

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Abteilung für Hämatonkologie

Die Rolle von NIPA im Zellzyklus nach DNS-Schädigung

Eva Grogro

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.-J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster (schriftliche Beurteilung)
Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt (mündliche Prüfung)
2. Priv.-Doz. Dr. I. Ringshausen

Die Dissertation wurde am 13. Dezember 2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24. Oktober 2012 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	3
3.1. Zellzyklus	3
3.2. Zellschädigung	5
3.3. Kontrollpunkte – Checkpoints	7
3.4. DNS-Schadensantwort Signalweg.....	7
3.4.1. G1/S-Kontrollpunkt	9
3.4.2. G2/M-Kontrollpunkt	10
3.5. NIPA.....	11
3.6. Zielsetzung.....	13
4. Material und Methoden	15
4.1. Material	15
4.1.1. Antikörper	15
4.1.2. Chemikalien und biogene Substanzen.....	15
4.1.3. DNS-Polymerasen	17
4.1.4. Inhibitoren.....	17
4.1.5. Medien und Supplemente für die Zellkultur	17
4.1.6. Molekularbiologische Kitsysteme	18
4.1.7. Molekulargewichtsmarker für DNS und Proteine.....	18
4.1.8. Oligonukleotide	18
4.1.8.1. siRNAs	18
4.1.8.2. Primer für die PCR	18
4.1.9. Standardgeräte	18
4.1.10. Standardlösungen und Puffer	19
4.1.11. Vektoren und DNS-Konstrukte	21
4.1.12. Zelllinien	21
4.2. Methoden	23
4.2.1. Zellkultur und molekularbiologische Methoden.....	23
4.2.1.1. Primäre Mausembryofibroblasten (MEFs) generieren.....	23
4.2.1.1.1. Gewinnung von Embryonen	23
4.2.1.1.2. Genotypisierung.....	24

	4.2.1.1.2.1. DNS Aufreinigung.....	24
	4.2.1.1.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
	4.2.1.1.2.3. Elektrophoretische Auftrennung der DNS in Agarosegelen	25
	4.2.1.1.2.4. Auswertung des Genotyps	26
4.2.1.2.	Zellkultur	26
	4.2.1.2.1. Kultivieren von Zellen.....	26
	4.2.1.2.1.1. Primäre Mausembryofibroblasten	26
	4.2.1.2.1.2. Übrige Zelllinien.....	27
	4.2.1.2.2. Auszählen von Zellen.....	27
	4.2.1.2.3. Einfrieren von Zellen	27
	4.2.1.2.4. Auftauen von Zellen	27
4.2.1.3.	Transfektion von Zellen	28
	4.2.1.3.1. Lipofektion	28
	4.2.1.3.2. Retrovirale Transduktion	28
	4.2.1.3.3. miRNA	29
	4.2.1.3.4. siRNA	29
4.2.1.4.	Synchronisation von Zellen	30
	4.2.1.4.1. Mitose	30
	4.2.1.4.2. S-Phase	30
4.2.1.5.	Behandlung von Zellen mit zellschädigenden Agenzien	31
	4.2.1.5.1. UV-Licht.....	31
	4.2.1.5.2. Ionisierende Gammastrahlung	31
	4.2.1.5.3. Zytostatika	31
	4.2.1.5.4. Weitere zellschädigende Stimuli	31
4.2.1.6.	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren.....	32
	4.2.1.6.1. Caffeine	32
	4.2.1.6.2. U0126	32
4.2.1.7.	Zellzyklusbestimmung und Apoptosemessung	32
	4.2.1.7.1. Durchflusszytometrie.....	32
	4.2.1.7.1.1. Propidiumiodid Färbung.....	33
	4.2.1.7.1.2. Phospho-Histon H3 FITC/PI Färbung	34
	4.2.1.7.2. Colony Assay	35
4.2.2.	Biochemische Methoden.....	35
	4.2.2.1. Lysatgewinnung	35
	4.2.2.1.1. Ganzzelllysate.....	35
	4.2.2.1.2. Behandlung der Zelllysate mit alkaliner Phosphatase ..	36

