

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

Identifizierung niedermolekularer Inhibitoren des Transkriptionsfaktors c-Myc

Anke Kiessling

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. Horst Kessler
3. apl. Prof. Dr. Luis Moroder

Die Dissertation wurde am 27.06.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 9.10.2006 angenommen.

**Die Neugier steht immer an erster Stelle
eines Problems, das gelöst werden will.**

Galileo Galilei

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Kiessling A., Sperl B., Hollis A., Eick D., Berg T. Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA binding by small molecules. *Chem. Biol.* **2006**, in press.

1. Einleitung	1
1.1 Protein-Protein-Interaktionen.....	1
1.2 Ansätze zur Inhibierung von Proteinen.....	2
1.2.1 Antisense-Technologien	3
1.2.2 Antikörper.....	4
1.2.3 Peptide und Peptidmimetika	4
1.2.4 Niedermolekulare Inhibitoren.....	5
1.3 Identifizierung niedermolekularer Modulatoren von Protein-Protein- Interaktionen mittels Hochdurchsatzanalyse	7
1.3.1 Verschiedene Screeningmethoden.....	7
1.3.2 Fluoreszenzpolarisation als <i>in vitro</i> Screeningmethode	8
1.4 Der Transkriptionsfaktor c-Myc.....	9
1.4.1 Das <i>c-myc</i> Gen.....	9
1.4.2 Struktur des c-Myc Proteins	10
1.4.3 Das Myc/Max/Mad Netzwerk	12
1.4.4 c-Myc als Transkriptionsaktivator und Repressor.....	13
1.4.5 Die physiologischen Funktionen von c-Myc.....	13
1.4.6 c-Myc und Tumorentwicklung	15
1.4.7 Niedermolekulare c-Myc-Inhibitoren.....	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Standards und Kits.....	21
2.1.3 Chemische Verbindungen	21
2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer	21
2.1.4.1 Medium für <i>E. coli</i> -Bakterien.....	21
2.1.4.2 Zellkulturmedien	22
2.1.4.3 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer.....	22
2.1.5 Proteine.....	24
2.1.5.1 Enzyme	24
2.1.5.2 Antikörper.....	24
2.1.6 Plasmide und Oligonukleotide.....	25

2.1.6.1 Ausgangsvektoren	25
2.1.6.2 Spezifizierte Vektoren	26
2.1.6.3 Oligonukleotide	26
2.1.7 Bakterienstämme	28
2.1.8 Zelllinien.....	28
2.1.9 Sonstige Materialien	28
2.2 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	29
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
2.2.3 PCR-Amplifikation.....	29
2.2.4 Gelelektrophorese	30
2.2.5 Isolierung von DNA	31
2.2.6 Enzymatische Behandlung von DNA.....	31
2.2.6.1 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	31
2.2.6.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten.....	31
2.2.7 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Stämmen.....	31
2.2.8 Sequenzierung	32
2.2.9 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden.....	32
2.3 Präparative Methoden	33
2.3.1 Expression rekombinanter Proteine.....	33
2.3.2 Proteinaufreinigung	33
2.3.2.1 His- <i>tag</i> Affinitätschromatographie.....	33
2.3.2.2 MBP- <i>tag</i> Affinitätschromatographie.....	34
2.3.2.3 Glutathion-S-Transferase Affinitätschromatographie	34
2.3.3 Dialyse	35
2.4 Proteinbiochemische Methoden	35
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.4.1.1 Methode nach Bradford.....	35
2.4.1.2 Methode nach Biuret	35
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.4.3 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen	36
2.4.4 Immunoblotting	37
2.4.5 GST- <i>Pulldown</i>	37
2.4.6 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	38

2.5 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen.....	39
2.5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	39
2.5.2 Transiente Transfektion von Säugetierzellen	39
2.5.3 Retroviraler Gentransfer in immortalisierte Rattenfibroblasten.....	40
2.6 Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen	40
2.6.1 Toxizitätstest.....	40
2.6.2 Proliferationstest.....	40
2.6.3 Bestimmung des S-Phase Eintritts mittels BrdU-Einbau	41
2.6.4 Dualer Luciferaseassay	41
2.6.5 Koloniebildung in Weichagar.....	43
2.7 Hochdurchsatzanalyse.....	43
2.7.1 Fluoreszenzpolarisation	44
2.7.1.1 Protein-DNA-Bindungskurven.....	44
2.7.1.2 Inhibitionskurven.....	44
2.7.2 Der Z'-Wert	44
3. Ergebnisse	46
3.1 Hochdurchsatzanalyse.....	46
3.1.1 Etablierung eines Fluoreszenzpolarisationsassays	46
3.1.2 Bestimmung des Z'-Werts.....	52
3.1.3 Ergebnis der Hochdurchsatzanalyse.....	53
3.2 Aktivitäten von Mycro1 und Mycro2 <i>in vitro</i>	58
3.2.1 Effekt auf c-Myc/Max DNA-Bindung im FP-Assay.....	58
3.2.2 Bestimmung der Spezifität mittels Fluoreszenzpolarisation	59
3.2.3 <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA).....	64
3.2.4 GST-Pulldown	67
3.3 Zelluläre Analyse der c-Myc-Inhibitoren Mycro1 und Mycro2	69
3.3.1 Bestimmung der Toxizität	69
3.3.2 Einfluss auf die Proliferation von c-Myc-abhängigen sowie c-Myc- unabhängigen Zelllinien	70
3.3.3 Luciferaseassays zur Untersuchung der Transkription.....	74
3.3.4 Mycro1 und Mycro2 inhibieren das verankerungsunabhängige Wachstum von Rat1a/c-Myc Zellen	79

4. Diskussion	84
4.1 Fluoreszenzpolarisation als Methode der Hochdurchsatzanalyse	84
4.1.1 Kriterien bei der Etablierung des Assays	84
4.1.2 Vergleich der Fluoreszenzpolarisation als <i>in vitro</i> Screeningmethode mit anderen Ansätzen.....	86
4.1.3 Ergebnis der Hochdurchsatzanalyse.....	88
4.2 Charakterisierung von Mycro1 und Mycro2.....	91
4.2.1 Aktivität der Inhibitoren <i>in vitro</i>	91
4.2.2 Aktivität der Verbindungen in zellbasierten Assays	92
4.2.3 Spezifität der Verbindungen.....	94
4.3 Mycro1 und Mycro2 im Kontext zu anderen c-Myc-Inhibitoren	97
4.4 Relevanz von Mycro1 und Mycro2 für die Wissenschaft	99
4.5 Ausblick	100
5. Zusammenfassung	102
6. Literaturverzeichnis.....	103
7. Abkürzungsverzeichnis.....	111
Danksagung.....	113

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Vereinfachte Darstellung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs
- Abb. 1.2** Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsassays
- Abb. 1.3** Strukturelle Domänen von c-Myc und seinem Interaktionspartner Max
- Abb. 1.4** Dreidimensionale Struktur des c-Myc/Max Heterodimers
- Abb. 1.5** c-Myc/Max reguliert die Aktivierung, sowie die Repression von Genen
- Abb. 1.6** Übersicht über die verschiedenen Funktionen von c-Myc
- Abb. 1.7** c-Myc steuert den Übergang der G1- zur S-Phase des Zellzyklus
- Abb. 1.8** Bekannte niedermolekulare c-Myc-Inhibitoren
- Abb. 2.1** Schematische Darstellung des Z'-Werts
- Abb. 3.1** Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem c-Myc und Max
- Abb. 3.2** Salzabhängigkeit der c-Myc/Max DNA-Bindungskurven
- Abb. 3.3** Einfluss der DNA- und DMSO-Konzentration auf den Verlauf der Bindungskurve
- Abb. 3.4** Vergleich der DNA-Bindungskurven von c-Myc/Max Heterodimeren und Max/Max Homodimeren
- Abb. 3.5** Inhibitionskurve des c-Myc-spezifischen Antikörpers anti-Myc (9E10)
- Abb. 3.6** Bestimmung des Z'-Werts
- Abb. 3.7** Darstellung der Screeningergebnisse für c-Myc und STAT3 in % Inhibition
- Abb. 3.8** Verifizierung der ChemDiv Verbindungen (CDI)
- Abb. 3.9** Verifizierung der Maybridge Verbindungen (MB)
- Abb. 3.10** Aktivität der sechs verbleibenden Verbindungen bezüglich der c-Myc-abhängigen Luciferaseaktivität
- Abb. 3.11** Strukturen von Mycro1, Mycro2 und eines inaktiven Derivats **3**
- Abb. 3.12** Aktivitätsprofil von Mycro1, Mycro2 und **3** gegen c-Myc/Max DNA-Bindung
- Abb. 3.13** Affinitätschromatographische Reinigung von C/EBP α und Jun
- Abb. 3.14** FP-Bindungskurven für c-Myc/Max, Max/Max, Jun/Jun und C/EBP α /C/EBP α
- Abb. 3.15** Aktivitätsprofil von Mycro1 und Mycro2
- Abb. 3.16** Aktivität von Mycro1 und Mycro2 gegen STAT3 und Lck
- Abb. 3.17** Affinitätschromatographisch gereinigtes Myc-CFP und Fos

- Abb. 3.18** *Electrophoretic Mobility Shift Assays* für c-Myc/Max und Jun/Fos DNA-Bindung
- Abb. 3.19** c-Myc/Max *Electrophoretic Mobility Shift Assay* für das inaktive Derivat 3
- Abb. 3.20** Affinitätschromatographisch gereinigtes GST-Max
- Abb. 3.21** c-Myc/Max GST-*Pulldown* für Mycro1, Mycro2 und das inaktive Derivat 3
- Abb. 3.22** Inhibition der Proliferation von c-Myc-abhängigen Krebszelllinien durch Mycro1 und Mycro2
- Abb. 3.23** Verlangsamung von Proliferation und S-Phase Eintritt durch Mycro1 und Mycro2 in NIH/3T3-Zellen
- Abb. 3.24** Effekt von Mycro1 und Mycro2 auf die Proliferation der c-Myc-unabhängigen PC-12 Zelllinie
- Abb. 3.25** c-Myc-abhängige Luciferaseaktivität
- Abb. 3.26** Effekt der Verbindungen auf die c-Myc-abhängige Reporteragenaktivität
- Abb. 3.27** Luciferaseassays für die dimeren Transkriptionsfaktoren AP-1 und SRF
- Abb. 3.28** Effekt von Mycro1 und Mycro2 auf die AP-1- und SRF-abhängige Luciferaseaktivität
- Abb. 3.29** Western Blot der stabilen c-Myc oder v-Src überexprimierenden Rat1a-Zellen
- Abb. 3.30** Mycro1 und Mycro2 inhibieren die c-Myc-abhängige Transformation von Rat1a-Zellen
- Abb. 4.1** Zusammenfassung der Hochdurchsatzanalyse für c-Myc/Max DNA-Inhibitoren
- Tab. 2.1** Verwendete Plasmidmengen für die Luciferaseassays (c-Myc, AP-1, SRF)

1. Einleitung

1.1 Protein-Protein-Interaktionen

Eine große Herausforderung der heutigen Wissenschaft besteht in der Aufklärung der genauen Funktionsweise eines Proteins. In der Regel erfüllen Proteine ihre Funktionen als Teil von Proteinkomplexen, so dass Protein-Protein-Interaktionen eine Schlüsselrolle in zahlreichen biologischen Prozessen bilden. Sie vermitteln strukturelle Aufgaben durch den Aufbau hochmolekularer Komplexe und sind für die intrazelluläre Kommunikation, sowie den programmierten Selbstmord der Zelle von Bedeutung. Dabei kommt es bereits an der Zelloberfläche zu Protein-Protein-Interaktionen. Für die korrekte Weiterleitung inter- und intrazellulärer Signale sorgen extrazelluläre Proteine, so genannte Liganden, die durch Bindung an entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche Signaltransduktionskaskaden auslösen. Die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, wie z. B. des EGFR (*epidermal growth factor receptor*) erfolgt durch die Bindung eines spezifischen Liganden und die in der Regel dadurch initialisierte Dimerisierung der Rezeptormonomere. Die dadurch erzielte Konformationsänderung führt zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase und darauf folgender Auto- oder Trans-Phosphorylierung im intrazellulären Bereich des Rezeptors (Liebmann, 2001). Die phosphorylierten Tyrosine dienen der Interaktion mit weiteren SH2 (*src homology 2*)-Domänen tragenden Proteinen, wie z. B. Shc (*SH2-domain containing*) oder Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2*). Dies führt zur Rekrutierung und Aktivierung des Ras-Aktivators Sos (*son of sevenless*) und zur Initiierung der Proteinkinase-Kaskade Ras-Raf1-MEK1/2-ERK1/2. Auch im Zellkern erfolgt die Weitergabe der Information über Protein-Protein-Interaktionen. Dimere Transkriptionsfaktoren, wie z. B. c-Myc oder c-Jun, sorgen im Verbund mit weiteren Proteinen des Transkriptionskomplexes für die Expression ihrer Zielgene (Davis, 1993; Kolch, 2005; Normanno *et al.*, 2006). In Abbildung 1.1 ist zur Verdeutlichung der Signifikanz von Protein-Protein-Interaktionen exemplarisch der Ras-Signaltransduktionsweg dargestellt.

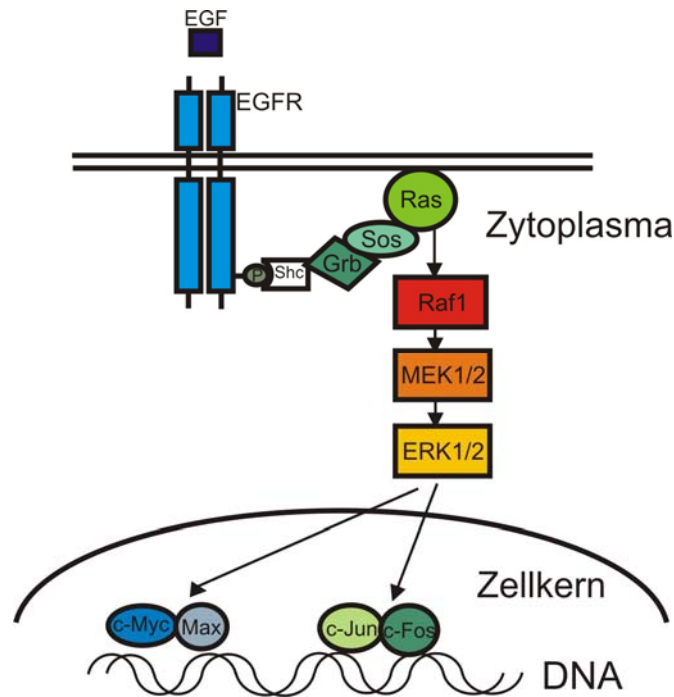


Abb. 1.1: Vereinfachte Darstellung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs

Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) durch Bindung des Liganden (EGF) an die extrazelluläre Domäne induziert Dimerisierung und darauf folgende Auto- oder Trans-Phosphorylierung im intrazellulären Bereich des Rezeptors. Diese phosphorylierten Reste dienen unter anderem als Bindungsstellen für Adapterproteine, wie z. B. Shc, welches durch Interaktion mit Grb2 die Signalweiterleitung über Sos, Ras, Raf1, MEK1/2 und ERK1/2 bis in den Zellkern vermittelt. Dimere Transkriptionsfaktoren wie c-Myc oder c-Jun sorgen dort im Verbund mit weiteren Proteinen des Transkriptionskomplexes für die Expression ihrer Zielgene.

Die Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen stellt somit eine entscheidende Möglichkeit zur Untersuchung einzelner Funktionen eines Proteins in der Zelle dar. Da fehlerhafte Protein-Protein-Interaktionen aber auch die Ursache für verschiedene Krankheiten sein können, ermöglicht ihre Inhibierung die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für die Medizin (Arkin & Wells, 2004).

1.2 Ansätze zur Inhibierung von Proteinen

In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um gezielt die Funktion einzelner Proteine auszuschalten, und somit ihre Interaktion mit anderen Proteinen zu unterbinden. Dabei wird die Funktion des Proteins entweder, wie im Falle der Antisense-Technologien bereits auf Genebene ausgeschaltet, oder man interferiert direkt mit der Wechselwirkung des Proteins mit seinen Interaktionspartnern, worauf die Funktionsweise von Antikörpern, Peptiden, Peptidmimetika oder niedermolekularen Inhibitoren basiert. Die einzelnen Ansätze sollen im Folgenden kurz diskutiert werden.

1.2.1 Antisense-Technologien

Mittels Antisense-Technologie lässt sich die Expression bestimmter Gene sequenzspezifisch inhibieren. Drei Strategien dieser Technologie sind mittlerweile bekannt: einzelsträngige Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme und RNA-Interferenz mittels kurzer RNA Moleküle (siRNA).

Antisense-Oligonukleotide sind 15 – 20 Nukleotide lang und komplementär zur mRNA des Zielgens. Durch die Bindung an die entsprechende mRNA-Sequenz blockieren sie entweder die Translation, indem sie die Ribosomen arretieren, oder sie induzieren die Aktivität der RNase H, einer Endonuklease, die RNA-DNA-Hybride erkennt und daraufhin den RNA-Strang schneidet, was zur Degradierung der mRNA führt (Kurreck, 2003).

Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle, die die Phosphodiesterbindung in RNA spalten können. Dazu hybridisieren sie über den Substrat-Erkennungs-Bereich mit komplementären RNA-Sequenzen. Das am häufigsten verwendete RNA-Enzym ist das Hammerhead Ribozym. Modifikation seines Substrat-Erkennungs-Bereichs erlauben die gezielte Erkennung und somit Ausschaltung einzelner Gene (Akashi *et al.*, 2005).

Bei RNA-Interferenz handelt es sich um einen natürlichen Mechanismus der posttranskriptionellen Genunterdrückung. Sie wird durch lange, doppelsträngige RNA-Moleküle initiiert, die von dem Enzym Dicer zu 21 - 23 Basenpaar langen RNA-Molekülen gekürzt werden. Diese interagieren dann mit der komplementären mRNA des Proteins, in einem als RISC (*RNA-induced silencing complex*) bezeichneten RNA-Protein-Komplex, in dem eine Nuklease den Abbau der mRNA betreibt (Hammond, 2005).

Antisense-Technologien stellen somit eine Möglichkeit dar, zielgerichtet die Funktion einzelner Proteine auszuschalten. Jedoch haben sie mit dem Problem der zellulären Aufnahme zu kämpfen. Des Weiteren sind Antisense-Technologien dem rapiden Abbau durch Nukleasen in der Zelle ausgesetzt. Da ihre Funktion bereits auf der Ausschaltung des Gens basiert, bewirken sie eine irreversible Unterdrückung der Expression des Zielproteins. Diese unwiderrufliche Art der Inhibition ist angesichts der Untersuchung der Funktionsweise von für die Zelle essentiellen Proteinen nicht immer wünschenswert.

1.2.2 Antikörper

Monoklonale Antikörper sind seit der Entwicklung der Hybridoma-Technik von Milstein und Köhler im Jahr 1975 (Kohler & Milstein, 1976) ein wichtiges Werkzeug der Wissenschaft, wie auch der pharmazeutischen Industrie geworden. Ihre Funktionsweise lässt sich im Allgemeinen zweiteilen: so greifen sie zum einen in die Signaltransduktion ein, indem sie z. B. durch die Blockade der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand intrazelluläre Signalwege hemmen. Auf der anderen Seite rekrutieren sie Komponenten des Immunsystems, wie z. B. das Komplementsystem (Kim *et al.*, 2005). Der große Vorteil von Antikörpern zur Modulation von Protein-Protein-Interaktionen liegt in der hohen Spezifität der Antigenerkennung. Das erlaubt es der pharmazeutischen Industrie, Antikörper zielgerichtet zur Tumorthherapie einzusetzen. So wird Trastuzumab (Herceptin[®], Genentech) zur Behandlung von Brustkrebs bei Frauen, die den Rezeptor HER-2 überexprimieren, eingesetzt. Man geht davon aus, dass der Antikörper unter anderem die Dimerisierung und HER-2-vermittelte Signaltransduktion unterbindet, wobei die genaue Wirkungsweise noch nicht geklärt ist (Nahta & Esteva, 2006). Als größtes Problem dieser Methode gilt die bedingt durch ihre Größe schlechte Zellpermeabilität der Antikörper, die ihre Anwendung auf Rezeptormoleküle beschränkt.

1.2.3 Peptide und Peptidmimetika

Des Weiteren können Peptide und Peptidmimetika zur Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden. Sie haben den Vorteil, dass sich ihre Sequenz von der Grenzfläche zwischen den Zielproteinen ableiten lässt, und die Wechselwirkung zwischen den Proteinen durch kompetitive Bindung an eines der Proteine erreicht werden kann. So konnte gezeigt werden, dass ein kurzes, synthetisches, von p53 abgeleitetes Peptid die Interaktion des Tumor-Suppressors mit MDM2 inhibieren kann (Picksley *et al.*, 1994). Durch Optimierung der Sequenz mittels Phagen-Display (Bottger *et al.*, 1996) und Verkürzung konnte das ursprüngliche Dodecapeptid auf acht Aminosäuren verkürzt werden, ohne dass es an Effizienz verlor (Chene *et al.*, 2000). Weitere Verbesserungen der Aktivität und Spezifität erhofft man sich z. B. durch den Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren.

Ebenfalls viel versprechende Peptide basieren auf der 1984 von Pierschbacher und Ruoslahti als minimales Integrinbindungsmotiv identifizierte Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984). So konnte mit dem cyclischen Peptid cyclo(RGDfV) der erste biologisch aktive und selektive Antagonist des, an der Tumor-induzierten Angiogenese beteiligten Integrinrezeptors $\alpha_v\beta_3$ identifiziert werden (Aumailley *et al.*, 1991; Gurrath *et al.*, 1992). Durch N-Methylierung der Aminosäure Valin lies sich die Struktur weiterhin verbessern, so das biologische Aktivitäten im unteren nanomolaren Bereich erzielt werden konnten (Dechantsreiter *et al.*, 1999). Dieses cyclische Peptid cyclo(RGDf-N(Me)V) (Cilengitide) befindet sich mittlerweile als Angiogenesehemmer in klinischen Studien der Phase I/II. Peptide, wie auch Peptidmimetika stellen eine gute Möglichkeit dar, reversibel die Funktion eines Proteins zu inhibieren. Jedoch leidet ihre Anwendung bezüglich intrazellulärer Protein-Protein-Wechselwirkungen generell an der schlechten Zellgängigkeit.

1.2.4 Niedermolekulare Inhibitoren

Unter niedermolekularen Inhibitoren versteht man in der Regel kleine organische Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 500 Da, wobei im Falle von Naturstoffen und daraus abgeleiteten Substanzen das Molekulargewicht auch darüber liegen kann. Die Eignung niedermolekularer Verbindungen als Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist bereits anhand vieler Naturstoffe eindrucksvoll gezeigt worden. So binden die Taxane Paclitaxel (Taxol) (Rowinsky, 1997) und sein semisynthetisches Derivat Docetaxel (Taxoter) (Guenard *et al.*, 1993) an die β -Untereinheit des Tubulin-Heterodimers und stabilisieren so die Wechselwirkung zwischen Tubulin-Heterodimeren, wodurch die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli beschleunigt wird. Da Mikrotubuli während der Mitose nicht nur polymerisieren, sondern auch depolymerisieren müssen, führt diese Stabilisierung zum Zellzyklusarrest und schließlich zur Apoptose, ein Ansatz der bereits zur Behandlung einiger Krebsarten genutzt wird.

Ein weiteres Beispiel ist Antimycin A, ein kompetitiver Inhibitor der Bindung der anti-apoptotischen Moleküle Bcl-2 oder Bcl-x_L an die BH3-Domäne des pro-apoptotischen Proteins Bak (Tzung *et al.*, 2001). Da die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 oder

Bcl-x_L dadurch gehemmt wird, löst Antimycin A, ebenso wie Taxol, den programmierten Zelltod aus.

Doch die Entwicklung solcher niedermolekularer organischer Moleküle zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist mit einigen Schwierigkeiten verbunden. So fehlt in der Regel eine Leitstruktur, von der potentielle Inhibitoren abgeleitet werden könnten, da natürlich vorkommende proteinbindende niedermolekulare Moleküle nicht für jedes Target bekannt sind. In einigen Fällen kommt erschwerend hinzu, dass die Grenzflächen der Protein-Protein-Interaktion relativ eben sind und keine offensichtlichen Bindungsstellen für niedermolekulare Inhibitoren aufweisen (Berg, 2003).

Des Weiteren übersteigt die Grenzfläche der Protein-Protein-Interaktion mit in der Regel mehr als 1100 Å² (Lo Conte *et al.*, 1999) die potentielle Bindungsfläche einer niedermolekularen Verbindung um ein Vielfaches. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass selbst ein kleiner Teil der Protein-Protein-Grenzfläche einen großen Beitrag zur freien Energie der Bindung zwischen den Proteinen liefern kann. Solche so genannten *Hot-Spots* sind häufig im Zentrum der Protein-Protein-Grenzfläche zu finden und sind von energetisch eher unwichtigen Aminosäuren umgeben, die der Abschirmung der *Hot-Spots* gegen Lösungsmittelmoleküle dienen (Bogan & Thorn, 1998). Die *Hot-Spots* Theorie sowie die Tatsache, dass bereits einige niedermolekulare Inhibitoren von Protein-Protein-Grenzflächen beschrieben sind, machen diese Moleküle zu interessanten Werkzeugen für die Forschung.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Methoden zur Modulation von Protein-Protein-Interaktionen besitzen niedermolekulare Verbindungen den großen Vorteil zellgängig zu sein, insbesondere dann, wenn sie die von Lipinski und seinen Mitarbeitern ermittelten Eigenschaften mit sich bringen. Diese werden in der Literatur oft auch als *Rule of Five* bezeichnet, die besagt, dass Stoffe mit den folgenden Voraussetzungen ein hohes Permeationsvermögen besitzen (Lipinski *et al.*, 2001):

- $\log P < 5$
- Molmasse < 500 Da
- Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (O- und N-Atome) < 10
- Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donoren (OH- und NH-Gruppen) < 5

Bei P handelt es sich dabei um den Verteilungskoeffizienten, der definiert ist als der Quotient aus der Konzentration des unionisierten Stoffes in *n*-Oktanol und in Wasser und somit die lipophilen und hydrophilen Eigenschaften des Stoffes beschreibt.

Darüber hinaus können niedermolekulare Verbindungen anders als Antisense-Technologien unter hoher zeitlicher Kontrolle eingesetzt werden, was z. B. Zellzyklus-spezifische Untersuchungen ermöglicht. Ihre generelle Reversibilität erlaubt auch das Studium von Proteinen, die für die Zelle von essentieller Bedeutung sind und stellt somit eine gute Alternative zu konditionalen *knock-outs* dar.

1.3 Identifizierung niedermolekularer Modulatoren von Protein-Protein-Interaktionen mittels Hochdurchsatzanalyse

1.3.1 Verschiedene Screeningmethoden

Auf Grund mangelnder Informationen über Leitstrukturen zur rationalen Entwicklung niedermolekularer Modulatoren von Protein-Protein-Interaktionen werden Hochdurchsatzverfahren (HTS = *high throughput screening*) zur Identifizierung von Strukturmotiven angewandt (Berg, 2003). Dabei werden in der Regel große chemische Bibliotheken auf ihre Fähigkeit hin durchsucht, mit Protein-Protein-Interaktionen interferieren zu können. Drei Vorgehensweisen sind dabei zu unterscheiden:

- *In vitro* Screening
- Zellbasiertes Screening
- Virtuelles (*in silico*) Screening

Das *in vitro* Screening bedient sich biochemischer Assays zur Identifizierung gesuchter Inhibitoren. Dabei hat es den großen Vorteil, dass man diese Ansätze sehr spezifisch gestalten kann, ganz im Gegensatz zu zellbasierten Screeningmethoden, bei denen man immer das wesentlich komplexere System der Zelle berücksichtigen muss. Meistens handelt es sich bei den *in vitro* Ansätzen auch um wesentlich weniger aufwendige Methoden, als bei den zellbasierten.

Das Durchmustern großer Bibliotheken direkt in der Zelle ermöglicht jedoch sogleich Aussagen über Zellgängigkeit und Toxizität der einzelnen Verbindungen. So lässt sich die Zellgängigkeit niedermolekularer Inhibitoren *in vitro* oder *in silico* Screens nur auf Grund bestimmter Gesetzmäßigkeiten wie der *Rule of Five* vorhersagen, eine Verifizierung in der Zelle ist jedoch nach dem erfolgten Screen in jedem Fall nötig.

In silico können große Bibliotheken vor allem in sehr kurzer Zeit und zudem kostengünstig untersucht werden. Allerdings benötigt das virtuelle Screening detaillierte Informationen über die Struktur der Protein-Protein-Grenzfläche. Die häufig unbekannte Plastizität dieser Grenzflächen erschwert die *in silico* Vorgehensweise (Jones & Thornton, 1996).

1.3.2 Fluoreszenzpolarisation als *in vitro* Screeningmethode

In dieser Arbeit wird ein *in vitro* Screeningverfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung, basierend auf Fluoreszenzpolarisation, vorgestellt.

Fluoreszenzpolarisation wurde erstmals 1926 von Perrin als eine Methode beschrieben, bei der nicht die Messung der Fluoreszenzintensität von Bedeutung ist, sondern die Änderung der Polarisationsrichtung der linear polarisierten Fluoreszenzemission.

Bei Anregung eines Fluorophors mit polarisiertem Licht bleibt auch das emittierte Licht polarisiert, sofern das Molekül in Lösung nicht rotiert. Auf Grund der Brownschen Molekularbewegung der Moleküle kommt es jedoch zu einer Depolarisation des emittierten Lichts. Die Stärke der Depolarisation hängt dabei von der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Rotationsdiffusion während der Lebensdauer des angeregten Zustands ab. So bewegen sich große Moleküle nur wenig innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustands des Fluorophors. Kleine Moleküle hingegen weisen eine größere Beweglichkeit auf, so dass die Ebene des emittierten Lichts relativ zur Anregungsebene depolarisiert wird. Dadurch kann zum Beispiel die Bindung eines großen Interaktionspartners an ein kleines fluoreszierendes Molekül dessen Rotationsbewegung verlangsamen und somit eine geringere Depolarisierung des Fluorophors hervorrufen (Nasir & Jolley, 1999).

Diese Eigenschaften wurden in der Arbeit genutzt, um die Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max, sowie die Inhibierung der Dimerisierung und DNA-Bindung durch kleine organische Moleküle zu untersuchen. Dazu wurden kurze, die entsprechenden Proteinbindungssequenzen enthaltende doppelstängige Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (entweder Texas Red oder Fluorescein) markiert wurden, verwendet (2.1.6). Während sich diese freie DNA auf Grund ihrer Größe in Lösung sehr schnell drehen kann, führt die Bindung von c-Myc/Max an die DNA auf Grund der Größe und Form der Proteine zu einer Verlangsamung der Rotation

und somit zu einer Erhöhung der Polarisation des emittierten Lichts (Rishi *et al.*, 2005). Inhibitoren der Proteindimerisierung oder der DNA-Bindung führen in beiden Fällen zu freier DNA. Das Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsassays ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

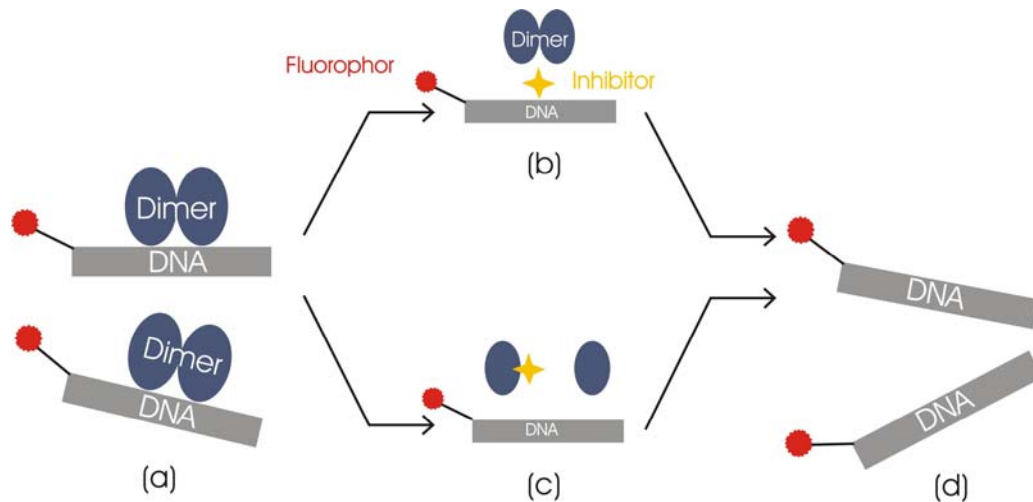


Abb. 1.2: Prinzip des Fluoreszenzpolarisationsassays

Der Komplex aus Proteindimer und DNA kann sich in Lösung nur langsam drehen (a), weswegen das emittierte Licht stark polarisiert ist. Inhibitoren die entweder die DNA-Bindung (b) oder die Dimerisierung (c) unterbinden, führen in beiden Fällen zu freier DNA, die auf Grund ihrer im Vergleich zum Komplex geringen Größe und Form schnell rotieren (d) kann, und somit stark depolarisiertes Licht emittiert.

1.4 Der Transkriptionsfaktor *c-Myc*

1.4.1 Das *c-myc* Gen

Das Proto-Onkogen *c-myc* wurde ursprünglich als das zelluläre Homolog des viralen Onkogen *v-myc* des „avian leukemia virus (ALV)“ identifiziert (Sheiness *et al.*, 1978). Dieser Retrovirus induziert bei Vögeln neben Karzinomen und Sarkomen die Myelocytomatose, woher das Gen seinen Namen trägt.

Neben *c-myc* wurden noch *N-myc* und *L-myc*, sowie die bis jetzt noch wenig charakterisierten, in Nagern vorkommenden Gene *S-myc* und *B-myc* gefunden. Die Mitglieder der Familie sind evolutionär hoch konserviert, werden aber zelltypspezifisch und zu unterschiedlichen Zeiten in der Entwicklung exprimiert. Während *N-myc* vor allem in neuronalen Zellen vorkommt und dort bei Überexpression Neuroblastome verursacht, wurde *L-myc* im kleinzelligen Lungenkarzinom entdeckt (Nau *et al.*, 1985; Schwab *et al.*, 1983).

Das humane *c-myc* Gen besteht aus 3 Exons, wobei Exon 2 und Exon 3 den offenen Leserahmen des Proteins codieren. Das Gen besitzt mehrere Promotoren, wobei in 75 – 90 % der Fälle Promoter P2 benutzt wird, der zur Expression zweier Proteine von 64 kDa und 67 kDa führt (Henriksson & Luscher, 1996).

1.4.2 Struktur des c-Myc Proteins

Das c-Myc Protein ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut (Abb. 1.3). Die N-terminale Domäne (NTD) enthält zwei der drei hochkonservierten Myc-Boxen, Myc-Box I (MBI) und Myc-Box II (MBII). Diese sind essentiell für die Transkriptionsaktivität des Proteins (Adhikary & Eilers, 2005). Die in der zentralen Region des Proteins zu findende, noch wenig untersuchte Myc-Box III (MBIII) spielt eine Rolle bei der c-Myc-vermittelten transkriptionellen Repression, sowie als negativer Regulator der Apoptose (Herbst *et al.*, 2005). In der C-terminalen Domäne (CTD) befindet sich das basische Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper Motiv (b-HLH-Zip). Der basische Bereich und die N-terminale Helix des HLH-Motivs vermitteln die sequenzspezifische DNA-Bindung, während die C-terminale Helix und der Leuzin-Zipper für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich sind. c-Myc kann, nach heutigem Wissensstand, seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausschließlich als heterodimerer Komplex mit dem b-HLH-Zip Protein Max (**Myc associated Factor X**) erfüllen (Abb. 1.3) (Blackwood & Eisenman, 1991). Das Heterodimer bindet für die transkriptionelle Regulation seiner Zielgene an die kanonische E-Box Sequenz 5'-CACGTG-3', sowie an ähnliche Sequenzen (Ma *et al.*, 1993). Des Weiteren befindet sich ein nukleäres Lokalisierungs-Signal (NLS) in der CTD des Proteins, das die Lokalisierung des Proteins in den Zellkern steuert (Dang & Lee, 1988).

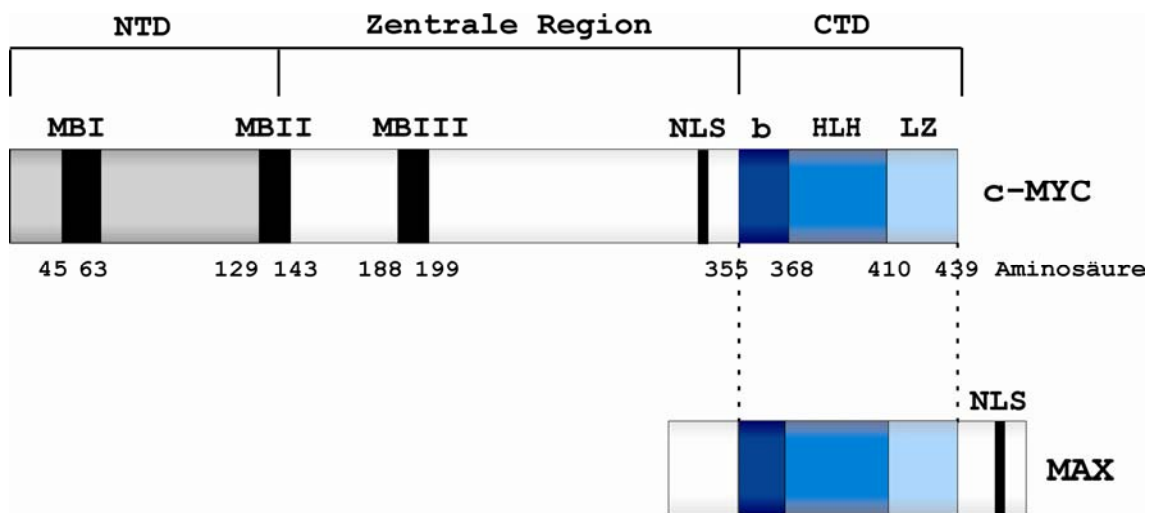


Abb. 1.3: Strukturelle Domänen von c-Myc und seinem Interaktionspartner Max

Das b-HLH-Zip Protein c-Myc ist aus drei Domänen aufgebaut. Die N-terminale Domäne (NTD) umfasst die Aminosäuren 1-143 und enthält die zwei hochkonservierten Myc-Boxen (MBI, MBII). Die dritte hochkonservierte Myc-Box (MBIII) befindet sich in der zentralen Region. Die die Aminosäuren 355-439 umfassende C-terminale Domäne (CTD) vermittelt über die b-HLH-Zip Bereiche die Dimerisierung von c-Myc mit dem b-HLH-Zip Protein Max. Beide Proteine besitzen ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS).

Die Kristallstruktur des Komplexes wurde 2003 von Burley *et al.* publiziert (Abb. 1.4). Jede Hälfte des Heterodimers besteht aus zwei langen α -Helizes, die durch einen kurzen Loop voneinander getrennt sind. Die N-terminale α -Helix besteht aus der basischen Region und der ersten Helix der HLH-Zip-Domäne. Auch die C-terminale α -Helix stellt ein kontinuierliches Sekundärstrukturelement bestehend aus Helix 2 und Leuzin-Zipper dar. Anders als c-Myc kann Max auch Homodimere bilden. Diese Eigenschaft liegt in der Sequenz der Leuzin-Zipper begründet. Während die neutralen Aminosäuren Glutamin und Asparagin an Position 91 und 92 in Max/Max Homodimeren eine Tetrade (Gln91-Asn92-Gln91*-Asn92*) bilden, verhindern die positiv geladenen Guanidiniumgruppen der Aminosäure Arginin die Ausbildung der Tetraden (Arg423-Arg424-Arg423*-Arg424*), und somit die c-Myc Homodimerisierung. c-Myc/Max Heterodimerisierung findet jedoch, auf Grund der Anordnung der komplementären polaren Reste an den entsprechenden Positionen (Gln91-Asn92-Arg423*-Arg424*) bevorzugt statt, da es hier zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen an der Schnittstelle des Heterodimers kommen kann (Nair & Burley, 2003).

