar, dass die erfolgreiche rRNA-Prozessierung/Ribosomenbiogenese im Nukleolus Signale an Ink4a/ARFvermittelt. Infolge dessen würde p53 dann inaktiviert. Dies wäre eine weitere Koordination von Zellzyklus und Wachstum, da ein inaktives p53 die Progression durch den Zyklus erlaubt.

Myc ist jedoch auch in der Lage ein alternatives Wachstumsprogramm in den Zellen zu aktivieren, das nicht in die Aktivierung des Zellzyklus führt (Abb. 32, gestrichelte Linie). Dieses Programm verläuft ohne Cdk-Aktivität und der Synthese neuer Ribosomen. Es bleibt eine spannende Aufgabe, die genauen molekularen Abläufe dieses Zellzyklus-unabhängigen Wachstumsprogramms genauer zu untersuchen.

Könnte eine deregulierte Ribosomenbiogenese auch für die Entwicklung von Krebs verantwortlich sein? In einem neueren Artikel werden diese Zusammenhänge diskutiert (Ruggero und Pandolfi, 2003). Schon lange ist unter Pathologen bekannt, dass die Hypertrophie des Nukleolus ein charakteristisches, zytologisches Merkmal von Krebszellen ist (Pianese, 1896). Aber erst kürzlich wurde diese Hyperthropie als prognostischer Faktor eingesetzt (Derenzini et al., 2000). Myc, das in vielen soliden Tumoren überexpremiert ist, induziert die Ribosomenbiogenese durch Induktion ribosomaler und nukleolärer Proteine und wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, durch die Effizienz der rRNA-Prozessierung. Diese Regulation könnte ein wichtiger Mechanismus sein, mit dem Myc Wachstum induziert und so die Tumorentstehung einleitet.

Die spezifische Inhibition der rRNA-Prozessierung könnte ein gezielter Ansatz sein, um die Aktivität eines onkogenen Mycs in verschiedenen Krebsarten zu bekämpfen. Viele Zytostatika wie Anthrazykline oder Platinderivate akkumulieren in den Nukleoli und bewirken eine nukleoläre Disaggregation. Eine antineoplastische Wirkung, die gezielt auf die Myc-induzierte rRNA-Prozessierung gerichtet ist, könnte eine interessante Strategie bei der Tumortherapie sein.

5.3 Zusammenfassung

Das Onkoprotein Myc spielt eine große Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl von humanen Tumoren. Wahrscheinlich erfolgt die Tumorgenese aufgrund von abnormal regulierten Myc-Zielgenen. Um die Ursache der onkogenen Aktivität von Myc zu verstehen, wurden daher in den letzten Jahren verstärkt mit Hochdurchsatz-Analysen nach Myc-regulierten Genen gesucht.

In dieser Arbeit wurden zwei genomweite Genchip-Analysen durchgeführt, um anhand der identifizierten Zielgene mehr über die Funktionen von Myc zu lernen. Die für die Genchip-Analysen verwendeten Zelllinien P493-6 und Smoxi-4 waren zuvor schon gut charakterisiert und eigneten sich aufgrund ihrer konditionalen Myc-Aktivität sehr gut für die Suche nach Zielgenen. Die Proliferation der P493-6 Zellen ist strikt abhängig von der Expression des exogenen *myc*–Gens und der Anwesenheit von Serum. Nach Serumentzug kann Myc nicht die S-Phase induzieren, jedoch wird ein Wachstum der Zellen beobachtet. In diesem Zellsystem wurde deshalb auch der Einfluss von Serum auf das Myc-induzierte Expressionsprofil untersucht. Es konnten dabei sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden. Die globale Wirkung von Myc und Serum auf die Genexpression wurde in einer Cluster-Analyse der Genchip-Daten deutlich. Hier konnten distinkte Expressionsprofile nach Stimulation der Zellen mit Serum, Myc oder Myc und Serum beschrieben werden. Eine detaillierte Analyse der jeweiligen Gene könnte zur Aufklärung der beiden Signalwege führen, durch die Myc Wachstum und Zellzyklus induziert.

In dem zweiten Zellsystem (Smoxi-4) konnten bekannte Myc-Zielgene bestätigt und neue potentielle Kandidaten identifiziert werden. Allerdings war die Anzahl der Gene im Vergleich zu den P493-6 Zellen deutlich geringer. In beiden Zelllinien wurde eine funktionelle Gruppe von Genen identifiziert, deren Funktion mit der Prozessierung der ribosomalen RNA (rRNA) verbunden ist.