4.2.2.1.3. Fraktionierung.....	36
4.2.2.2. SDS-Gelelektrophorese.....	37
4.2.2.2.1. Elektrophoretische Auftrennung der Proteine	38
4.2.2.3. Western Blot.....	38
4.2.2.3.1. Transfer	38
4.2.2.3.2. Entwicklung.....	38
4.2.2.3.2.1. Blocken unspezifischer Proteine	38
4.2.2.3.2.2. Erster und zweiter Antikörper	39
4.2.2.3.2.3. Entwickeln.....	39
5. Ergebnisse	40
5.1. Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung	40
5.1.1. Regulation von NIPA nach Zellschädigung	40
5.1.2. Phosphorylierung von NIPA	43
5.1.3. Wird die Phosphorylierung von NIPA p53-unabhängig reguliert?	44
5.1.4. Phosphorylierungsstelle von NIPA	44
5.1.5. Welche Proteinkinase phosphoryliert NIPA nach DNS-Schädigung?	45
5.1.5.1. Caffeine.....	46
5.1.5.2. U0126	47
5.1.5.3. Erk1-miRNA und Erk2-miRNA.....	48
5.2. Welche Rolle spielt NIPA für die Zelle nach Zellschädigung?	49
5.2.1. Einfluss der NIPA-Expression auf die Sensibilität der Zellen gegenüber Zellschädigung	49
5.2.1.1. Apoptosemessung mittels PI Färbung	50
5.2.1.2. Colony Assay	52
5.2.2. Spielt NIPA eine Rolle als Checkpoint-Protein?	54
5.3. Bindet NIPA an die DNS?.....	56
6. Diskussion.....	58
6.1. Posttranslationale Modifikation von NIPA nach Zellschädigung.....	58
6.2. NIPA wird nach DNS-Schädigung an Serin 354 phosphoryliert	61
6.3. p53-unabhängige Phosphorylierung von NIPA	62
6.4. Regulierung von NIPA in der DNS-Schadensantwort	63
6.5. Antiapoptotische Wirkung von NIPA.....	65
6.6. Funktion von NIPA am G2/M-Kontrollpunkt	65
6.7. Bindung von NIPA an die DNS	67
6.8. Schlussfolgerung.....	68

7. Anhang	69
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	69
7.2. Literaturverzeichnis	71

1. Zusammenfassung

Die Schädigung des menschlichen Erbgutes kann ernsthafte Folgen haben. Mutationen begünstigen die Entartung einer Zelle und prädisponieren zur Krebsentstehung. Um zu verhindern, dass sich Schäden an der DNS auf die Tochterzellen übertragen, unterliegt der Zellzyklus einer ständigen Kontrolle. Die an dieser Regulation beteiligten Mechanismen sind äußerst komplex und ihre Entschlüsselung ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten.

NIPA (nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase) ist in seiner Funktion als F-Box Protein bisher hauptsächlich wegen seiner Bedeutung am Übergang des ungestörten Zellzyklus in die Mitose erforscht worden. Untersuchungen dieser Arbeit sollten Aufschluss darüber geben, wie NIPA in den Zellzyklus nach DNS-Schädigung einzuordnen sei.

Die Versuche hierzu wurden in NIPA-exprimierenden und NIPA-defizienten embryonalen Mausfibroblasten, NIH/3T3-Zellen und der Osteosarkomzelllinie U2OS durchgeführt. Ihre Umsetzung erfolgte mithilfe der folgenden Methoden: Western Blot, Propidiumiodid Färbung, Phospho-Histon H3 FITC/PI Färbung und Colony Assays.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach ganz unterschiedlichen Zellschädigungen zu einer Phosphorylierung von NIPA kommt und dass diese am Serinrest 354 des Proteins erfolgt. Versuche mit p53-defizienten Zellen belegen, dass die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung p53 unabhängig erfolgt. Es gibt Anzeichen dafür, dass sowohl Erk2 als auch Kinasen des ATR-Signalweges für diesen Phosphorylierungsvorgang verantwortlich sind. Beim Vergleich NIPA-exprimierender und NIPA-defizienter Zellen wurde beobachtet, dass NIPA nach Zellschädigung eine antiapoptotische Wirkung besitzt. Das Ziel weiterer Versuche war es eine mögliche Funktion von NIPA als Kontrollpunktprotein am G2/M-Übergang nachzuweisen. Abschließende Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis darauf, dass NIPA an die DNS bindet. Diese Aussage gilt es jedoch zukünftig zu bekräftigen.

Es ist gelungen, das Verständnis über die Regulierung von NIPA und seine Funktion für die Zelle nach DNS-Schädigung auszubauen. Die erhoffte Aufdeckung einer eindeutigen Aufgabe von NIPA im Rahmen der Schadensantwort ist leider ausgeblieben. Dies verdeutlicht erneut die Komplexität der Vorgänge im Zellzyklus und lässt Raum für zukünftige Forschungsarbeiten.

Schlagwörter: NIPA, Zellzyklus, DNS-Schädigung, Kontrollpunkte, DNS-Schadensantwort

2. Abstract

Damage to the human genome may have serious consequences. Genetic mutations can predispose to carcinogenic change. In order to reduce the transference of genetic damage to daughter cells, the cell cycle is constantly monitored. Mechanisms involved in such regulation pathways are complex and their decoding is the topic of various research studies.