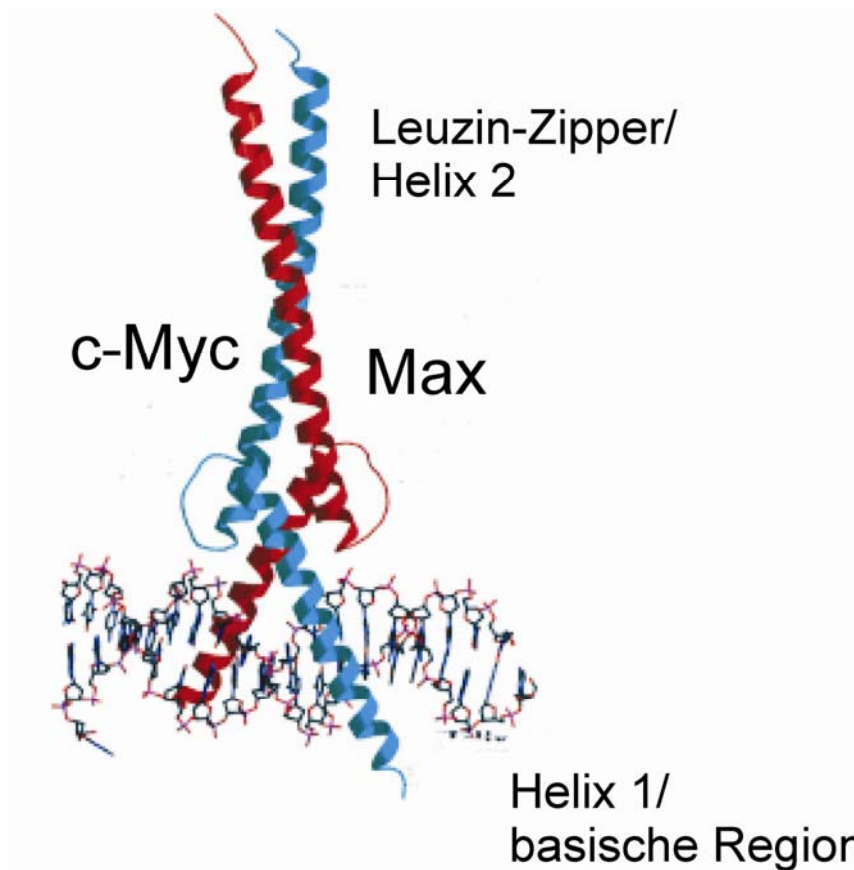


Abb. 1.4: Dreidimensionale Struktur des c-Myc/Max Heterodimers

Jede Hälfte des Heterodimers besteht aus zwei langen α -Helizes, die durch einen kurzen *random coil loop* unterbrochen werden. Die N-terminale Helix setzt sich dabei aus der basischen Region und der Helix 1 zusammen, die C-terminale Helix aus Helix 2 und dem Leuzin-Zipper Bereich des jeweiligen Proteins. Die DNA-Bindung wird durch die N-terminalen Helizes vermittelt (modifiziert nach (Nair & Burley, 2003)).

1.4.3 Das Myc/Max/Mad Netzwerk

Während c-Myc vor allem in Zellen mit hoher Proliferationsrate exprimiert wird und nur über eine kurze Halbwertszeit von 20 bis 30 Minuten verfügt, wird Max konstitutiv in proliferierenden und differenzierenden Zellen exprimiert und besitzt zudem eine wesentlich längere Halbwertszeit. Dazu passt, dass Max neben c-Myc noch mit den anderen b-HLH-Zip Proteinen Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4 und Mnt dimerisiert, welche vor allem in differenzierenden Zellen exprimiert werden. Während c-Myc/Max Dimere Proliferation, Wachstum und Apoptose induzieren, löst die Bindung von Max an einen dieser anderen Partner antagonistische Funktionen in der Zelle, wie Differenzierung und Wachstumsarrest, aus (Henriksson & Luscher, 1996).

1.4.4 c-Myc als Transkriptionsaktivator und Repressor

c-Myc kann die Transkription von Zielgenen sowohl aktivieren, wie auch reprimieren (Abb. 1.5). Dazu benötigt es jedoch immer seinen Dimerisierungspartner Max. Der Komplex aktiviert die Transkription, wenn er direkt an die DNA-Erkennungssequenz (E-Box) gebunden vorliegt. Die Repression der Transkription hingegen erfolgt durch Inaktivierung von Miz-1. c-Myc/Max verhindert durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Miz-1 dessen Aktivität, zum einen indem es die Rekrutierung der Histon-Acetyltransferase p300 verhindert (Herold *et al.*, 2002; Staller *et al.*, 2001). Zum anderen rekrutiert c-Myc die DNA-Methyltransferase DNMT3a, was darauf schließen lässt, dass die Transkriptionsrepression zum Teil durch Methylierung der Zielgen-Promotoren erreicht wird (Brenner *et al.*, 2005).

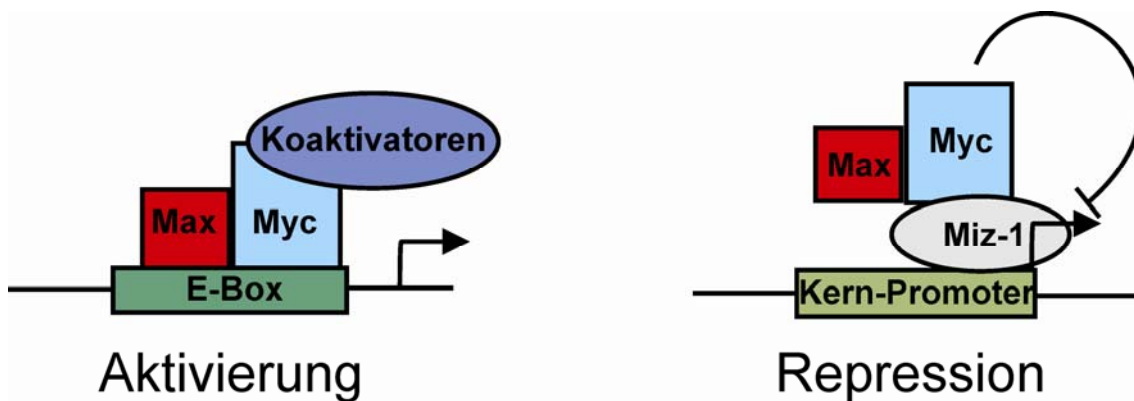


Abb. 1.5: c-Myc/Max reguliert die Aktivierung, sowie die Repression von Genen

c-Myc kann die Aktivierung von Genen regulieren, indem es als Heterodimer an die E-Box-Sequenz bindet. Indirekt können c-Myc/Max Heterodimere auch die Repression von Genen steuern, indem sie indirekt über das Zinkfinger-Protein Miz-1 an DNA binden.

1.4.5 Die physiologischen Funktionen von c-Myc

Seine physiologischen Funktionen übt c-Myc durch die Regulation der Expression zahlreicher Zielgene aus. In den letzten Jahren konnten durch Genchip-, SAGE- (*serial analysis of gene transcription*) und ChIP- (**Chromatin Immunopräzipitation**) Analysen bis zu 1000 potentielle c-Myc Zielgene identifiziert werden (Patel *et al.*, 2004). Diese Zahl ist möglicherweise artifiziell hoch, da häufig nicht zwischen direkten und indirekten Zielgenen unterschieden wurde. Auch ist die Veränderung in der Genexpression dieser Zielgene mit 3- bis 5-fach sehr gering, was die Untersuchungen erschwert. Eine Gliederung der Zielgene zeigt, dass diese an vielen verschiedenen zellulären Stoffwechselprozessen und Signalwegen beteiligt sind, wie z. B.

Zellzyklusregulation, Zellwachstum, Differenzierung, genomische Instabilität, Apoptose und Immortalität (Abb. 1.6) (Grandori *et al.*, 2000).

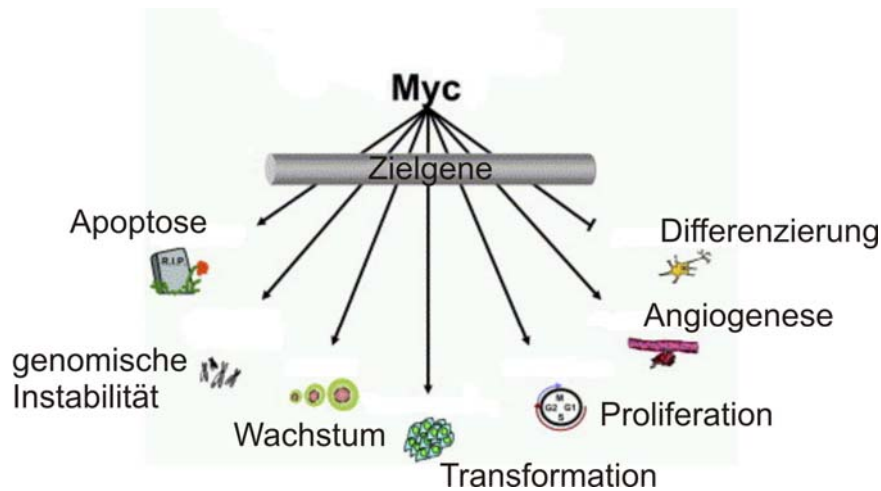


Abb. 1.6: Übersicht über die verschiedenen Funktionen von c-Myc

c-Myc reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl von Zielgenen. Diese lassen sich gliedern in Regulatoren von Apoptose, genomischer Instabilität, Wachstum, Transformation, Proliferation, Angiogenese und Differenzierung (modifiziert nach (Ponzielli *et al.*, 2005))

Eine der Hauptfunktionen von c-Myc ist die Zellzyklusregulation (Amati, 2001; Dang, 1999). In ruhenden Zellen ist die Expression von c-Myc kaum nachweisbar. Erst nach Stimulation durch Serum oder Mitogene kommt es zu einer Induktion der *c-myc* mRNA sowie des c-Myc Proteins, und die Zellen treten in die G1-Phase des Zellzyklus ein. In proliferierenden Zellen verringert sich die Menge an c-Myc auf ein niedriges, gleich bleibendes Niveau, welches nach Serumentzug oder Entzug von Wachstumsfaktoren wieder abfällt und die Zelle arretiert.

Insbesondere steuert c-Myc den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus (Coller *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2000; Schuhmacher *et al.*, 2001). Dazu muss die Zelle den so genannten Restriktionspunkt (R) überwinden. Dieser Checkpoint wird durch das Tumorsuppressorprotein Rb (Retinoblastom) kontrolliert, dass durch Phosphorylierung durch die Kinasen Cdk2 und Cdk4 inaktiviert werden kann. Die Rolle von c-Myc in diesem Prozess ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

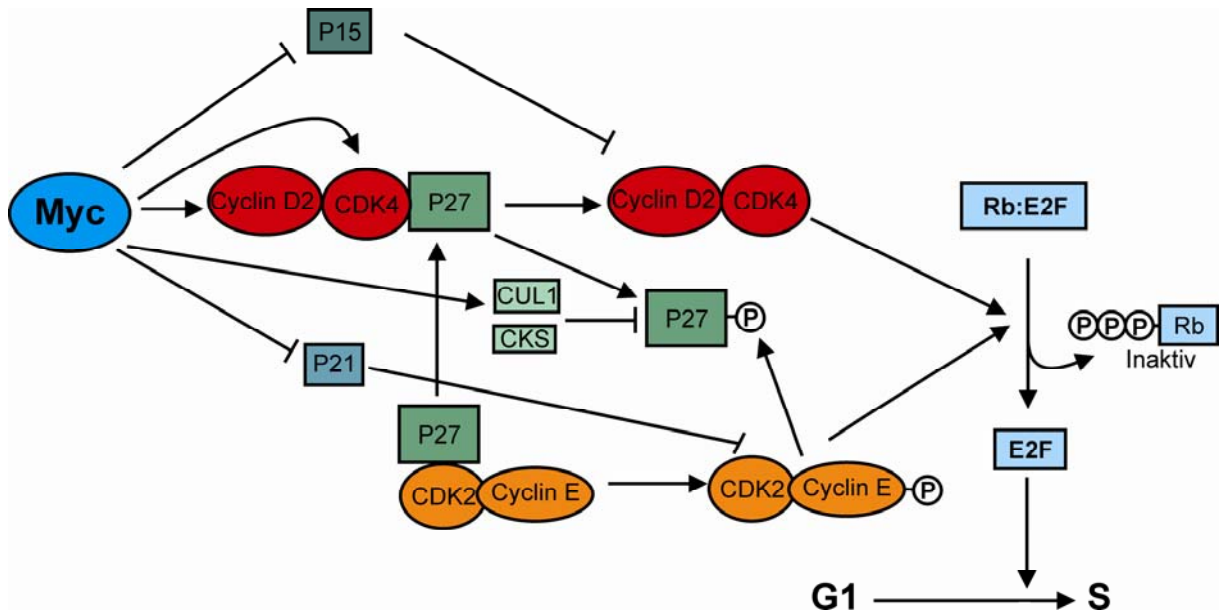


Abb. 1.7: c-Myc steuert den Übergang der G1- zur S-Phase des Zellzyklus

c-Myc reguliert den G1/S-Phase Übergang des Zellzyklus unter anderem durch Aktivierung seiner Zielgene Cdk4 und CyclinD2. Diese inaktivieren den Cyclin/Cdk Inhibitor p27, wodurch der Komplex aus CyclinE und Cdk2 aktiviert wird. Weiterhin inhibiert c-Myc die Cyclin/Cdk Inhibitoren p15 und p21. All diese Schritte haben die Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins Rb und somit den G1/S-Übergang zur Folge.

c-Myc aktiviert die Zielgene Cdk4 und CyclinD2, die als aktiver Komplex den Cyclin/Cdk Inhibitor p27 sequestrieren. Dadurch wird der CyclinE/Cdk2 Komplex aktiviert, der daraufhin p27 phosphoryliert, sodass es unter Beteiligung von Cul1 und Csk2 durch einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex abgebaut werden kann. Bei Cul1 und Csk2 handelt es sich ebenfalls um c-Myc Zielgene. Weiterhin inhibiert c-Myc die Cyclin/Cdk Inhibitoren p15 und p21, wodurch indirekt ebenso die Kinasekomplexe CyclinD2/Cdk4 und CyclinE/Cdk2 aktiviert werden.

1.4.6 c-Myc und Tumorentwicklung

In den meisten humanen Tumoren liegt eine Überexpression von c-Myc vor, die häufig auf Amplifikation des *c-myc* Gens zurückzuführen ist. Das gilt für Brustkrebs, Prostatakrebs, Darmkrebs und das Neuroblastom (Nesbit *et al.*, 1999). In Lymphomen liegt die Ursache für die Überexpression meist in der Translokation des *c-myc* Gens. So kommt es z. B. beim Burkitt-Lymphom zu einer Translokation des *c-myc* Gens von Chromosom 8 auf die Immunglobulin (Ig)-Loci der Leichtketten auf Chromosom 2 (κ -Leichte-Kette) oder 22 (λ -Leichte-Kette), oder auf den Locus der Ig-Schwerketten (μ -Schwere-Kette) auf Chromosom 14 (Klein, 1999). Aber auch Mutationen in der

codierenden Region des *c-myc* Gens, wie z. B. in den Phosphorylierungsstellen des c-Myc Proteins (Threonin 58, Serin 62) können ursächlich für die Tumorentstehung sein (Nesbit *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren konnten Experimente mit transgenen Mausmodellen zeigen, dass möglicherweise die kurzzeitige Inaktivierung von c-Myc ausreicht, um die Proliferation der Tumorzellen zu stoppen und ihre Differenzierung auszulösen. Dabei wurden induzierbare c-Myc Modelle für Leberzellen (Shachaf *et al.*, 2004), pankreatische Inselzellen (Pelengaris *et al.*, 2002), hämatopoetische Zellen (Felsher & Bishop, 1999) oder Brustdrüsenzellen (D'Cruz *et al.*, 2001) untersucht. Jain *et al.* konnten mittels ihres Mausmodells für Osteosarkome sogar zeigen, dass in den Zellen nach erneuter Aktivierung von c-Myc Apoptose induziert wurde und diese nicht in ihr vorheriges Tumorwachstum zurück verfielen (Jain *et al.*, 2002). Diese Erkenntnisse implizieren, dass eine Inhibierung von c-Myc von Bedeutung für die Tumorthherapie sein könnte.

1.4.7 Niedermolekulare c-Myc-Inhibitoren

In den letzten Jahren wurden bereits verschiedene niedermolekulare c-Myc-Inhibitoren publiziert.

Die ersten nicht-peptidischen, niedermolekularen Substanzen IIA6B17 und IIA4B20 wurden 2002 von Berg *et al.* in einem *in vitro Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) Assay identifiziert, der auf der Dimerisierung von c-Myc/Max basiert. Jedoch behielt nur die Substanz IIA6B17 ihre Aktivität auch in Gegenwart von DNA bei. IIA6B17 inhibierte sowohl die durch c-Myc, wie auch die durch v-Jun-induzierte Fokusbildung in embryonalen Hühnerfibroblastenzellen mit einem IC₅₀-Wert von 20 µM (Berg *et al.*, 2002).

Des Weiteren wurden vier strukturell voneinander unabhängige Substanzen in einem *in vitro* Yeast Two Hybrid Screen gefunden (Yin *et al.*, 2003). Es handelt sich bei diesen Verbindungen zwar um Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung, jedoch wurde ihre *in vitro* Aktivität bezüglich der Inhibition der DNA-Bindung von c-Myc nicht gezeigt. Alle vier Inhibitoren zeigten einen Effekt auf die Proliferationsrate von Fibroblasten, sowie auf die c-Myc-abhängige Transkriptionsaktivität. Ebenso reduzierten sie das Tumorwachstum in Nacktmäusen.

Weiterhin wurde der Effekt von ungesättigten Fettsäuren auf die c-Myc/Max DNA-Bindung beschrieben (Chung *et al.*, 2002). Die Autoren konnten zeigen, dass

ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure oder konjugierte Linolsäure die DNA-Bindung des Heterodimers in *Gelshift*-Experimenten inhibierten. Jedoch zeigte lediglich die konjugierte Linolsäure auch einen Effekt auf die mittels RT-PCR überprüfte c-Myc Zielgenexpression.

Auch für gesättigte Fettsäuren wie Myristin- oder Stearinsäure wurde eine gewisse Aktivität bezüglich c-Myc beschrieben (Jung *et al.*, 2006). Jedoch waren hier die Ergebnisse widersprüchlich. Stearinsäure zeigte zwar eine deutlich stärkere Inhibition der c-Myc/Max DNA-Bindung als Myristinsäure (IC_{50} : 2,2 μ M für Stearinsäure und 97 μ M für Myristinsäure), jedoch konnte durch Zugabe dieser Fettsäure keine Reduktion der Proliferation von HL-60-Zellen beobachtet werden, während Myristinsäure eine geringe Reduktion zeigte.

Aus einer Gruppe planarer und hydrophober Moleküle konnten weitere vier Inhibitoren der c-Myc/Max DNA-Bindung identifiziert werden, wie in *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs) gezeigt wurde (Xu *et al.*, 2006). Jedoch zeigten alle vier Moleküle vergleichbare Reduktion der c-Myc-induzierten, wie auch v-Jun-induzierten Transkriptionsaktivität. Der Effekt der Verbindungen auf die c-Myc-bedingte Transformation wurde ebenso untersucht, wobei zu erwähnen gilt, dass die beste Verbindung nach EMSA Untersuchungen hier keine Aktivität mehr zeigte.

Aus neuesten Untersuchungen von Mo and Henriksson gingen zwei weitere niedermolekulare Inhibitoren MYRA-A und MYRA-B (*Myc pathway response agents*) hervor (Mo & Henriksson, 2006). Diese in einem zellulären Screen identifizierten Verbindungen zeigten zwar einen Effekt auf die Proliferation der c-Myc-abhängigen Zelllinie HOmyc3 und induzierten Apoptose in ebendieser Zelllinie, jedoch konnte nur MYRA-A als Inhibitor der c-Myc/Max DNA-Bindung verifiziert werden. Weder MYRA-A noch MYRA-B inhibierten die Dimerisierung der Proteine, wie mittels Immunopräzipitation überprüft.

In Abbildung 1.8 sind die eben benannten niedermolekularen Inhibitoren zu sehen.

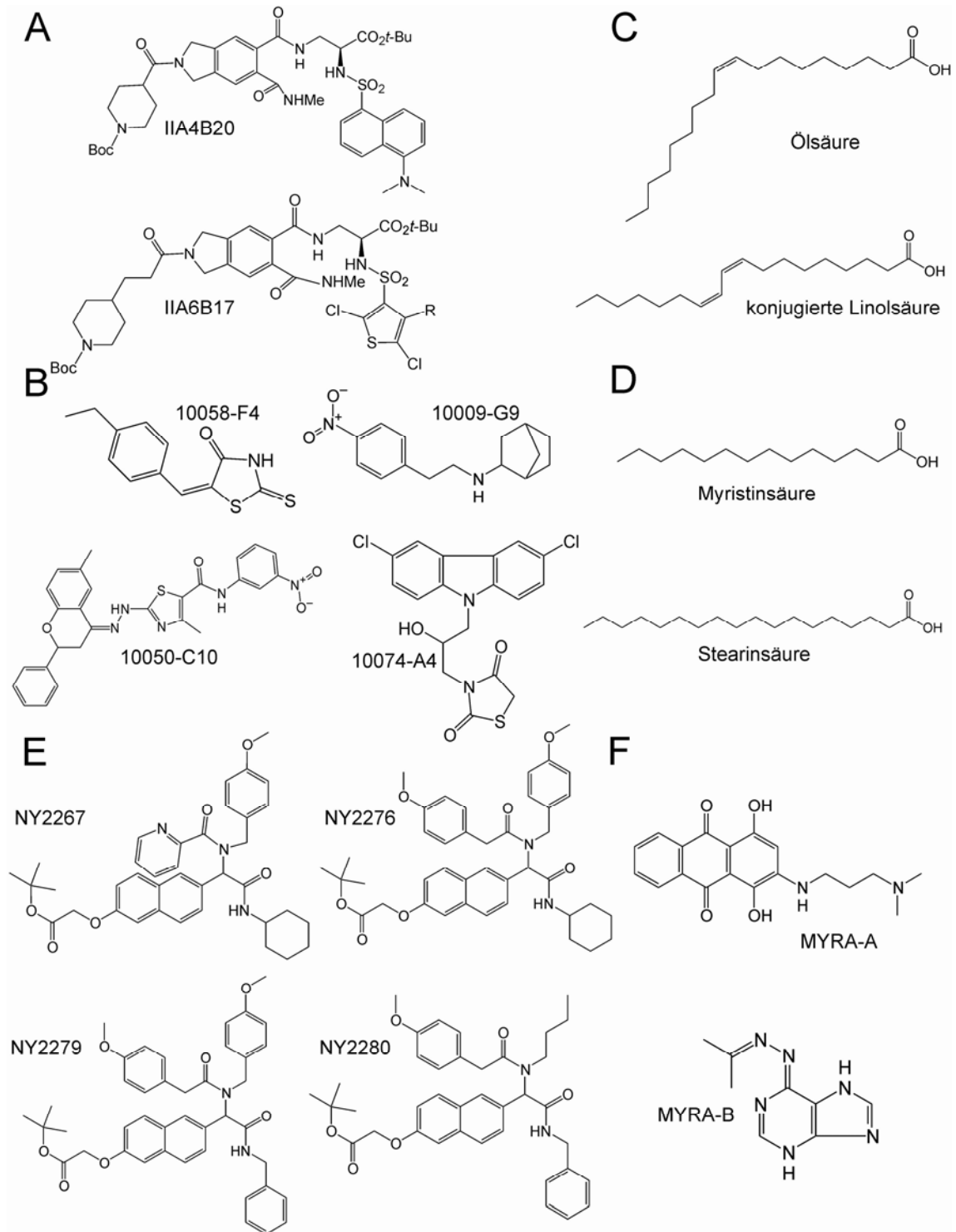


Abb. 1.8: Bekannte niedermolekulare c-Myc-Inhibitoren

A) Berg *et al.* identifizierten 2002 mittels eines *in vitro* FRET-Assays die beiden Verbindungen IIA4B20 und IIA6B17 als Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung (Berg *et al.*, 2002). **B)** Die vier strukturell voneinander unabhängigen Verbindungen 10058-F4, 10009-G9, 10050-C10, 10074-A4 wurden in einem *in vitro* Yeast Two Hybrid Screen gefunden (Yin *et al.*, 2003). **C)** Ungesättigte Fettsäuren als Inhibitoren der c-Myc/Max DNA-Bindung (Chung *et al.*, 2002). **D)** Auch die gesättigten Fettsäuren Myristin- und Stearinsäure inhibieren die DNA-Bindung der Proteine (Jung *et al.*, 2006) **E)** Die planaren, hydrophoben Moleküle NY2267, NY2276, NY2279 und NY2280 wurden 2006 von Xu *et al.* identifiziert (Xu *et al.*, 2006). **F)** MYRA-A und MYRA-B wurden in einem zellulären Screen identifiziert. Nur MYRA-A inhibiert die DNA-Bindung der Proteine. Keine der beiden Verbindungen inhibiert die Dimerisierung von c-Myc und Max (Mo & Henriksson, 2006).

Die Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass es generell möglich ist, die Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max mittels niedermolekularer Verbindungen zu inhibieren. Jedoch stellt insbesondere die Spezifität nach wie vor eine große Herausforderung dar.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor c-Myc stellt sowohl für die Wissenschaft, wie auch für die Medizin ein interessantes Forschungsgebiet dar. Unerlässlich für seine normale Funktionalität in der Zelle, wie auch für seine Rolle in der Tumorentwicklung, ist seine Dimerisierung mit Max, einem anderen Protein der b-HLH-Zip Familie. Somit stellt die Inhibierung der Dimerisierung zwischen c-Myc und Max, sowie deren Bindung an die DNA nicht nur eine gute Möglichkeit dar, ungeklärte Funktionen des Proteins zu klären, sondern sie eröffnet auch neue Wege für die Krebstherapie.

Ziel dieser Arbeit war es, niedermolekulare Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung zu identifizieren. Dazu galt es zuerst einen *in vitro* Fluoreszenzpolarisationsassay zu entwickeln, der die schnelle und effiziente Durchmusterung großer Bibliotheken chemischer Moleküle erlaubten sollte. Potentielle Kandidaten aus dem Hochdurchsatz-Screen sollten im Folgenden mittels verschiedener *in vitro* Methoden verifiziert werden. Ebenso galt es ihre Aktivität auch in zellulären Assaysystemen zu zeigen. Die Spezifität der Verbindungen sollte sowohl *in vitro* als auch in zellulären Systemen überprüft werden, insbesondere in Bezug auf die strukturell sehr ähnlichen Proteine der basischen Leuzin-Zipper Familie.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Adenosintriophosphat (ATP)	Pharmacia, Freiburg
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Bio-Rad, München
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Calbiochem, Bad Soden
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP)	Boehringer, Mannheim
Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP)	Pharmacia, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Geneticin [®] (G 418)	Gibco, Eggenstein
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
Hefeextrakt	Difco, Detroit
4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin -ethansulfonsäure (HEPES)	Serva, Heidelberg
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Fermentas, USA
Kanamycin	Calbiochem, Bad Soden
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Methanol	Sigma, Taufkirchen
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Biomol, Haub
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Nonidet P40 Substitute (NP-40)	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol 4000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Standards und Kits

Bio-Rad Protein Assay	Bio Rad, München
Dualer Luciferase Reporter Assay	Promega, USA
ECL Kit	NEN, Brüssel
Kaleidoscope Marker	Bio Rad, München
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, USA
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
SmartLadder	Eurogentec, Belgien

2.1.3 Chemische Verbindungen

Die Verbindungen Mycro1 und Mycro2 wurden von der Firma ChemDiv bezogen:

Mycro1: Verbindungsnummer 1762-0456

Mycro2: Verbindungsnummer 1762-0445

Verbindung 3 wurde von der Firma Asinex bezogen:

Verbindungsnummer BAS 00923999

Mycro1	[N-(4-methoxybenzyl)-(thiophen-2-yl)-7-(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-2-carboxamid]
Mycro2	[(5-(thiophen-2-yl)-N-(thiophen-2-ylmethyl)-7-(trifluormethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidine-2-carboxamid]
Verbindung 3	[5-(thiophen-2-yl)-N-(thiophen-2-ylmethyl)-7-trifluoromethyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-carboxamid]

Für den Hochdurchsatz-Screen wurden 8298 Verbindungen von ChemDiv und 9000 Verbindungen von Maybridge bezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Substanzbibliotheken größtmögliche strukturelle Diversität aufwiesen, und die Substanzen die Lipinski *Rule of five* erfüllten.

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer

2.1.4.1 Medium für *E. coli*-Bakterien

LB-Medium	1,0 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	1,0 % NaCl
	pH 7,2

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren die benötigten Antibiotika in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 34 µg/ml Chloramphenicol.

Zur Herstellung fester Nährböden wurde das Medium mit 1,5 % Agar versetzt.

2.1.4.2 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze und fötales Kälberserum (FBS) wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glucose, 10 % FBS oder 5 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640, 10 % FBS oder 5 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

McCoy's 5A Medium, 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

Modified Eagle Medium (MEM), 10 % FBS, 1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium: 90% FBS, 10% DMSO

2.1.4.3 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Acrylamidlösung (30/0,8)	30,0 % (w/v) 0,8 % (w/v)	Acrylamid Bisacrylamid
Amylose-Säulenpuffer	20 mM 200 mM 1 mM pH auf 7,5 einstellen	Tris-HCl pH 7,5 NaCl EDTA pH 8,0
DNA-Auftragspuffer (6 x)	0,25 % 0,25 % 30,0 % 100 mM	Bromphenolblau Xylencyanol Glyzerin EDTA pH 8,0
GST-Elutionspuffer	75 mM 150 mM 5 mM 10 mM pH auf 7,4 einstellen	HEPES pH 7,4 NaCl DTT reduziertes Glutathion
HBS (2x)	46 mM 274 mM 1,5 mM pH 7,0 (NaOH)	HEPES pH 7,5 NaCl Na ₂ HPO ₄
His-tag Bindungspuffer (8x)	4 M 160 mM 40 mM	NaCl Tris-HCl pH 7,9 Imidazole

His-tag Elutionspuffer (4x)	2 M 80 mM 4 M	NaCl Tris-HCl pH 7,9 Imidazol
His-tag Waschpuffer (8x)	4 M 160 mM 480 mM	NaCl Tris-HCl pH 7,9 Imidazol
Laemmli-Puffer (3x)	65 mM 3 % 30 % 0,01 % 5 %	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glyzerin Bromphenolblau β -Mercaptoethanol
Lyse-Puffer (Stammlösung)	50 mM 150 mM 1 mM 10 % 1 % 100 mM 10 mM	Hepes pH 7,5 NaCl EDTA Glyzerin Triton X-100 NaF $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$
NET (10x)	150 mM 5 mM 50 mM 0,05 % pH 7,4 (HCl)	NaCl EDTA Tris Triton X-100
NiSO_4 -Ladungspuffer (8x)	400 mM	NiSO_4
PBS	13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4 , pH 7,4 (HCl)
SD-Transblot	50 mM 40 mM 20 % 0,004 %	Tris/HCl pH 7,5 Glycin Methanol SDS
STE-Puffer	10 mM 150 mM 1 mM	Tris-HCl pH 8,0 NaCl EDTA pH 8,0
Strip-Puffer	65 mM 2 % 0,68 %	Tris/HCl pH 6.8 SDS β -Mercaptoethanol

TAE (10x)	400 mM 10 mM pH 8,0 (Eisessig)	Tris/Acetat EDTA
TBST	10 mM 150 mM 0,1 %	Tris/HCl NaCl Tween-20
TE (10/0,1)	10,0 mM 1,0 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248 mM 1918 mM 1 %	Tris/HCl pH 7,5 Glycin SDS

2.1.5 Proteine

2.1.5.1 Enzyme

Lysozym	Boehringer, Mannheim
Klenow-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	Pharmacia, Freiburg Boehringer, Mannheim Biolabs, New England MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Taufkirchen
T4-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin	Gibco, Eggenstein

2.1.5.2 Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Referenz
anti-GFP	Maus, monoklonal	AG Gerrisch
anti-GST (4H3)	Maus, monoklonal (Klon 4H3)	Biomol
anti-Src (N-16)	Hase, polyklonal	Santa Cruz
anti-Myc (9E10)	Maus, monoklonal (Klon 9E10)	Santa Cruz
anti-Myc (C-33)	Maus, monoklonal	Santa Cruz

2.1.6 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.6.1 Ausgangsvektoren

Vektor	Eigenschaft	Referenz
pcDNA3	Expressionsvektor, Amp ^r , CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl	Invitrogen, USA
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor	Clontech Laboratories (Miller & Rosman, 1989)
pGEX-2TK	Expressionsvektor, Amp ^r , ori aus pBR322, interne <i>lacI^q</i> -Genregion, <i>tac</i> Promotor, Glutathion-S-Transferase Genregion, β -Lactamase Genregion	Amersham Pharmacia Biotech
pET28a	Expressionsvektor, Kan ^r , N-terminaler 6xHis- <i>tag</i> , optionaler C-terminaler 6xHis- <i>tag</i> , pBR322-Derivat, interne <i>lacI^q</i> -Genregion, T7-Promoter	Novagen, Madison, USA
pQE-80L FA	Modifizierter pQE-80L Expressionsvektor mit zusätzlichen Enzymschnittstellen für FseI und AseI, ColE1 ori, Amp ^r , N-terminaler 6xHis- <i>tag</i> , T5-Promoter, β -Lactamase Genregion	T. Mayer
pMAL-C	Expressionsvektor, Amp ^r , ori aus pBR322, interne <i>lacI^q</i> -Genregion, <i>tac</i> Promotor, N-terminaler MBP- <i>tag</i>	BioLabs
pGL3-Promoter	ColE1 ori, Amp ^r , SV40 Promotor, Luciferase Gen	Promega
pAP1	ori aus pUC, Amp ^r , HSV-TK Promotor, vier Kopien des AP1 Enhancers vor dem Luciferase Gen	BD Biosciences, Clontech
phRL-TK	T7-Promoter, TK-Promoter, Amp ^r , <i>Renilla</i> Luciferase Gen	Promega
phRL-CMV	T7-Promoter, CMV-Promoter, Amp ^r , <i>Renilla</i> Luciferase Gen	Promega

2.1.6.2 Spezifizierte Vektoren

Vektor	Eigenschaft	Referenz
pET28a-Myc	cDNA der b-HLH-Zip-Domäne von humanem c-Myc (Genfragment für Aminosäuren 354 - 434)	diese Arbeit
pET28a-Max	cDNA der b-HLH-Zip-Domäne von Max p21 der Ratte (Genfragment für Aminosäuren 13 - 93)	diese Arbeit
pQE-80L-CEBP	cDNA der b-Zip-Domäne von humanem C/EBP α (Genfragment für Aminosäuren 510 - 742)	diese Arbeit
pMAL-c-Jun	cDNA der b-Zip-Domäne von v-Jun (Genfragment für die letzten 166 Aminosäuren des C-Terminus)	M. Nishizawa
pMAL-c-Fos	cDNA der b-Zip-Domäne von v-Fos (Genfragment für Aminosäuren 30 - 189)	M. Nishizawa
pcDNA3-Myc	cDNA von c-Myc	diese Arbeit
pGL3-E-Box	4 E-Box Elemente	diese Arbeit
pGL3-E-Box-mut	4 mutierte E-Box Elemente	diese Arbeit
pAP1 mut	4 Kopien des AP1 Enhancers mutiert	diese Arbeit
pMLV.SRF.VP16	SRF Codons 1 – 412 fusioniert mit VP16 Codons 410 - 490	G. Posern
3D.Aluc	3 SRF Bindungselemente vor Luciferase Gen	G. Posern
pLXSN-Myc	cDNA von c-Myc mit einem N-terminalen FLAG- <i>tag</i>	diese Arbeit
pLXSN-Src	cDNA von v-Src mit einem C-terminalen V5- <i>tag</i>	diese Arbeit

2.1.6.3 Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
Ebox-Fluorescein-fwd	Fluorescein-CACGTGGTCTGGG	Fluoreszenzmarkierte DNA für c-Myc und Max im FP
Ebox-Fluorescein-rev	CCCAGACCACGTG	Fluoreszenzmarkierte DNA für c-Myc und Max im FP
Ebox-TR-fwd	Texas Red-CACGTGGTCTGGG	Fluoreszenzmarkierte DNA für c-Myc und Max im FP
Ebox-TR-rev	CCCAGACCACGTG	Fluoreszenzmarkierte DNA für c-Myc und Max im FP
CEBP2-TR-fwd	Texas Red-TTGCGCAATATCGGTC	Fluoreszenzmarkierte DNA für C/EBP α im FP

CEBP2-TR-rev	GACCGATATTGCGCAA	Fluoreszenzmarkierte DNA für C/EBP α im FP
TRE-TR-fwd	Texas Red- TGACTCATATCGGTCC	Fluoreszenzmarkierte DNA für Jun im FP
TRE-TR-rev	GGACCGATATGAGTCA	Fluoreszenzmarkierte DNA für Jun im FP
pAP1-mut-fwd	AGAGTCAGAGAGTCACAGACTCACAGACTC AAGAGTCAGCAGACTCA	Klonierung von pAP1-mut
pAP1-mut-rev	GAGTCTGCTGACTCTTGAGTCTGTGAGTCTG TGACTCTCTGACTCTG	Klonierung von pAP1-mut
4Ebox-fwd	CCCCACCAC CGTGGTGCCT CCCCACCAC CGTGG TGCCTCCCACC ACGTGGTGCCT CCCCACCA CGTGGTGCCTA	Klonierung von pGL3-E-Box
4Ebox-rev	GATCTAGGCACCACGTGGTGGGAGGCACCA CGTGGTGGGAGGCACCACGTGGTGGGAG GCACCACGTGGTGGGGGTAC	Klonierung von pGL3-E-Box
4Ebox-mut-fwd	CCCACCACCTGGTGCCTCCCACCACCTGGTG CCTCCCACCACCTGGTGCCTCCCACCACCT GGTGCCT	Klonierung von pGL3-E-Box-mut
4Ebox-mut-rev	AGGCACCAGGTGGTGGGAGGCACCAGGTGG TGGGAGGCACCAGGTGGTGGGAGGCACCA GGTGGTGGG	Klonierung von pGL3-E-Box-mut
EboxOligoF	AGTTGACC ACGTGGTCTGGG	E-Box Oligo EMSA für c-Myc/Max
EboxOligoR	CCCAGACCACGTGGTCAACT	E-Box Oligo EMSA für c-Myc/Max
EboxOligomutF	AGTTGACTACGTAGTCTGGG	E-Box-mut Oligo EMSA für c-Myc/Max
EboxOligomutR	CCCAGACT ACGTAGTCAACT	E-Box-mut Oligo EMSA für c-Myc/Max
TRE-EMSA-F	AGTCAGAATGACTCATATCGGTCC	TRE Oligo EMSA für v-Jun/v-Fos
TRE-EMSA-R	GACCGATATGAGTCATTCTGACT	TRE Oligo EMSA für v-Jun/v-Fos

2.1.7 Bakterienstämme

Die angegebenen *E. coli*-Bakterienstämme wurden für Transformationen und zur Proteinexpression benutzt.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
DH5 α	F ⁺ /endA1 hsd17 (r _k ⁻ m _k ⁻), supE44, recA1, gyrA (Nal), thi-1, (lacZYA-argF), Amp ^r	Stratagene
Rosetta TM (DE3)	BL21 derivate, expresses 6 rare tRNAs, Amp ^r , Kan ^r , F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)	Novagen, Madison, USA

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
HEK 293T	humane embryonale Nierenfibroblasten, transformiert mit humaner adenoviraler DNA Typ 5 (Ad 5), exprimieren „large T“-Antigen des SV40 Virus	ATCC CRL-1573
MCF-7	Humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-22
NIH/3T3	Murine Embryonale Fibroblastenzelllinie	ATCC CRL-1658
PC-12	Phäochromozytomische Nebennierenzellen der Ratte (Tumor der chromafinen Zellen des Nebennierenmarks)	ATCC CRL-1721
Phoenix E	Modifizierte HEK 293-Linie zur Produktion helfervirusfreier, ekotropher Retroviren	Nolan Lab, Stanford
Raji	Humane Burkittslymphomzelllinie	ATCC CCL-86
Rat1a	Immortalisierte Rattenfibroblasten	D. Eick
Rat1a/pLXSN	Immortalisierte Rattenfibroblasten, stabil infiziert mit pLXSN (Leervektor), polyklonal	diese Arbeit
Rat1a/c-Myc	Immortalisierte Rattenfibroblasten, stabil infiziert mit pLXSN-Myc, polyklonal	diese Arbeit
Rat1a/v-Src	Immortalisierte Rattenfibroblasten stabil infiziert mit pLXSN-Src, polyklonal	diese Arbeit
U-2OS	Humane Knochenkarzinomzellen	ATCC HTB-96

2.1.9 Sonstige Materialien

Amylose
Filterpapier 3MM
Glutathion-Sepharose

Biolabs, New England
Whatman, USA
Pharmacia, Freiburg

Hyperfilm™ MP	Amersham, Braunschweig
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen
	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
	Corning Incorporated, USA
Ni-NTA His•Bind® Resin	Novagen, Madison, USA
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Sephadex G-50 Spin Columns	Amersham, Uppsala, Schweden
Sterilfilter 0,22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0,45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Zellkultureinsätze	Falcon, U.K.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Die Anzucht der verschiedenen *E. coli*-Stämme erfolgte, sofern nicht anders angegeben bei 37 °C in LB-Medium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika. Das Wachstum der Zellen wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt.