In P493-6 Zellen konnte die Annahme, dass Myc eine Rolle bei der rRNA-Prozessierung spielt, durch Markierungsexperimente mit ^{3}H-Uridin bestätigt werden. Myc induziert sehr stark die Produktion der reifen 18S und 28S rRNAs. Die Transkription der rRNA wird jedoch nicht durch Myc reguliert. Während dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen rRNA-Prozessierung und Cdk-Aktivität in P493-6 Zellen bestätigt werden. Abschließend wurde ein Modell entwickelt, wie Myc durch die gleichzeitige Regulation von Cdk-Aktivität und rRNA-Prozessierung Zellzyklus

und Wachstum koordinieren könnte. Da Myc auch in arretierten Zellen Wachstum und rRNA-Prozessierung induzieren kann, wird ein Zellzyklus-unabhängiges Wachstumsprogramm vorgeschlagen, das durch Myc aktiviert wird.

Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
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
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
c-Myc	zelluläres Myc
cpm	Zerfälle pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
Cyc	Cyclin
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
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Östrogen Rezeptor
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanin
G1	Gap-Phase 1
G2/M	Gap-Phase 2/Mitose

GAPDH	Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase
h	Stunde
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
N-	Amino-
NTP	Ribonukleosid-5’-triphosphat
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
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
Tet	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N’,N’-Tetramethylendiamin
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheiten
UTP	Uridintriphosphat

Literatur

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

Alexandrova, N., Niklinski, J., Bliskovsky, V., Otterson, G. A., Blake, M., Kaye, F. J., and Zajac-Kaye, M. (1995). The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro. Mol Cell Biol *15*, 5188-5195.

Amati, B. (2001). Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control. Nat Cell Biol *3*, E112-113.

Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A. I. (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. Curr Biol *12*, 1-11.

Arver, B., Du, Q., Chen, J., Luo, L., and Lindblom, A. (2000). Hereditary breast cancer: a review. Semin Cancer Biol *10*, 271-288.

Asai, A., Miyagi, Y., Sugiyama, A., Nagashima, Y., Kanemitsu, H., Obinata, M., Mishima, K., and Kuchino, Y. (1994). The s-Myc protein having the ability to induce apoptosis is selectively expressed in rat embryo chondrocytes. Oncogene *9*, 2345-2352.

Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L. C., and Holtta, E. (1992). Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. Nature *360*, 355-358.

Avni, D., Shama, S., Loreni, F., and Meyuhas, O. (1994). Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element. Mol Cell Biol *14*, 3822-3833.

Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., and Larsson, L. G. (2000). c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. Blood *95*, 2104-2110.

Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (1997). The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. Exp Cell Res *237*, 1-6.

Beijersbergen, R. L., Hijmans, E. M., Zhu, L., and Bernards, R. (1994). Interaction of c-Myc with the pRb-related protein p107 results in inhibition of c-Myc-mediated transactivation. Embo J *13*, 4080-4086.

Berns, K., Hijmans, E. M., Koh, E., Daley, G. Q., and Bernards, R. (2000). A genetic screen to identify genes that rescue the slow growth phenotype of c-myc null fibroblasts. Oncogene *19*, 3330-3334.

Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. Mol Cell Biol *13*, 5216-5224.

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

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

Blomberg, I., and Hoffmann, I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. Mol Cell Biol *19*, 6183-6194.

Boon, K., Caron, H. N., van Asperen, R., Valentijn, L., Hermus, M. C., van Sluis, P., Roobeek, I., Weis, I., Voute, P. A., Schwab, M., and Versteeg, R. (2001). N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. Embo J *20*, 1383-1393.

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

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

Bull, J. J., Muller-Rover, S., Patel, S. V., Chronnell, C. M., McKay, I. A., and Philpott, M. P. (2001). Contrasting localization of c-Myc with other Myc superfamily transcription factors in the human hair follicle and during the hair growth cycle. J Invest Dermatol *116*, 617-622.

Claassen, G. F., and Hann, S. R. (2000). A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 9498-9503.

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

Dalla-Favera, R., Gelmann, E. P., Martinotti, S., Franchini, G., Papas, T. S., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1982). Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 6497-6501.

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

David-Pfeuty, T. and Nouvian-Dooghe, Y. (2002). Human p14(Arf): an exquisite sensor of morphological changes and of short-lived perturbations in cell cycle and in nucleolar function. Oncogene 21, 6779-6790.