Kulturen auf LB-Agarplatten mit den benötigten Antibiotika wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für kürzere Zeiträume konnten diese Kulturen bei 4 °C aufbewahrt werden. Für eine dauerhafte Konservierung der *E. coli*-Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 750 µl einer Übernachtskultur und 500 µl 50 % (v/v) Glycerin vermischt und anschließend bei -80 °C weggefroren wurden.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Gewinnung kleinerer Mengen an Plasmid-DNA (2-10 µg) erfolgte aus 3 ml Übernachtskulturen unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hildesheim). Für größere und reinere Mengen an DNA wurden Plasmidpräparationen aus 100 bis 500 ml Bakterienkulturen mittels des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hildesheim) durchgeführt. In beiden Fällen erfolgte die Aufreinigung nach Herstellerangaben.

2.2.3 PCR-Amplifikation

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) handelt es sich um eine schnelle und effiziente Methode zur Amplifizierung bestimmter DNA-Stücke (Mullis & Faloona, 1987). Dazu wird der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mittels eines sich wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer und anschließender Synthese des komplementären Strangs exponentiell vermehrt. Die verwendeten Primer wurden unter Zuhilfenahme des Programms Amplify v1.2 (für Macintosh) erstellt, wobei darauf geachtet wurde, dass sie eine Schmelztemperatur (T_M)

zwischen 65 und 72 °C besaßen und keine selbstkomplementären Bereiche enthielten, die eine Ausbildung von Sekundärstrukturelementen ermöglicht hätten.

Eine Standard-PCR wurde nach folgendem Schema in einem Volumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA (100 ng)
 1 µl *sense* Primer (10 pmol/µl)
 1 µl *antisense* Primer (10 pmol/µl)
 5 µl 10x Pfu-Polymerase Puffer
 1 µl dNTP-Mix (10 mM) aus dGTP, dATP, dCTP und dTTP
 4 µl MgCl₂ (25 mM)
 1 µl Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)
 ad 50 µl H₂O

10x Pfu-Polymerase Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 mM KCl, 20 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5% (v/v) Nonidet P40, 0,5% (v/v) Tween 20)

Als Matrizen-DNA wurde entweder Plasmid-DNA oder cDNA verschiedener Zelllinien oder der Placenta verwendet.

Die Reaktion wurde in 0,5 ml PCR-Röhrchen (Eppendorf) in einem Thermocycler Progene der Firma Techne unter Verwendung des folgenden Standardprotokolls durchgeführt:

erste Denaturierung:	5 min	95 °C	
Amplifikation (30 – 35 Zyklen):	30 sec	95 °C	(Denaturierung)
	30 sec	T _M – 5 °C	(Annealing)
	1 min	72 °C	(Synthese)
zur Vervollständigung der Synthese	2 min	72 °C	

Dabei musste im Einzelnen zur Optimierung des Ergebnisses von diesem Protokoll abgewichen werden.

Das Ergebnis der PCR-Reaktion wurde mittels Gelelektrophorese (2.2.4) überprüft und anschließend das gewünschte Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquickTM Gel Extraktion Kits (2.2.5) aufgereinigt.

2.2.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen, mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegelen nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde der DNA 1/6 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer zugegeben und die Elektrophorese bei 80 V durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die Größe der aufgetrennten Fragmente konnte mittels des DNA-Standards (SmartLadder) von Gibco abgeschätzt werden. Die DNA-Banden wurden auf einem Transilluminator mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationsanlage (AIDA, Raytest) fotografiert. Um DNA-Mutationen durch

das UV-Licht zu vermeiden, wurde DNA die weiterverwendet werden sollte mittels eines Darkreaders (Clare Chemical Research) bei einer Wellenlänge von 460 nm sichtbar gemacht.

2.2.5 Isolierung von DNA

Über Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mittels steriler Skalpellklingen aus 1%igen Agarosegelen unter Zuhilfenahme des Darkreaders ausgeschnitten und mittels des QIAquickTM Gel Extraktion Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.6 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.6.1 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für analytische und präparative Zwecke wurden in der Regel 0,5 bis 1 µg DNA und 2 U/µl der entsprechenden Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller dafür vorgesehenen Reaktionspuffer 1 – 3 hr bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Bei Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Enzymen gleichzeitig wurde auf kompatible Pufferbedingungen geachtet.

2.2.6.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit dem entsprechenden, geschnittenen Vektor wurde die T4-DNA-Ligase (5 U/µl) verwendet. Die Menge an einzusetzender Fragment-DNA wurde dazu nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Volumen(Insert)}}{\text{Volumen(Vektor)}} = 3 * \frac{\text{Größe(Insert)}}{\text{Größe(Vektor)}} * \frac{\text{Konzentration(Vektor)}}{\text{Konzentration(Insert)}}$$

Die Ligation erfolgte in 1x T4-DNA-Ligasepuffer (10x: 0,66 M Tris/HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP) mittels 3,75 U T4-DNA-Ligase für 1 hr bei Raumtemperatur. Der Ligationsansatz wurde im Anschluss zur Transformation von Bakterien verwendet. Überschüssiger Ligationsansatz wurde bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.7 Transformation von kompetenten *E. coli*-Stämmen

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli*-Zellen (DH5α) auf Eis aufgetaut und mit 3 µl des Ligationsansatzes oder 1 µl Plasmid-DNA aus einer Plasmidpräparation vermischt. Der Ansatz wurde nach 30-minütiger Inkubation auf Eis einem 45-sekundigem Hitzeschock unterzogen. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurden die Ansätze abzentrifugiert, der Überstand

abgenommen und das Pellet in 50 μ l LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit dem zur Selektion benötigten Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die für die Expression der Proteine verwendeten *E. coli* RosettaTM(DE3)-Zellen wurden nach Herstellerangaben transformiert. (Novagen)

2.2.8 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten gemäß der Kettenabbruchmethode nach Sanger mit ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer Geräten der Firma Perkin Elmer. Die zu sequenzierende DNA wurde dazu mittels einer PCR gemäß des „ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencer“ Protokolls amplifiziert:

Reaktionsansatz: 5 μ l Terminator Ready Reaction Mix (TRR)
 0,5 μ g dsDNA
 10 pmol primer
 ad 10 μ l H₂O

PCR-Programm: 25 Amplifikationszyklen
 30 sec 96 °C (Denaturierung)
 15 sec 45 – 60 °C (Hybridisierung)
 4 min 60 °C (Synthese)
 Abkühlen auf 4 °C

Die amplifizierte DNA konnte im Anschluss durch Zugabe von 80 μ l H₂O und 250 μ l 100%igem Ethanol gefällt werden. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge für 20 min pelletiert. Im Anschluss wurde die DNA mit 250 μ l 75%igem Ethanol gewaschen und nochmals für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das restliche Ethanol bei Raumtemperatur verdunsten lassen. Die DNA konnte dann in 20 μ l H₂O aufgenommen werden und in einer Verdünnung von 1:4 in ein Sequenziergefäß überführt werden, welches mit einem Septum verschlossen wurde. Proben konnten bei -20 °C bis zur Sequenzierung aufbewahrt werden.

2.2.9 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden wurde die Polynukleotid T4 Kinase (PNK A, Fermentas) verwendet, die den Transfer des γ -Phosphats von ATP an das 5'-OH von einzel- oder doppelsträngiger DNA katalysiert. Dazu wurden 2 μ l eines 2,5 μ M doppelsträngigen Oligonukleotids mit 5 μ l PNK-Puffer A, 1 μ l PNK A, 30 μ l H₂O und 12 μ l γ -³²P-ATP (10 mCi/ml, Amersham) versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2 μ l 0,5 M EDTA und einminütigem Erhitzen auf 78 °C wurde die Reaktion gestoppt. Freies γ -³²P-ATP wurde mittels einer Sephadex G-50 Säule (Amersham) abgetrennt.

2.3 Präparative Methoden

2.3.1 Expression rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta verwendet, der tRNAs für selten in *E. coli* vorkommende Codons koexprimiert.

Das mit den benötigten Antibiotika versetzte LB-Medium wurde mit einer Vorkultur (je 10 ml pro 1 l LB-Medium) in 3 l schikanierten Erlenmeyerkolben angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C und 140 rpm geschüttelt. Nach 30-minütigem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Induktion der Bakterien mit 1 mM IPTG. Bis zur Ernte wurden die Bakterien weiter bei Raumtemperatur geschüttelt.

2.3.2 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der in *E. coli* exprimierten rekombinanten Proteine erfolgte, je nach verwendetem Expressionsplasmid über verschiedene affinitätschromatographische Methoden. Das Trennprinzip dieser Methode basiert auf der selektiven und reversiblen Bindung des gewünschten Proteins an einen Liganden, der kovalent an die Gelmatrix gebunden ist. Während durch Waschen der Säule unspezifische Proteine entfernt werden können, lässt sich das gewünschte Protein nur durch einen Überschuss an freiem Liganden oder durch Änderung der Pufferbedingungen von der Säule eluieren.

Allen zur Proteinaufreinigung benötigten Puffern wurde direkt vor der Verwendung PMSF (200 x) und Aprotinin (200 x) zur Inhibition von Proteasen zugegeben.

2.3.2.1 His-tag Affinitätschromatographie

Das wohl am häufigsten zur Aufreinigung verwendete Affinitätspeptid ist der His-tag. Hierbei handelt es sich um meist sechs aufeinander folgende Histidinreste, aber auch vier oder zehn Histidinreste sind möglich. Seine Imidazolgruppen chelatieren Ni²⁺-Ionen, die wiederum als Chelatkomplexe mit an Festphase gebundene Iminodiessigsäure oder Nitrilotriessigsäure vorliegen (Arnold, 1991; Hochuli, 1988).

In dieser Arbeit wurde Ni-NTA His•Bind[®] Resin der Firma Novagen verwendet. Das Bakterienpellet wurde dazu zuerst auf Eis aufgetaut und dann in 4 ml His-tag Bindungspuffer pro 100 ml Kultur resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (5 mal 2 min bei einer Amplitude von 70 % und einem Zeitintervall von 70 zu 30 pro 500 ml Kultur) auf Eis. Die Suspension wurde anschließend für 20 min bei 19000 rpm und 4 °C in einem SS34-Rotor abzentrifugiert. Weitere unlösliche Zellbestandteile konnten mittels Filtration durch einen 0,45 µm Filter entfernt werden. Danach wurde der Überstand auf die Säule aufgetragen. Für 800 ml Kultur wurden 2 ml 50%iges Ni-NTA His•Bind[®] Resin verwendet. Das Säulenmaterial wurde zuerst durch Waschen mit 3 Säulenvolumen autoklaviertem H₂O, 5 Säulenvolumen NiSO₄-Ladungspuffer und 3 Säulenvolumen His-tag Bindungspuffer vorbereitet. Nach der Auftragung der Zellsuspension wurden ungebundene Proteine mit

10 Säulenvolumen His-tag Bindungspuffer und 6 Säulenvolumen His-tag Waschpuffer entfernt, bevor das gewünschte Protein in 2 Fraktionen mit 2 Säulenvolumen His-tag Elutionspuffer eluiert wurde.

2.3.2.2 MBP-tag Affinitätschromatographie

Bei Proteinen, die als Fusion mit dem 40 kDa großen Maltose-Bindungsprotein (MBP) exprimiert wurden, erfolgte die Reinigung über immobilisierte Amylose.

Das auf Eis aufgetaute Bakterienpellet wurde hierzu in 5 ml Amylose-Säulenpuffer pro 100 ml Kultur resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall wie unter 2.3.2.1 beschrieben. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation und Filtration wie in 2.3.2.1 bereits erwähnt entfernt. Um sicher zu gehen, dass das Protein effizient an die Amylose binden konnte, wurde es vor dem Auftragen auf die Säule mit 10 ml Amylose-Säulenpuffer pro 100 ml Kultur verdünnt. Für 500 ml Kultur wurden 3 ml aufgeschlämmtes Amylose-Säulenmaterial der Firma Biolabs verwendet, welches vor dem Auftragen der Zellsuspension mit 10 Säulenvolumen Amylose-Säulenpuffer gewaschen wurde. Ungebundene Proteine wurden nach der Auftragung mit 3 Säulenvolumen Amylose-Säulenpuffer entfernt. Die Elution erfolgte in mindestens 4 Fraktionen mit je 1,5 Säulenvolumen Amylose-Säulenpuffer dem zusätzlich 10 mM Maltose zur Verdrängung des MBP zugegeben wurden.

2.3.2.3 Glutathion-S-Transferase Affinitätschromatographie

Bei der Glutathion-S-Transferase handelt es sich um ein 26 kDa großes Protein, das an Glutathion-Sepharose bindet. Das Tripeptid Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin) wird dazu kovalent an die Matrix gekoppelt.

Für die Aufreinigung wurde Glutathion-Sepharose der Firma Amersham Pharmacia verwendet.

Das Bakterienpellet wurde nach dem Auftauen in 7 ml STE-Puffer pro 100 ml Kultur resuspendiert und nach Zugabe von 100 μ g/ml Lysozym für 15 min auf Eis inkubiert. Der weitere Zellaufschluss erfolgte wie bereits in 2.3.2.1 beschrieben durch Ultraschall. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation und Filtration wie in 2.3.2.1 erwähnt entfernt. Durch die Zugabe von 1,2 ml STE-Puffer mit 10 % TritonX-100 pro 100 ml Kultur konnten unspezifische Bindungen zwischen dem Fusionsprotein und bakteriellen Proteinen verhindert werden. Um eine gute Bindung des Proteins an die Matrix zu erreichen, wurde das Lysat für mindestens 1 h bei 4 °C mit der Glutathion-Sepharose inkubiert. Pro 100 ml Kultur wurden 0,1 ml 50%iges Säulenmaterial verwendet. Nach dem Packen der Säule wurden unspezifisch gebundene Proteine durch zweimaliges Waschen mit je 4 ml PBS pro 100 ml Kultur entfernt. Die Elution des GST-Fusionsproteins erfolgte in 4 Fraktionen mit je 250 μ l GST-Elutionspuffer pro 100 ml Kultur.

2.3.3 Dialyse

Um die für die verschiedenen Affinitätsreinigungen benötigten Pufferzusätze zu entfernen wurden die Fusionsproteine anschließend dialysiert. Dazu wurden Dialyseschläuche mit einer Porengröße von 3,5 kDa verwendet. Diese wurden zuerst durch 30-minütiges Waschen in einer 1 mM EDTA-Lösung von Schwermetallionen befreit und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen. Dann konnten sie mit den Proteinlösungen befüllt werden. Die Dialyse erfolgte in einem 100fachen Volumen an Dialysepuffer unter ständigem Rühren bei 4 °C. Um vollständigen Pufferaustausch zu erreichen wurde dieser dreimal gewechselt.

Dialysepuffer für MBP- und His-*tag* Proteine: 200 mM Tris/HCl pH 7,5
500 mM NaCl
30 mM MgCl₂
2 mM DTT
10 mM EDTA pH 8,0

Dialysepuffer für GST-*tag* Proteine: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
100 mM NaCl
1 mM DTT
10 % Glycerin
1 mM EDTA pH 8,0

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.4.1.1 Methode nach Bradford

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, die auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine im sauren Milieu basiert. Dies hat eine konzentrationsabhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm zur Folge.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Farbstofflösung der Firma Bio-Rad 1:4 mit Wasser vorverdünnt und je 200 µl dieser Verdünnung zu 10 µl Proteinlösung gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Absorption bei 595 nm gemessen, und durch Vergleich mit der Absorption einer Standardkurve (20 – 400 µg Rinderserumalbumin /ml) die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.4.1.2 Methode nach Biuret

Die Methode nach Biuret (Smith *et al.*, 1985) basiert auf der Reduktion von Kupferionen ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$) durch verschiedene Seitengruppen von Aminosäuren (vor allem Cystin, Cystein, Tyrosin und Tryptophan) und der anschließenden Bildung eines

stabilen Farbkomplexes aus Kupfer-Ionen und Bicinchoninsäure (BCA). Dieser Komplex lässt sich kolorimetrisch bei 562 nm detektieren.

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ der Firma PIERCE nach Herstellerangaben verwendet. Eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100 – 1500 µg Protein/ml) wurde als Vergleichsstandard eingesetzt.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamidgele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) komplexiert die Proteine und verleiht ihnen dabei eine negative Gesamtladung, die unabhängig von der Aminosäurezusammensetzung und der Eigenladung der Proteine ist. Das Wanderungsverhalten der Proteine im Gel ist somit ausschließlich von ihrer Größe abhängig. Des Weiteren wird dem Laemmli-Probenpuffer β -Mercaptoethanol zugegeben, welches intra- und intermolekulare Disulfidbrücken der Proteine reduziert. In Kombination mit der Erhitzung der Proteinproben auf 95 °C kommt es so zu einer Aufhebung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden vertikale Gelapparaturen (Atto Cooperation, Japan) bestehend aus Laufkammern, Glasplatten, Abstandshaltern, Kämmen und Gummidichtungen verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 7 – 15%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele angefertigt.

Dazu wurde, nach Zugabe von TEMED zur Quervernetzung und von Ammoniumpersulfat (10%ige Lösung) als Radikalstarter zur Trenngellösung das Gemisch sofort zwischen die gereinigten Glasplatten gegossen und mit ungefähr 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und der Kamm eingesteckt. Nach ca. 20 Minuten konnten die Gummidichtungen entfernt und die Gele in die Laufkammern eingebracht werden. Nach Herausnehmen der Kämmen wurden die Taschen mit Laufpuffer gespült, die Proben 10 Minuten bei 95 °C in 1 x Laemmlipuffer aufgekocht, abzentrifugiert und anschließend mit einer Mikroliter[®] Spritze (Hamilton, Bonaduz) aufgetragen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt. Die Gele wurden anschließend in Coomassie R-250 angefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der Farbmaler der Firma Bio-Rad verwendet

2.4.3 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1 % Coomassie R-250, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol) 15 Minuten gefärbt und anschließend für mehrere Stunden mit einer Mischung aus 10 % Essigsäure und 40 % Methanol entfärbt. Zum Trocknen wurden die

Gele zwischen zwei mit Wasser getränkten Zellophanfolien luftblasenfrei eingespannt und für 3 Stunden durch einen warmen Luftstrom getrocknet.

2.4.4 Immunoblotting

Bei dieser Methode werden die Proteine aufgrund ihrer durch das gebundene SDS vorhandenen negativen Ladung nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni & Palade, 1983) und anschließend mit einem Antikörper-gekoppelten Verfahren nachgewiesen. Der verwendete primäre Antikörper erkennt dabei spezifisch die auf der Membran immobilisierten Antigene. Im zweiten Schritt wird der primäre Antikörper von einem sekundären Antikörper erkannt, der wiederum an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase werden anschließend die Antigenbanden detektiert.

Der Transfer erfolgte in Transblot-SD Puffer für 3 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, BA 85, $0,45 \mu\text{M}$) auf einer „Semidry“-Blotapparatur. Der Blot wurde dabei wie folgt aufgebaut: Kathode, 4 Schichten 3MM Whatman-Papier, Acrylamidgel, Nitrozellulosemembran, 4 Schichten 3 MM Whatman-Papier, Anode. Nach erfolgtem Transfer wurden die Proteine auf der Membran durch einminütige Färbung mit Ponceau S (2 g/l in 2 % (w/v) Trichloressigsäure) sichtbar gemacht. So konnten die Banden des Proteinmarkers mit Kugelschreiber nachgezeichnet werden. Anschließend wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen mit 1 x NET-Gelatine (0,25 % Gelatine in 1 x NET) entfärbt. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Nitrozellulose zu verhindern, wurde die Membran je nach verwendetem Antikörper über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 1 x NET-Gelatine oder 5 % Milchpulver in 1 x TBST inkubiert. Dann wurde die Nitrozellulose für 1 h bei RT mit dem primären Antikörper in 1 x NET-Gelatine oder in 5 % Milchpulver in 1 x TBST inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 1 x NET-Gelatine oder 1 x TBST wurde die Membran für eine weitere Stunde mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in 1 x NET-Gelatine oder 1 x TBST inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit der Firma NEN. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Um weitere Proteine auf der gleichen Membran zu detektieren, konnten die gebundenen Antikörper durch einstündige Inkubation der Nitrozellulose bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ in Strip-Puffer entfernt werden. Um das im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol anschließend wieder vollständig zu entfernen wurde die Membran gründlich in 1 x NET-Gelatine gewaschen.

2.4.5 GST-Pulldown

Mit dieser Methode können Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* untersucht werden. Dazu werden beide Proteine in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Eines der beiden Proteine enthält einen GST-tag, mit dem es an

Glutathion-Sepharose binden kann. Das zweite, hier mit einem CFP-tag versehene Protein bindet im Falle einer Interaktion an das immobilisierte GST-Fusionsprotein. Durch mehrfaches Waschen wird ungebundenes Protein entfernt. Der ganze Ansatz wird anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Falle einer Interaktion der beiden Proteine kann man so mit dem gebundenen GST-Protein das andere Protein aus der Lösung herausholen. Man spricht deswegen von einem GST-Pulldown. In dieser Arbeit wurde der GST-Pulldown verwendet, um die Inhibitoren auf ihre Fähigkeit hin zu überprüfen, die Dimerisierung der Proteine c-Myc und Max zu unterbinden.

Die Glutathion-Sepharose 4B (Amersham) wurde dazu zuerst viermal mit GST-Pulldown Puffer (5 % Glycerin, 5 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 2,5 % DMSO, 1 % BSA) gewaschen und anschließend mit dem Puffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Je 60 µl der 50%igen Sepharose Suspension wurden dann mit 500 ng GST oder GST-Max in je 500 µl GST-Pulldown Puffer versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze je viermal mit 300 µl GST-Pulldown Puffer gewaschen und bei 6000 rpm für je 1 min abzentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von je 500 ng Myc-CFP in 500 µl GST-Pulldown Puffer sowie von je 25 µl DMSO oder den verschiedenen Verbindungen bei unterschiedlichen Konzentrationen. Nach erneuter Inkubation der Ansätze über Nacht bei 4 °C und erneutem viermaligem Waschen der Proben konnten diese in je 40 µl 3 x SDS-Laemmli-Puffer bei 95 °C aufgekocht werden, wovon im Anschluss je 15 µl auf 10%ige SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen wurden. Immunoblotting erfolgte zum einen mit einem anti-GFP-Antikörper (homemade) zur Detektion des Myc-CFP, sowie mit einem anti-GST Antikörper (Biomol) der GST und GST-Max erkennt.

2.4.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* dient dem Nachweis der Protein-DNA-Bindung. Er beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von Protein-DNA-Komplexen im Vergleich zu freier DNA in Polyacrylamidgelen.

In dieser Arbeit wurden die Interaktionen der Proteinkomplexe c-Myc/Max und v-Jun/v-Fos mit ihren entsprechenden DNA-Bindungssequenzen, sowie der Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Protein-DNA-Interaktion untersucht. Dazu wurden die Proben wie folgt vorbereitet: 18 µl von Myc-CFP und Max (finale Dimerkonzentration: 200 nM) oder MBP-getagtem v-Jun und v-Fos in Dimerisierungspuffer (200 mM HEPES pH 7,5, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 2 mM DTT und 10 mM EDTA) wurden mit 2 µl Verbindung oder DMSO versetzt und 1 h bei 20 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl Bindungspuffer (33 mM HEPES pH 7,5, 83 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,3 mM DTT, 1,6 mM EDTA, 15 ng/µl poly dI/dC (Amersham)) sowie 200000 cpm des radioaktiv markierten DNA Oligonukleotids (2.2.9) zugegeben. Nach erneuter 20-minütiger Inkubation bei 20 °C wurden je 20 µl der Proben auf ein 4%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 90 min bei 140 V unter nicht denaturierenden Bedingungen in 0,5 x TBE-Puffer. Die Gele wurden anschließend auf Whatman-Papier gezogen und mit Saranfolie bedeckt für 1 h bei 80 °C

unter Vakuum getrocknet. Die Detektion der Protein-DNA-Komplexe erfolgte durch Autoradiographie oder mittels eines IP-Screens. Das Einlesen und die Auswertung der Screens erfolgten am Phosphoimager (Fujifilm, BAS 2500) mit dem 2D-Densitometrie Programm AIDA (*Advanced Image Data Analyzer*) der Firma Raytest. Die Intensitäten der mit unterschiedlichen Konzentrationen an Verbindungen inkubierten Protein-DNA-Komplexe wurden mit den Intensitäten der entsprechenden Proteinstandardkurve verglichen und mittels SigmaPlot (SPSS Science Software GmbH) ausgewertet.

2.5 Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

2.5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5 % CO₂, 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in Einfriermedium bestehend aus 90 % FBS und 10 % DMSO aufgenommen und in Einfrier-Ampullen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.5.2 Transiente Transfektion von Säugetierzellen

Die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten Kalziumphosphat-Methode. Das Kalzium bildet hierbei mit dem Phosphat des HBS-Puffers schwer lösliche Komplexe, an die die jeweilige DNA bindet. Die so entstehenden DNA-Präzipitate werden von den eukaryotischen Zellen gut aufgenommen. Die DNA liegt als Transgenom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilung verloren (Scangos & Ruddle, 1981). Man spricht deswegen von transienter Transfektion.

Die Zellen wurden 12 h vor der Transfektion auf 12-Loch Zellkulturschalen ausgesät. 30 min vor der Transfektion wurden die Zellen mit 45 µl FBS pro Ansatz stimuliert. Pro Transfektionsansatz wurden 0,5 - 1 µg DNA mit TE 10/0,1 auf ein Volumen von 20 µl pro Ansatz verdünnt. Nach Zugabe von je 20 µl 0,5 M CaCl₂ und 25 µl 2 x HBS wurde die Mischung für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 15 µl 2 mM Chloroquin zur Inhibierung lysosomaler DNasen erfolgte eine weitere Inkubation von 5 min. Dann wurde das Präzipitat tröpfchenweise auf die Zellen verteilt und diese für 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor das Medium abgenommen und gegen neues Medium ersetzt wurde.

2.5.3 Retroviraler Gentransfer in immortalisierte Rattenfibroblasten

Um eine stabile Expression bestimmter Proteine zu erreichen wurde die Verpackungszelllinie Phoenix E verwendet. Bei den zu infizierenden Zellen handelte es sich um die Zelllinie Rat1a. Phoenix E Zellen wurden dazu zuerst mit der unter 2.5.2 beschriebenen Kalziumphosphat-Methode mit der zu exprimierenden cDNA in dem retroviralen Expressionsvektor pLXSN transfiziert. Die Transfektion erfolgte in 10 cm-Kulturschalen. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium der transfizierten Zellen zum Sammeln von Virusüberstand gegen 3,5 ml frisches Medium ausgetauscht. Dieses wurde 4 h später abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter steril filtriert und 3 ml davon auf die zu infizierenden Zellen gebracht. Um eine höhere Effizienz zu erreichen wurde die Infektion weitere zweimal nach jeweils 3 h wiederholt. 12 h nach Abschluss der Infektion wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen zur Herstellung stabiler Zelllinien in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion erfolgte hierbei mit Geneticin (G418), einem Aminoglykosid-Antibiotikum (3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryotische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, für die ein Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) kodiert, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen sterben innerhalb weniger Tage ab.

2.6 Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen

2.6.1 Toxizitätstest

Um auszuschließen, dass es sich bei den verschiedenen, in dieser Arbeit identifizierten Verbindungen um toxische Substanzen handelte, wurden HEK 293T- und NIH/3T3-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Verbindungen für bis zu 72 h inkubiert. Dazu wurden je 10000 NIH/3T3- oder HEK 293T-Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät und das Medium nach 8 h gegen Medium ersetzt, dem die verschiedenen Verbindungen bzw. als Kontrolle die entsprechende Menge an DMSO zugegeben wurden. Da es sich bei beiden Zelllinien um adhärente Zellen handelte, konnte Toxizität an dem Ablösen und somit Absterben der Zellen erkannt werden.

2.6.2 Proliferationstest

Der Effekt der verschiedenen Verbindungen auf die Proliferation unterschiedlicher Zelllinien wurde durch Zählen der Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Bei adhärennten Zellen erfolgte dies mittels eines Beckman Coulter Counters während für Suspensionszellen eine Neubauer-Zählkammer verwendet wurde. Die verschiedenen Zelllinien wurden je nach ihrem Wachstumsverhalten in unterschiedlichen Zelldichten in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 6 – 8 h wurde bei den adhärennten Zellen das Medium gegen frisches Medium ersetzt, in dem die verschiedenen Verbindungen in

verschiedenen Konzentrationen sowie die entsprechende Menge an DMSO als Kontrolle vorhanden waren. Ein erneuter Mediumwechsel erfolgte nach 3 Tagen. Zum Zählen der Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten wurden diese einmal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 3 x Trypsin von der Platte abgelöst und mittels des Coulter Counters gezählt. Bei Suspensionszellen wurde nach 6 – 8 h dem Medium direkt die Verbindung oder DMSO zugegeben. Das geschah ein weiteres Mal nach 3 Tagen. Zum Zählen wurden hier die Zellen zu den gegebenen Zeitpunkten gut gemischt und dann Aliquots 1 : 1 mit Trypan Blau gemischt und die Lebendzellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Während bei den adhärennten Zelllinien eventuelle tote Zellen durch Waschen mit PBS entfernt wurden, konnte die Zahl der toten Zellen bei den Suspensionszellen durch den Farbstoff Trypan Blau bestimmt werden, der nur von toten Zellen aufgenommen werden kann und diese somit blau färbt.

2.6.3 Bestimmung des S-Phase Eintritts mittels BrdU-Einbau

Der Eintritt von Zellen in die S-Phase des Zellzyklus kann über den Einbau des Basenanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU), das an Stelle von Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird, verfolgt werden. In dieser Arbeit wurde so der Effekt der einzelnen Verbindungen auf den S-Phase Eintritt von NIH/3T3-Zellen untersucht. Dazu wurde der „5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III“ der Firma Roche verwendet, bei dem die Detektion des eingebauten BrdU über einen spezifischen Antikörper erfolgt. An diesen Antikörper wiederum ist das Enzym Peroxidase gekoppelt, welches das farbige Substrat ABTS umsetzt, was zu einer Absorptionsänderung bei 405 nm führt. Die Durchführung des Experimentes erfolgte in 96-Loch-Platten. Pro Ansatz wurden 2500 NIH/3T3-Zellen ausgesät. Nach 8 - 10 h wurden diese für 24 h mit Hungermedium, welches statt 10 % FBS nur 0,1 % FBS enthielt inkubiert, um die Zellen zu synchronisieren. Dann wurde das Medium wieder gegen Medium mit 10 % FBS ersetzt, dem nun die verschiedenen Verbindungen oder DMSO bei einer finalen DMSO-Konzentration von 0,2 % beigegeben wurden. Nach 16-stündiger Stimulation wurde das Medium erneut gegen Medium mit 10 % FBS und 100 µg/ml BrdU ersetzt. 4 h später konnten die Zellen mit einer 70%igen Ethanolösung mit 2 M HCl bei -20 °C fixiert werden. Im Weiteren wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Messung der Farbreaktion erfolgte mittels des Plattenlesegeräts ULTRA Evolution der Firma Tecan.

2.6.4 Dualer Luciferaseassay

Unter dualem Luciferaseassay versteht man die Expression und Messung zweier voneinander unabhängiger Reporterenzyme in einem System. Dabei korreliert einer der beiden Reporter mit dem Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen, während die Aktivität des zweiten kotransfizierten Reporters eine interne Kontrolle

darstellt. Durch Normalisierung der Aktivität des experimentellen Reporters auf die Aktivität des Kontrollreporters lassen sich experimentelle Schwankungen ausgleichen, wie sie zum Beispiel durch Unterschiede in der Transfektionseffizienz entstehen.

In dieser Arbeit wurde der „Dual-Luciferase Reporter Assay Kit“ der Firma Promega verwendet. Bei dem experimentellen Reporter handelt es sich dabei um das Luciferasegen des Leuchtkäfers (*firefly*) *Photinus pyralis* während als Kontrollreporter das Luciferasegen der Weichkoralle *Renilla reniformis* verwendet wird. Da beide Enzyme unterschiedliche Substrate umsetzen lässt sich zwischen beiden Biolumineszenzsignalen unterscheiden. Die einzelnen Messungen erfolgten nach Herstellerangaben.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedenen Reportersysteme verwendet um die Aktivität der verschiedenen Verbindungen auf die Dimerisierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Es wurde sowohl die c-Myc-abhängige, wie auch die AP-1- und SRF-abhängige Luciferaseaktivität analysiert. In Tab. 2.1 sind die pro Ansatz verwendeten DNA-Mengen angegeben. Die verwendeten Plasmide sind unter 2.1.6 beschrieben.

	E-Box		E-Box-mut	
	Myc	pcDNA3	Myc	pcDNA3
CMV-H _M	375 ng	-	375 ng	-
pcDNA3	-	375 ng	-	375 ng
phRL-CMV	12,8 ng	12,8 ng	12,8 ng	12,8 ng
pGL3-E-Box	500 ng	500 ng	-	-
pGL3-E-Box-mut	-	-	500 ng	500 ng

	AP-1	AP-1 mut
	pAP1	10 ng
pAP1 mut	-	10 ng
phRL-CMV	6,4 ng	6,4 ng

	SRF	Kontrolle
	pMLV.SRF.VP16	50 ng
phRL-TK	100 ng	100 ng
3D.Aluc	40 ng	40 ng
pEF-Flag	50 ng	100 ng

Tab. 2.1: Verwendete Plasmidmengen für die Luciferaseassays (c-Myc, AP-1, SRF)

Für die Luciferase Experimente wurden je 108000 HEK 293T-Zellen in 12-Loch-Platten ausgesät. 14 - 18 h später erfolgte die Transfektion nach der Kalziumphosphatmethode (2.5.2). Beim Mediumwechsel 5 h nach der Transfektion wurden die einzelnen Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen oder DMSO als Kontrolle zugegeben. Im Falle des c-Myc-, sowie des SRF-abhängigen Reporterassays betrug die finale DMSO-Konzentration 1 %. Um eine Aktivierung des endogenen AP-1 zu erreichen wurden die Zellen hierzu beim Mediumwechsel zusätzlich mit 1 ng/ml TPA pro Ansatz stimuliert. Eine Stimulierung der Zellen war

hier nur bei einer finalen Konzentration von 0,3 % DMSO möglich. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte 24 h später mit einem Luminometer der Firma EG & G Berthold.

2.6.5 Koloniebildung in Weichagar

Während normale Epithelzellen den Kontakt zum Wachstumssubstrat und zu benachbarten Zellen benötigen, proliferieren transformierte Epithelzellen auch ohne diese Voraussetzungen. Auf diesem Unterschied basiert die Koloniebildung in Weichagar. Zellen werden hierzu in Weichagar ausgesät, welcher die Kontakte zu Nachbarzellen und zum Wachstumssubstrat unterbindet. Durch verschiedene Onkogene transformierte Zellen bilden über einen Zeitraum von 10 – 14 Tagen Kolonien, während normale Zellen unter diesen Umständen nicht wachsen können. In dieser Arbeit wurden die mit den Onkogenen c-Myc oder v-Src stabil infizierte Rat1a-Zellen verwendet und die Effekte der verschiedenen Inhibitoren auf die Koloniebildung dieser Zellen untersucht.

Zuerst wurde der Bodenagar bestehend aus je 300 µl 0,7 iger Weichagarlösung auf 24-Loch-Platten ausgebracht. 4 iger Agar der Firma Gibco wurde dazu aufgeköcht und mit 2 x MEM-Medium (versetzt mit 20 % FBS und 2 % Penicillin/Streptomycin) auf 0,7 % verdünnt. Nach dem Aushärten des Bodens konnten die Zellen zusammen mit den verschiedenen Verbindungen oder DMSO in einer finalen Konzentration von 0,2 % in je 200 µl 0,3%igem Weichagar resuspendiert und in die vorbereiteten Löcher pipettiert werden. Pro Ansatz wurden 200 Rat1a/v-Src Zellen oder 400 Rat1a/c-Myc oder Rat1a/pLXSN Zellen ausgesät. Die Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Alle 3 – 4 Tage wurden den Zellen erneut Verbindung oder DMSO, resuspendiert in je 100 µl 0,3%iger Agarlösung, zugegeben. Nach 10 – 14 Tagen konnten die Kolonien mit Iodonitrotetrazoliumchlorid (1 mg/ml) angefärbt und anschließend eingescannt werden. Die Auszählung der Kolonien unter Berücksichtigung ihrer Größe (Kolonien > 0,13 mm) erfolgte unter Zuhilfenahme der Software Corel Photo Paint.

2.7 Hochdurchsatzanalyse

Mittels der Hochdurchsatzanalyse (HTS, *high throughput screening*) konnten 17298 Verbindungen der verschiedenen chemischen Bibliotheken (8298 Verbindungen von Chemical Diversity, 9000 Verbindungen von Maybridge) in 384-Loch-Platten schnell und effizient *in vitro* auf ihre Aktivität bezüglich der Inhibierung der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung hin getestet werden. Jede Verbindung wurde im Duplikat getestet.

Dazu wurde der Roboter Biomek FX der Firma Beckman Coulter verwendet. Die Aktivität der Verbindungen wurde mittels Fluoreszenzpolarisation bestimmt.

2.7.1 Fluoreszenzpolarisation

Es wurden in dieser Arbeit die folgenden Protein-DNA-Interaktionen mittels Fluoreszenzpolarisation untersucht:

<u>Proteindimer</u>	<u>DNA</u>
c-Myc/Max	E-Box
Max/Max	E-Box
C/EBP α /C/EBP α	C/EBP
Jun/Jun	TRE

2.7.1.1 Protein-DNA-Bindungskurven

Alle Protein-DNA-Bindungskurven wurden bei einer finalen Pufferkonzentration von 60 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 9 mM MgCl₂, 3 mM EDTA, 0,6 mM DTT, 0,1 % NP-40 und 10 % DMSO gemessen. Zu steigenden Konzentrationen an Proteindimer wurde DNA bei einer finalen Konzentration von 3 nM pipettiert und in schwarzen 384-Loch-Platten (Corning) mittels des Plattenlesegeräts ULTRA Evolution der Firma Tecan gemessen. Die Auswertung der Kurven erfolgte in SigmaPlot (SPSS Science Software GmbH), wobei eine *Hill Four Parameter* Kurvenanpassung zugrunde gelegt wurde.

2.7.1.2 Inhibitionskurven

Zur Bestimmung der Inhibitionskurven wurden Proteinkonzentrationen nahe der K_D-Werte der einzelnen Bindungskurven verwendet (30 nM c-Myc/Max, 30 nM Max/Max, 30 nM C/EBP α /C/EBP α , 50 nM Jun/Jun). Proteindimere wurden für je 30 min mit den verschiedenen Konzentrationen an Verbindungen inkubiert, bevor die entsprechende DNA zugegeben wurde. Die Messung erfolgte wie auch die Messung der Protein-DNA-Bindungskurven. Für die Kurvenanpassung in SigmaPlot wurde die *Four Parameter Logistic* Kurvenanpassung zugrunde gelegt. Inhibitionskurven wurden je dreimal in unabhängigen Experimenten wiederholt.

2.7.2 Der Z'-Wert

Zur Beurteilung von HTS-Assays wurde der Z'-Wert eingeführt (Zhang *et al.*, 1999). Es handelt sich hierbei um eine statistische Größe, die sich aus den Mittelwerten und Standardabweichungen mit und ohne Proteindimer, bzw. mit und ohne Hemmstoff berechnen lässt. In der Abbildung 2.2 ist die statistische Auswertung eines Assays schematisch dargestellt. Zwischen der Streuung um den Mittelwert der Kontrolle und der Streuung um den Mittelwert der Probe muss ein genügend großes Messfenster bleiben. Nur so lassen sich Hemmstoffe im HTS-Assay eindeutig identifizieren. In der Formel 2.2 ist die genaue Berechnung des Z'-Werts angegeben (Zhang *et al.*, 1999).

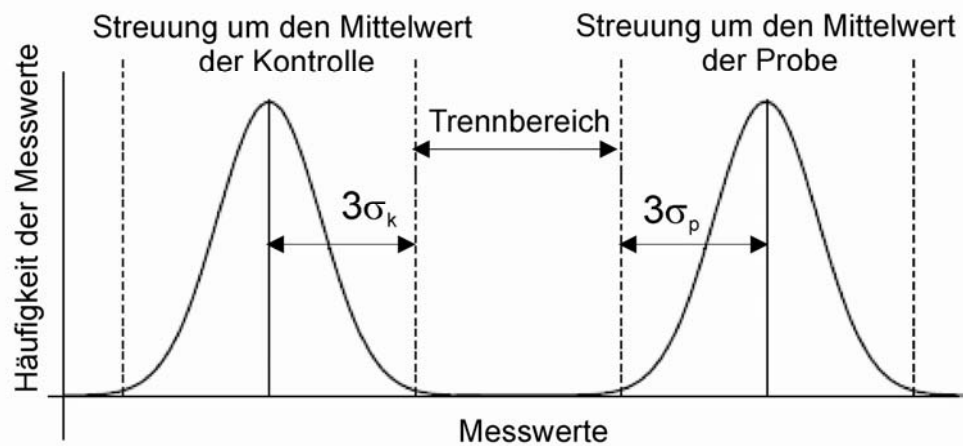


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Z'-Werts

Für die Berechnung des Z'-Werts werden die Streuung um den Mittelwert der Probe und die Streuung um den Mittelwert der Kontrolle nach der Formel 2.2 zueinander ins Verhältnis gesetzt. μ : Mittelwert der Messungen; σ : Standardabweichung der Messwerte; k: Kontrolle; p: Probe (modifiziert nach (Zhang *et al.*, 1999))

$$Z' = 1 - \frac{(3\sigma_k + 3\sigma_p)}{|\mu_k - \mu_p|} \quad (2.2)$$

Bei einem idealen Assay liegt der Z'-Wert nahe 1. Zwischen 1 und 0,5 sind Assays gut durchführbar. Sinkt der Z'-Wert unter 0,5, so wird der Trennbereich zwischen Kontrolle und Probe zu klein und es ist keine klare Unterscheidung zwischen gehemmter und ungehemmter Protein-DNA-Bindung mehr möglich.

In dieser Arbeit wurde der Z'-Wert wie folgt bestimmt: 30 nM c-Myc/Max wurden für 30 min mit 30 nM anti-Myc (9E10) (Santa Cruz, 2.1.4) inkubiert, der die Dimerisierung durch Bindung an den Leuzin-Zipper von c-Myc inhibiert (Kontrolle = freier Zustand). Ebenso wurden 30 nM c-Myc/Max für 30 min in dem für alle Fluoreszenzpolarisationsmessungen verwendeten Puffer inkubiert (Probe = gebundener Zustand). Dann wurden 3 nM Fluorescein-markierte DNA zugegeben und die Messung in 384-Loch-Platten durchgeführt. Aus drei solcher unabhängigen Messungen mit jeweils 48 Werten für Probe und Kontrolle wurde der Z'-Wert nach der Formel 2.2 berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Hochdurchsatzanalyse

3.1.1 Etablierung eines Fluoreszenzpolarisationsassays

Der Transkriptionsfaktors c-Myc ist, nach heutigem Kenntnisstand, ausschließlich als Heterodimer mit seinem Interaktionspartner Max aktiv (Henriksson & Luscher, 1996). Da c-Myc nicht nur in zahlreichen Krebsarten überexprimiert vorliegt, sondern auch in normalen Zellen eine Vielzahl von Funktionen erfüllt, ist die Forschung an Ansätzen interessiert, die die Funktionalität des Transkriptionsfaktors hemmen (Hermeking, 2003). Dadurch erhofft man sich, ungeklärte Aufgaben des Proteins studieren zu können, sowie neue Möglichkeiten für die Krebstherapie zu eröffnen. Ziel dieser Arbeit war es, die Dimerisierung von c-Myc und Max mittels niedermolekularer Verbindungen zu inhibieren. Dazu musste zuerst ein geeignetes *in vitro* Verfahren entwickelt werden, das die schnelle und effiziente Durchmusterung großer Bibliotheken kleiner organischer Moleküle ermöglichen sollte. Fluoreszenzpolarisationsassays wurden bereits zur Analyse verschiedener biochemischer Interaktionen, wie z. B. zur Untersuchung von Actin-bindenden Proteinen (Vinson *et al.*, 1998), von Tyrosinkinase (Seethala & Menzel, 1997), von Protease-Aktivitäten (Schade *et al.*, 1996), von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Banks *et al.*, 2000) oder von STAT-Rezeptor-Interaktionen (Wu *et al.*, 1997) etabliert.

In dieser Arbeit wurde ein Fluoreszenzpolarisationsassay entwickelt, der die Protein-DNA-Interaktion zwischen c-Myc/Max und dessen DNA-Bindungsmotiv analysiert. Da c-Myc nur als Dimer mit Max an die DNA binden kann, können auf diese Weise Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung identifiziert werden. Im Hochdurchsatzverfahren wurden so die verschiedenen Molekülbibliotheken im Mikrotiterformat analysiert.

Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc und Max erfolgt ausschließlich über die b-HLH-Zip Domänen der beiden Proteine. Um speziell Inhibitoren der DNA-Bindung und Dimerisierung zu identifizieren, wurden deswegen auch nur die diesen Bereichen entsprechenden DNA-Sequenzen in den Vektor pET28a kloniert (2.1.6) und im *E. coli*-Stamm Rosetta (2.1.7) exprimiert. Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über einen N-terminalen sechsfachen Histidin-tag wie in Material und

Methoden unter 2.3.2.1 beschrieben. Das Ergebnis der Ni-NTA Reinigung ist in Abbildung 3.1 zu sehen.

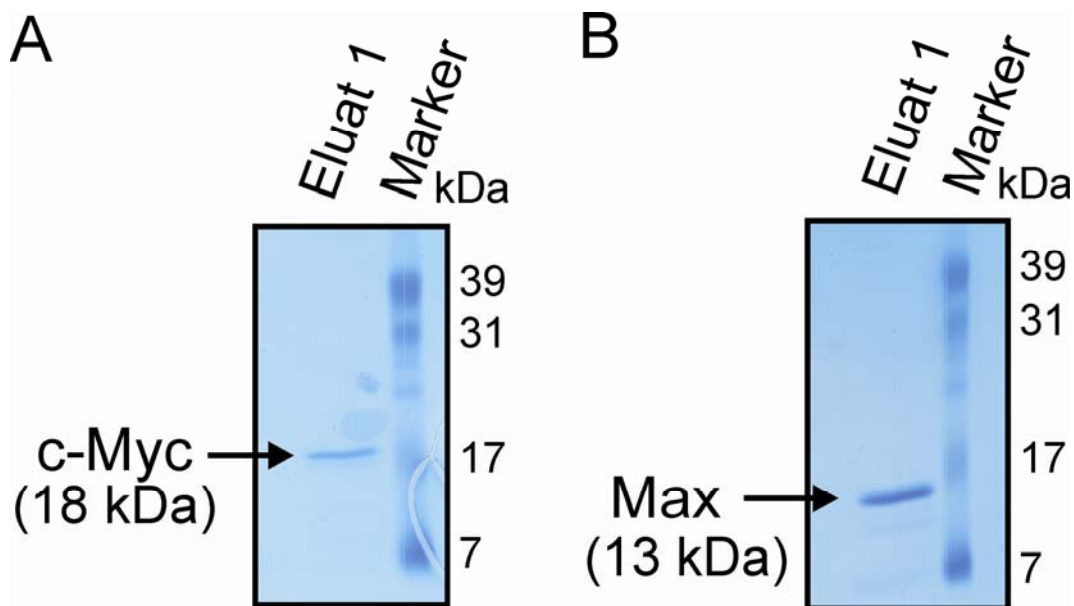


Abb.3.1: Affinitätschromatographische Aufreinigung von rekombinantem c-Myc und Max
Die b-HLH-Zip Domänen der Proteine c-Myc (A) und Max (B) wurden mittels des Vektors pET28a im *E. coli*-Stamm Rosetta exprimiert und über den N-terminalen Histidin-*tag* aufgereinigt. Die mittels Ni-NTA Säulen gewonnenen Proteine konnten in jeweils einem Schritt eluiert werden (Eluat 1). Als Größenstandard wurde ein Marker der Firma Bio Rad (2.1.2) verwendet.

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde das jeweilige Eluat 1 gegen den unter 2.3.3 beschriebenen Dialysepuffer dialysiert, und anschließend die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (2.4.1.1) bestimmt. Die so gewonnenen Proteine konnten verwendet werden um Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max mittels Fluoreszenzpolarisation zu untersuchen.

Fluoreszenzpolarisation ist eine spektroskopische Methode, die die Rotation eines fluoreszierenden Moleküls in Lösung misst (Nasir & Jolley, 1999). In diesem Fall handelt es sich um ein fluoreszenzmarkiertes kurzes doppelsträngiges Oligonukleotid, das die entsprechende c-Myc/Max DNA-Bindungssequenz (E-Box) enthält (2.1.6). Als Fluoreszenzmarker für die Hochdurchsatzanalyse wurde Fluorescein verwendet. Durch die Bindung des Proteindimers an die DNA wird das Rotationsvermögen des Komplexes eingeschränkt, was zu einer Polarisierung des emittierten Lichts und somit zu einer erhöhten Polarisierung im Vergleich zur freien DNA führt. Durch steigende Konzentrationen an Dimer lässt sich die Fluoreszenzpolarisation erhöhen, wie in Abbildung 3.2 zu sehen.

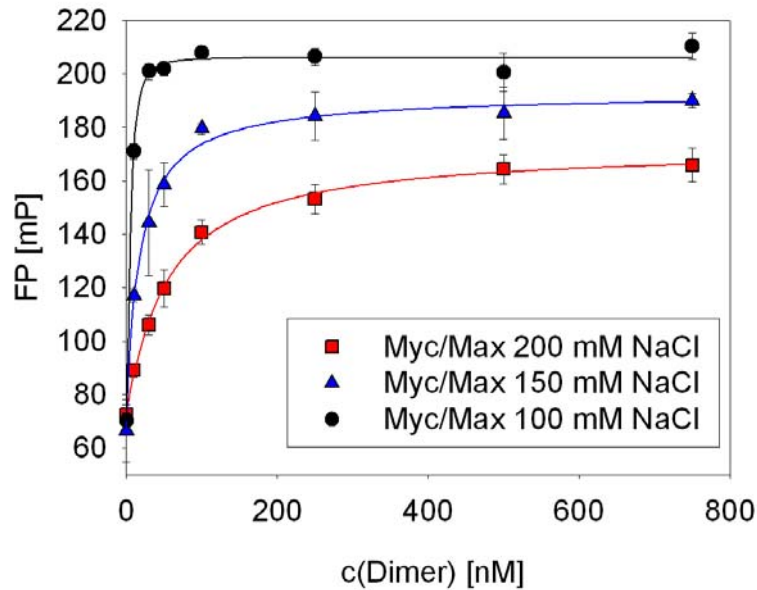


Abb. 3.2: Salzabhängigkeit der c-Myc/Max DNA-Bindungskurven

Die Bindung von c-Myc/Max Dimeren an Fluorescein-markierte, die E-Box Sequenz enthaltende DNA wurde mittels Fluoreszenzpolarisation bei verschiedenen Salzkonzentrationen gemessen. Der Verlauf der Bindungskurve wurde mit steigenden Salzkonzentrationen flacher, was sich in der Zunahme des K_D -Werts widerspiegelte (K_D -Werte: 100 mM NaCl = 2,8 nM, 150 mM NaCl = 14,2 nM, 200 mM NaCl = 41,3 nM).

Dabei zeigte sich, dass die Salzkonzentration einen starken Einfluss auf das Bindungsverhalten hatte. Steigende Salzkonzentrationen hatten eine Abflachung der Bindungskurve und somit eine Zunahme des K_D -Werts, sowie eine Verkleinerung des Messbereichs zur Folge. Um für alle weiteren Experimente die Fehlerrate gering zu halten, galt es das für den Screen benötigte Messfenster zwischen freier und Protein-gebundener DNA möglichst groß zu wählen, so wie es bei einer Salzkonzentration von 100 mM NaCl erreicht wurde. Jedoch birgt ein zu steiler Kurvenverlauf das Risiko, dass geringfügige Abweichungen der Dimerkonzentration, wie sie im Rahmen von Pipettiergenauigkeiten auftreten können, zu großen Änderungen im FP-Wert führen können. Deswegen wurde für alle weiteren Messungen die mittlere Salzkonzentration von 150 mM NaCl gewählt, die obendrein den Vorteil hatte, den physiologischen Bedingungen in der Zelle am nächsten zu kommen, was in Anbetracht der späteren zellulären Experimente zur Verifizierung möglicher Inhibitoren von Bedeutung war.

Weiterhin war es maßgeblich, den Einfluss der DNA-Konzentration auf die Bindungskurve zu untersuchen, um auch hier mögliche Fehler durch Pipettiergenauigkeiten ausschließen zu können. Wie Abbildung 3.3A gezeigt, hatte eine Änderung der Oligonukleotidkonzentration von 2 nM auf 5 nM im Rahmen der Messgenauigkeit keinen Einfluss auf den Verlauf der Bindungskurve. Künftige

Experimente wurden folglich bei 3 nM DNA durchgeführt, da man somit sicherstellen konnte, dass geringe Schwankungen in der DNA-Konzentration keine Veränderung der Fluoreszenzpolarisation bewirken würden.

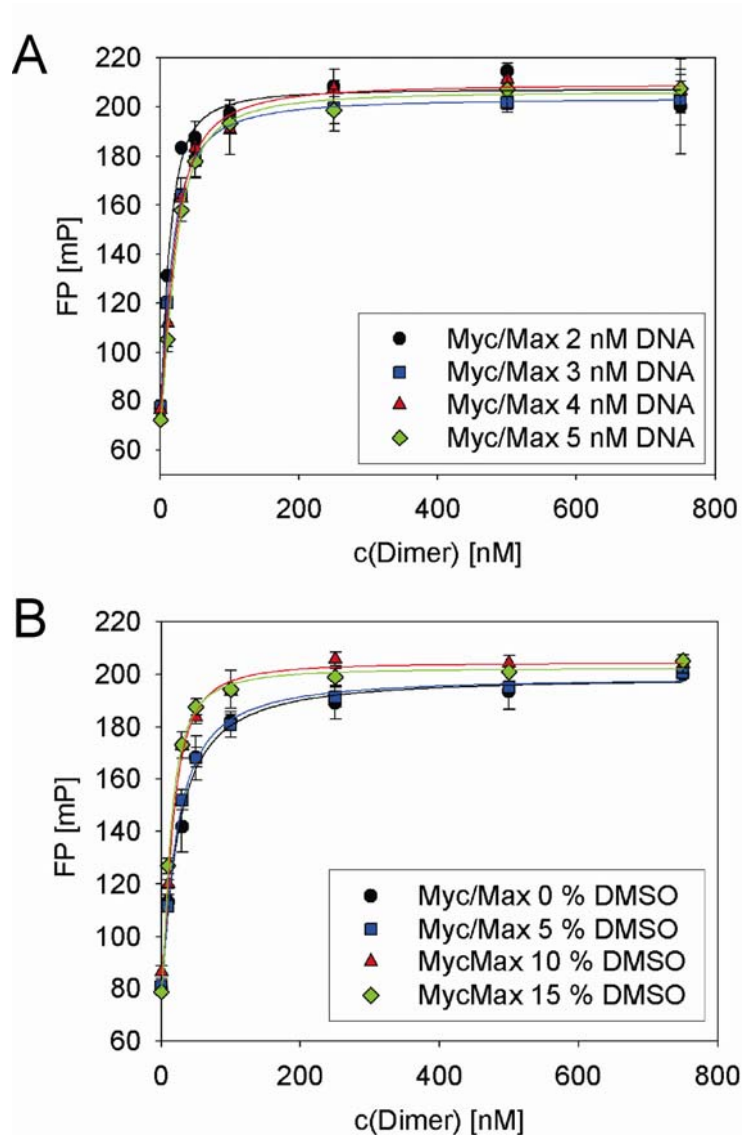


Abb. 3.3: Einfluss der DNA- und DMSO-Konzentration auf den Verlauf der Bindungskurve

A) Die Variation der Konzentrationen an Fluorescein-markierter DNA (2 nM - 5 nM) hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Bindung von c-Myc/Max an die DNA. **B)** DMSO-Konzentrationen von 10 und 15 % im Puffer bewirkten einen geringfügig steileren Bindungskurvenverlauf, als wenn kein oder lediglich 5 % DMSO dem Puffer zugegeben wurde (K_D -Werte: 0 % DMSO = 21,8 nM, 5 % DMSO: 19,8 nM, 10 % DMSO = 13,8 nM, 15 % DMSO = 11 nM). Alle c-Myc/Max DNA-Bindungskurven wurden bei 150 mM NaCl gemessen.

Da die Substanzbibliotheken in DMSO gelöst wurden, galt es eine adäquate Konzentration für den Messpuffer zu wählen. In Abbildung 3.3B ist der Verlauf der Bindungskurve bei 0 %, 5 %, 10 % und 15 % DMSO gezeigt. Wie zu erkennen, verläuft die Kurve bei höheren DMSO-Konzentrationen geringfügig steiler, als bei niedrigeren

Konzentrationen. Jedoch ist der Unterschied gering, wie die Änderung des K_D -Wertes von 19,8 nM der Bindungskurve bei 5 % DMSO auf 13,8 nM bei 10 % DMSO belegt. Somit wurde für die weiteren Messungen die DMSO-Konzentration auf 10 % festgelegt, um dadurch die ausreichende Löslichkeit der Verbindungen im Assay zu gewährleisten.

Anders als c-Myc kann Max auch Homodimere bilden (Kretzner *et al.*, 1992), wobei die genaue biologische Funktion dieser Komplexe noch nicht geklärt ist. Da Max/Max Homodimere ebenso an die E-Box binden können wie c-Myc/Max Heterodimere, wurden die mittels Fluoreszenzpolarisation ermittelten Bindungskurven der beiden Komplexe verglichen (Abb. 3.4). Max/Max DNA-Bindung ist jedoch, wie aus dem flacheren Kurvenverlauf ersichtlich, schwächer als c-Myc/Max DNA-Bindung. Diese Tatsache wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben (Fieber *et al.*, 2001).

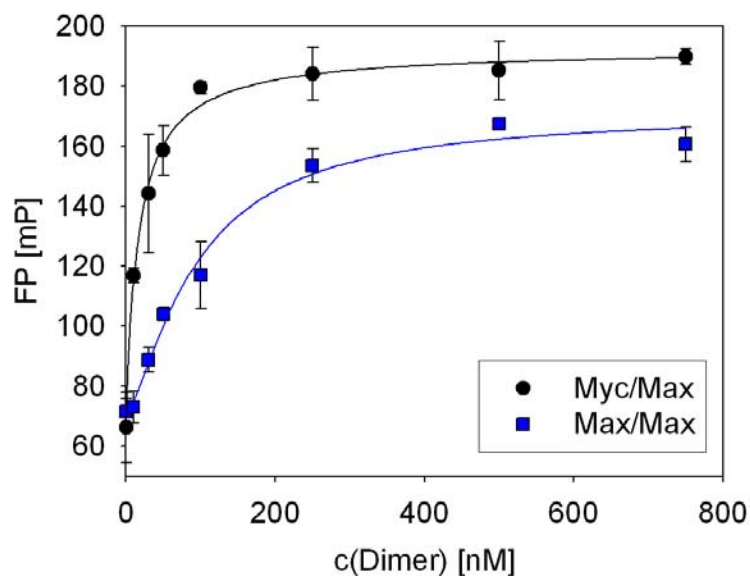


Abb. 3.4: Vergleich der DNA-Bindungskurven von c-Myc/Max Heterodimeren und Max/Max Homodimeren

Der mittels Fluoreszenzpolarisation gemessene Verlauf der c-Myc/Max DNA-Bindung wurde mit der Bindung von Max/Max Homodimeren an das gleiche Sequenzmotiv (E-Box) verglichen. Beide Kurven wurden bei 150 mM NaCl gemessen. Max/Max DNA-Bindung ist schwächer als c-Myc/Max DNA-Bindung, wie durch den flacheren Kurvenverlauf von Max/Max gezeigt (K_D -Werte: c-Myc/Max = 16,3 nM, Max/Max = 94,8 nM)

Auf Grund der unterschiedlichen K_D -Werte der beiden Kurven konnte sichergestellt werden, dass der Anteil der Max/Max Homodimere am Fluoreszenzpolarisationssignal der c-Myc/Max DNA-Bindung vernachlässigbar gering ist. Somit konnte der Assay

gezielt für die Suche nach c-Myc/Max Dimerisierungs- und DNA-Bindungsinhibitoren genutzt werden.

Die für den HTS verwendete Konzentration an c-Myc/Max Heterodimer wurde dabei an Hand der Protein-DNA-Bindungskurve festgelegt. Dabei galt es, zum einen ein ausreichend großes Messfenster zu gewährleisten. Auf der anderen Seite sollte die Konzentration jedoch noch im steilen Bereich der Kurve liegen. Nur so konnte sichergestellt werden, dass der durch Inhibitoren der Dimerisierung oder DNA-Bindung erzielte erhöhte Anteil an freier fluoreszenzmarkierter DNA auch zu einer deutlichen Erniedrigung des Fluoreszenzpolarisationswertes führen würde. Diese Kriterien waren bei einer c-Myc/Max Dimerkonzentration von 30 nM erfüllt. Der Screen erfolgte somit bei einer Proteinkonzentration von 30 nM, einer DNA-Konzentration von 3 nM und unter finalen Pufferzusammensetzungen von 10 % DMSO und 150 mM NaCl (2.7).

Als spezifische Positivkontrolle für die Inhibition der c-Myc/Max Dimerisierung wurde ein Antikörper eingesetzt, der den Leuzin-Zipper Bereich von c-Myc erkennt (anti-Myc (9E10), Santa Cruz, 2.1.5).

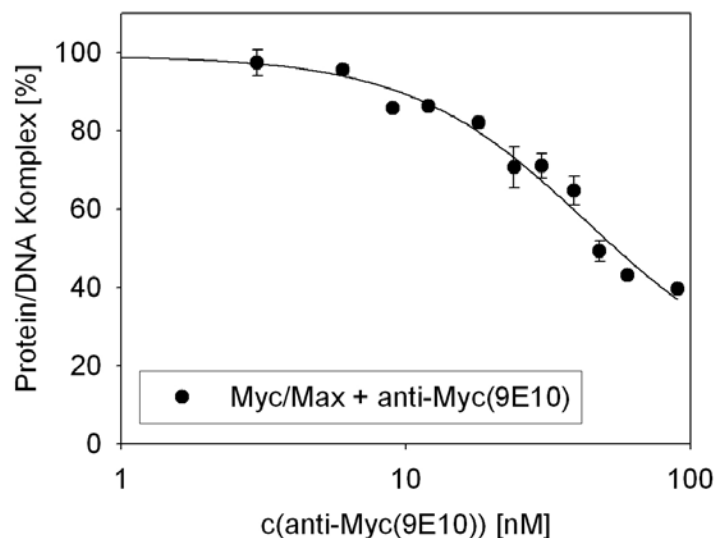


Abb. 3.5: Inhibitionskurve des c-Myc-spezifischen Antikörpers anti-Myc (9E10)

30 nM c-Myc/Max wurden für eine Stunde mit steigenden Konzentrationen des Antikörpers anti-Myc (9E10) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der Fluorescein-markierten DNA wurde das Fluoreszenzpolarisationssignal gemessen. Die Inhibition der c-Myc/Max Dimerisierung zeigte sich in der prozentualen Abnahme des Protein-DNA-Komplexes.

In Abbildung 3.5 ist der Inhibitionseffekt des Antikörpers auf die Protein-DNA-Bindung bei 30 nM c-Myc/Max dargestellt. Eine vollständige Inhibition konnte nicht erzielt werden, da durch die Konzentration des Antikörpers die zuzugebende Menge so beschränkt war, dass die Konzentration des Antikörpers im Assay maximal 100 nM

betragen konnte. Höhere Konzentrationen hätten eine zu starke Abweichung von den etablierten Pufferkonzentrationen zur Folge gehabt. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass die Dimerisierung von c-Myc und Max reversibel ist, was eine grundlegende Voraussetzung für die Verwendung des Assays zur Suche nach niedermolekularen Inhibitoren des Komplexes darstellt.

3.1.2 Bestimmung des Z'-Werts

Als essentielles Kriterium für die Eignung des Assays zur Hochdurchsatzanalyse wurde der Z'-Wert eingeführt (Zhang *et al.*, 1999). Dieser stellt die Standardabweichungen zwischen den einzelnen Messwerten ohne zugegebene Verbindung ins Verhältnis zu den Unterschieden zwischen freier und Proteindimer-gebundener DNA (2.7.2). Ein Z'-Wert von 1 würde den idealen Assay darstellen, bei dem die Schwankungen zwischen den einzelnen Messwerten ohne Verbindung 0 sind, verglichen mit den Unterschieden zwischen freier und gebundener DNA. Der Z'-Wert des Fluoreszenzpolarisationsassays für c-Myc/Max DNA-Bindung lag bei $0,65 \pm 0,07$. Assays eignen sich per Definition für Hochdurchsatzanalysen, wenn ihr Z'-Wert bei mindestens 0,5 liegt. Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Fluoreszenzpolarisationsassay erwies sich somit als für den HTS einsetzbar.

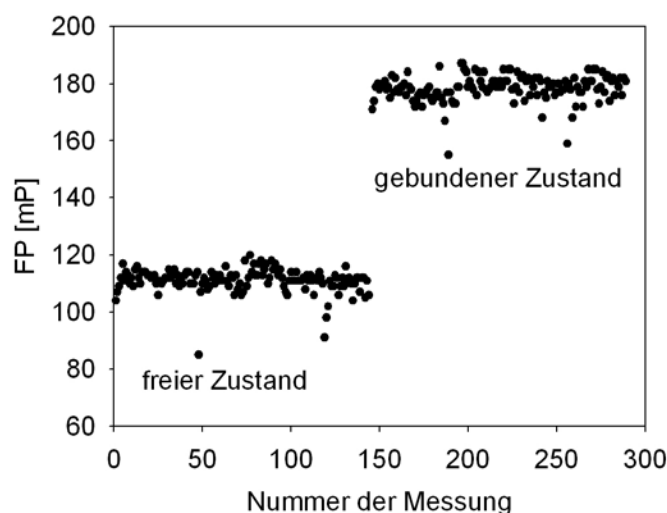


Abb. 3.6: Bestimmung des Z'-Werts

Zusammenfassung der, zur Bestimmung des Z'-Werts notwendigen Fluoreszenzpolarisationswerte dreier Messungen mit jeweils 96 Messpunkten. Der gebundene Zustand stellt das an die Fluorescein-markierte DNA gebundene c-Myc/Max Dimer dar, während für den freien Zustand der Protein-DNA-Komplex eine Stunde mit dem als Positivkontrolle verwendeten Antikörper (anti-Myc (9E10)) bei einer Konzentration von 100 nM inkubiert wurde. Alle Messungen wurden mit 30 nM Proteindimer und 3 nM DNA bei 150 mM NaCl, 10 % DMSO, sowie bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Bestimmung des Z' -Werts wurden drei Messungen mit jeweils 96 Messpunkten durchgeführt. Der gebundene Zustand stellt dabei das an die Fluorescein-markierte DNA-gebundene c-Myc/Max Dimer dar, während der freie Zustand die Fluoreszenzpolarisation des Komplexes nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit dem als Positivkontrolle verwendeten Antikörper (anti-Myc (9E10)) bei einer Konzentration von 100 nM wiedergibt (Abb. 3.6). Für die Messungen wurden 30 nM c-Myc/Max Dimer und 3 nM DNA verwendet. Die Pufferbedingungen entsprachen mit 150 mM NaCl und 10 % DMSO den für den HTS etablierten Bedingungen.

3.1.3 Ergebnis der Hochdurchsatzanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 17298 niedermolekulare Verbindungen (8298 Verbindungen von ChemDiv und 9000 Verbindungen von Maybridge) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max zu inhibieren. Die aus zwei verschiedenen Bibliotheken stammenden Verbindungen wurden dazu so gewählt, dass sie eine möglichst große Vielfalt verschiedener Strukturen abdeckten. Weiterhin entsprachen sie der Lipinski *Rule of Five* (Lipinski *et al.*, 2001), die entscheidende Kriterien für die Zellgängigkeit einer chemischen Verbindung beschreibt.

Der Screen erfolgte bei einer Konzentration an Verbindung von 100 μ M in 384-Loch-Platten mittels eines Roboters der Firma Beckman Coulter. Alle Verbindungen wurden in Duplikaten getestet, um die Zahl der falsch positiven Kandidaten zu verringern. Der Transfer der Verbindungen erfolgte dabei mit einem aus einzelnen Metallstiften bestehenden so genannten *Pin Tool* im 384er Format.

1,7 % der Verbindungen (291) zeigten mindestens 70 % Inhibition in beiden Messungen. Davon erwiesen sich 157 Verbindungen als unspezifisch, da sie in einem in der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführten Screen für STAT3 (Dissertation J. Schust, in Vorbereitung) mindestens 30 % Inhibition zeigten (Abb. 3.7). Bei STAT3 handelt es sich um einen weiteren Transkriptionsfaktor, dessen Dimerisierung durch die Bindung eines Phosphotyrosinrestes des einen Partners an die SH2-Domäne des anderen Partners vermittelt wird (Levy & Darnell, 2002). Diese somit zur c-Myc/Max Dimerisierung

gänzlich andere Interaktionsart stellt eine gute Möglichkeit dar, unspezifische Inhibitoren zu identifizieren.

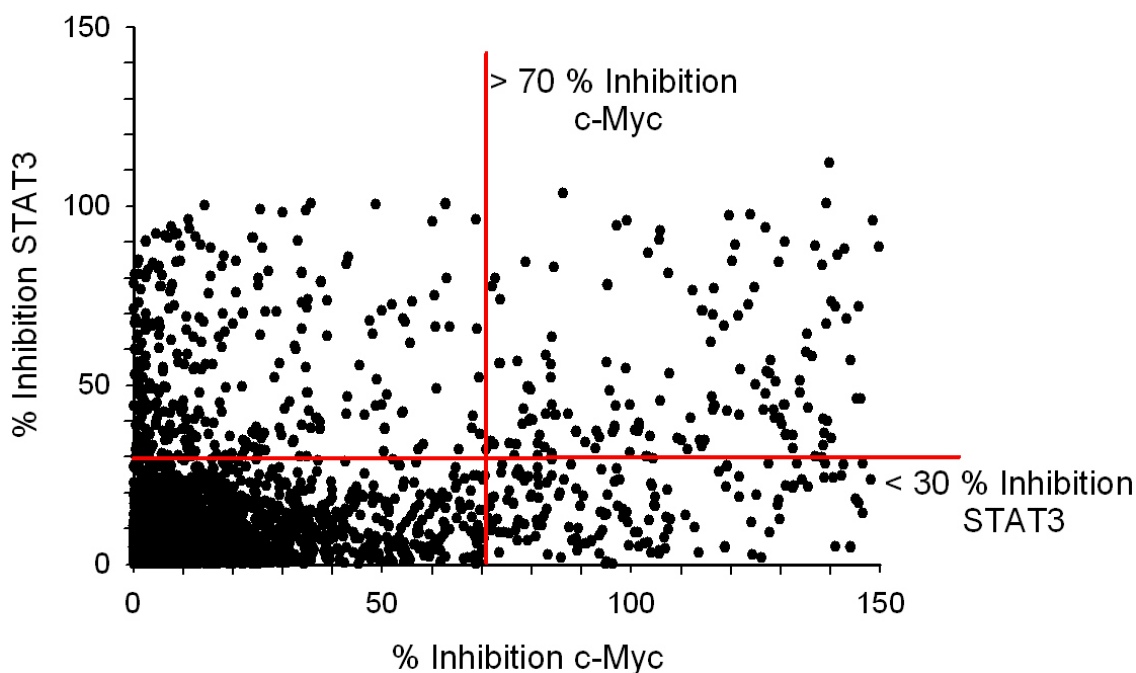


Abb. 3.7: Darstellung der Screeningergebnisse für c-Myc und STAT3 in % Inhibition

Die Ergebnisse des HTS für c-Myc in % Inhibition wurden mit den Ergebnissen des Screens für STAT3 in % Inhibition verglichen. Im Folgenden weiter untersucht wurden nur Verbindungen, die mindestens 70 % Inhibition von c-Myc in beiden Durchgängen zeigten und zusätzlich STAT3 in beiden Durchgängen nur zu maximal 30 % inhibierten. Inhibitionswerte über 100 % sind auf Fluoreszenzartefakte zurückzuführen.

Somit verblieben 134 Verbindungen (0,8 %), von denen 33 Verbindungen auf Grund zu stark abweichender Totalintensitätswerte im Screen nicht weiter analysiert wurden. Die Verifizierung der verbleibenden Verbindungen erfolgte als erstes per Hand mittels des c-Myc/Max FP-Assays bei einer Konzentration von 50 μ M (Abb. 3.8, Abb. 3.9). Als erste Spezifitätskontrolle wurden die Verbindungen ebenfalls bei einer Konzentration von 50 μ M auf ihre Fähigkeit, die Max/Max Homodimerisierung und DNA-Bindung zu inhibieren, überprüft. Die Ergebnisse der Verifizierung sind für die Verbindungen von ChemDiv (CDI) in Abbildung 3.8 und für die Verbindungen von Maybridge (MB) in Abbildung 3.9 dargestellt.

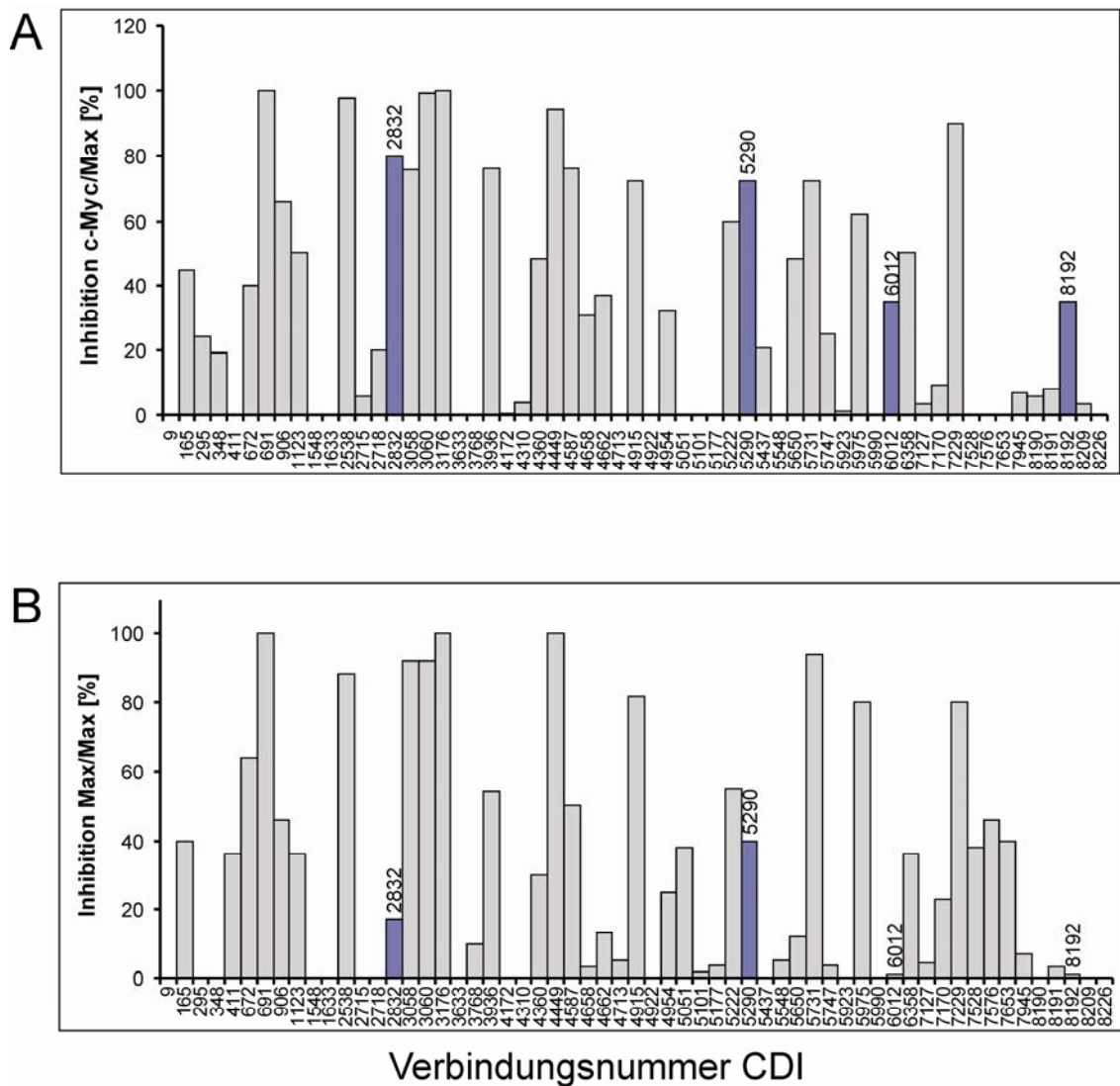


Abb. 3.8: Verifizierung der ChemDiv Verbindungen (CDI)

Die Verifizierung der verbleibenden 60 ChemDiv Verbindungen erfolgte sowohl bezüglich c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung (A), wie auch zur Kontrolle der Spezifität bezüglich Max/Max Homodimerisierung und DNA-Bindung (B). Die Fluoreszenzpolarisationsassays wurden per Hand bei einer Konzentration an Verbindung von 50 μ M durchgeführt. Die vier Verbindungen, die im Folgenden weiter analysiert wurden, sind blau markiert.

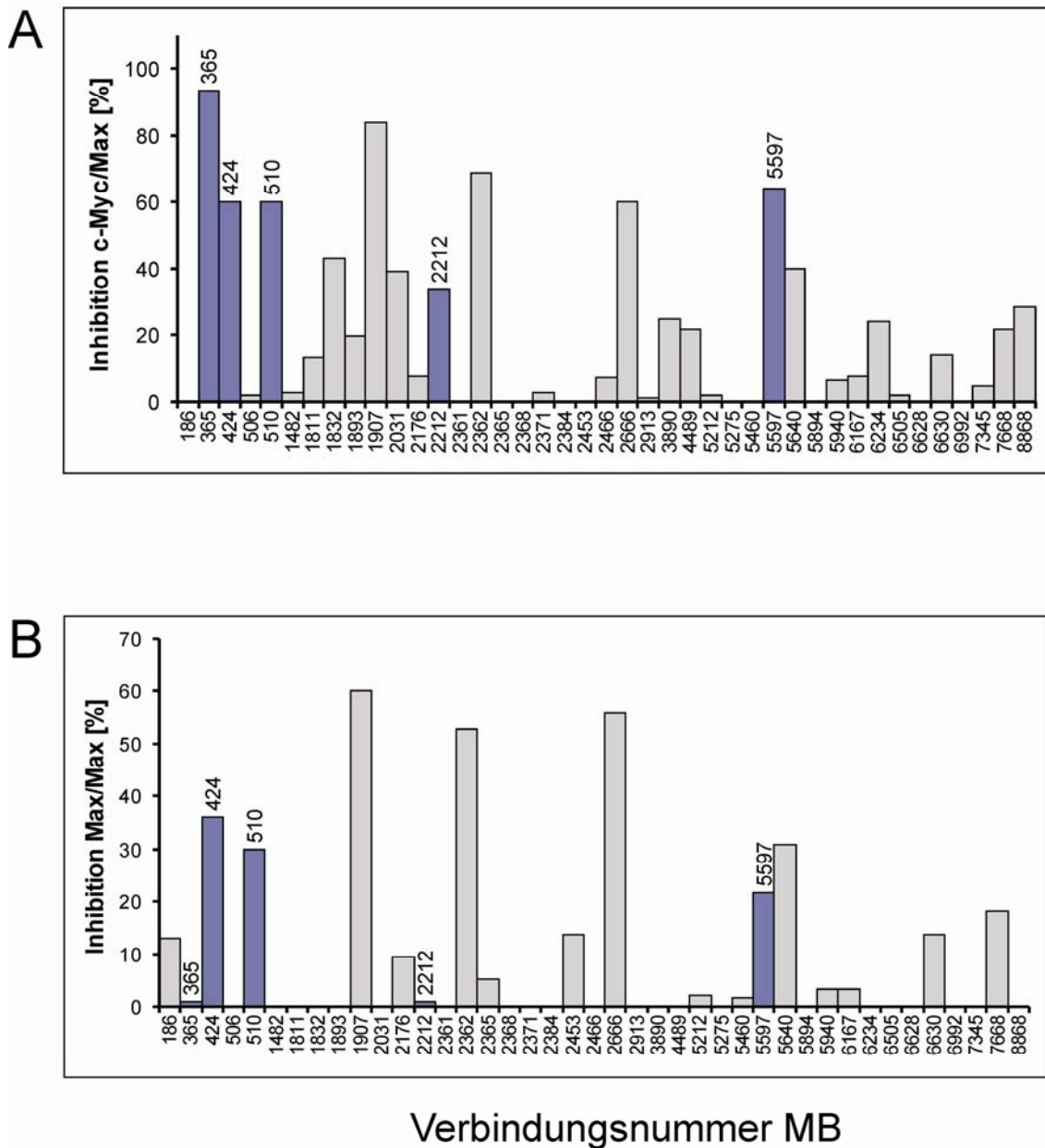


Abb. 3.9: Verifizierung der Maybridge Verbindungen (MB)

Die Verifizierung der verbleibenden 41 Maybridge Verbindungen erfolgte, wie unter Abbildung 3.8 beschrieben, bezüglich c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung **(A)**, sowie bezüglich Max/Max Homodimerisierung und DNA-Bindung **(B)**. Die fünf blau markierten Verbindungen wurden im Folgenden weiter analysiert.