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

DePinho, R. A., Schreiber-Agus, N., and Alt, F. W. (1991). myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. Adv Cancer Res *57*, 1-46.

Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Govoni, M., Sirri, V., and Chieco, P. (2000). Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. J Pathol *191*, 181-186.

Dolnick, B. J., and Black, A. R. (1996). Alternate splicing of the rTS gene product and its overexpression in a 5-fluorouracil-resistant cell line. Cancer Res *56*, 3207-3210.

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

Eberhardy, S. R., and Farnham, P. J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. J Biol Chem *276*, 48562-48571.

Eberhardy, S. R., and Farnham, P. J. (2002). Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. J Biol Chem *277*, 40156-40162.

Eichler, D. C., and Craig, N. (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol *49*, 197-239.

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

Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 14863-14868.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature *411*, 494-498.

Fatica, A., and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. Curr Opin Cell Biol *14*, 313-318.

Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. Genes Dev *17*, 1115-1129.

Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S. and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. Genes Dev *15*, 2069-2082

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

Galardi, S., Fatica, A., Bachi, A., Scaloni, A., Presutti, C., and Bozzoni, I. (2002). Purified box C/D snoRNPs are able to reproduce site-specific 2'-O-methylation of target RNA in vitro. Mol Cell Biol *22*, 6663-6668.

Gartel, A. L., and Shchors, K. (2003). Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. Exp Cell Res *283*, 17-21.

Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 4510-4515.

Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M. et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature *415*, 141-147.

Gerdes, J. (1988). Determination of the growth fraction by means of immunostainings with monoclonal antibody Ki-67. Acta Histochem Suppl *36*, 437-446.

Girard, J. P., Lehtonen, H., Caizergues-Ferrer, M., Amalric, F., Tollervey, D., and Lapeyre, B. (1992). GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. Embo J *11*, 673-682.

Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N., and White, R. J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. Nature *421*, 290-294.

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

Gregory, R. I., Khosla, S., and Feil, R. (2001). Probing chromatin structure with nuclease sensitivity assays. Methods Mol Biol *181*, 269-284.

Grummt, I. (1999). Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol *62*, 109-154.

Guo, Q. M., Malek, R. L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N. H., Dang, C. V., and Liu, E. T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. Cancer Res *60*, 5922-5928.

Hann, S. R., King, M. W., Bentley, D. L., Anderson, C. W., and Eisenman, R. N. (1988). A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. Cell *52*, 185-195.

Hateboer, G., Timmers, H. T., Rustgi, A. K., Billaud, M., van 't Veer, L. J., and Bernards, R. (1993). TATA-binding protein and the retinoblastoma gene product bind to overlapping epitopes on c-Myc and adenovirus E1A protein. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 8489-8493.

Henriksson, M., Bakardjiev, A., Klein, G., and Luscher, B. (1993). Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. Oncogene *8*, 3199-3209.

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

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

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K. et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry Nature *415*, 180-183

Hoang, A. T., Lutterbach, B., Lewis, B. C., Yano, T., Chou, T. Y., Barrett, J. F., Raffeld, M., Hann, S. R., and Dang, C. V. (1995). A link between increased transforming activity of lymphoma-derived MYC mutant alleles, their defective regulation by p107, and altered phosphorylation of the c-Myc transactivation domain. Mol Cell Biol *15*, 4031-4042.

Hölzel, M., Kohlhuber, F., Schlosser, I., Hölzel, D., Luscher, B., and Eick, D. (2001). Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles. EMBO Rep *2*, 1125-1132.

Hong, B., Wu, K., Brockenbrough, J. S., Wu, P., and Aris, J. P. (2001). Temperature sensitive nop2 alleles defective in synthesis of 25S rRNA and large ribosomal subunits in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res *29*, 2927-2937.

Ingvarsson, S., Asker, C., Axelson, H., Klein, G., and Sumegi, J. (1988). Structure and expression of B-myc, a new member of the myc gene family. Mol Cell Biol *8*, 3168-3174.

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

Iyer, V. R., Eisen, M. B., Ross, D. T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J. C., Trent, J. M., Staudt, L. M., Hudson, J., Jr., Boguski, M. S.*, et al.* (1999). The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. Science *283*, 83-87.

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

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

Kim, S., Li, Q., Dang, C. V., and Lee, L. A. (2000). Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 11198-11202.

Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. J Biol Chem *275*, 10477-10483.

Kohl, N. E., Kanda, N., Schreck, R. R., Bruns, G., Latt, S. A., Gilbert, F., and Alt, F. W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. Cell *35*, 359-367.