Neun Verbindungen inhibierten die Ausbildung des c-Myc/Max DNA-Komplexes mit verschieden stark ausgeprägter Selektivität im Vergleich zum Max/Max DNA-Komplex. Diese Verbindungen wurden im Folgenden in einem ersten zellulären Assay auf ihre Fähigkeit hin, die c-Myc-induzierte Transkriptionsaktivität zu inhibieren, untersucht wurden. Bei den 92 anderen Verbindungen konnte entweder die im Screen ermittelte Aktivität bezüglich c-Myc nicht reproduziert werden, oder sie inhibierten die

Homodimerisierung und DNA-Bindung von Max/Max annähernd gleich stark, oder sogar stärker als die Heterodimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max. Die Tatsache, dass 47 Verbindungen, die im Screen mit mehr als 70 % Inhibition identifiziert werden konnten, bei der Verifizierung bezüglich c-Myc keine Aktivität mehr zeigten, könnte zum einen an Übertragungsfehlern des *Pin Tools* liegen. Aber auch beim Transfer der Proteinlösung sind Fehler möglich, die zu falsch positiven Ergebnissen geführt haben könnten.

Von den 9 verbleibenden Kandidaten waren die Verbindungen CDI8192, MB510 und MB5597 toxisch, weswegen sie nicht im zellulären c-Myc-abhängigen Luciferaseassay getestet werden konnte. Auch die Verbindung MB365 erwies sich ab einer Konzentration von 100 μM als toxisch, so dass ihre Aktivität in Zellen lediglich bei 50 μM getestet werden konnte. Die Aktivität der Verbindungen bezüglich der c-Myc-abhängigen Luciferaseaktivität ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

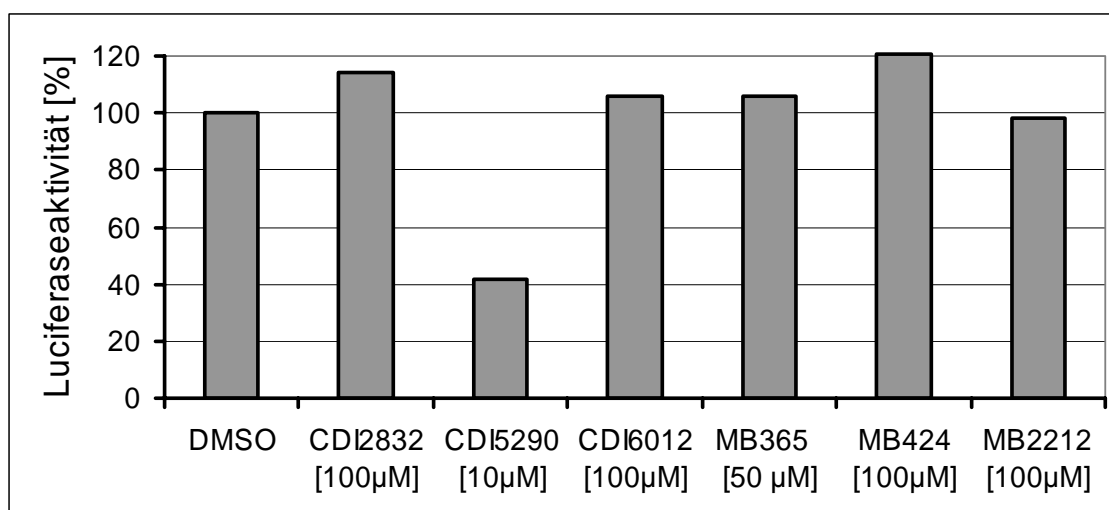


Abb. 3.10: Aktivität der sechs verbleibenden Verbindungen bezüglich der c-Myc-abhängigen Luciferaseaktivität

Der Effekt der Verbindungen auf die c-Myc-abhängige Reporteraktivität wurde in HEK 293T-Zellen bei den angegebenen Konzentrationen getestet. Nur für die Verbindung CDI5290 konnte bereits bei 10 μM eine Reduktion der Luciferaseaktivität gemessen werden, während die anderen Verbindungen selbst bei Konzentrationen von 50 μM oder 100 μM keinen Effekt zeigten. Die Verbindungen CDI8192, MB510 und MB5597 konnten nicht in Zellen getestet werden, da sie toxisch waren.

Keine Reduktion der c-Myc-vermittelten Transkriptionsaktivität zeigten die Verbindungen CDI2832, CDI6012, MB424 und MB2212 bei einer Konzentration von 100 μM , sowie die Verbindung MB365 bei 50 μM . Lediglich für die Verbindung CDI5290 konnte eine Inhibition der c-Myc-abhängigen Luciferaseaktivität beobachtet werden, wobei eine Konzentration von 10 μM hierzu ausreichend war. Die verbleibende

Verbindung CDI5290 wurde Mycro1 (*Myc* activity-reducing organic substance) genannt.

Die Analyse weiterer, strukturell ähnlicher Verbindungen ergab einen weiteren Kandidaten mit vergleichbarer Aktivität gegenüber c-Myc im FP-Assay, der im Folgenden mit Mycro2 bezeichnet wurde. Die Strukturen von Mycro1, Mycro2, sowie einer weiteren ähnlichen, aber inaktiven Verbindung (3) sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

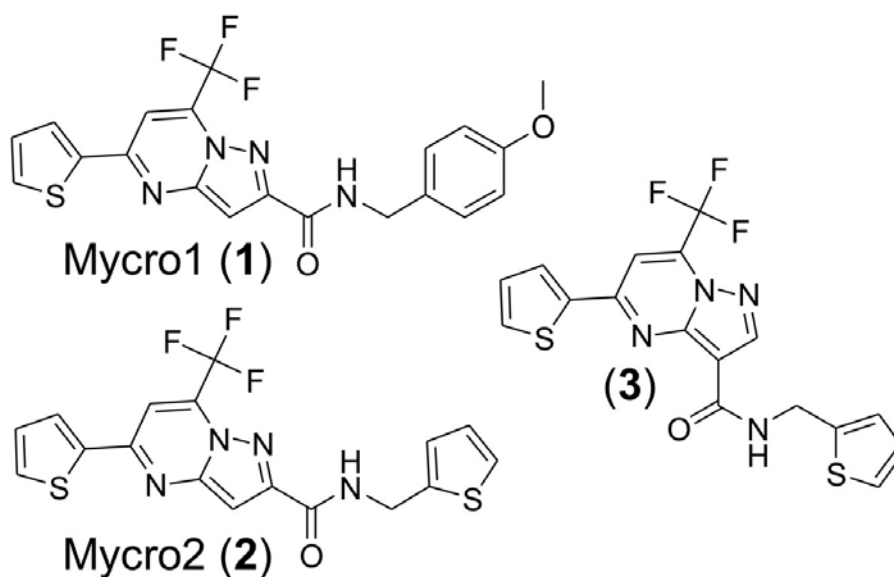


Abb. 3.11: Strukturen von Mycro1, Mycro2 und eines inaktiven Derivats 3

Die chemischen Strukturen der an Hand des HTS ermittelten c-Myc-Inhibitoren Mycro1 und Mycro2, sowie des inaktiven Derivats 3.

Mycro2 unterscheidet sich von Mycro1 lediglich durch die Substitution der Methoxyphenyl-Gruppe gegen eine Thiophenyl-Gruppe. Bei der inaktiven Verbindung 3 handelt es sich um ein Regioisomer der Verbindung Mycro2.

3.2 Aktivitäten von Mycro1 und Mycro2 in vitro

3.2.1 Effekt auf c-Myc/Max DNA-Bindung im FP-Assay

Es galt, in einem ersten Schritt die im HTS ermittelte Aktivität von Mycro1 in demselben Assay zu verifizieren. Ebenso wurde die inhibitorische Wirkung der strukturell ähnlichen Verbindung Mycro2 auf die c-Myc/Max DNA-Bindung im FP-Assay gemessen. Beide Verbindungen inhibierten die c-Myc/Max Dimerisierung und

DNA-Bindung mit ähnlicher Aktivität (IC_{50} -Werte: Mycro1: $30 \pm 5 \mu\text{M}$, Mycro2: $23 \pm 4 \mu\text{M}$), während das Regioisomer zu Mycro2 keine Inhibition zeigte. In Abbildung 3.12 ist das Aktivitätsprofil der drei Verbindungen gegen c-Myc/Max dargestellt.

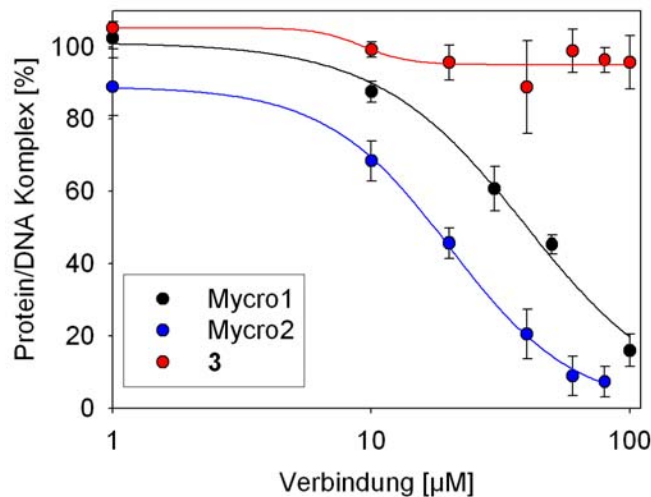


Abb. 3.12: Aktivitätsprofil von Mycro1, Mycro2 und 3 gegen c-Myc/Max DNA-Bindung

Mycro1 und Mycro2 inhibierten die c-Myc/Max DNA-Bindung, während das Regioisomer **3** keinen signifikanten Effekt zeigte. Steigende Konzentrationen der jeweiligen Verbindung wurden dazu für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Protein inkubiert, bevor die Texas Red-markierte DNA zugegeben, und die Fluoreszenzpolarisation gemessen wurde. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um die mittlere Standardabweichung.

Die FP-Messungen wurden in diesem Fall mit Texas Red-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Das hat generell den Vorteil, dass mögliche, durch Eigenfluoreszenz einer Verbindung hervorgerufene Artefakte so ausgeschlossen werden können. Die beiden Farbstoffe Texas Red und Fluorescein besitzen unterschiedliche Wellenlängenbereiche. Texas Red wird, im Gegensatz zu Fluorescein (Anregung: 490 nm; Emission: 515 nm) erst bei einer Wellenlänge von 590 nm angeregt, und emittiert das Licht wieder bei 635 nm.

3.2.2 Bestimmung der Spezifität mittels Fluoreszenzpolarisation

Um erste Aussagen über die Spezifität von Mycro1 und Mycro2 treffen zu können wurden vergleichbare Fluoreszenzpolarisationsassays für Max, C/EBP α und Jun etabliert. Während Max wie c-Myc zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper Proteine gehört, handelt es sich bei C/EBP α (Lekstrom-Himes & Xanthopoulos, 1998) und Jun (van Dam & Castellazzi, 2001) um Transkriptionsfaktoren der basischen Leuzin-Zipper (b-Zip) Familie. Alle drei Proteine binden als Homodimere an DNA.

Max/Max Homodimere erkennen dabei, wie c-Myc/Max Heterodimere die E-Box-Sequenz, während Jun/Jun Homodimere an das so genannte TRE-Element (TPA responsives Element, TGA₂CTCA) und C/EBP α /C/EBP α Homodimere an die Sequenz GCGCAAT binden. Allen vier Proteinen ist gemein, dass ihre Dimerisierung durch die Leuzin-Zipper Bereiche bestimmt wird. Es handelt sich hierbei um ein Sequenzmotiv, bei dem sich charakteristischerweise an jeder siebten Position die Aminosäure Leuzin befindet. Auf Grund der α -helikalen Struktur organisieren sich diese hydrophoben Reste auf einer Seite der Helix und können so mit den amphipatischen α -Helizes anderer Proteine der gleiche Familie wechselwirken (Vinson *et al.*, 2002). Die deswegen zu c-Myc/Max relativ ähnlichen Proteindimere stellen somit eine sehr strenge Spezifitätskontrolle dar.

Wie auch bei c-Myc und Max wurden für den Fluoreszenzpolarisationsassay lediglich die für Dimerisierung und DNA-Bindung notwendigen b-Zip Bereiche von C/EBP α (2.1.6) und Jun (2.1.6) im *E. coli*-Stamm Rosetta exprimiert und mittels Ni-NTA-Säule (für C/EBP α , 2.3.2.1) oder Amylose-Säule (für Jun, 2.3.2.2) aufgereinigt. Die das gereinigte Protein enthaltenden Elutionsfraktionen sind in Abbildung 3.13 zu sehen.

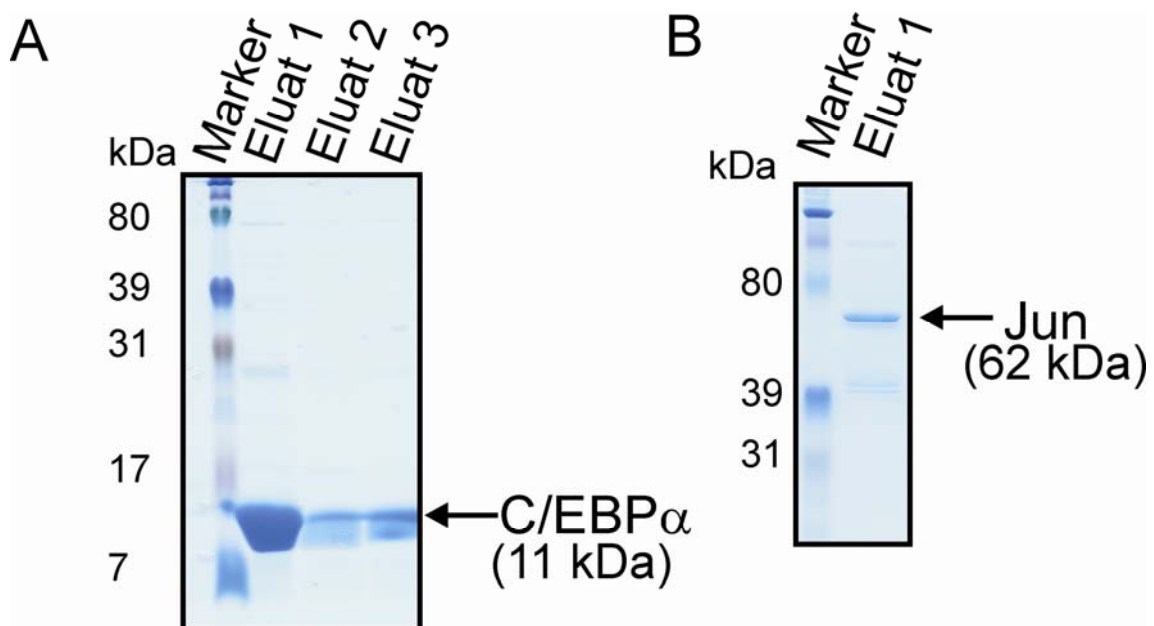


Abb. 3.13: Affinitätschromatographische Reinigung von C/EBP α und Jun

A) Die in den Vektor pQE80L FA klonierten b-Zip Domänen von C/EBP α wurden nach der Expression in dem *E. coli*-Stamm Rosetta über den N-terminalen His-tag mittels Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Das Protein war überwiegend in Eluat 1, aber auch noch in den Eluaten 2 und 3 zu finden. **B)** Die b-Zip Domänen von Jun wurden mittels des Vektors pMAL-C zusammen mit einem N-terminalen MBP-tag exprimiert und über eine Amylose-Säule aufgereinigt. Neben dem 62 kDa großen Protein Jun war noch der MBP-tag (40 kDa) alleine im Eluat 1 zu finden.

Die das jeweilige Protein enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereinigt und dialysiert (2.3.3). Im Eluat 1 von Jun war neben der das gewünschte Protein darstellenden Bande noch eine weitere Bande knapp über 39 kDa zu finden. Da es sich bei dem MBP-tag um ein 40 kDa großes Protein handelt, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser Bande um das MBP-Protein als Spaltprodukt handelte. Da das Maltose-Bindungsprotein jedoch weder Dimere bilden, noch an die DNA binden kann, war diese Verunreinigung für die Etablierung des Jun/Jun FP-Assays ohne Bedeutung.

Für alle Proteindimere wurden Bindungskurven unter den im c-Myc/Max FP-Assay verwendeten identischen Pufferbedingungen gemessen. Auch hier wurde als Fluoreszenzfarbstoff Texas Red verwendet. Die Bindungskurven der vier Proteindimere an ihre jeweilige DNA-Sequenz sind in Abbildung 3.14 zu sehen.

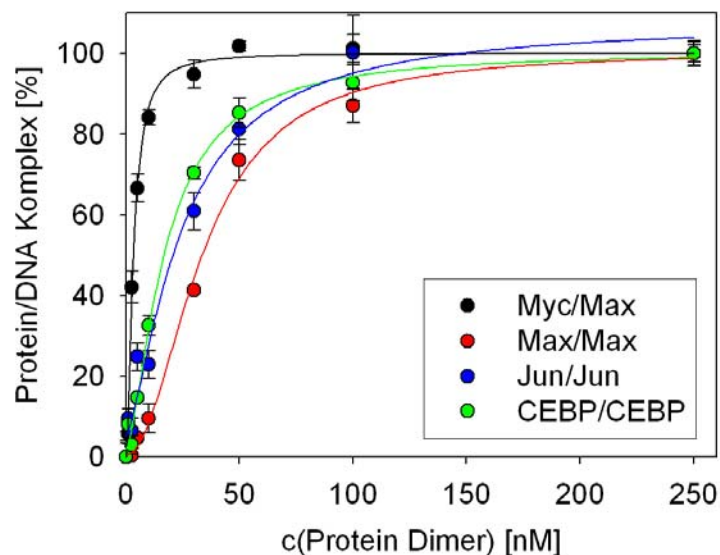


Abb. 3.14: FP-Bindungskurven für c-Myc/Max, Max/Max, Jun/Jun und C/EBP α /C/EBP α

In Anlehnung an den Fluoreszenzpolarisationsassay für c-Myc/Max wurden vergleichbare Protein-DNA-Bindungskurven für Max/Max, Jun/Jun und C/EBP α -C/EBP α gemessen. Die Messung der FP-Werte erfolgte dabei mit Texas Red-markierten Oligonukleotiden, die die dem Proteindimer entsprechende Bindungssequenz enthielten. Zum Vergleich der Kurven untereinander wurde das Fluoreszenzpolarisationssignal als % Protein-DNA-Komplex ausgedrückt. Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.

Die im Folgenden für die Spezifitätsanalysen verwendeten Proteinkonzentrationen wurden ebenfalls auf 30 nM Dimer festgelegt. Diese Konzentration erfüllte nicht nur die Kriterien, wie sie zuvor bereits bei der Wahl der Konzentration von c-Myc/Max berücksichtigt wurden, sondern sie ermöglichte auch einen guten Vergleich der

Aktivität einer Verbindungen bezogen auf die verschiedenen Dimere untereinander. In Abbildung 3.15 ist das Aktivitätsprofil von Mycro1 (A) und Mycro2 (B) dargestellt.

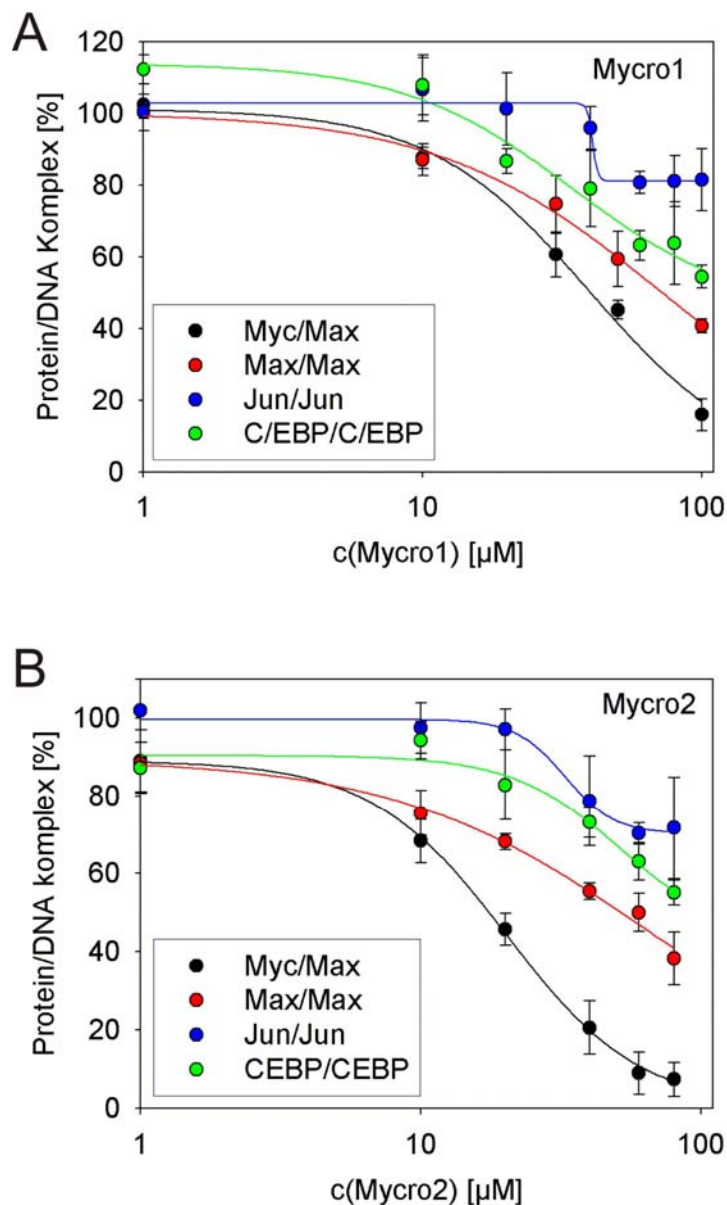


Abb. 3.15: Aktivitätsprofil von Mycro1 und Mycro2

Die inhibitorischen Effekte von Mycro1 (A) und Mycro2 (B) auf die Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max, Max/Max, Jun/Jun und C/EBP α /C/EBP α wurden mittels Fluoreszenzpolarisation bestimmt. Dazu wurden steigende Konzentrationen der jeweiligen Verbindung für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Proteindimer inkubiert, bevor die Texas Red-markierte DNA zugegeben wurde. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.

Beide Verbindungen zeigten, verglichen mit der Inhibition der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung, gute Spezifität gegenüber der Max/Max Homodimerisierung und DNA-Bindung (IC_{50} -Werte: Mycro1: $72 \pm 13 \mu\text{M}$, Mycro2: $54 \pm 9 \mu\text{M}$) und inhibierten die dimeren Transkriptionsfaktoren der b-Zip Klasse zu einem

wesentlich geringeren Anteil. Insbesondere die, wenn auch nur geringe Spezifität der Verbindungen für c-Myc/Max gegenüber Max/Max ist beachtenswert, berücksichtigt man, dass sich die beiden Proteine im Bereich der Dimerisierungsdomänen zu 59 % ähnlich sind.

Als weitere Spezifitätskontrolle konnte auf in der Arbeitsgruppe etablierte Fluoreszenzpolarisationsassays für die Proteinkinase Lck und den Transkriptionsfaktor STAT3 (Schust & Berg, 2004) zurückgegriffen werden. Beide Proteine besitzen SH2-Domänen, die phosphorylierte Tyrosinreste binden. Darauf basierend konnte mittels Fluoreszenzpolarisation die Bindung von Fluorescein-markierten Phosphopeptiden (STAT3: 5'-Carboxyfluorescein-GpYLKTKF, Lck: 5'-Carboxyfluorescein-GpYEEIP) an das entsprechende Protein gemessen werden. Weder Mycro1, noch Mycro2 hatten einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Bindung des Phosphopeptids an die jeweilige SH2-Domäne, wie in Abbildung 3.16 zu sehen.

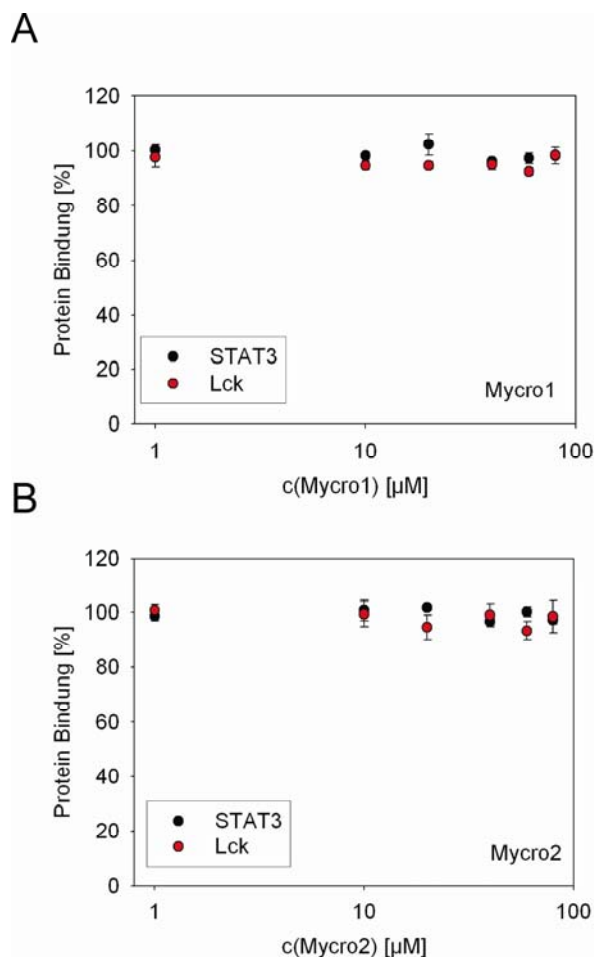


Abb. 3.16: Aktivität von Mycro1 und Mycro2 gegen STAT3 und Lck

Mycro1 (**A**) und Mycro2 (**B**) zeigten keinen Effekt auf die jeweilige SH2-Domäne von STAT3 oder Lck. Steigende Konzentrationen der Verbindungen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Protein inkubiert, bevor das Phosphopeptid zugegeben, und das Fluoreszenzpolarisationssignal gemessen wurde. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 3 Experimenten.

3.2.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der Effekt von Mycro1 und Mycro2 auf die c-Myc/Max DNA-Bindung wurde weiterhin mittels *Gelshift*-Assays (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA) überprüft. Dieser Assay basiert auf dem unterschiedlichen Laufverhalten freier und Protein-gebundener DNA in Polyacrylamidgelen. Im Vergleich zur Fluoreszenzpolarisation konnte hier die inhibitorische Wirkung der Verbindungen auf die Protein-DNA-Bindung in einem fluoreszenzunabhängigen Format gezeigt werden. Neben der c-Myc/Max DNA-Bindung wurde weiterhin als zusätzliche Spezifitätskontrolle der Effekt der Verbindungen auf die DNA-Bindung von Jun/Fos Heterodimeren ermittelt.

Für die EMSAs wurden rekombinantes, affinitätschromatographisch gereinigtes c-Myc-CFP, Max, Jun und Fos verwendet. Die verwendeten Eluate des mittels Ni-NTA-Säule erhaltenen Myc-CFP (2.1.6) und des mittels Amylose-Säule gewonnenen Fos (2.1.6) sind in Abbildung 3.17 zu sehen. In dem Eluat1 von Fos war neben dem gewünschten Protein noch eine geringe Menge an Maltose-Bindungsprotein (40 kDa) zu finden, die jedoch auf Grund der relativ zu Fos geringen Konzentration vernachlässigbar war. Für Jun und Max konnte auf die bereits im FP-Assay verwendeten (3.2.2) Proteine zurückgegriffen werden.

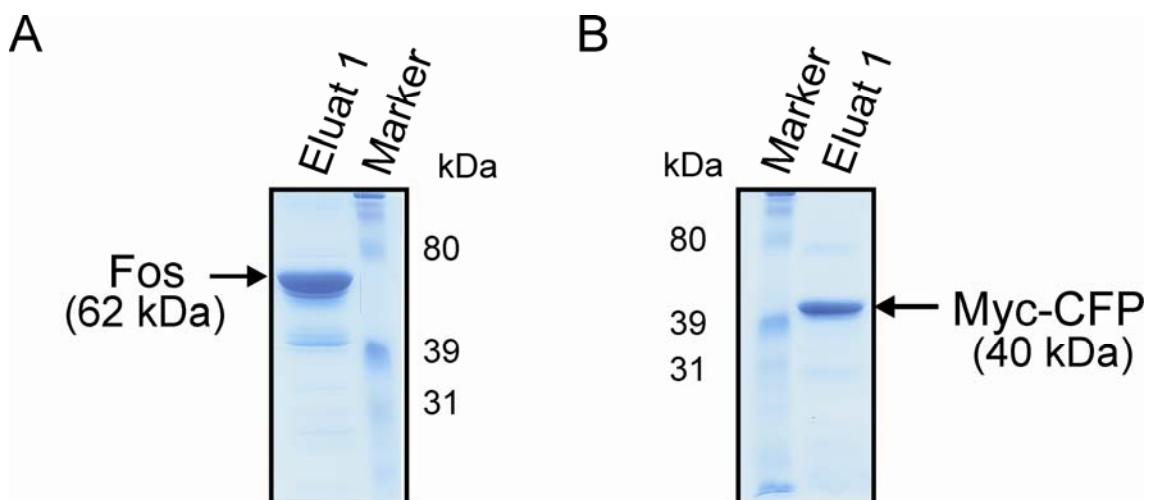


Abb. 3.17: Affinitätschromatographisch gereinigtes Myc-CFP und Fos

A) Das mit dem Vektor pMAL-C in Rosetta exprimierte Fos-Protein konnte über seinen MBP-tag mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden. Das für weitere Experimente verwendete Protein war in Eluat 1 zu finden. **B)** Rekombinantes Myc-CFP wurde in pET28a mit einem N-terminalen His-tag in Rosetta-Zellen exprimiert und über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Auch hier konnte das Protein in Eluat 1 gewonnen werden.

Die EMSAs wurden, wie in Material und Methoden 2.4.6 beschrieben, bei einer finalen Proteinkonzentration von 200 nM durchgeführt. Als Sonde im c-Myc/Max EMSA wurde ein am 5'-Ende mit ^{32}P radioaktiv markiertes Oligonukleotid verwendet, welches die E-Box-Sequenz enthielt (2.1.6). Für den Jun/Fos EMSA wurde, wie schon im FP-Assay, ein TRE-enhaltendes Oligonukleotid radioaktiv markiert. Mehrere Kontrollen zeigten die c-Myc/Max-, bzw. Jun/Fos-spezifische DNA-Bindung. So war für Max, bzw. Jun alleine keine Bindung an die DNA festzustellen, wie an der jeweils zweiten Spur des Autoradiogramms zu erkennen ist. Ein Überschuss an nicht radioaktiv markierter DNA sorgte für eine schwächere Bindung von c-Myc/Max bzw. Jun/Fos an das radioaktive Oligonukleotid. Die entsprechende mutierte nicht-radioaktive DNA zeigte wie erwartet keinen Effekt. Wie durch Weglassen des Proteindimers gezeigt werden konnte führte die freie radioaktive DNA auf Grund ihrer geringeren Größe zu keinem Signal auf Höhe der Protein-DNA-Bande (Abb. 3.18A und B).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Fluoreszenzpolarisation zeigten beide Verbindungen gute Inhibition der c-Myc/Max DNA-Bindung (Abb. 3.18A). dagegen war lediglich sehr schwache Inhibition der Jun/Fos DNA-Bindung zu erkennen (Abb. 3.18B).

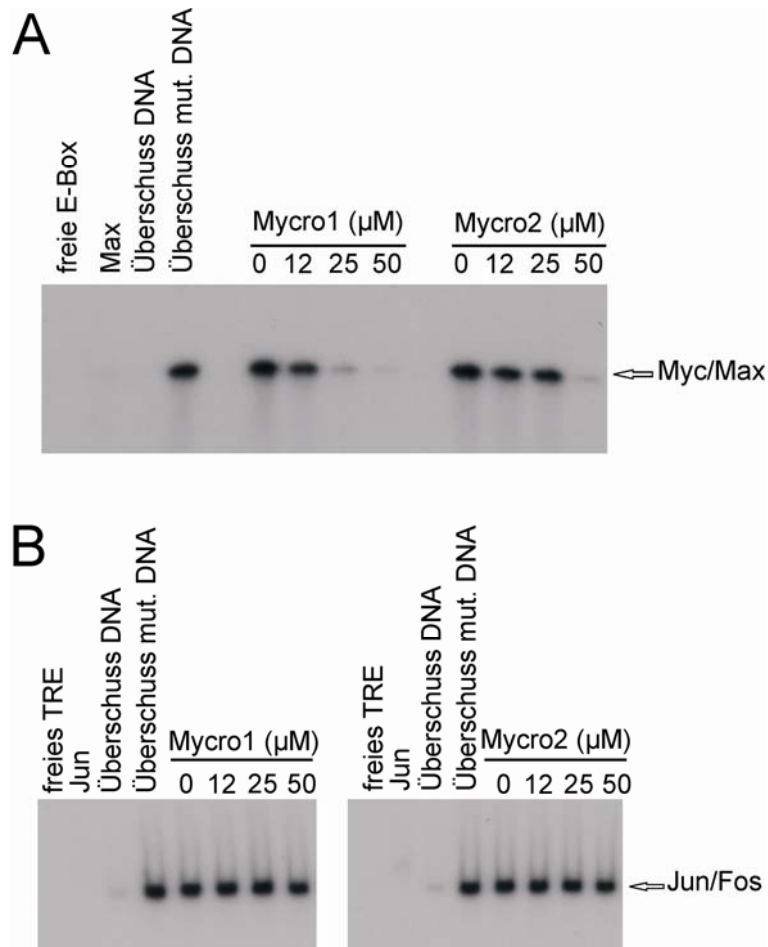


Abb. 3.18: Electrophoretic Mobility Shift Assays für c-Myc/Max und Jun/Fos DNA-Bindung
 Mycro1 und Mycro2 zeigten einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die DNA-Bindung von c-Myc/Max (**A**), jedoch nicht auf die DNA-Bindung von Jun/Fos (**B**). In beiden Fällen führte die freie, radioaktiv markierte DNA (**A**: E-Box; **B**: TRE) zu keinem Signal auf Höhe der Protein-DNA-Bande. Max (**A**), bzw. Jun (**B**) alleine binden nicht an die DNA, wie an der jeweils zweiten Spur des Autoradiogramms zu erkennen ist. Durch Zugabe von überschüssiger nicht-radioaktiver DNA (**A**, **B**) konnte das Protein-DNA-Signal unterdrückt werden. Die entsprechende mutierte nicht-radioaktive DNA zeigte diesen Effekt jedoch nicht. Diese Kontrollen bestätigten die spezifische Interaktion von c-Myc/Max mit der E-Box (**A**), bzw. von Jun/Fos mit der TRE-Sequenz (**B**).

Die Kontrollverbindung **3** zeigte im Einklang mit den FP-Daten keine Inhibition der c-Myc/Max DNA-Bindung (Abb. 3.19).

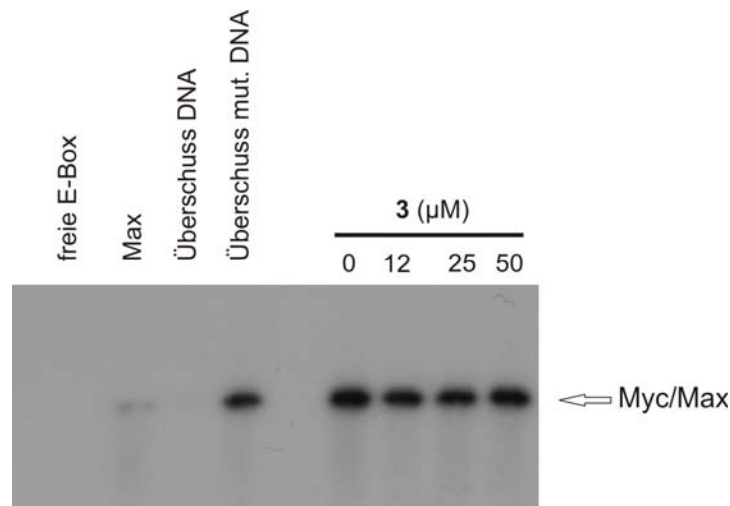


Abb. 3.19: c-Myc/Max Electrophoretic Mobility Shift Assay für das inaktive Derivat 3

Das Derivat 3 zeigte keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die DNA-Bindung von c-Myc/Max. Die wie in Abb. 3.18 beschriebenen Kontrollen bestätigen, dass c-Myc/Max spezifisch die E-Box-Sequenz enthaltende DNA bindet.

3.2.4 GST-Pulldown

Um zu überprüfen, ob es sich bei Mycro1 und Mycro2 um Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung handelt, wurden GST-Pulldown Experimente durchgeführt. Hierfür wurden rekombinantes GST-Max und Myc-CFP (3.2.3) verwendet. GST-Max wurde über den GST-tag mittels Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die mittels verschiedener Konzentrationen an reduziertem Glutathion gewonnenen Eluate sind in Abbildung 3.20 zu sehen. Sie wurden im Anschluss an die Reinigung vereinigt und als eine Fraktion dialysiert.

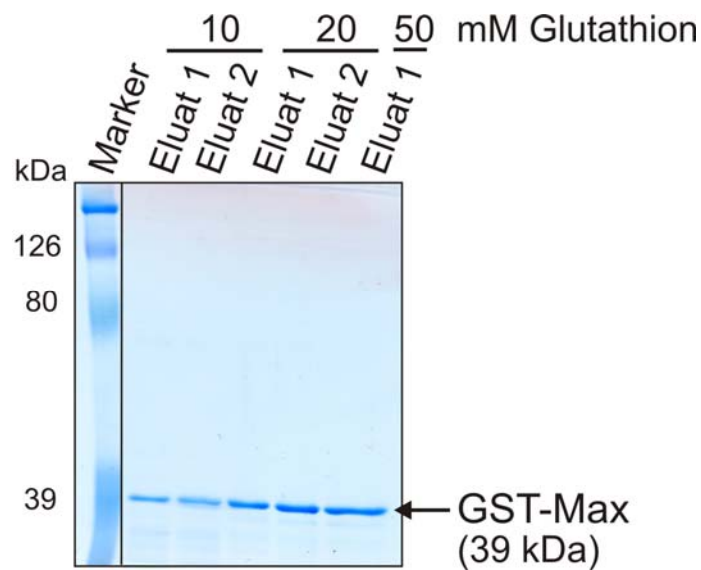


Abb. 3.20: Affinitätschromatographisch gereinigtes GST-Max

Die Aufreinigung des in Rosetta exprimierten GST-Max erfolgte über Glutathion-Sepharose. Mittels steigender Konzentrationen an reduziertem Glutathion konnte GST-Max in insgesamt 5 Fraktionen gewonnen werden. Alle Eluate wurden vereinigt und gemeinsam dialysiert.

Wie in Material und Methoden 2.4.5 beschrieben, wurden für diesen Assay je 500 ng GST oder GST-Max über Nacht bei 4 °C mit 500 ng Myc-CFP und der entsprechenden Verbindung oder DMSO alleine inkubiert. Die Interaktion des im *Pulldown* an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-Max mit Myc-CFP wurde im Western Blot mittels eines Antikörpers gegen GFP ermittelt. Gleichmäßiges Laden der SDS-Gele konnte mittels eines Antikörpers gegen GST überprüft werden. Freies GST alleine zeigte, wie in Abbildung 3.21A und B an der fehlenden Bande im anti-GFP Western zu sehen, keine Interaktion mit Myc-CFP. Somit konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Myc-CFP und GST-Max spezifisch durch die Dimerisierungsdomänen der Proteine vermittelt wird. Sowohl Mycro1 wie auch Mycro2 inhibierten die Dimerisierung von c-Myc/Max bereits ab einer Konzentration von 10 μ M (Abb. 3.21A), was gut mit den Ergebnissen des EMSAs übereinstimmt. Die Verbindung **3** zeigte keinen Effekt im GST-*Pulldown* (Abb. 3.21B).

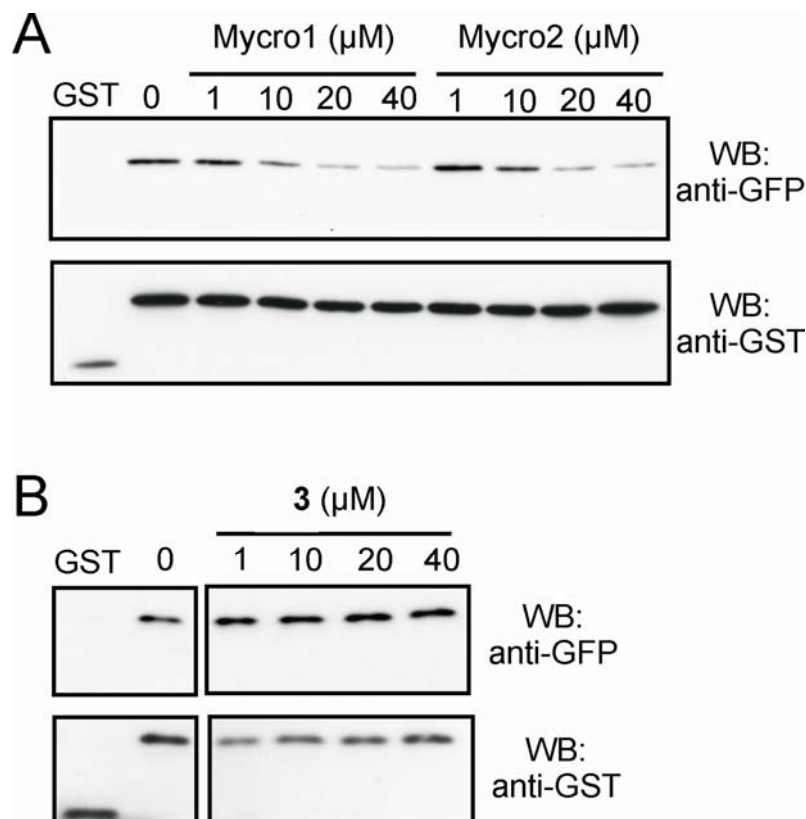


Abb. 3.21: c-Myc/Max GST-Pull-down für Mycro1, Mycro2 und das inaktive Derivat 3

A) Mycro1 und Mycro2 zeigten eine konzentrationsabhängige Inhibition der Dimerisierung von GST-Max und Myc-CFP im GST-Pull-down. GST alleine jedoch wechselwirkte nicht mit Myc-CFP, wie an Hand der fehlenden Bande in Bahn 1 des anti-GFP Western zu erkennen. Der Reblot mit anti-GST bestätigt das gleichmäßige Laden des SDS-Gels. B) Das Derivat 3 zeigte selbst bei 40 μM keinen Einfluss auf die Dimerisierung von c-Myc/Max.

Die Ergebnisse der bislang beschriebenen Analysen zeigen, dass es sich bei Mycro1 und Mycro2 *in vitro* um zwei niedermolekulare Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung handelt.

3.3 Zelluläre Analyse der c-Myc-Inhibitoren Mycro1 und Mycro2

3.3.1 Bestimmung der Toxizität

Bevor die Verbindungen in zellulären Assays bezüglich ihrer Aktivität untersucht werden konnten, wurden sie zuerst auf eventuelle Toxizität hin überprüft. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass mögliche zelluläre Effekte primär durch ein Absterben der Zellen hervorgerufen wurden. Dazu wurden die adhärenenten HEK 293T und NIH/3T3 Zelllinien wie unter 2.6.1 beschrieben ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen an Mycro1, Mycro2 oder Verbindung 3 für einen Zeitraum von 72 Stunden inkubiert. Weder bei 10 μM noch bei 20 μM Verbindung konnte ein verstärktes Abrunden und

Ablösen der Zellen vom Boden der 96-Loch-Platten beobachtet werden. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass keine der verwendeten Verbindungen toxische Effekte aufwies.

3.3.2 Einfluss auf die Proliferation von c-Myc-abhängigen sowie c-Myc-unabhängigen Zelllinien

Da der Transkriptionsfaktor c-Myc eine Vielzahl von Genen steuert, die an entscheidenden Funktionen der Zelle beteiligt sind, kann man davon ausgehen, dass bereits eine geringe Reduktion der Aktivität dieses Proteins einen bemerkbaren Effekt in zellulären Assays zeigen wird. So spielt c-Myc bei fast allen Zelllinien eine große Rolle bei der Steuerung der Proliferation, insbesondere was den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus anbelangt (Amati *et al.*, 1998; Grandori *et al.*, 2000). Deswegen war zu erwarten, dass die Inhibition von c-Myc zu einer Verlangsamung der Proliferation führen sollte. Diese Annahme konnte, wie an Hand verschiedener Zelllinien gezeigt, bestätigt werden. Wie in Abbildung 3.22 zu sehen, inhibierten Mycro1 und Mycro2 die Proliferation der c-Myc-abhängigen Krebszelllinien U-2OS (Osteosarcomzellen), MCF-7 (Brustkrebszellen) und Raji (Burkitt's Lymphom Zellen) bei Konzentrationen von 10 μM und 20 μM .

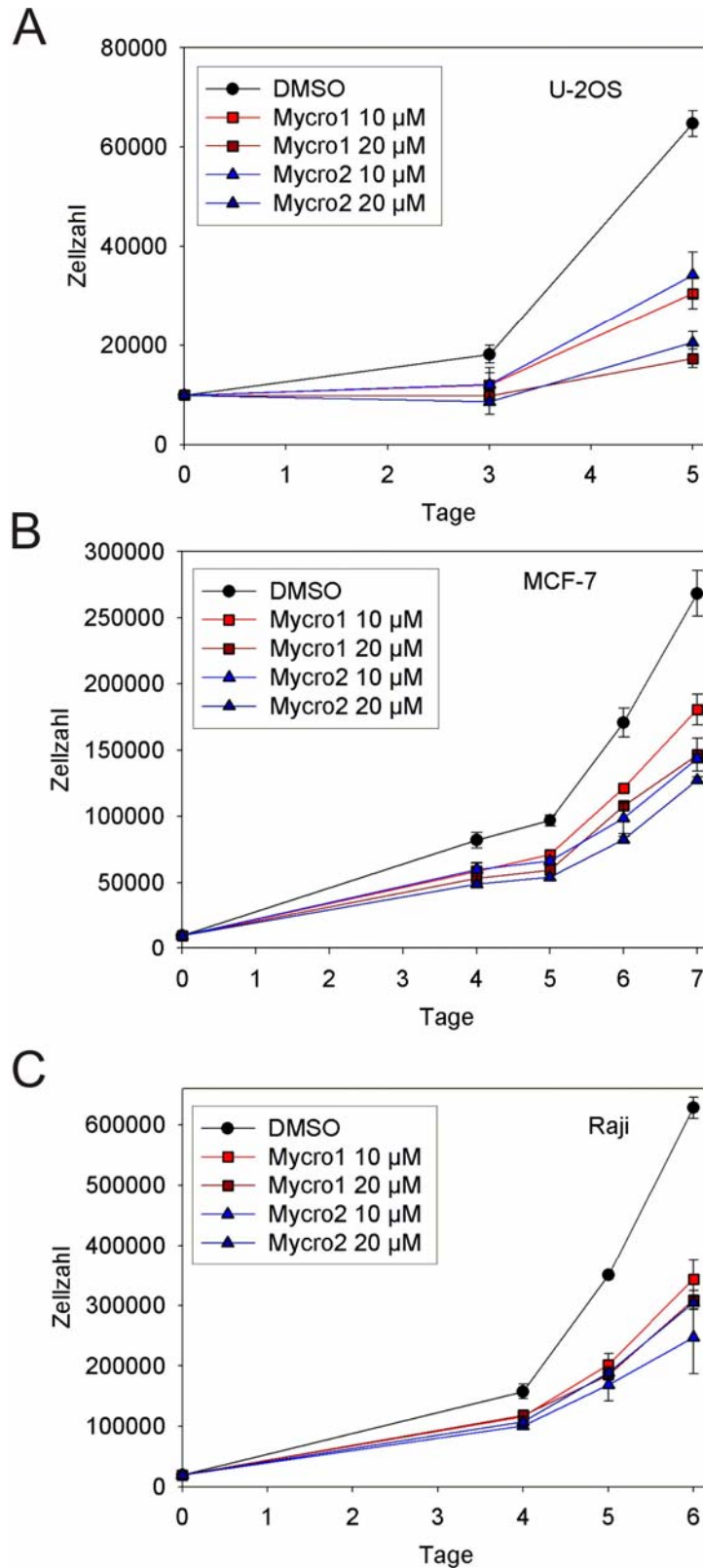


Abb. 3.22: Inhibition der Proliferation von c-Myc-abhängigen Krebszelllinien durch Mycro1 und Mycro2

Der Effekt von 10 µM und 20 µM Mycro1 und Mycro2 auf die Proliferation der c-Myc-abhängigen Krebszelllinien U-2OS (A), MCF-7 (B) und Raji (C) wurde durch Bestimmung der Zellzahl an verschiedenen Tagen ermittelt. Beide Verbindungen reduzierten die Proliferation, verglichen mit dem Wachstum von DMSO-behandelten Zellen.

Das Wachstum konnte durch Zählen der Zellen über mehrere Tage hinweg mittels eines Counters der Firma Beckmann Coulter gemessen werden (2.6.2). Als Kontrolle dienten DMSO-behandelten Zellen, wodurch eine DMSO-bedingte Reduktion der Proliferation ausgeschlossen werden konnte.

Weiterhin wurde der Effekt von Mycro1 und Mycro2 auf die Rattenfibroblasten Zelllinie NIH/3T3 untersucht. Abbildung 3.23A zeigt, dass beide Verbindungen bei 10 μM und 20 μM die c-Myc-abhängige Proliferation deutlich verlangsamen.

Diese Aussage wurde verstärkt durch die Untersuchung des S-Phase Eintritts (2.6.3). Mittels des hierfür verwendeten Kits der Firma Roche konnte der BrdU-Einbau in die DNA kolorimetrisch im 96-Loch-Platten-Format verfolgt werden. Bei Bromdesoxyuridin handelt es sich um ein Basenanalogue, das an Stelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird und mittels eines Peroxidasegekoppelten BrdU-Antikörpers detektiert werden kann. Beide Verbindungen bewirkten bei 10 μM bereits einen deutlich verspäteten Eintritt der NIH/3T3-Zellen in die S-Phase des Zellzyklus, wie in Abbildung 3.23B zu sehen. Die Zellen wurden für dieses Experiment vor Zugabe der Verbindung für vierundzwanzig Stunden gehungert (Medium mit 0,1 % FCS), um sie in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Anschließend wurden die Zellen mit 10 % Serum stimuliert, und der Eintritt in die S-Phase über den BrdU-Einbau in die DNA verfolgt.

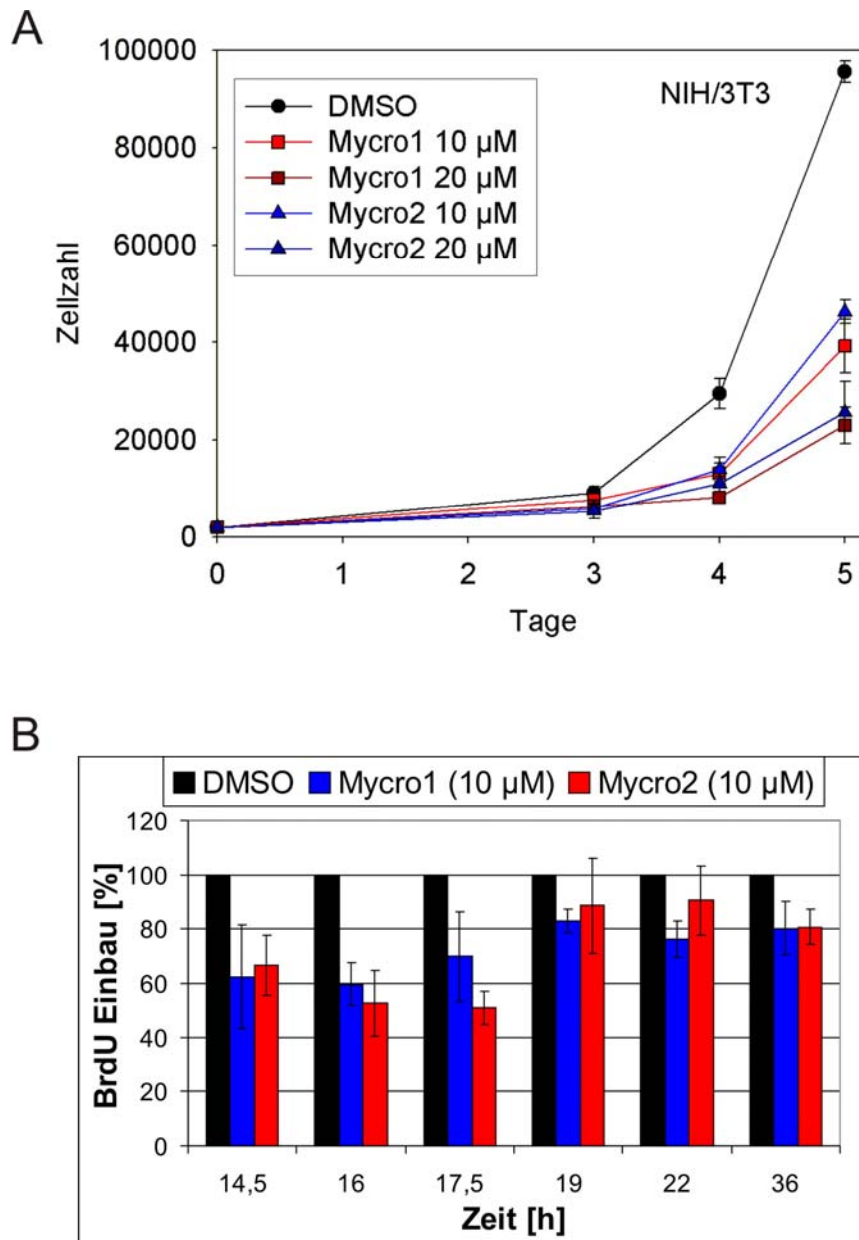


Abb. 3.23: Verlangsamung von Proliferation und S-Phase Eintritt durch Mycro1 und Mycro2 in NIH/3T3-Zellen

A) Mycro1 und Mycro2 inhibierten bei Konzentrationen von 10 und 20 μM die c-Myc-abhängige Proliferation der Fibroblastenzelllinie NIH/3T3. **B)** Der mittels BrdU-Einbau untersuchte Eintritt der NIH/3T3-Zellen in die S-Phase des Zellzyklus konnte bereits durch 10 μM Mycro1 oder Mycro2 verlangsamt werden.

Im Gegensatz zur Inhibition der c-Myc-abhängigen Zelllinien zeigte keine der beiden Verbindungen einen Effekt auf die Proliferation der Zelllinie PC-12 (Abb. 3.24). Diesen Zellen fehlt auf Grund einer homozygoten Mutation ein funktionelles Max-Protein, weswegen ihre Proliferation in c-Myc/Max-unabhängiger Weise erfolgt (Hopewell & Ziff, 1995). Somit kann man davon ausgehen, dass die Inhibition der Proliferation der anderen Zellen auf einen c-Myc-abhängigen Mechanismus zurückzuführen ist.

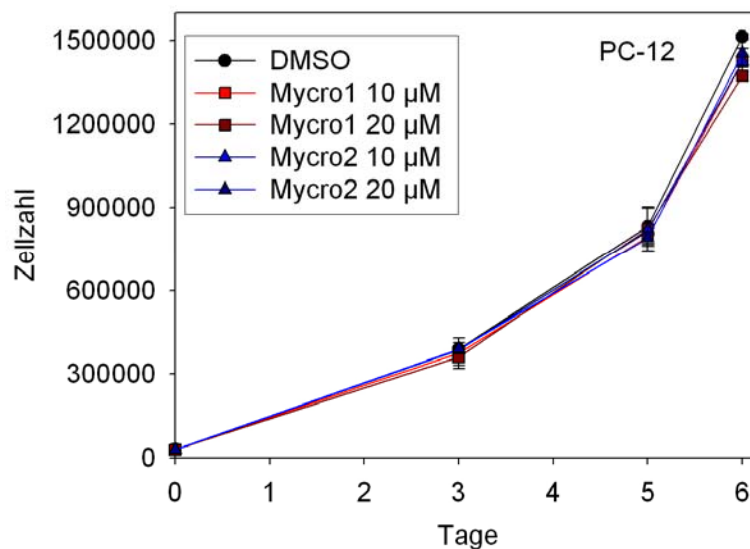


Abb. 3.24: Effekt von Mycro1 und Mycro2 auf die Proliferation der c-Myc-unabhängigen PC-12 Zelllinie

Mycro1 und Mycro2 zeigen weder bei 10 µM noch bei 20 µM einen Effekt auf die Proliferation der c-Myc-unabhängigen Zelllinie PC-12, wie durch Bestimmung der Zellzahl nach verschiedenen Tagen gezeigt werden konnte.

3.3.3 Luciferaseassays zur Untersuchung der Transkription

c-Myc steuert als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl von Genen, in der Regel aber nur um einen Faktor drei oder sogar noch weniger (Patel *et al.*, 2004). Das erschwert die Analyse von Änderungen des Transkriptionslevels der Zielgene. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein c-Myc-abhängiger Luciferaseassay etabliert, mit dem der Einfluss von Mycro1 und Mycro2 auf die Transkriptionsaktivität des Proteins untersucht werden konnte. In Abbildung 3.25 ist die durch exogenes und endogenes c-Myc in HEK 293T-Zellen erreichte Induktion der Luciferaseaktivität dargestellt. Dazu wurden die Zellen neben dem für c-Myc codierenden Plasmid pcDNA3-Myc entweder mit dem *firefly* Luciferase-Plasmid pGL3-E-Box oder dem *firefly* Luciferase-Plasmid pGL3-E-Box-mut transfiziert. Das Plasmid pGL3-E-Box enthält vor dem Gen für die *firefly* Luciferase die Sequenz der E-Box vier Mal hintereinander, was die c-Myc-vermittelte Luciferaseaktivität erlaubt. Das Plasmid pGL3-E-Box-mut dagegen enthält die mutierte E-Box Sequenz, was die c-Myc-vermittelte Aktivierung der *firefly* Luciferase verhindert. Zur Normierung der Transfektionseffizienz wurde die durch den Vektor phRL-CMV vermittelte *Renilla* Luciferaseaktivität gemessen. Das duale Luciferase System der Firma Promega ermöglicht die Messung beider, von einander unabhängiger Reporter in einem Ansatz.

Somit lassen sich durch Pipettierungenauigkeiten hervorgerufene Schwankungen vermeiden, wie sie zum Beispiel bei der Verwendung der β -Galaktosidase zur Normierung auftreten können. Die Messung der Reporteraktivitäten erfolgte vierundzwanzig Stunden nach dem der Transfektion folgenden Mediumwechsel (2.6.4).

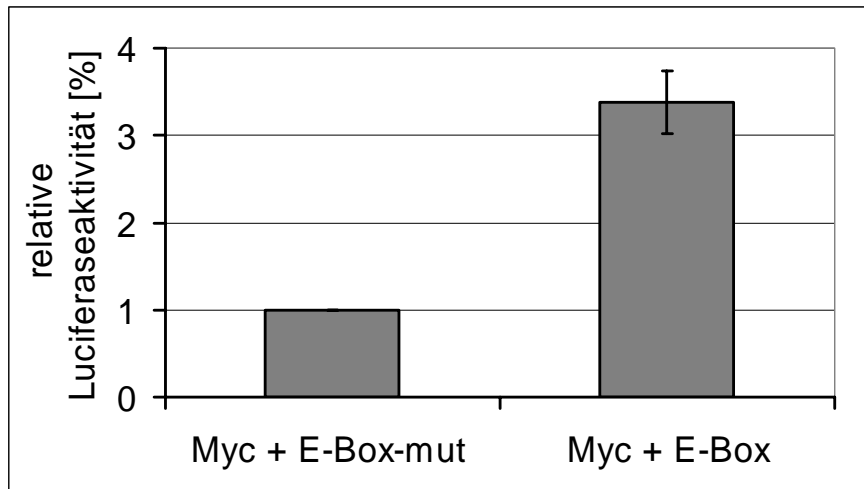


Abb. 3.25: c-Myc-abhängige Luciferaseaktivität

Zur Bestimmung der c-Myc-abhängigen Luciferaseaktivität wurden HEK 293T-Zellen mit dem Vektor pcDNA3-Myc, sowie den Vektoren pGL3-E-Box oder pGL3-E-Box-mut transfiziert. Durch Kotransfektion des Plasmids phRL-CMV konnte neben dem durch c-Myc hervorgerufenen *firefly* Luciferasesignal noch die Aktivität des Kontrollreporters (*Renilla* Luciferase) für jeden Ansatz bestimmt, und somit die Transfektionseffizienz berechnet werden. Die Messung der Reporteraktivitäten erfolgte vierundzwanzig Stunden nach dem der Transfektion folgenden Mediumwechsel, wobei das duale Luciferase System der Firma Promega verwendet wurde. Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.

Die durch Zugabe von 10 μ M Mycro1 oder Mycro2 erzielte Reduktion der c-Myc-abhängigen Luciferaseaktivität ist in Abbildung 3.26 zu sehen. Während Mycro1 bei dieser Konzentration bereits eine 50 % Inhibition erzielte, reduzierte Mycro2 die Transkription sogar um fast 80 %. Das Derivat **3** hingegen hatte keinen Einfluss auf die Induktion der Luciferaseaktivität. Alle Verbindungen wurden mit dem Mediumwechsel nach der Transfektion für vierundzwanzig Stunden zu den Zellen gegeben, bevor die Reporteraktivitäten gemessen wurden. Als Kontrolle dienten in gleicher Weise mit 1 % DMSO anstelle der Verbindung behandelte Zellen (2.6.4).

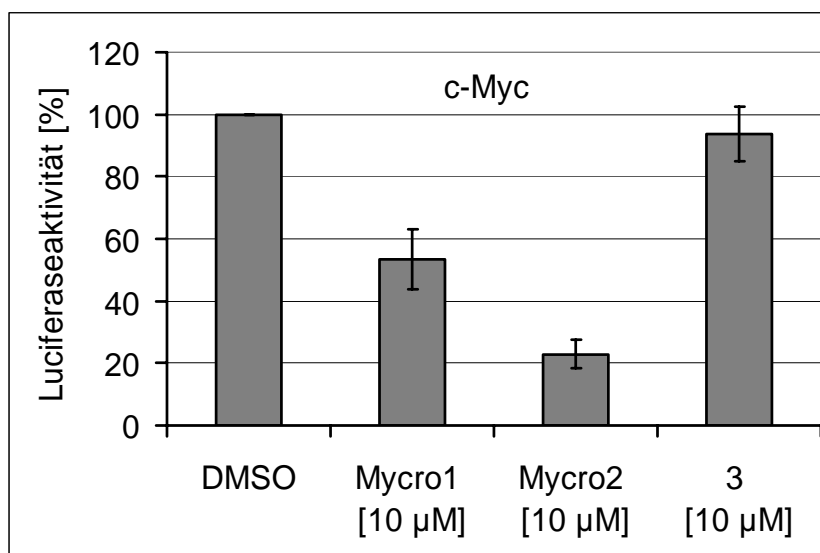


Abb. 3.26: Effekt der Verbindungen auf die c-Myc-abhängige Reporterogenaktivität

Mycro1 und Mycro2 reduzierten bei 10 µM die c-Myc-abhängige Luciferaseaktivität in HEK 293T-Zellen, während das Derivat **3** keinen Einfluss hatte. Als Kontrolle wurden die Zellen für vierundzwanzig Stunden mit 1 % DMSO anstelle der Verbindungen behandelt. Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.

Um weitere Aussagen über die Spezifität der Verbindungen machen zu können, wurden ähnliche Luciferaseassays für weitere dimere Transkriptionsfaktoren etabliert. Zum einen wurde die AP-1-abhängige Transkription untersucht. Bei AP-1 handelt es sich um einen Sammelbegriff für Mitglieder der Jun, Fos, ATF und Maf Protein Unterfamilien, die alle zu den b-Zip-Proteinen gehören, wobei in Säugetierzellen vorwiegend die Proteine Jun und Fos exprimiert werden (Vogt, 2002). Der andere Luciferaseassay basiert auf der Transkriptionsaktivität des dimeren Proteins *serum response factor* (SRF), das an das *serum response element* (SRE) bindet (Chai & Tarnawski, 2002). Während im Fall von SRF die Transkriptionsaktivität des konstitutiv aktiven Proteins analysiert wurde (SRF.VP16), konnte im Fall von AP-1 endogene Transkriptionsaktivität gemessen werden.

AP-1-Aktivierung wurde durch 24-stündige Stimulation der Zellen mit dem Phorbolster TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) erzielt. Neben dem die TRE- (*TPA responsive element*) Region enthaltenden *firefly* Luciferase-Plasmid (AP-1) wurde ein weiteres Plasmid generiert, in welchem Mutationen in der TRE-Region die AP-1 Bindung verhindern (AP-1 mut).

Im Falle von SRF wurde kein die mutierte Bindungssequenz enthaltendes Luciferase-Plasmid verwendet, sondern die Aktivität des Transkriptionsfaktors in Vergleich zu Zellen gesetzt, die lediglich mit dem SRF Leervektor pEF transfiziert wurden.

Auch für diese beiden Reporterassays wurde das duale Luciferasesystem verwendet. Die Normierung der Transfektionseffizienz wurde mittels im gleichen Ansatz erfolgender Bestimmung der *Renilla* Luciferaseaktivität erreicht. Die in beiden Experimenten erzielte Induktion ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

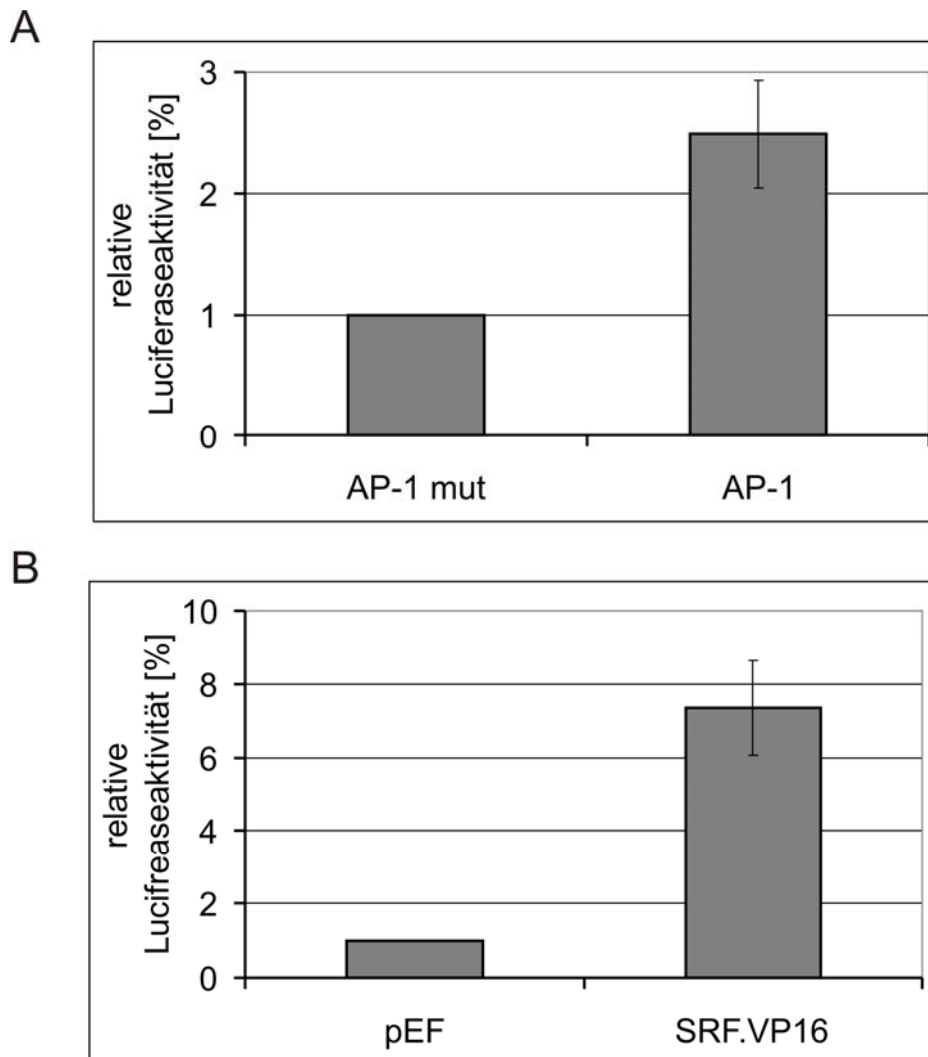


Abb. 3.27: Luciferaseassays für die dimeren Transkriptionsfaktoren AP-1 und SRF

In dieser Abbildung ist die relative Luciferaseaktivität der dimeren Transkriptionsfaktoren AP-1 (A) und SRF (B) in HEK 293T-Zellen dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.

A) Im Falle von AP-1 wurde die endogene Aktivität des Proteins durch Stimulation mit TPA erzielt und verglichen mit Zellen, die statt mit dem die TRE-Region enthaltenden *firefly* Luciferase-Plasmid mit einem, eine mutierte AP-1 Bindungsregion enthaltenden Plasmid transfiziert wurden.

B) Für die SRF-abhängige Luciferaseaktivität wurden die konstitutiv aktives SRF- (SRF.VP16) exprimierenden Zellen mit Zellen verglichen, die lediglich mit dem Leervektor transfiziert wurden.

Mycro1 und Mycro2 reduzierten auch die Luciferaseaktivität des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 (Abb. 3.28A). Jedoch zeigte Mycro2 gute Selektivität bezüglich c-Myc, was in Einklang steht zu den Ergebnissen des FP-Assays (Abb.

3.15B) und des EMSAs (Abb. 3.18B). Mycro1 inhibierte die AP-1-induzierte Luciferaseaktivität in etwa gleich stark, wie auch die c-Myc-abhängige Luciferaseaktivität. Die Tatsache, dass dies nicht mit den Ergebnissen des FP-Assays (Abb. 3.15A) und des EMSAs (Abb. 3.18B) korreliert könnte daran liegen, dass in Säugetierzellen neben Jun und Fos auch noch andere dimere Proteine der AP-1 Familie exprimiert werden, die ebenfalls einen Beitrag zur AP-1-vermittelten Reporterogenaktivität leisten können. Diese werden möglicherweise durch Mycro1 inhibiert.

Die Aktivität des dimeren Transkriptionsfaktors SRF hingegen blieb trotz Zugabe von Mycro1 oder Mycro2 nahezu unverändert (Abb. 3.28B). In beiden Ansätzen wurde die Verbindung mit dem Mediumwechsel nach der Transfektion für vierundzwanzig Stunden zu den Zellen gegeben. Im Falle der AP-1-abhängigen Luciferaseaktivität erfolgte dieser Schritt zusammen mit der TPA-Stimulation der HEK 293T-Zellen.

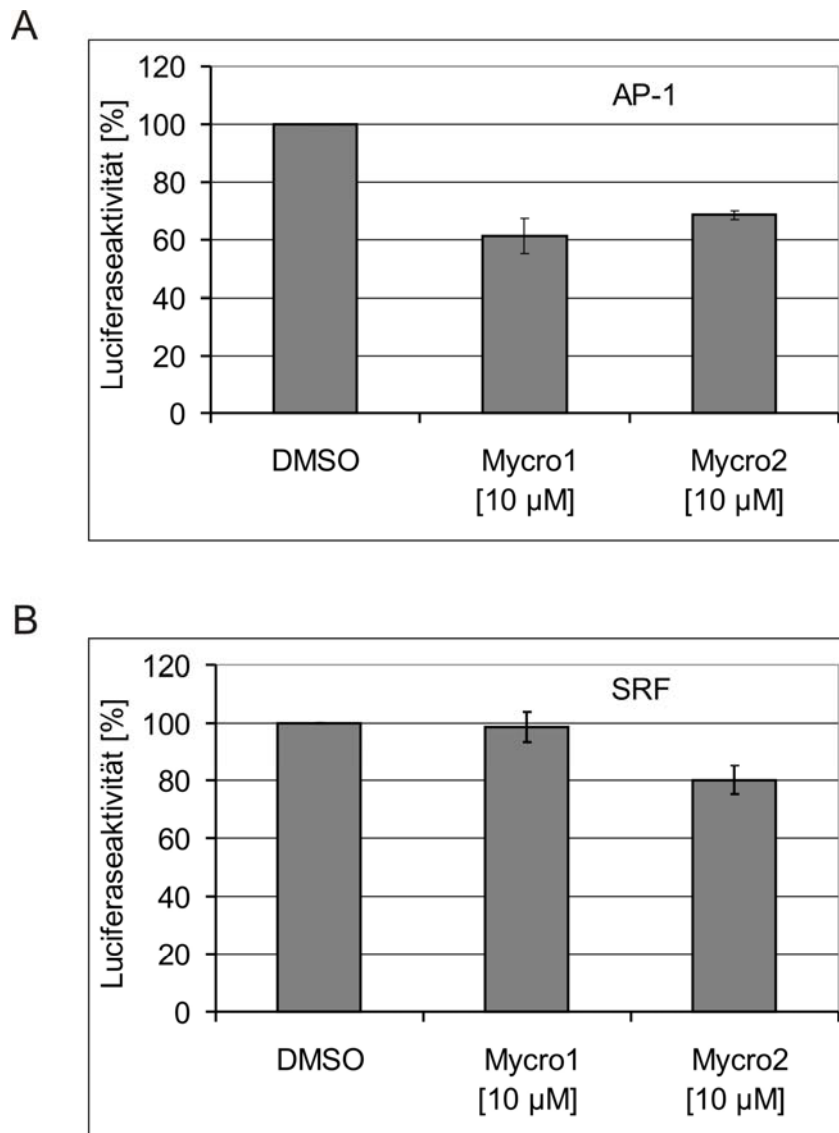


Abb. 3.28: Effekt von Mycro1 und Mycro2 auf die AP-1- und SRF-abhängige Luciferaseaktivität

A) Mycro1 und Mycro2 zeigten geringe Inhibition der AP-1-abhängigen Reporteraktivität in HEK 293T-Zellen. Bei AP-1 handelt es sich in Säugetierzellen vor allem um die Proteine Jun und Fos, aber auch andere Proteine der AP-1-Familie tragen zur Luciferaseaktivität bei. TPA-Stimulation und Zugabe der Verbindung erfolgten fünf Stunden nach der Transfektion. *Firefly* Luciferase- und *Renilla* Luciferaseaktivität wurden vierundzwanzig Stunden später gemessen.

B) Die Luciferaseaktivität des dimeren Transkriptionsfaktors SRF in HEK 293T-Zellen wurde nicht durch Mycro1 und nur geringfügig durch Mycro2 beeinflusst. Die Messung der durch *firefly* Luciferase oder *Renilla* Luciferase erzeugten Lumineszenz erfolgte ebenso vierundzwanzig Stunden nach Zugabe der Verbindungen. Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.

3.3.4 Mycro1 und Mycro2 inhibieren das verankerungsunabhängige Wachstum von Rat1a/c-Myc Zellen

c-Myc reguliert als Transkriptionsfaktor verschiedene zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose. Überexpression von c-Myc dereguliert diese Prozesse jedoch und führt zur malignen Transformation (Oster *et al.*,

2002). Rat1a-Zellen stellen ein gutes Zellsystem dar, um diesen Prozess zu untersuchen, da sie lediglich durch Überexpression von c-Myc transformiert werden können (Conzen *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 1997) und nicht die Aktivierung zweier Onkogene, wie z. B. *K-ras* und *c-myc* benötigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale stabile Zelllinien generiert, die entweder c-Myc oder v-Src überexprimieren. Dazu wurden wie in Material und Methoden 2.6.4 beschrieben Rat1a-Zellen mit virushaltigem Überstand von Phoenix E-Zellen infiziert, welche entweder pLXSN-Myc oder pLXSN-Src oder lediglich den Leervektor pLXSN als Kontrolle exprimierten. Die anschließende Selektion erfolgte für zwei Wochen mit G418. Die Expression von v-Src oder c-Myc in den entsprechenden Rat1a-Zellen konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.29). Die Detektion von v-Src in den Rat1a/v-Src Zellen erfolgte mittels eines Antiköpers gegen Src (anti-Src, sc-19, Santa Cruz, 2.1.5.2). Zum Nachweis von c-Myc in den Rat1a/c-Myc Zellen wurde der c-Myc Antikörper C-33 von Santa Cruz (2.1.5.2) verwendet. Die zur Kontrolle lediglich mit dem Leervektor pLXSN infizierten Zellen zeigten weder erhöhte Level an c-Myc noch an v-Src, was mit ihrer Unfähigkeit, in Weichagar Kolonien zu bilden, übereinstimmte.

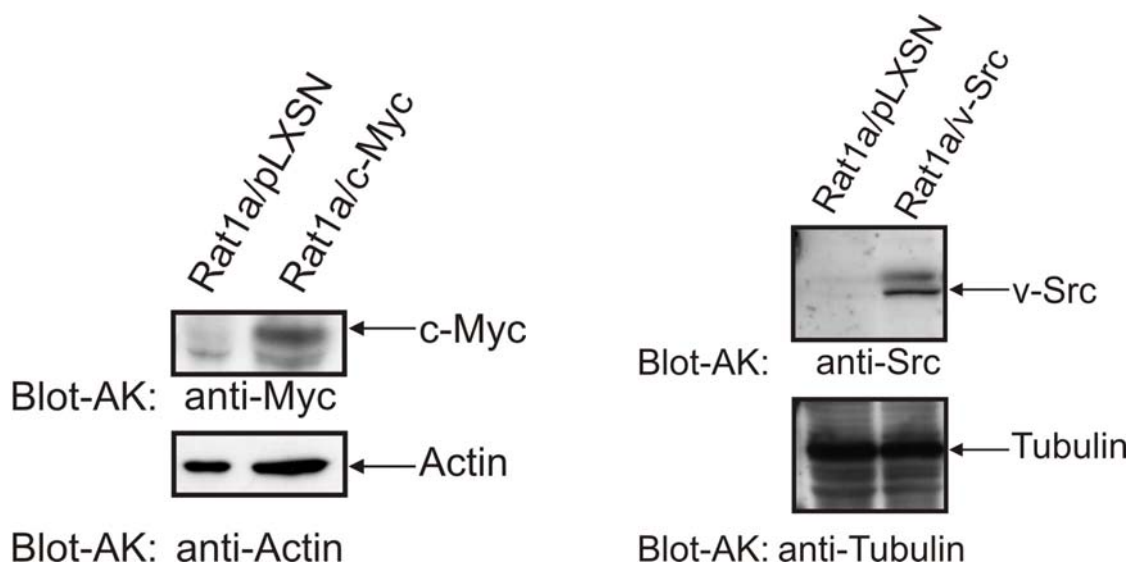


Abb. 3.29: Western Blot der stabilen c-Myc oder v-Src überexprimierenden Rat1a-Zellen

Rat1a Rattenfibroblastenzellen wurden mit viralen Überständen von Phoenix E Zellen, die entweder c-Myc oder v-Src überexprimierten, infiziert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Überstand von Phoenix E-Zellen infiziert, die nur mit Leervektor transfiziert worden waren. Die Selektion erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen mit 1 mg/ml G418. Western-Blot-Analysen mit einem c-Myc Antikörper (anti-Myc C-33, Santa Cruz) oder einen v-Src Antikörper (anti-Src sc-19, Santa Cruz) bestätigen die Expression der Proteine.