Kressler, D., Linder, P., and de La Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol *19*, 7897-7912.

Lafontaine, D. L., and Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 514-520.

Lasorella, A., Noseda, M., Beyna, M., Yokota, Y., and Iavarone, A. (2000). Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. Nature *407*, 592-598.

Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman, P., and Duncan, S. A. (2002). Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation. J Biol Chem *277*, 45347-45355.

MacCallum, D. E., and Hall, P. A. (2000). The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. J Pathol *190*, 537-544.

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

Menssen, A., and Hermeking, H. (2002). Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 6274-6279.

Milkereit, P., Kuhn, H., Gas, N. and Tschochner, H. (2003). The pre-ribosomal network. Nucleic Acids Res *31*, 799-804.

Morgenbesser, S. D., and DePinho, R. A. (1994). Use of transgenic mice to study myc family gene function in normal mammalian development and in cancer. Semin Cancer Biol *5*, 21-36.

Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O. W., Bertness, V., Hollis, G. F., and Minna, J. D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. Nature *318*, 69-73.

Nikiforov, M. A., Kotenko, I., Petrenko, O., Beavis, A., Valenick, L., Lemischka, I., and Cole, M. D. (2000). Complementation of Myc-dependent cell proliferation by cDNA expression library screening. Oncogene *19*, 4828-4831.

Niklinski, J., Claassen, G., Meyers, C., Gregory, M. A., Allegra, C. J., Kaye, F. J., Hann, S. R., and Zajac-Kaye, M. (2000). Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma. Mol Cell Biol *20*, 5276-5284.

O'Hagan, R. C., Schreiber-Agus, N., Chen, K., David, G., Engelman, J. A., Schwab, R., Alland, L., Thomson, C., Ronning, D. R., Sacchettini, J. C.*, et al.* (2000). Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. Nat Genet *24*, 113-119.

Orian, A., van Steensel, B., Delrow, J., Bussemaker, H. J., Li, L., Sawado, T., Williams, E., Loo, L. W., Cowley, S. M., Yost, C.*, et al.* (2003). Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. Genes Dev *17*, 1101-1114.

Oster, S. K., Ho, C. S., Soucie, E. L., and Penn, L. Z. (2002). The myc oncogene: MarvelouslY Complex. Adv Cancer Res *84*, 81-154.

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

Pestov, D. G., Strezoska, Z., and Lau, L. F. (2001). Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. Mol Cell Biol *21*, 4246-4255.

Reed, S. I. (1997). Control of the G1/S transition. Cancer Surv *29*, 7-23.
Roy, A. L., Carruthers, C., Gutjahr, T., and Roeder, R. G. (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. Nature *365*, 359-361.
Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2003). Does the ribosome translate cancer? Nat Rev Cancer *3*, 179-192.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory).

Schmidt, M. H., Broll, R., Bruch, H. P., Bogler, O. and Duchrow, M. (2003) . The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. J Pathol *199*, 18-27.

Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Hölzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G. W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U. H., and Eick, D. (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. Nucleic Acids Res *29*, 397-406.

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

Sheiness, D., Fanshier, L., and Bishop, J. M. (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. J Virol *28*, 600-610.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev *13*, 1501-1512.

Sirri, V., Hernandez-Verdun, D., and Roussel, P. (2002). Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. J Cell Biol *156*, 969-981.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. Nat Cell Biol *3*, 392-399.

Sugimoto, M., Kuo, M. L., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (2003). Nucleolar arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. Mol Cell *11*, 415-424.

Takayama, M., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2000a). CDC6 interacts with c-Myc to inhibit E-box-dependent transcription by abrogating c-Myc/Max complex. FEBS Lett *477*, 43-48.

Takayama, M. A., Taira, T., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2000b). ORC1 interacts with c-Myc to inhibit E-box-dependent transcription by abrogating c-Myc-SNF5/INI1 interaction. Genes Cells *5*, 481-490.

Thomas, T., and Thomas, T. J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. Cell Mol Life Sci *58*, 244-258.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E. C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. Cell *72*, 443-457.

Trumpp, A., Refaeli, Y., Oskarsson, T., Gasser, S., Murphy, M., Martin, G. R., and Bishop, J. M. (2001). c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. Nature *414*, 768-773.

Tusher, V. G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 5116-5121.

Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., and Bishop, J. M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. J Virol *42*, 773-779.