Mittels dieser Zelllinien konnte die inhibitorische Wirkung von Mycro1 und Mycro2 auf die c-Myc-induzierte Koloniebildung in Weichagar untersucht werden (2.6.4). Das verankerungsunabhängige Wachstum ist ein Merkmal transformierter Zellen, die anders als normale Zellen auch ohne Kontakt zum Wachstumssubstrat und zu anderen Zellen proliferieren können. Für die Experimente wurden, wie in Material und Methoden 2.6.4 beschrieben, die Zellen auf eine 0,6%ige Schicht aus Weichagar (*Bottom Agar*) in einer 0,3%igen Weichagarschicht (*Top Agar*) ausgesät. Dem *Top Agar* wurden zusätzlich die verschiedenen Verbindungen oder DMSO als Kontrolle zugegeben. Dieser Schritt wurde alle drei bis vier Tage wiederholt. Nach zwei Wochen konnten die Kolonien mit Iodonitrotetrazoliumchlorid angefärbt werden, und Kolonien größer 0,13 mm nach dem Einscannen der Wells unter Zuhilfenahme einer Maske in Corel Photo Paint ausgezählt werden. Wie in Abbildung 3.30A zu sehen, inhibierte Mycro1 die c-Myc-abhängige Koloniebildung bei 20 μM , während Mycro2 bereits ab einer Konzentration von 10 μM einen Effekt auf das verankerungsunabhängige Wachstum der Rat1a/c-Myc Zellen zeigte. Bei 20 μM Mycro2 zeigte sich eine besonders deutliche Verringerung der c-Myc-bedingten Koloniebildung (Abb. 3.30A und B). Rat1a/v-Src Zellen wurden, zur weiteren Kontrolle der Spezifität, ebenfalls mit Mycro1 und Mycro2 inkubiert. Ergebnisse von Bowman *et al.* belegen zwar, dass die v-Src-abhängige Transformation zum Teil von c-Myc abhängen soll, wie sie an Hand von Fokusbildungsassays in den c-Myc Knockout-Zellen HO15.19 zeigten (Bowman *et al.*, 2001). Sie postulieren in ihrer Arbeit ein Modell, bei dem die PDGF-Rezeptor Aktivierung zur Aktivierung von Src, daraus folgender STAT3-Aktivierung und schließlich Expression von *c-myc* führt. Jedoch liegen diese Daten im Widerspruch zu den von Sachsenmaier *et al.* (Sachsenmaier *et al.*, 1999) durchgeführten Experimenten, die zeigen, dass die Expression von c-Myc unabhängig von v-Src reguliert wird. Ihre Aussage basiert auf PDGF-Rezeptor-Studien mit mutierten intrazellulären Rezeptorbereichen, die eine verstärkte oder stark abgeschwächte Src-Aktivierung bewirken. Somit konnten sie zeigen, dass die *c-myc* Expression in den, die verschiedenen Mutanten exprimierenden NIH/3T3-Zellen unabhängig von der Src-Aktivierung erfolgte. Aus diesen beiden Arbeiten lässt sich folgern, dass eine unvollständige Inhibition der c-Myc-bedingten Transformation nur einen schwachen Effekt auf die v-Src-bedingte kontaktunabhängige Proliferation haben sollte. Dies wurde bereits für die von Berg *et al.* (Berg *et al.*, 2002), sowie auch für die von Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2006) identifizierten Inhibitoren beobachtet.

Tatsächlich wird die Koloniebildung von Rat1a/v-Src Zellen durch Mycro1 und Mycro2 ebenfalls nur schwach inhibiert (Abb. 3.30A und B).

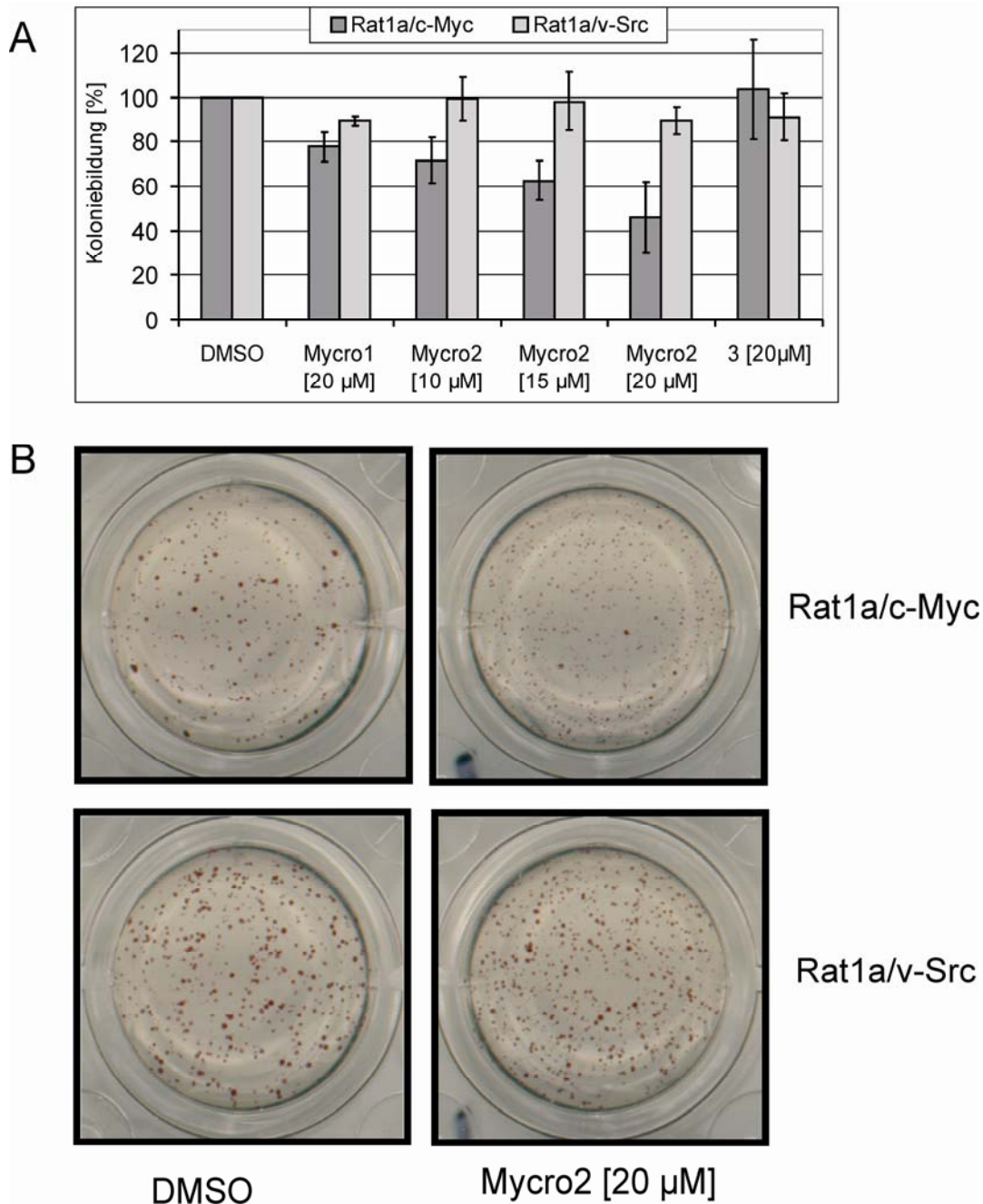


Abb. 3.30: Mycro1 und Mycro2 inhibieren die c-Myc-abhängige Transformation von Rat1a-Zellen
A) Die Koloniebildung von Rat1a/c-Myc Zellen in Weichagar konnte durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an Mycro1 oder Mycro2 inhibiert werden, während das Derivat **3** keinen Effekt zeigte. Die v-Src-abhängige Transformation der Zellen wurde lediglich schwach durch Mycro1 und Mycro2 inhibiert. Die Zellen wurden auf eine 0,7%igen Weichagarbodenschicht in 0,3%igem Weichagar ausgesät. Die entsprechenden Verbindungen oder DMSO wurden ebenfalls der oberen Weichagarschicht zugegeben. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen mit frischen Verbindungen in 0,3%igem Weichagar überschichtet. Nach zwei Wochen wurden die Kolonien mit Iodonitrotetrazoliumchlorid angefärbt, die Wells eingescannt und Kolonien größer als 0,13 mm unter Zuhilfenahme einer Maske in Corel Photo Paint ausgezählt. Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung.
B) Die eingescannten Wells zeigen exemplarisch die Reduktion des verankerungsunabhängigen Wachstums der Rat1a/c-Myc Zellen durch 20 µM Mycro2 und den wesentlich geringeren Effekt der Verbindung auf die Koloniebildung der Rat1a/v-Src Zellen.

Die entsprechenden Rat1a-Zellen, welche c-Jun oder das c-Myc Zielgen HMG-I/Y stabil überexprimieren (Wood *et al.*, 2000) bildeten im Zeitraum des Experimentes von vierzehn Tagen keine signifikante Anzahl an Kolonien, weswegen sie nicht als Kontrolle für die Spezifität der Verbindungen verwendet werden konnten.

Wie ebenfalls in Abbildung 3.30A zu sehen zeigte die Kontrollverbindung **3**, übereinstimmend mit der bereits beobachteten Inaktivität *in vitro*, keinen Effekt auf die c-Myc- oder v-Src-bedingte Transformation.

Dieser Assay konnte somit belegen, dass Mycro1 und Mycro2 selektiv die c-Myc-abhängige, kontaktunabhängige Proliferation inhibieren.

4. Diskussion

Der b-HLH-Zip Transkriptionsfaktor c-Myc ist essentiell an der Regulation einer Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse, wie Zellzyklusregulation, Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose und Transformation beteiligt. Um direkt, wie auch indirekt an die DNA binden und somit die Zielgenexpression steuern zu können muss c-Myc mit Max, einem weiteren Mitglied der b-HLH-Zip Familie, dimerisieren. Dieser Vorgang ist nicht nur für die Regulation der verschiedenen Prozesse in normalen Zellen unumgänglich, sondern er bestimmt auch die Funktionalität des Proteins in Krebszellen. Bei c-Myc handelt es sich um ein Onkoprotein, das in zahlreichen menschlichen Tumoren dereguliert vorliegt. Ein großes Augenmerk der wissenschaftlichen Forschung ist somit auf die Aufklärung der genauen Funktionen des Proteins, sowie auf Möglichkeiten der Inhibierung seiner Aktivität, gerichtet. Einen hervorragenden Ansatzpunkt zur Klärung dieser Fragestellungen bietet die c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung.

In dieser Arbeit wurden zwei, als Mycro1 und Mycro2 bezeichnete Substanzen identifiziert, welche die Dimerisierung zwischen c-Myc und Max, und damit auch die Bindung von c-Myc/Max an die DNA, inhibieren. Ihre Identifikation gelang mit einem, im Rahmen dieser Arbeit entwickelten *in vitro* Assay, der die schnelle und effiziente Analyse einer großen Anzahl chemischer Verbindungen im Hochdurchsatzverfahren erlaubte. Des Weiteren wurden Aktivität und Selektivität beider Verbindungen *in vitro* und mittels zellbasierter Assays gezeigt.

4.1 Fluoreszenzpolarisation als Methode der Hochdurchsatzanalyse

4.1.1 Kriterien bei der Etablierung des Assays

Die Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung wurden mittels eines Fluoreszenzpolarisationsassays identifiziert. Diese spektroskopische Methode basiert auf dem Rotationsverhalten einer, mit polarisiertem Licht angeregten Probe in Lösung (Rishi *et al.*, 2005). Dabei handelt es sich um ein, die c-Myc/Max DNA-Bindungssequenz (E-Box) enthaltendes fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid. Dieses

dreht sich, verglichen mit der Lebensdauer des Fluorophors, relativ schnell, wodurch es zu einer Abnahme der Polarität des emittierten Lichts kommt. Durch Bindung des c-Myc/Max Heterodimers an das entsprechende DNA-Bindungsmotiv, sowie durch die daraus resultierende T-förmige Anordnung (Rishi *et al.*, 2005) wird das Rotationsvermögen des c-Myc/Max DNA-Komplexes eingeschränkt, was sich in einer verstärkten Polarisierung des emittierten Lichts widerspiegelt. Mittels Fluoreszenzpolarisierung können somit Inhibitoren der Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max identifiziert werden.

Bei der Etablierung des Assays galt es verschiedene Punkte zu berücksichtigen. Zum einen erwies sich die Salzkonzentration als entscheidend für den Verlauf der Bindungskurve. Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration führte zu einer Erhöhung des K_D -Wertes von 2,8 nM (100 mM NaCl) auf 41,3 nM (200 mM NaCl) (Abb. 3.2). Die Salzkonzentration von 150 mM NaCl war deswegen aus zwei Gründen am besten für weitere Experimente geeignet: zum einen konnte so ein ausreichend großer Messbereich gewährleistet werden, ohne dass geringfügige Schwankungen der Proteinkonzentration starke Änderungen des FP-Wertes hervorrufen würden. Zum anderen entsprach diese Salzkonzentration am ehesten den physiologischen Salzbedingungen in der Zelle.

Keinen, bzw. nur einen sehr geringen Einfluss auf den Verlauf der Bindungskurve hatte eine Änderung der DNA-Konzentration von 2 nM auf 5 nM, sowie eine Änderung der DMSO-Konzentration von 0 % auf 15 % DMSO, wie in Abbildung 3.3 zu sehen. Die Hochdurchsatzanalyse konnte deswegen bei einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl, einer finalen DMSO-Konzentration von 10 % und unter Verwendungen von 3 nM DNA durchgeführt werden. Unter diesen Bedingungen war es möglich, durch Pipettierungenauigkeiten hervorgerufenen Schwankungen der Messwerte und somit die Fehlerrate zu minimieren. Die DMSO-Konzentration von 10 % DMSO gewährleistete eine gute Löslichkeit der Verbindungen.

Des Weiteren musste noch die Tatsache berücksichtigt werden, dass Max neben Heterodimeren mit c-Myc auch Homodimere bilden kann, die ebenso wie c-Myc/Max an die E-Box binden (Kretzner *et al.*, 1992). Die Max/Max Bindungskurve verlief jedoch unter den eben genannten Bedingungen flacher als die c-Myc/Max Bindungskurve, was sich in den unterschiedlichen K_D -Werten widerspiegelte (K_D -Werte: c-Myc/Max = 16,3 nM, Max/Max = 94,8 nM; Abb. 3.4). Somit konnte bei der, für den Screen gewählten Konzentration von 30 nM c-Myc/Max sichergestellt werden, dass der Anteil der Max/Max Homodimere nur geringfügig zum FP-Signal beitrug.

Dieser Assay eignete sich folglich zur Identifizierung von Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung.

Die Reversibilität des Assays wurde mittels eines Antikörpers überprüft, der spezifisch den Leuzin-Zipper Bereich von c-Myc erkennt (Abb. 3.5). In Anbetracht der Größe des Antikörpers hätten niedermolekulare c-Myc-Inhibitoren, wie in der Einleitung unter 1.4.7 beschrieben, eine bessere Kontrolle zur Überprüfung der Reversibilität des Assays dargestellt. Sie waren jedoch zum Zeitpunkt des Screens nicht verfügbar. Generell konnte mittels des Antikörpers aber gezeigt werden, dass der Assay für die Suche nach Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung geeignet ist.

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Verwendung eines Assays in der Hochdurchsatzanalyse ist der so genannte Z' -Wert (Zhang *et al.*, 1999). Bei dieser dimensionslosen Größe handelt es sich um ein Maß, das sowohl den Messbereich, wie auch die Standardabweichungen der einzelnen Messwerte ins Verhältnis zueinander setzt (2.7.2). Mit $0,65 \pm 0,07$ (Abb. 3.6) lag der Z' -Wert des FP-Assays innerhalb des Rahmens von 0,5 bis 1, der einen Assay als zur Hochdurchsatzanalyse geeignet beschreibt. Ein idealer Assay ohne jegliche Fehlerschwankungen hätte demnach einen Z' -Wert von 1. Eine Möglichkeit zur Verbesserung des Z' -Werts hätte eine Erhöhung der zugegebenen Antikörpermenge geboten. Die dadurch eventuell erzielte stärkere Inhibition der Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max hätte durch die daraus folgende Vergrößerung des Messbereiches auch zu einem größeren Z' -Wert geführt. Jedoch war die Menge an Antikörper der zugegeben werden konnte durch die Konzentration der Antikörperlösung auf 100 nM beschränkt, was lediglich zu einer knapp 60%igen Inhibition und dem daraus resultierenden Z' -Wert von 0,65 führte.

4.1.2 Vergleich der Fluoreszenzpolarisation als *in vitro* Screeningmethode mit anderen Ansätzen

Fluoreszenzpolarisation bietet generell insbesondere für die Hochdurchsatzanalyse entscheidende Vorteile. So erlaubt diese spektroskopische Methode eine Durchführung in homogener Lösung. Die Einstellung des Gleichgewichts erfolgt relativ schnell, was den Zeitbedarf für die Durchführung des Assays deutlich reduziert. Weiterhin kann auf die Verwendung von Radioaktivität verzichtet werden. Da lediglich geringe Volumina

für die Messung benötigt werden, konnte der Screen in 384-Loch-Platten durchgeführt werden, was nicht nur Material, sondern auch Zeit spart.

Speziell bietet der in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Fluoreszenzpolarisationsassay die Möglichkeit Verbindungen zu identifizieren, die sowohl die Protein-Protein-Wechselwirkung, wie auch die Protein-DNA-Interaktionen inhibieren. Somit unterscheidet er sich von anderen Ansätzen, wie z. B. *GST-Pulldowns*, die ein heterogenes System darstellen, das lediglich die Identifikation von Inhibitoren der Protein-Protein-Interaktion erlaubt. Aus gleichem Grund ist dieser Fluoreszenzpolarisationsassay auch dem klassischen FRET-Assay vorzuziehen. EMSAs, die eine Möglichkeit bieten Inhibitoren der Protein-DNA-Interaktionen zu identifizieren sind hingegen wesentlich arbeitsintensiver und aus diesem Grund nicht für Hochdurchsatzanalysen geeignet.

Fluoreszenzpolarisation ist jedoch anfällig bezüglich Interferenzerscheinungen durch stark fluoreszierende Verbindungen (Wu *et al.*, 1997). Um dadurch hervorgerufene falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde im Anschluss an den Screen der Fluoreszenzfarbstoff gewechselt. An Stelle von Fluorescein wurde das die E-Box-enthaltende Oligonukleotid mit Texas Red markiert. Dadurch kam es zu einem Wechsel des Anregungs- und Emissionsbereichs von 490 nm/515 nm (Fluorescein) auf 590 nm/635 nm (Texas Red). Aber auch andere Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der DNA sind denkbar, eine Möglichkeit die z. B. FRET-Assays nicht bieten können, da hier ein einfacher Wechsel der Fluorophore nicht so leicht funktioniert. Verbindungen, die in einem der beiden Wellenlängenbereiche Eigenfluoreszenz zeigten, und somit ein möglicherweise falsch positives Ergebnis erzielten, konnten auf Grund des Wechsels des Fluoreszenzfarbstoffes rechtzeitig erkannt und im weiteren Verlauf mit Vorsicht behandelt werden.

In vitro Screens sind nach wie vor als schnelle und billige Methode insbesondere für die Analyse großer, diverser Bibliotheken geeignet. Zwar erlaubten die Ergebnisse des *in vitro* Screens keine Aussage über die Aktivität der Verbindungen in Zellen, jedoch konnte mittels der Lipinski *Rule of Five* (Lipinski *et al.*, 2001) bereits eine Vorauswahl betreffend der Zellpermeabilität der organischen Moleküle getroffen werden. Diese Kriterien ermöglichten die Zusammenstellung einer sehr diversen Bibliothek niedermolekularer Verbindungen, was insbesondere auf Grund unbekannter Bindungsstellen für kleine Moleküle innerhalb der c-Myc/Max Dimerisierungsfläche von großer Bedeutung für die Effizienz des HTS war.

Im Vergleich zu zellbasierten Screens war der *in vitro* FP-Assay insbesondere bezüglich seines spezifischen c-Myc-abhängigen *Readouts* von Vorteil. Die Tatsache, dass c-Myc als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl von Genen innerhalb der Zelle steuert erschwert die Entwicklung eines einfachen und schnellen c-Myc-spezifischen Assays für zelluläre Screens.

In silico Screening Ansätze für c-Myc-Inhibitoren waren auf Grund fehlender Informationen über mögliche Bindungstaschen in der vorwiegend flachen Interaktionsfläche von c-Myc/Max nicht möglich.

Einen alternativen Ansatz zur Identifizierung von Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung in der Hochdurchsatzanalyse könnte die *SAR-by-NMR*-Methode (*structure-activity relationship by nuclear magnetic resonance*) darstellen. Basierend auf einzelnen Fragmenten geringer Aktivität ermöglicht sie eine Optimierung des Inhibitors durch Verknüpfung verschiedener Fragmente. Von Vorteil hierbei ist die hohe Sensitivität der NMR-basierten Screeningmethoden, die selbst die Detektion schwacher Affinitäten im millimolaren Bereich erlaubt (Carr *et al.*, 2005; Coles *et al.*, 2003). Dies wurde unter anderem eindrucksvoll von Hajduk *et al.* für die Matrix-Metalloproteinase Stromelysin (MMP3) gezeigt, in dem die Autoren zwei Inhibitoren mit geringen Aktivitäten von 17 mM und 280 μ M zu einem, im unteren nanomolaren Bereich aktiven Inhibitor, verknüpften (P. J. Hajduk, 1997).

4.1.3 Ergebnis der Hochdurchsatzanalyse

Bei der Auswertung der Hochdurchsatzanalyse galt es bezüglich möglicher falsch positiver Ergebnisse Vorsicht walten zu lassen. So wurde der Screen im Duplikat durchgeführt und nur Verbindungen weiterhin untersucht, die auch in beiden Durchgängen ein vergleichbares Ergebnis zeigten. Mit 100 μ M Verbindung wurde eine relativ hohe Konzentration für den Screen gewählt, die sicherstellen sollte, dass keine potentiellen Kandidaten übersehen werden konnten. Für die ausreichende Löslichkeit der Verbindungen wurde der Screen bei einer finalen DMSO-Konzentration von 10 % durchgeführt.

Als weiteres Ausschlusskriterium konnten die Ergebnisse eines Screens verwendet werden, in dem die gleichen Bibliotheken nach Inhibitoren des Transkriptionsfaktors STAT3 untersucht wurden. STAT3 besitzt eine SH2-Domäne, die phosphorylierte

Tyrosinreste binden kann. Darauf basierend wurde mittels eines Fluoreszenzpolarisationsassays nach Inhibitoren der STAT3-Phosphopeptidbindung gesucht, wobei das Phosphopeptid Fluorescein-markiert war (Schust & Berg, 2004). Von den 291 Verbindungen die mindestens 70 % Inhibition der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung in beiden Durchgängen zeigten, erreichten 157 auch eine mindestens 30%ige Inhibition von STAT3 (Abb. 3.7). Diese Unspezifität kann jedoch auch auf Fluoreszenzartefakte zurück zu führen sein.

Von den verbleibenden potentiellen 134 c-Myc-Inhibitoren zeigten 33 entweder eine stark erhöhte oder stark erniedrigte Totalintensität, weswegen sie ebenfalls für weitere Analysen ausschieden.

Die restlichen 101 Verbindungen wurden in einem ersten Schritt per Hand im Fluoreszenzpolarisationsassay verifiziert. Gleichzeitig wurde ihr Effekt auf die Max/Max Homodimerisierung und DNA-Bindung in einem vergleichbaren FP-Assay untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass von den 60 verbleibenden Verbindungen von ChemDiv (Abb. 3.8) und den 41 verbleibenden Verbindungen von Maybridge (Abb. 3.9) nur neun Verbindungen für weitere Experimente übrig blieben. Für 47 Verbindungen ließen sich die Aktivitäten des Screens nicht mehr reproduzieren. Das könnte zum einen an Transferfehlern des *Pin Tools* liegen. Aber auch Fehler bei der Übertragung der Proteinlösung sind denkbar und können falsch positive Ergebnisse mit sich bringen.

Der Effekt der Verbindungen auf Max/Max Homodimerisierung und DNA-Bindung wurde untersucht, da es sich bei den Inhibitoren auch um Interkalatoren der DNA handeln könnte. Da sowohl c-Myc/Max Heterodimere, wie auch Max/Max Homodimere an das gleiche Sequenzmotiv binden, bestand bei gleicher Inhibition beider Dimere das Risiko, einen DNA-Interkalator mittels des Screens identifiziert zu haben. Jedoch war auch zu erwarten, dass Verbindungen, die ihren inhibitorischen Effekt durch Interaktion mit Max erzielten, nicht zwischen c-Myc/Max oder Max/Max Dimeren unterscheiden würden. Da weder DNA-Interkalatoren, noch Inhibitoren, die keine Spezifität bezüglich c-Myc/Max DNA-Bindung ausübten, von weiterem Interesse waren, wurden diese Verbindungen aussortiert.

Lediglich sechs der neun verbleibenden Verbindungen konnten in einem c-Myc-abhängigen Luciferaseassay bezüglich ihrer Aktivität in Zellen untersucht werden. Die anderen drei Verbindungen CDI8192, MB510 und MB5597 waren in Zellen toxisch. Nur die Verbindung CDI5290 zeigte eine Inhibition der c-Myc-abhängigen

Luciferaseaktivität bei 10 μ M und erwies sich deswegen als einzige für weitere Analysen geeignet. Sie wurde im Folgenden als Mycro1 bezeichnet. Abbildung 4.1 fasst die einzelnen Schritte des Screens und der darauf folgenden Verifizierung der Ergebnisse zusammen.

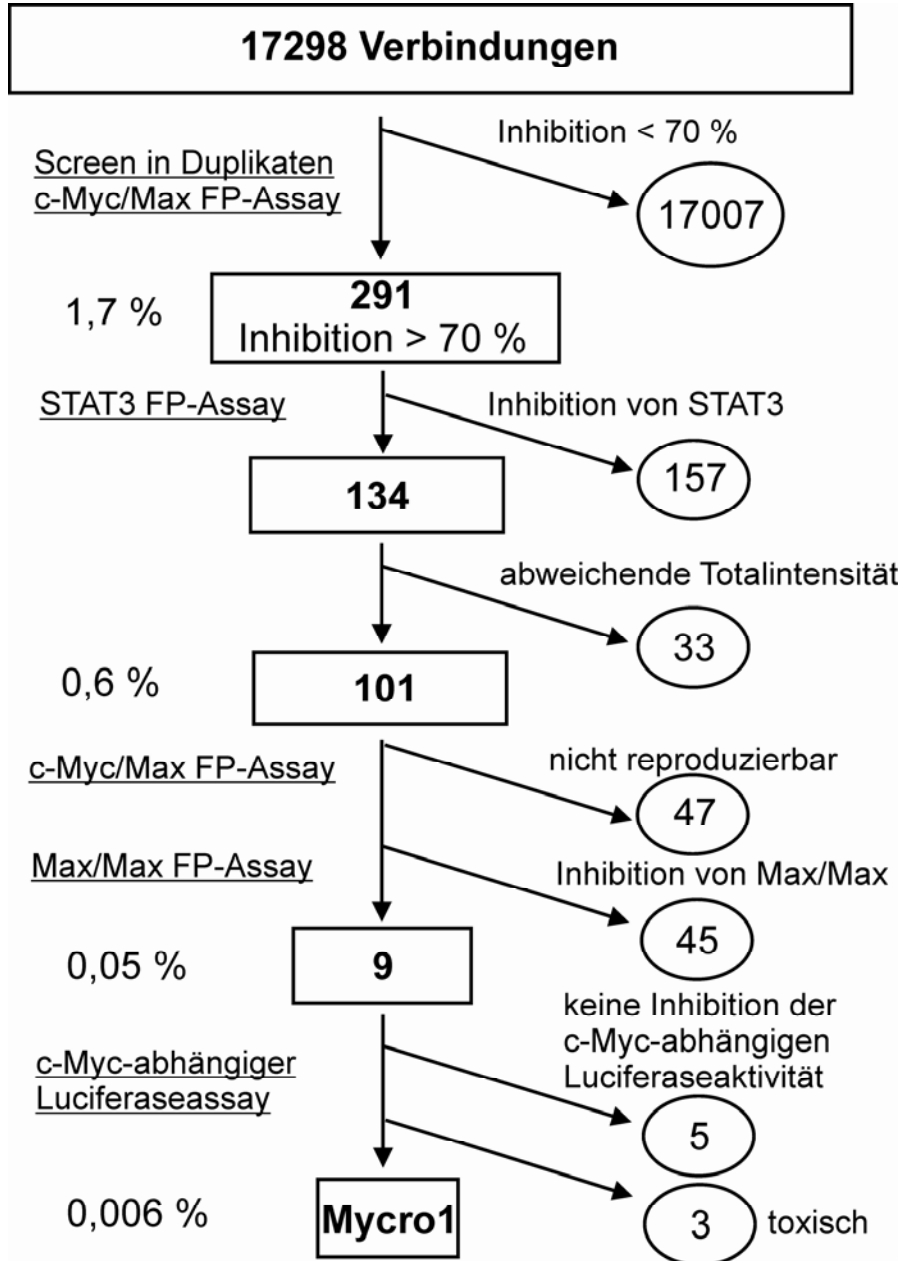


Abb. 4.1: Zusammenfassung der Hochdurchsatzanalyse für c-Myc/Max DNA-Inhibitoren

17298 Verbindungen zweier strukturell divers gestalteter Bibliotheken wurden in Duplikaten in einem FP-Assay auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die c-Myc/Max DNA-Bindung zu inhibieren. 291 Verbindungen zeigten mehr als 70 % Inhibition in beiden Durchgängen. Davon inhibierten 157 auch die STAT3-Phosphopeptidbindung, während 33 Verbindungen abweichende Totalintensitäten zeigten. Von den verbleibenden 101 zeigten nur 9 eine bevorzugte Spezifität für c-Myc/Max DNA-Bindungen, 45 interferierten auch mit der DNA-Bindung und Homodimerisierung von Max/Max und für 47 konnte das Ergebnis des Screens nicht reproduziert werden. Lediglich die als Mycro1 bezeichnete Verbindung behielt ihre Aktivität auch in einem c-Myc-abhängigen Luciferaseassay bei.

Die Hit-Rate betrug somit nur 0,006 %, was relativ niedrig erscheinen mag, jedoch in Anbetracht der Größe der Interaktionsfläche von 3206 Å² der beiden Proteine (Nair & Burley, 2003), der Abwesenheit offensichtlicher Bindungstaschen, sowie der strukturell divers gestalteten Bibliotheken ein realistisches Ergebnis darstellt.

Aus einer Reihe von Derivaten von Mycro1 konnte ein strukturell sehr ähnliches Derivat, im Folgenden als Mycro2 (Abb. 3.11) bezeichnet, identifiziert werden, das vergleichbare Aktivität bezüglich c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung zeigt. Eine ebenfalls strukturell sehr ähnliche, aber inaktive Verbindung **3** (Abb. 3.11) wurde in den weiteren Experimenten als Negativkontrolle verwendet.

4.2 Charakterisierung von Mycro1 und Mycro2

4.2.1 Aktivität der Inhibitoren *in vitro*

Mycro1 und Mycro2 zeigten mit IC₅₀-Werten von 30 ± 5 µM, bzw. 23 ± 4 µM nahezu gleiche Aktivitäten im Fluoreszenzpolarisationsassay. Das Derivat **3** hatte keinen Effekt auf die Dimerisierung und DNA-Bindung der Proteine (siehe Abb. 3.12).

Um ausschließen zu können, dass es sich bei der beobachteten Inhibition im FP-Assay um fluoreszenzbedingte Artefakte handelte, wurden die Verbindungen in einem fluoreszenzunabhängigen Experiment auf ihre Aktivität bezüglich der c-Myc/Max DNA-Bindung untersucht. Dazu geeignet war der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA). Wie in Abbildung 3.18A zu sehen, zeigten beide Verbindungen bereits ab 12 µM Inhibition der c-Myc/Max-abhängigen DNA-Bindung. Mycro1 erwies sich zwar als geringfügig besser als Mycro2 in diesem Experiment, jedoch lassen sich Unterschiede wie diese durch verschiedene experimentelle Rahmenbedingungen, wie z. B. die Salzkonzentration oder die Proteinkonzentration erklären.

Um eine Aussage treffen zu können, ob es sich bei Mycro1 und Mycro2 um Inhibitoren der Dimerisierung oder DNA-Bindung handelte, wurde ihre Aktivität in einem GST-*Pulldown* analysiert, da dieses Experiment ausschließlich auf der Dimerisierung der beiden Proteine basiert. Beide Verbindungen inhibierten die Interaktion von c-Myc und Max mit einem IC₅₀-Wert von ca. 10 µM (siehe Abb. 3.21A). Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Mycro1 und Mycro2 um Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung handelte. Zwar wäre auch eine zusätzliche Inhibition der Protein-DNA-Interaktion denkbar, jedoch müsste diese sequenzspezifisch erfolgen, was

unwahrscheinlich ist, berücksichtigt man, dass die Inhibition der Bindung von Max/Max an die gleiche DNA-Sequenz schwächer ist als die Inhibition der c-Myc/Max DNA-Bindung (Abb. 3.15).

Die DNA-Bindung von c-Myc/Max bringt eine bis zu einem Faktor von 10^9 erhöhte Stabilisierung des Heterodimeren Komplexes mit sich (Fieber *et al.*, 2001). Von daher ist es entscheidend, das gezeigt werden konnte, das Mycro1 und Mycro2 nicht nur mit der Dimerisierung der beiden Proteine interferieren, sondern auch die DNA-Bindung des Komplexes verhindern können. Jedoch hätte man aus genau diesem Grund auch einen größeren Aktivitätsunterschied der Verbindungen im GST-Pulldown und EMSA erwarten können. Die Tatsache, dass die Dimerisierung lediglich um einen Faktor drei stärker inhibiert wurde als die DNA-Bindung, lässt sich an Hand eines Modells erklären, bei dem die Konformation monomeren c-Myc's durch Bindung der Verbindung in einer Weise geändert wird, die seine Bindung an Max verhindert. Dementsprechend könnte auch die DNA-Bindung keine weitere Stabilisierung bringen. Unwahrscheinlich ist, dass die Bindung der Inhibitoren Proteinaggregation und Präzipitation verursachte, da davon auch andere Proteine wie z. B. Lck oder STAT3 betroffen sein müssten. Jedoch wurden diese Proteine nicht durch Mycro1 oder Mycro2 inhibiert (Abb. 3.16).

4.2.2 Aktivität der Verbindungen in zellbasierten Assays

Weiterhin wurde die Aktivität von Mycro1 und Mycro2 in zellbasierten Assays untersucht. So konnte nicht nur festgestellt werden, inwiefern die Verbindungen die c-Myc-abhängigen Funktionen innerhalb einer Zelle beeinflussen, sondern es konnte auch eine Aussage über Zellgängigkeit und Toxizität getroffen werden.

In einem ersten Schritt wurde sichergestellt, dass keine Verbindung einen toxischen Effekt auf Zellen hatte. Die hierzu verwendeten adhärennten Zelllinien HEK 293T und NIH/3T3 zeigten keine erhöhte Zahl abgelöster, im Medium schwimmender Zellen bei den in den weiteren Experimenten verwendeten Konzentrationen. Damit war die Grundvoraussetzung für weitere zelluläre Studien erfüllt.

Da c-Myc einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation hat, war es nahe liegend, den Effekt der Verbindungen auf c-Myc-abhängige Zelllinien zu untersuchen (Grandori *et al.*, 2000). Hierzu wurden die Krebszelllinien U-2OS, MCF-7 und Raji, sowie die Nicht-Krebszelllinie NIH/3T3 verwendet. In allen Fällen konnte eine Reduktion der

Proliferationsrate bei 10 μM und 20 μM Mycro1 oder Mycro2 beobachtet werden (Abb. 3.22, 3.23A).

Da c-Myc seinen Einfluss auf die Proliferation unter anderem durch die Regulation des S-Phase Eintritts steuert, wurde konkret auch noch der Einfluss von Mycro1 und Mycro2 auf diesen Teil des Zellzyklus untersucht. Mittels BrdU-Einbau konnte verfolgt werden, dass beide Verbindungen bei 10 μM einen verspäteten Eintritt in die S-Phase bewirkten (Abb. 3.23B), was gut mit den Ergebnissen der Proliferation übereinstimmte. Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt, wobei er jedoch in der Regel nur für eine schwache, meist nicht mal 3-fache Expression dieser Gene sorgt (Patel *et al.*, 2004). Diese Tatsache erschwert die Analyse einer durch Mycro1 oder Mycro2 hervorgerufenen Änderung der Expressionsstärke, wie sie klassischer Weise in Form von *Northern Blots* oder RT-PCR erfolgt. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit die c-Myc-gesteuerte Luciferaseaktivität untersucht, da hiermit eine stabile 3-fache Induktion erzielt werden konnte (Abb. 3.25). Beide Verbindungen reduzierten bei 10 μM die c-Myc-abhängige Reporterogenaktivität um 50 bzw. 80 % (Abb. 3.22). Die Kontrollverbindung **3** hatte keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität des Transkriptionsfaktors, was in Einklang liegt mit den zuvor diskutierten *in vitro*-Daten.

Des Weiteren kann c-Myc Zellen onkogen transformieren (Oster *et al.*, 2002). Dieser Effekt des Proteins lässt sich hervorragend in stabil c-Myc überexprimierenden Rat1a-Zellen untersuchen. In diesem System ist bereits die Aktivität eines Onkogens ausreichend für die Transformation (Conzen *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 1997), ein Prozess, der an Hand des verankerungsunabhängigen Wachstums der Zellen beobachtet werden kann. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde deswegen die Koloniebildung der Zellen in Weichagar, sowie der inhibitorische Effekt der Verbindungen auf diesen Vorgang, untersucht. Beide Verbindungen verringerten die Anzahl der Kolonien mit einem Durchmesser größer als 0,13 mm, während die Kontrollverbindung auch in diesem Experiment keinen Effekt zeigte (Abb. 3.30). Mycro2 bewirkte bei 20 μM sogar eine 50%ige Reduktion der Anzahl an großen Kolonien. Die Unterschiede der Aktivitäten der einzelnen Verbindungen in den verschiedenen Experimenten liegen in den unterschiedlichen Rahmenbedingungen der Assays begründet. Die geringfügig verringerte Aktivität im *Soft Agar Assay* hängt möglicherweise mit einer schlechteren Diffusionsfähigkeit der Verbindungen, bedingt durch die Konsistenz des Agars,

zusammen, was zu einer verringerten effektiven Konzentration an Verbindung in der Zelle führen könnte.

Die gute Korrelation zwischen *in vitro*- und zellulären Aktivitäten der Substanzen Mycro1, Mycro2, wie auch der Kontrollverbindung **3** deutet darauf hin, dass die zellulären Effekte tatsächlich durch Inhibition von c-Myc verursacht werden.

4.2.3 Spezifität der Verbindungen

Generell von großer Bedeutung für die Verwendung niedermolekularer Inhibitoren ist ihre Spezifität bezüglich des gewählten Zielproteins. Untersuchungen hierzu sind, auf Grund der Vielzahl der verschiedenen Bestandteile einer Zelle, natürlich immer nur bedingt möglich. Diese Komplexität erschwert die spezifische Untersuchung der Funktionalität eines Inhibitors, weswegen in der Regel Spezifitätsanalysen *in vitro* vorgezogen werden.

Aus diesem Grund erfolgten auch die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zur Spezifität von Mycro1 und Mycro2 in erster Linie mittels *in vitro* Experimenten, bevor zu zellulären Analysen übergegangen wurde. Bei der Wahl der Proteine wurden sowohl strukturell sehr ähnliche, wie auch sich von c-Myc/Max stark unterscheidende Proteine gewählt.

Als erstes wurde der Effekt der Verbindungen auf andere Proteine in weiteren Fluoreszenzpolarisationsassays untersucht. Bei den hierfür verwendeten Proteinen Jun und C/EBP α handelt es sich um Mitglieder der basischen Leuzin-Zipper Familie, die aus diesem Grund eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu c-Myc und Max besitzen. Beide Verbindungen zeigten lediglich eine geringe Aktivität bezüglich der Homodimerisierung und DNA-Bindung dieser Proteine (Abb. 3.15). Als wesentlich strengere Spezifitätskontrolle wurde der Effekt auf Max untersucht, das mit 59 % sehr ähnlich zu c-Myc ist. Mycro1 und Mycro2 zeigten mit IC₅₀-Werten von $72 \pm 13 \mu\text{M}$ (Mycro1) und $54 \pm 9 \mu\text{M}$ (Mycro2) einen schwächeren Effekt auf Max/Max Homodimerisierung und DNA-Bindung (Abb. 3.15), als auf die Bindung von c-Myc/Max an DNA (IC₅₀-Werte: Mycro1: $30 \pm 5 \mu\text{M}$, Mycro2: $23 \pm 4 \mu\text{M}$).

Als strukturell unterschiedliche Proteine wurden die Kinase Lck und der Transkriptionsfaktor STAT3 verwendet. In Fluoreszenzpolarisationsassays, die die Phosphopeptidbindung an die entsprechende SH2-Domäne des Proteins analysieren, konnte festgestellt werden, dass die Verbindungen keinen Effekt auf diese Interaktion

hatten (Abb. 3.16). Damit kann für Mycro1 und Mycro2 eine selektive Aktivität bezüglich des b-Zip Motivs postuliert werden. Einen genauen Nachweis darüber könnten Strukturanalysen liefern, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Die Spezifität bezüglich Jun konnte des Weiteren in einem *Gelshift*-Experiment belegt werden. Mycro1 und Mycro2 zeigten lediglich bei 50 μM eine minimale Inhibition der Jun/Fos DNA-Bindung (Abb. 3.18B). Eine Analyse der Jun/Jun DNA-Bindung, wie sie bereits im Fluoreszenzpolarisationsassay erfolgte, war in diesem Experiment nicht möglich, da die entsprechenden *Gelshift*-Analysen auf Grund der schwächeren DNA-Bindung des Homodimers eine wesentlich höhere Proteinkonzentration erfordert hätten. Somit wäre ein sinnvoller Vergleich mit der mittels EMSA untersuchten Inhibition der c-Myc/Max DNA-Bindung nicht möglich gewesen. Eine genaue Korrelation der Aktivitäten der Verbindungen im EMSA und im FP-Assay kann somit nicht erwartet werden.

Auch auf zellulärer Ebene wurde die Spezifität bezüglich des b-Zip Proteins Jun nachgewiesen. Dazu wurde in einem Luciferaseassay die AP-1-abhängige Reporterogenaktivität untersucht. Bei AP-1 handelt es sich um einen Sammelbegriff für die Mitglieder der Jun, Fos, ATF und Maf Protein-Unterfamilien, die in Zellen vor allem durch die Proteine Jun und Fos vertreten werden (Vogt, 2002). Mycro1 und Mycro2 inhibierten zwar bei einer Konzentration von 10 μM die AP-1-abhängige Luciferaseaktivität zu 30 – 40 % (Abb. 3.28A), jedoch zeigte insbesondere Mycro2 gute Spezifität bezüglich c-Myc-abhängiger Reporterogenaktivität. Die Ursache für den lediglich sehr geringen Aktivitätsunterschied von Mycro1 in beiden Systemen liegt möglicherweise an der Inhibition der, neben Jun/Fos und Jun/Jun noch zur Luciferaseaktivität beitragenden anderen Proteinen der AP-1-Familie.

Zusätzlich wurde ein weiterer Luciferaseassay für den dimeren Transkriptionsfaktor SRF zur Analyse der Spezifität verwendet. DNA-Bindung und Dimerisierung dieses Komplexes werden über eine zentrale Domäne von ca. 90 Aminosäuren gesteuert. Dabei erfolgt die DNA-Bindung des Dimers primär durch zwei antiparallele amphipatische α -Helizes, während es sich bei dem zentralen Element der Dimerisierung um ein viersträngiges, anti-paralleles β -sheet Bündel handelt (Pellegrini *et al.*, 1995). Der SRF-DNA Komplex weist somit wesentlich geringere strukturelle Ähnlichkeit zu den Mitgliedern der b-HLH-Zip oder b-Zip Familien auf. Dazu passend

konnte auch keine oder nur eine geringe Aktivität der Verbindungen auf die SRF-abhängige Luciferaseaktivität beobachtet werden (Abb. 3.28B).

Auch der Weichagarassay erlaubte eine zelluläre Analyse der Spezifität. Neben c-Myc ist auch v-Src in der Lage, wenn überexprimiert, in Rat1a-Zellen verankerungsunabhängiges Wachstum zu bewirken. Mycro1 und Mycro2 zeigten einen sehr geringen Effekt auf die Transformationseffizienz der Rat1a/v-Src Zellen (Abb. 3.30). Die v-Src-vermittelte Transformation sollte c-Myc-abhängig, wie auch c-Myc-unabhängig erfolgen. Dass belegen die Untersuchungen von Bowman *et al.*, die eine c-Myc-abhängige Transformation durch v-Src beschrieben (Bowman *et al.*, 2001), wie auch die Ergebnisse von Sachsenmaier *et al.*, deren Studien die c-Myc-unabhängige v-Src Signaltransduktion nachweisen konnten (Sachsenmaier *et al.*, 1999). Dazu passend wurde auch nur ein geringer Effekt von Mycro1 und Mycro2 auf das Wachstum der Rat1a/v-Src Zellen in Weichagar beobachtet, wie er auf Grund der unvollständigen Inhibition der c-Myc-vermittelten Transformation durch diese Verbindungen auch nicht stärker erwartet werden konnte. Vergleichbare Ergebnisse zeigten ebenso die von Berg *et al.* (Berg *et al.*, 2002), sowie die von Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2006) identifizierten Inhibitoren.

Die aussagekräftigste zelluläre Spezifitätsanalyse ermöglichte jedoch die c-Myc-unabhängigen Krebszelllinie PC-12. Bei diesen Zellen kann Max auf Grund einer homozygoten Mutation nicht mit c-Myc dimerisieren (Hopewell & Ziff, 1995), weswegen die Proliferation in einer c-Myc/Max-unabhängigen Weise erfolgen muss. Mycro1 und Mycro2 zeigten weder bei 10 μ M noch bei 20 μ M einen Effekt auf die Proliferation. Daraus lies sich schließen, dass beide Verbindungen ihre Aktivität in c-Myc/Max-abhängiger Weise ausführen. Die als weitere Kontrolle für die Spezifität verwendbare Zelllinie HO15.19, die auf Grund eines somatischen *knock-outs* kein c-Myc mehr exprimiert, wurde wegen des im Vergleich zu den anderen Zelllinien sehr stark verlangsamten Wachstums nicht zu Proliferationsstudien herangezogen (Mateyak *et al.*, 1997).

4.3 Mycro1 und Mycro2 im Kontext zu anderen c-Myc-Inhibitoren

Zu Beginn dieser Arbeit waren außer den von Berg *et al.* (Berg *et al.*, 2002) identifizierten niedermolekularen Substanzen IIA6B17 und IIA4B20 keine c-Myc-Inhibitoren bekannt. In den letzten Jahren haben sich jedoch verschiedene Arbeitsgruppen intensiv mit der Identifizierung weiterer c-Myc-Inhibitoren beschäftigt, was das Interesse der Wissenschaft an niedermolekularen Modulatoren für Protein-Protein-Interaktionen verdeutlicht. Meistens wurden diese mittels *in vitro* Screens ermittelt.

Lediglich Mo und Henriksson wendeten einen zellbasierten Assay zur Identifizierung an (Mo & Henriksson, 2006). Die von ihnen gefundenen Verbindungen MYRA-A und MYRA-B zeigten eine stärkere Reduktion der Lebensfähigkeit von Zellen, die c-Myc überexprimieren, als von Zellen mit normalen c-Myc Expressionsraten. Damit einhergehend konnten die Autoren auch eine verstärkte Apoptoserate in c-Myc-abhängigen Zellen beobachten. Jedoch konnte nur für MYRA-A eine Inhibition der c-Myc/Max DNA-Bindung, sowie der c-Myc-abhängigen Reporterogenaktivität erzielt werden. Weiterhin inhibierte MYRA-A auch die DNA-Bindung von Mnt/Max und Max/Max in EMSAs. Immunoprecipitationsstudien belegten jedoch, dass MYRA-A seine Wirkung nicht durch Inhibition der Dimerisierung von c-Myc und Max erzielte, weswegen noch zu klären bleibt, ob der Effekt von MYRA-A durch direkte oder indirekte Interferenz mit der DNA-Bindung E-Box-bindender Transkriptionsfaktoren erfolgt. Dieses Beispiel verdeutlicht die Problematik eines zellulären Screens, der auf Grund der Komplexität des Systems nicht ausschließen kann, dass die Inhibition anderer Bestandteile der Zelle für den beobachteten Effekt verantwortlich ist.

Bei weiteren identifizierten c-Myc-Inhibitoren handelt es sich um ungesättigte und gesättigte Fettsäuren. Die Wirkung ungesättigter Fettsäuren auf verschiedene zelluläre Prozesse, wie Apoptose, Genregulation oder Tumorentwicklung ist seit einigen Jahren bekannt (Arita *et al.*, 2001; Hughes-Fulford *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 1995; Sessler & Ntambi, 1998). Chung *et al.* zeigten zusätzlich, dass insbesondere Ölsäure und konjugierte Linolsäure die DNA-Bindung von c-Myc/Max unterbinden. Konjugierte Linolsäure reduzierte weiterhin auch die c-Myc-induzierte Zielgenexpression (Chung *et al.*, 2002). Jedoch präsentierten die Autoren keine Daten bezüglich der Spezifität dieser

Fettsäuren, die auf Grund der Vielfältigkeit ihrer bekannten Funktionen auch nur schwer vorstellbar ist.

Gleiches gilt für die gesättigten Fettsäuren Stearinsäure und Myristinsäure. Es konnte gezeigt werden, dass beide Verbindungen die c-Myc/Max DNA-Bindung inhibierten. Daten zur Spezifität wurden jedoch nicht präsentiert (Jung *et al.*, 2006). Hinzu kam, dass die im EMSA mit einem IC_{50} von 2,2 μ M als viel versprechend charakterisierte Stearinsäure keinen Effekt auf die Proliferation der Zelllinie HL-60 mehr zeigte. Generell lässt sich festhalten, dass Fettsäuren einen Effekt auf verschiedene zelluläre Prozesse, und somit auch auf c-Myc haben, dass sie jedoch als spezifische c-Myc-Inhibitoren keine Verwendung finden können.

Xu *et al.* durchsuchten eine kombinatorische Bibliothek aus 285 Molekülen nach potentiellen c-Myc-Inhibitoren (Xu *et al.*, 2006). Die planaren, hydrophoben Verbindungen sollten dazu wie Kreditkarten in die flache, keine bekannten Bindungstaschen enthaltende c-Myc/Max Interaktionsfläche passen. Zwar konnten die Autoren mit diesem Ansatz vier Verbindungen identifizieren, die in *Gelshift*-Experimenten mit der DNA-Bindung des Heterodimers interferierten, jedoch inhibierten nur noch zwei davon signifikant die c-Myc-induzierte Transformation von embryonalen Hühnerfibroblasten. Keine der beiden Verbindungen zeigte Spezifität bezüglich Jun-abhängiger Reporterogenaktivität. Bibliotheken wie diese ermöglichen folglich eine schnelle, gezielte Suche nach Inhibitoren, jedoch birgt dieser Ansatz den Nachteil, dass auf Grund der geringen Größe und der damit einhergehenden fehlenden Diversität der Bibliothek der Screen möglicherweise ergebnislos bleiben könnte. Weiterhin besteht auf Grund der planaren und hydrophoben Gestaltung dieser Verbindungen das erhöhte Risiko, unspezifische Inhibitoren verschiedener Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren, da viele dieser Wechselwirkungen durch flache Grenzflächen vermittelt werden.

Bei der von Berg *et al.* in einem *in vitro* Screen identifizierten Verbindung IIA6B17 handelte es sich um einen Inhibitor der Dimerisierung, wie auch der DNA-Bindung der beiden Proteine c-Myc/Max. Jedoch zeigte auch diese nicht-peptidische Verbindung keine Spezifität bezüglich der Jun-induzierten Transformation von embryonalen Hühnerfibroblasten (Berg *et al.*, 2002).

Die vier strukturell voneinander unabhängigen Verbindungen 10058-F4, 10009-G9, 10050-C10, 10074-A4 reduzierten die c-Myc-abhängige Proliferationsrate, sowie das c-Myc-regulierte Tumorwachstum in Nacktmäusen (Yin *et al.*, 2003). Zwar konnten diese

Verbindungen als Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung identifiziert werden, jedoch zeigten die Autoren keinen *in vitro* Beweis für die Inhibition der DNA-Bindung des Heterodimers.

Mycro1 und Mycro2 stellen somit die ersten niedermolekularen c-Myc/Max Dimerisierungsinhibitoren dar, für die *in vitro* gezeigt werden konnte, dass sie mit guter Spezifität bezüglich anderer dimerer Transkriptionsfaktoren die DNA-Bindung von c-Myc/Max inhibieren. Spezifitätsanalysen wurden dazu insbesondere für Mitglieder der strukturell sehr ähnlichen Familie der b-Zip-Proteine durchgeführt. Aber es konnte *in vitro* auch eine bevorzugte Inhibition der c-Myc/Max DNA-Bindung verglichen mit Homodimerisierung und DNA-Bindung des, im Bereich der Dimerisierungsdomänen zu 59 % zu c-Myc ähnlichen Proteins Max gezeigt werden. Diese Arbeit unterstützt weiterhin die Aussage, dass Protein-Protein-Interaktionen, trotz unbekannter Bindungsstellen für niedermolekulare Verbindungen inhibierbar sind.

4.4 Relevanz von Mycro1 und Mycro2 für die Wissenschaft

Bei c-Myc handelt es sich um einen für die normale Funktionalität der Zelle essentiellen Transkriptionsfaktor. Seit der Entdeckung *c-myc* 1982 als zelluläres Homolog des viralen Gens *v-myc* (Vennstrom *et al.*, 1982) hat die Forschung ein vehementes Interesse an der Aufklärung der genauen Rolle dieses Proteins. Obwohl die Untersuchungen der letzten Jahre bereits eine sehr gute Charakterisierung des Transkriptionsfaktors ermöglichen, besteht in Bezug auf manche Funktionen des Proteins noch Klärungsbedarf.

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten niedermolekularen Verbindungen Mycro1 und Mycro2 besitzen das Potential, als Werkzeuge bei der Beantwortung bestimmter c-Myc-betreffender Fragen fungieren zu können. So könnten sie bei der Aufklärung noch nicht identifizierter c-Myc Zielgene nützlich sein (Dang, 1999; Patel *et al.*, 2004). Ebenso besteht gewisse Unklarheit darüber, unter welchen Bedingungen c-Myc entweder Proliferation oder Apoptose steuert (Nilsson & Cleveland, 2003). Als niedermolekulare Verbindungen inhibieren Mycro1 und Mycro2 dabei das bereits vorhandene Protein. Sie lassen somit, anders als Antisense-Technologien, die generelle Expression des Proteins zu und verhindern somit eine grundlegende Veränderung des Expressionsmuster in der Zelle. Damit stellen sie eine gute Alternative zu konditionalen

knock-outs dar, wie sie generell für die Untersuchung von für die Zelle essentiellen Proteinen wie c-Myc eingesetzt werden.

Als onkogenes Protein ist c-Myc jedoch auch in unnatürlich hohen Konzentrationen in den meisten menschlichen Tumoren vorhanden (Dang, 1999). Die konditionale Überexpression von c-Myc führt in genetischen Modellsystemen zur Tumorentwicklung, ein Vorgang, der durch Inaktivierung des Proteins revertierbar ist (Felsher & Bishop, 1999; Jain *et al.*, 2002; Pelengaris *et al.*, 1999; Shachaf *et al.*, 2004). Von daher ist die Inaktivierung von c-Myc auch für die Krebsforschung von Interesse. Mycro1 und Mycro2 könnten somit eingesetzt werden, um die Bedingungen zu klären, unter denen die durch Überexpression des Proteins in Tiermodellen bedingte Tumorgenese rückgängig gemacht werden kann. Weiterhin könnten diese niedermolekularen Inhibitoren auch als Ausgangspunkte für die Medikamentenentwicklung dienen, insbesondere unter Berücksichtigung ihrer Spezifität im unteren mikromolaren Bereich.

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fluoreszenzpolarisation als Methode für die Hochdurchsatzanalyse sehr gut geeignet ist. Auf Grund des einfachen Aufbaus dieses Assays sollte eine Erweiterung auf andere Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Interaktionen problemlos funktionieren, so wie es in dieser Arbeit bereits für Jun/Jun oder C/EBP α /C/EBP α demonstriert wurde. Dementsprechend wären weitere vergleichbare Screens für andere Targets denkbar.

Weiterhin vorstellbar ist, den im Rahmen dieser Arbeit für c-Myc/Max entwickelten Fluoreszenzpolarisationsassay zur Hochdurchsatzanalyse fokussierter Bibliotheken, basierend auf den Grundlagen der Struktur von Mycro1 oder Mycro2, einzusetzen. Mittels Analysen zur Struktur-Wirkungsbeziehung könnten Verbesserungen bezüglich der Aktivität und Spezifität der Inhibitoren erzielt werden. Aber auch aus Naturstoffen und Naturstoff-ähnlichen Verbindungen bestehende Bibliotheken sollten auf ihre Aktivität bezüglich c-Myc untersucht werden. Insbesondere solchen Verbindungen wird ein hohes Potential prognostiziert, als niedermolekulare Inhibitoren fungieren zu können, da gerade die Natur durch den Lauf der Evolution zielgeformte Verbindungen hervorgebracht hat.

Interessant wäre auch, ob eine fokussierte Substanzbibliothek auf der Grundlage der Strukturen von Mycro1 und Mycro2 Aussagen über die strukturellen Voraussetzungen bezüglich der generellen Aktivität der Verbindungen Mitglieder der b-HLH-Zip Familie betreffend, ermöglicht. Somit könnte geklärt werden, ob es allgemeine Regeln dafür gibt, welche Verbindungen bevorzugt eine Inhibition von Proteinen der b-HLH-Zip- oder der b-Zip-Familie bewirken.

5. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor c-Myc aus der Familie der basischen Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper (b-HLH-Zip) Proteine reguliert eine Vielzahl von Genen. In Tumoren ist die Expression von c-Myc häufig dereguliert. Da sämtliche bekannte biologische Funktionen von c-Myc dessen Bindung an seinen Aktivierungspartner Max erfordern, eröffnen niedermolekulare Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung neue Möglichkeiten zur Klärung der genauen Funktion von c-Myc, sowie möglicherweise neue Ansätze für die Tumorthherapie.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei niedermolekulare Inhibitoren der c-Myc/Max Dimerisierung und DNA-Bindung identifiziert, und ihre Aktivitäten und Spezifitäten in unabhängigen *in vitro* Assays sowie zellulären Assays nachgewiesen. Dazu wurde zunächst ein Fluoreszenzpolarisationsassay entwickelt, der die Identifizierung potentieller niedermolekularer Inhibitoren der Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc/Max in einem Hochdurchsatz-Screen erlaubte. Aus einer strukturell diversen chemischen Substanzbibliothek mit 17298 Mitgliedern wurde eine Verbindung, in der Arbeit als Mycro1 bezeichnet, identifiziert, welche die Dimerisierung und DNA-Bindung von c-Myc und Max im mikromolaren Konzentrationsbereich inhibierte. Eine weitere, strukturell verwandte Verbindung besaß vergleichbare Aktivität. Die Aktivitäten beider Inhibitoren wurden in Gelshift-Assays und GST-Pulldown Experimenten verifiziert. Die in dieser Arbeit identifizierten Substanzen sind die ersten Inhibitoren der c-Myc/Max-Dimerisierung, die sowohl die Dimerisierung als auch die DNA-Bindung von c-Myc/Max mit akzeptabler Selektivität gegenüber strukturell ähnlichen Transkriptionsfaktoren aus der Familie der b-HLH-Zip oder der b-Zip Proteine *in vitro* inhibieren. In zellulären Assays inhibierten die Verbindungen selektiv die c-Myc-abhängige Proliferation, Gentranskription und onkogene Transformation im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich. Diese Daten zeigen, dass die Aktivität dimerer Transkriptionsfaktoren, selbst bei Abwesenheit offensichtlicher Bindungstaschen, selektiv durch niedermolekulare, zellpermeable Verbindungen reguliert werden kann.

6. Literaturverzeichnis

- Adhikary, S. & Eilers, M. (2005). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 635-45. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins
- Akashi, H., Matsumoto, S. & Taira, K. (2005). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 413-22. Gene discovery by ribozyme and siRNA libraries
- Amati, B. (2001). *Nat Cell Biol*, **3**, E112-3. Integrating Myc and TGF-beta signalling in cell-cycle control
- Amati, B., Alevizopoulos, K. & Vlach, J. (1998). *Front Biosci*, **3**, d250-68. Myc and the cell cycle
- Arita, K., Kobuchi, H., Utsumi, T., Takehara, Y., Akiyama, J., Horton, A.A. & Utsumi, K. (2001). *Biochem Pharmacol*, **62**, 821-8. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids
- Arkin, M.R. & Wells, J.A. (2004). *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 301-17. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream
- Arnold, F.H. (1991). *Biotechnology (N Y)*, **9**, 151-6. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing
- Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R. & Kessler, H. (1991). *FEBS Lett*, **291**, 50-4. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1
- Banks, P., Gosselin, M. & Prystay, L. (2000). *J Biomol Screen*, **5**, 159-68. Fluorescence polarization assays for high throughput screening of G protein-coupled receptors
- Berg, T. (2003). *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**, 2462-81. Modulation of protein-protein interactions with small organic molecules
- Berg, T., Cohen, S.B., Desharnais, J., Sonderegger, C., Maslyar, D.J., Goldberg, J., Boger, D.L. & Vogt, P.K. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3830-5. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts
- Blackwood, E.M. & Eisenman, R.N. (1991). *Science*, **251**, 1211-7. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc
- Bogan, A.A. & Thorn, K.S. (1998). *J Mol Biol*, **280**, 1-9. Anatomy of hot spots in protein interfaces
- Bottger, V., Bottger, A., Howard, S.F., Picksley, S.M., Chene, P., Garcia-Echeverria, C., Hochkeppel, H.K. & Lane, D.P. (1996). *Oncogene*, **13**, 2141-7. Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display

- Bowman, T., Broome, M.A., Sinibaldi, D., Wharton, W., Pledger, W.J., Sedivy, J.M., Irby, R., Yeatman, T., Courtneidge, S.A. & Jove, R. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7319-24. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis
- Bradford, M.M. (1976). *Anal Biochem*, **72**, 248-54. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Vire, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P.G., Amati, B., Kouzarides, T., de Launoit, Y., Di Croce, L. & Fuks, F. (2005). *Embo J*, **24**, 336-46. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor
- Carr, R.A., Congreve, M., Murray, C.W. & Rees, D.C. (2005). *Drug Discov Today*, **10**, 987-92. Fragment-based lead discovery: leads by design
- Chai, J. & Tarnawski, A.S. (2002). *J Physiol Pharmacol*, **53**, 147-57. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing
- Chene, P., Fuchs, J., Bohn, J., Garcia-Echeverria, C., Furet, P. & Fabbro, D. (2000). *J Mol Biol*, **299**, 245-53. A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines
- Chung, S., Park, S. & Yang, C.H. (2002). *Cancer Lett*, **188**, 153-62. Unsaturated fatty acids bind Myc-Max transcription factor and inhibit Myc-Max-DNA complex formation
- Coles, M., Heller, M. & Kessler, H. (2003). *Drug Discov Today*, **8**, 803-10. NMR-based screening technologies
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N. & Golub, T.R. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3260-5. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion
- Conzen, S.D., Gottlob, K., Kandel, E.S., Khanduri, P., Wagner, A.J., O'Leary, M. & Hay, N. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 6008-18. Induction of cell cycle progression and acceleration of apoptosis are two separable functions of c-Myc: transrepression correlates with acceleration of apoptosis
- D'Cruz, C.M., Gunther, E.J., Boxer, R.B., Hartman, J.L., Sintasath, L., Moody, S.E., Cox, J.D., Ha, S.I., Belka, G.K., Golant, A., Cardiff, R.D. & Chodosh, L.A. (2001). *Nat Med*, **7**, 235-9. c-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations
- Dang, C.V. (1999). *Mol Cell Biol*, **19**, 1-11. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism
- Dang, C.V. & Lee, W.M. (1988). *Mol Cell Biol*, **8**, 4048-54. Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal

- Davis, R.J. (1993). *J Biol Chem*, **268**, 14553-6. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway
- Dechantsreiter, M.A., Planker, E., Matha, B., Lohof, E., Holzemann, G., Jonczyk, A., Goodman, S.L. & Kessler, H. (1999). *J Med Chem*, **42**, 3033-40. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists
- Felsher, D.W. & Bishop, J.M. (1999). *Mol Cell*, **4**, 199-207. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A. & Amati, B. (2003). *Genes Dev*, **17**, 1115-29. Genomic targets of the human c-Myc protein
- Fieber, W., Schneider, M.L., Matt, T., Krautler, B., Konrat, R. & Bister, K. (2001). *J Mol Biol*, **307**, 1395-410. Structure, function, and dynamics of the dimerization and DNA-binding domain of oncogenic transcription factor v-Myc
- Gershoni, J.M. & Palade, G.E. (1983). *Anal Biochem*, **131**, 1-15. Protein blotting: principles and applications
- Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P. & Eisenman, R.N. (2000). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 653-99. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior
- Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F., Dubois, J. & Potier, P. (1993). *J Natl Cancer Inst Monogr*, 79-82. Structure-activity relationships of Taxol and Taxotere analogues
- Guo, Q.M., Malek, R.L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N.H., Dang, C.V. & Liu, E.T. (2000). *Cancer Res*, **60**, 5922-8. Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray
- Gurrath, M., Müller, G., Kessler, H., Aumailley, M. & Timpl, R. (1992). *Eur J Biochem*, **210**, 911-21. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides
- Hammond, S.M. (2005). *FEBS Lett*, **579**, 5822-9. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway
- Henriksson, M. & Luscher, B. (1996). *Adv Cancer Res*, **68**, 109-82. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation
- Herbst, A., Hemann, M.T., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., Lowe, S.W. & Tansey, W.P. (2005). *EMBO Rep*, **6**, 177-83. A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity
- Hermeking, H. (2003). *Curr Cancer Drug Targets*, **3**, 163-75. The MYC oncogene as a cancer drug target
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaaja, J., Saluz, H.P., Haenel, F. & Eilers, M. (2002). *Mol Cell*, **10**, 509-21. Negative

- regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1
- Hochuli, E. (1988). *J Chromatogr*, **444**, 293-302. Large-scale chromatography of recombinant proteins
- Hopewell, R. & Ziff, E.B. (1995). *Mol Cell Biol*, **15**, 3470-8. The nerve growth factor-responsive PC12 cell line does not express the Myc dimerization partner Max
- Hughes-Fulford, M., Chen, Y. & Tjandrawinata, R.R. (2001). *Carcinogenesis*, **22**, 701-7. Fatty acid regulates gene expression and growth of human prostate cancer PC-3 cells
- Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., Sundberg, C.D., Bishop, J.M. & Felsher, D.W. (2002). *Science*, **297**, 102-4. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC
- Jones, S. & Thornton, J.M. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13-20. Principles of protein-protein interactions
- Jung, K.C., Park, C.H., Hwang, Y.H., Rhee, H.S., Lee, J.H., Kim, H.K. & Yang, C.H. (2006). *Leukemia*, 122-127. Fatty acids, inhibitors for the DNA binding of c-Myc/Max dimer, suppress proliferation and induce apoptosis of differentiated HL-60 human leukemia cell
- Kim, S.J., Park, Y. & Hong, H.J. (2005). *Mol Cells*, **20**, 17-29. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies
- Klein, G. (1999). *Curr Top Microbiol Immunol*, **246**, 161-7. Immunoglobulin gene associated chromosomal translocations in B-cell derived tumors
- Kohler, G. & Milstein, C. (1976). *Eur J Immunol*, **6**, 511-9. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion
- Kolch, W. (2005). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 827-37. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors
- Kretzner, L., Blackwood, E.M. & Eisenman, R.N. (1992). *Nature*, **359**, 426-9. Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities
- Kurreck, J. (2003). *Eur J Biochem*, **270**, 1628-44. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications
- Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, **227**, 680-5. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
- Lekstrom-Himes, J. & Xanthopoulos, K.G. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 28545-8. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors
- Levy, D.E. & Darnell, J.E., Jr. (2002). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 651-62. Stats: transcriptional control and biological impact

- Liebmann, C. (2001). *Cell Signal*, **13**, 777-85. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J. (2001). *Adv Drug Deliv Rev*, **46**, 3-26. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings
- Lo Conte, L., Chothia, C. & Janin, J. (1999). *J Mol Biol*, **285**, 2177-98. The atomic structure of protein-protein recognition sites
- Ma, A., Moroy, T., Collum, R., Weintraub, H., Alt, F.W. & Blackwell, T.K. (1993). *Oncogene*, **8**, 1093-8. DNA binding by N- and L-Myc proteins
- Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Adachi, S. & Sedivy, J.M. (1997). *Cell Growth Differ*, **8**, 1039-48. Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination
- Miller, A.D. & Rosman, G.J. (1989). *Biotechniques*, **7**, 980-2, 984-6, 989-90. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression
- Mo, H. & Henriksson, M. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 6344-9. Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). *Methods Enzymol*, **155**, 335-50. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction
- Nahta, R. & Esteva, F.J. (2006). *Cancer Lett*, **232**, 123-38. Herceptin: mechanisms of action and resistance
- Nair, S.K. & Burley, S.K. (2003). *Cell*, **112**, 193-205. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors
- Nasir, M.S. & Jolley, M.E. (1999). *Comb Chem High Throughput Screen*, **2**, 177-90. Fluorescence polarization: an analytical tool for immunoassay and drug discovery
- Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G.F. & Minna, J.D. (1985). *Nature*, **318**, 69-73. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer
- Nesbit, C.E., Tersak, J.M. & Prochownik, E.V. (1999). *Oncogene*, **18**, 3004-16. MYC oncogenes and human neoplastic disease
- Nilsson, J.A. & Cleveland, J.L. (2003). *Oncogene*, **22**, 9007-21. Myc pathways provoking cell suicide and cancer
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F. & Salomon, D.S. (2006). *Gene*, **366**, 2-16. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer

- Oster, S.K., Ho, C.S., Soucie, E.L. & Penn, L.Z. (2002). *Adv Cancer Res*, **84**, 81-154. The myc oncogene: Marvelously Complex
- P. J. Hajduk, G.S., D. G. Nettesheim, E. T. Olejniczak, S. B. Shuker, R. P. Meadows, D. H. Steinman, G. M. Carrera, Jr., P. A. Marcotte, J. Severin, K. Walter, H. Smith, E. Gubbins, R. Simmer, T. F. Holzman, D. W. Morgan, S. K. Davidsen, J. B. Summers, and S. W. Fesik. (1997). *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 5828 - 5832. Discovery of Potent Nonpeptide Inhibitors of Stromelysin Using SAR by NMR
- Patel, J.H., Loboda, A.P., Showe, M.K., Showe, L.C. & McMahon, S.B. (2004). *Nat Rev Cancer*, **4**, 562-8. Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC
- Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G.I. (2002). *Cell*, **109**, 321-34. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G. & Evan, G. (1999). *Mol Cell*, **3**, 565-77. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion
- Pellegrini, L., Tan, S. & Richmond, T.J. (1995). *Nature*, **376**, 490-8. Structure of serum response factor core bound to DNA
- Picksley, S.M., Vojtesek, B., Sparks, A. & Lane, D.P. (1994). *Oncogene*, **9**, 2523-9. Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides
- Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E. (1984). *Nature*, **309**, 30-3. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule
- Ponzielli, R., Katz, S., Barsyte-Lovejoy, D. & Penn, L.Z. (2005). *Eur J Cancer*, **41**, 2485-501. Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc
- Rao, G.N., Alexander, R.W. & Runge, M.S. (1995). *J Clin Invest*, **96**, 842-7. Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells
- Rishi, V., Potter, T., Laudeman, J., Reinhart, R., Silvers, T., Selby, M., Stevenson, T., Krosky, P., Stephen, A.G., Acharya, A., Moll, J., Oh, W.J., Scudiero, D., Shoemaker, R.H. & Vinson, C. (2005). *Anal Biochem*, **340**, 259-71. A high-throughput fluorescence-anisotropy screen that identifies small molecule inhibitors of the DNA binding of B-ZIP transcription factors
- Rowinsky, E.K. (1997). *Semin Oncol*, **24**, S19-1-S19-12. Paclitaxel pharmacology and other tumor types
- Sachsenmaier, C., Sadowski, H.B. & Cooper, J.A. (1999). *Oncogene*, **18**, 3583-92. STAT activation by the PDGF receptor requires juxtamembrane phosphorylation sites but not Src tyrosine kinase activation

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, -
edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, Cold Spring Harbor.
- Scangos, G. & Ruddle, F.H. (1981). *Gene*, **14**, 1-10. Mechanisms and applications of
DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review
- Schade, S.Z., Jolley, M.E., Sarauer, B.J. & Simonson, L.G. (1996). *Anal Biochem*, **243**,
1-7. BODIPY-alpha-casein, a pH-independent protein substrate for protease
assays using fluorescence polarization
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzner, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M.,
Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H. & Eick, D. (2001).
Nucleic Acids Res, **29**, 397-406. The transcriptional program of a human B cell
line in response to Myc
- Schust, J. & Berg, T. (2004). *Anal Biochem*, **330**, 114-8. A high-throughput fluorescence
polarization assay for signal transducer and activator of transcription 3
- Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F.,
Brodeur, G., Goldstein, M. & Trent, J. (1983). *Nature*, **305**, 245-8. Amplified
DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human
neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour
- Seethala, R. & Menzel, R. (1997). *Anal Biochem*, **253**, 210-8. A homogeneous,
fluorescence polarization assay for src-family tyrosine kinases
- Sessler, A.M. & Ntambi, J.M. (1998). *J Nutr*, **128**, 923-6. Polyunsaturated fatty acid
regulation of gene expression
- Shachaf, C.M., Kopelman, A.M., Arvanitis, C., Karlsson, A., Beer, S., Mandl, S.,
Bachmann, M.H., Borowsky, A.D., Ruebner, B., Cardiff, R.D., Yang, Q.,
Bishop, J.M., Contag, C.H. & Felsher, D.W. (2004). *Nature*, **431**, 1112-7. MYC
inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in
hepatocellular cancer
- Sheiness, D., Fanshier, L. & Bishop, J.M. (1978). *J Virol*, **28**, 600-10. Identification of
nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian
retrovirus MC29
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B.C., Wu, C.S., Dang, G., Jungmann, R.A., Dalla-Favera,
R. & Dang, C.V. (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6658-63. c-Myc
transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano,
M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985). *Anal
Biochem*, **150**, 76-85. Measurement of protein using bicinchoninic acid
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T.,
Bartek, J., Massague, J., Hanel, F. & Eilers, M. (2001). *Nat Cell Biol*, **3**, 392-
9. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1

- Tzung, S.P., Kim, K.M., Basanez, G., Giedt, C.D., Simon, J., Zimmerberg, J., Zhang, K.Y. & Hockenbery, D.M. (2001). *Nat Cell Biol*, **3**, 183-91. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3
- van Dam, H. & Castellazzi, M. (2001). *Oncogene*, **20**, 2453-64. Distinct roles of Jun: Fos and Jun: ATF dimers in oncogenesis
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J. & Bishop, J.M. (1982). *J Virol*, **42**, 773-9. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29
- Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A.A., Moll, J.R. & Bonovich, M. (2002). *Mol Cell Biol*, **22**, 6321-35. Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties
- Vinson, V.K., De La Cruz, E.M., Higgs, H.N. & Pollard, T.D. (1998). *Biochemistry*, **37**, 10871-80. Interactions of Acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin
- Vogt, P.K. (2002). *Nat Rev Cancer*, **2**, 465-9. Fortuitous convergences: the beginnings of JUN
- Wood, L.J., Mukherjee, M., Dolde, C.E., Xu, Y., Maher, J.F., Bunton, T.E., Williams, J.B. & Resar, L.M. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 5490-502. HMG-I/Y, a new c-Myc target gene and potential oncogene
- Wu, P., Brasseur, M. & Schindler, U. (1997). *Anal Biochem*, **249**, 29-36. A high-throughput STAT binding assay using fluorescence polarization
- Xu, Y., Shi, J., Yamamoto, N., Moss, J.A., Vogt, P.K. & Janda, K.D. (2006). *Bioorg Med Chem*, **14**, 2660-73. A credit-card library approach for disrupting protein-protein interactions
- Yin, X., Giap, C., Lazo, J.S. & Prochownik, E.V. (2003). *Oncogene*, **22**, 6151-9. Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function
- Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R. (1999). *J Biomol Screen*, **4**, 67-73. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b-HLH-Zip	basische Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper Domäne
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
°C	Grad Celsius
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
Cdk	<i>cyclin dependent kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i> (Zyan fluoreszierendes Protein)
Ci	Curie
CMV	<i>cytomegalovirus</i> (Cytomegalie-Virus)
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
CTD	C-terminale Domäne
c-Myc	<i>cellular</i> (zelluläres) Myc
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E-Box	Enhancer Box
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum)
FP	Fluoreszenzpolarisation
g	Gramm
G1	Gap-Phase 1
G2/M	Gap-Phase 2/Mitose
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HBS	<i>HEPES Buffered Saline</i> (HEPES gepufferte Salzlösung)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HTS	<i>High Throughput Screen</i> (Hochdurchsatzanalyse)
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> (inhibitorische Konzentration)
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton
LB (-Medium)	“Luria Bertani” (Medium)
Max	Myc assoziierter Faktor X
MBP	<i>Mannose-Binding Protein</i> (Maltose-Bindungsprotein)
min	Minute
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)

Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriessigsäure)
NP-40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamide-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rb	Retinoblastom
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i> (Natrium-Dodecylsulfat)
S-Phase	DNA-Synthesephase
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TPA	12-O-tetradecanoyl Phorbol-13-Acetat
TR	Texas Red
TRE	<i>TPA Responsive Element</i>
U	Enzymaktivitätseinheit (Unit)
Vol.	Volumen
v/v	Verhältnis Volumen zu (Gesamt-)Volumen
WB	Western-Blot
w/v	Verhältnis Masse (weight) zu (Gesamt-)Volumen (volume)
w/w	Verhältnis Masse (weight) zu (Gesamt-) Masse (weight)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)
z. B.	zum Beispiel

Englische Bezeichnungen und Ausdrücke, die aus dem Englischen ins Deutsche übernommen wurden, wurden *kursiv* gedruckt.

Abkürzungen der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Aspartat	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Glu	Glutamat	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	W	Trp	Tryptophan
H	His	Histidin	Y	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Berg, der mir mit der Vergabe dieses Themas ein äußerst interessantes und vielseitiges Projekt ermöglichte. Insbesondere möchte ich ihm für die vielen Anregungen und Diskussion sowie für die hervorragende Betreuung danken.

Besonders herzlich möchte ich auch Professor Johannes Buchner für seine Bereitschaft danken, meine Arbeit als Doktorvater an der Fakultät der Chemie der Technischen Universität München zu betreuen. Über die Möglichkeit, den Fortschritt meiner Arbeit im Rahmen seiner internen Lehrstuhlseminare zu diskutieren, habe ich mich sehr gefreut.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Professor Axel Ullrich für die Aufnahme in der Abteilung für Molekularbiologie und die großzügige Unterstützung bedanken.

Bei meinem Labor möchte ich mich in erster Linie für die herzliche Atmosphäre und die tolle Teamarbeit bedanken. Bianca Sperl gebührt besonderer Dank für ihre stete Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente. Wolfgang Reindl danke ich für seine unermüdlichen Versuche, mir die Welt des Fußballs begreiflich zu machen sowie seine stets gute Laune und Freude über Kleinigkeiten im Alltag. Angela Berg und Judith Müller danke ich für zahlreiche Klonierungen sowie die tatkräftige fachliche Unterstützung der Arbeit. Ganz herzlich möchte ich auch meiner Diplomandin Rita Wiesinger für ihren unermüdlichen Eifer und ihre ansteckende Freude an der Arbeit danken. Jochen Schust danke ich für die nette Einführung in die Abteilung Ullrich.

Matthias Schneider danke ich für die kontinuierliche Versorgung mit Kaffee und Keksen. Bei Christiane Stadler und Wolfgang Reindl möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken. Christiane danke ich weiterhin für zahlreiche Diskussionen, Protokolle und unterhaltsame Stunden auch außerhalb des Labors.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Ullrich danke ich für ihre Unterstützung und die abwechslungsreichen Stunden im Labor.

Insbesondere möchte ich auch meinen Eltern, meiner Schwester Marte und meinem Freund Christian danken, die alle auf ihre Weise entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders erfreut haben mich Christians Bemühungen, die Arbeit als Fachfremder auch inhaltlich zu verstehen.