Volarevic, S., Stewart, M., Ledermann, B., Zilberman, F., Terracciano, L., Montini, E., Grompe, M., Kozma, S. C., and Thomas, G. (2000). Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. Science *288*, 2045-2047
Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K., and Greene, M. I. (1998). BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. Oncogene *17*, 1939-1948.

Waters, C. M., Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Moore, J. P. and Evan, G. I. (1991). c-*myc* protein expression in untransformed fibroblasts. Oncogene *6*, 797-805

Weber, J. D., Kuo, M. L., Bothner, B., DiGiammarino, E. L., Kriwacki, R. W., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (2000) Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. Mol Cell Biol *20*, 2517-2528

Wood, M. A., McMahon, S. B., and Cole, M. D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. Mol Cell *5*, 321-330.

Zhang, Y.and Xiong, Y. (1999) Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. Mol Cell *3*, 579-591.

Veröffentlichungen

Hölzel, M., Kohlhuber, F., **Schlosser, I.**, Hölzel, D., Lüscher, B. and Eick, D. (2001) Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles. *EMBO Rep*, 2, 1125-1132

Schlosser, I., Hölzel, M., Mürnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U.H. and Eick D. (2003) A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acid Research,* Vol. 31, No.21, 1-9

Schlosser, I., Hölzel, M., Hoffmann, R., Burtscher, H., Weidle, U.H. and Eick D. (2003) Dissection of expression profiles in response to mitogens or c,-Myc in a human B-cell line. Manuskript in Vorbereitung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dirk Eick für die Unterstützung und Betreuung der Arbeit, besonders für seine Diskussionsbereitschaft, seinen wissenschaftlichen Rat und seine Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit,

der Firma Roche Diagnostic in Penzberg für die Möglichkeit, dort die Affymetrix-Technologie zu erlernen, den Mitarbeitern Dr. Ulrich Weidle, Dr. Helmut Burtscher und speziell Ute Bär für die exzellente technische Unterstützung und die vielen praktischen Tipps,

Dr. Reinhard Hoffmann für seine ausgiebige Geduld und wertvolle Hilfe bei der Auswertung der Chipdaten, die er jederzeit zur Verfügung stellte und die ich nur zu gerne in Anspruch genommen habe,

Dr. Andreas Trumpp und seiner gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Zeit am ISREC und dem unterhaltsamen Wetten bei der Fußballweltmeisterschaft,

Rob Chapmann, Thomas Grimm, Manuela Horndasch, Andreas Lang, Christoph Lux, Jennifer Müller, Marlies Mürnseer, Martin Schlee und Maria Sobennikova für den vielen Spaß im Labor und ihre Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen und sonstigen Problemen, besonders Michael Hölzel, ohne dessen Hilfe dieses Projekt nicht zustande gekommen wäre,

allen Mitgliedern der Abteilung KMOLBI für die gute Zusammenarbeit, praktische Unterstützung und wissenschaftliche Diskussion und allen Kolleginnen und Kollegen des Hämatologikums für die gute Arbeitsatmosphäre,

meiner Familie und natürlich Alexei für unentbehrliche moralische Unterstützung.

Curriculum Vitae

Isabel Schlosser, geboren am 07. Juni 1975 in Düsseldorf

SCHULAUSBILDUNG

8/1981 – 6/1985	Grundschule Benderstraße, Düsseldorf
8/1985 – 5/1994	Gymnasium Gerresheim, Düsseldorf, Abitur

STUDIUM

10/1994 – 1/2000	Rheinische Friedrich-Wilhems-Universität Bonn, Studiengang: Diplom-Biologie
11/1996	Vordiplom
4/1999 – 1/2000	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Milan Höfer, Institut für Botanik, Rheinische Friedrich-Wilhems-Universität Bonn
Thema der Diplomarbeit:	Genetische Untersuchung der extrazellulären Enzyme der kohleverflüssigenden Deuteromyceten *Fusarium oxysporum* und *Trichoderma atroviride*
10/1999	Mündliche Diplomprüfungen: Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Zytologie und Anorganische Chemie
Akademischer Grad:	Diplom-Biologin
10/2000 – 9/2003	Promotion in der Arbeitsgruppe Prof. D. Eick an der GSF, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik:
Thema der Doktorarbeit:	Zielgene des Proto-Onkogens c-*myc*: Von der genom-weiten Analyse zur ribosomalen RNA-Prozessierung
7/2002	Forschungsaufenthalt am ISREC, Schweizerisches Krebs-forschungsinstitut, Lausanne, Arbeitsgruppe Dr. A. Trumpp
seit 10/2003	Produktmanagerin bei Bristol-Myers Squibb, München