NIPA (nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase) is a protein. It is known for its important role in the transition of the undisturbed cell cycle to mitosis. The goal of this project was to examine the activity of NIPA after treatment with different cell damaging agents, and to further clarify how this protein participates in cell cycle regulation after DNA damage.

NIPA's function was examined in cells from various sources, including cells with NIPA expressed and cells without NIPA expressed. The cells came from murine embryonic fibroblasts and from osteoblasts taken from an osteosarcoma. The following techniques were used to study NIPA in these cells: Western Blotting, PI staining, Phospho-Histon H3 FITC/PI staining and Colony Assays.

This study showed that NIPA does result in phosphorylation after different cell damages and that this phosphorylation occurs on the serine residue 354. Experiments with p53-deficient cells identified that the phosphorylation of NIPA after DNA damage is p53 independent. There is evidence that Erk2 and the ATR pathway are involved in the phosphorylation process. The comparison of NIPA-deficient cells with NIPA-expressing cells showed that the deficient cells are more sensitive to DNA damage. The next experiments aimed to determine the role of NIPA as a checkpoint protein at the G2/M-checkpoint. The final experiments provided some support for the theory that NIPA directly binds to DNA, but the presence and nature of such binding still needs to be clarified.

This project has improved the understanding of how NIPA is regulated after DNA-damage. Further study is required to fully understand NIPA's role in the cell cycle after DNA damage.

Keywords: NIPA, cell cycle, DNA damage, checkpoints, DNA damage response

3. Einleitung

3.1. Zellzyklus

Im menschlichen Organismus hat die Zelle als kleinste funktionelle, eigenständig lebensfähige und hoch spezialisierte Einheit eines Lebewesens ihre Eigenständigkeit weitgehend verloren. Im Vordergrund steht ihr Zusammenspiel mit anderen Zellen innerhalb eines Zellverbandes. Anders ist es bei Einzellern, wie z.B. den Hefen, die ohne Zellverband als autonome Einheiten lebensfähig sind. Zum einen um die Existenz einer Zelle zu gewährleisten, zum anderen aber auch dafür, dass ein solch komplexes Gefüge, wie im menschlichen Organismus funktionieren und reguliert werden kann, unterliegt jede Zelle einem streng kontrollierten Zellzyklus, in dem situationsabhängig festgelegt wird, ob sich die Zelle teilen, ihr Wachstum vorübergehend einstellen, sich ausdifferenzieren oder ihren programmierten Zelltod einleiten soll. Schon kleinste Fehler in diesem Ablauf können gravierende Folgen für die Zelle und den menschlichen Organismus haben und machen daher das Verständnis über die Vorgänge in der Zelle enorm wichtig.

Im Jahr 2001 wurde den Biochemikern Leland H. Hartwell, R. Timothy Hunt und Paul M. Nurse der Nobelpreis in Medizin für ihre Entdeckungen betreffend der Kontrolle des Zellzyklus verliehen.

Der Zellzyklus, bei dem sich die Zelle in zwei gleiche Tochterzellen teilt, kann in zwei große Abschnitte unterteilt werden, die Interphase und die Mitose. Die Interphase setzt sich aus der G1-Phase, der S-Phase (Synthesephase) und der G2-Phase zusammen. Die S-Phase dient der Replikation der DNS und damit der Verdopplung des Erbgutes. Die G1- und die G2-Phase sind Zwischenphasen, in denen die Zelle Proteine synthetisiert, Fehler erkennt und behebt und sich auf die sich anschließenden Phasen vorbereitet. Während der Mitose richtet sich die Zelle für die bevorstehende Zellteilung, indem sie das in der S-Phase verdoppelte Erbgut auf zwei Tochterzellen verteilt. Dies geschieht in fünf, die Mitose definierenden, Schritten - Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase [McIntosh und Koonce 1989]. Mit der Zytokinese (Zellteilung) wird die Mitose abgeschlossen. Die so entstandenen Tochterzellen treten erneut in den Zellzyklus ein, der, sobald er einmal begonnen wurde und fehlerfrei verläuft, wieder eine Zellteilung nach sich zieht (Abb. 3.1.).

Nicht alle Zellen durchlaufen jedoch permanent den Zellzyklus. Anstatt nach der Zellteilung erneut in den Zellzyklus einzutreten, verlassen einige Zellen, abhängig von Substratangebot und Wachstumsfaktoren, die G1-Phase und treten in die G0-Phase, eine teilungsinaktive Phase, ein. Diese Ruhephase kann wie im Fall von ausdifferenzierten Zellen von Dauer oder

nur vorübergehend sein, bis die Zelle durch aktivierende Faktoren erneut zum Eintritt in den Zellzyklus stimuliert wird. Während die Regulierung in der G₁-Phase durch extrazelluläre Einflüsse getriggert ist, verläuft der Zellzyklus in den übrigen Phasen unabhängig von Wachstumsfaktoren.

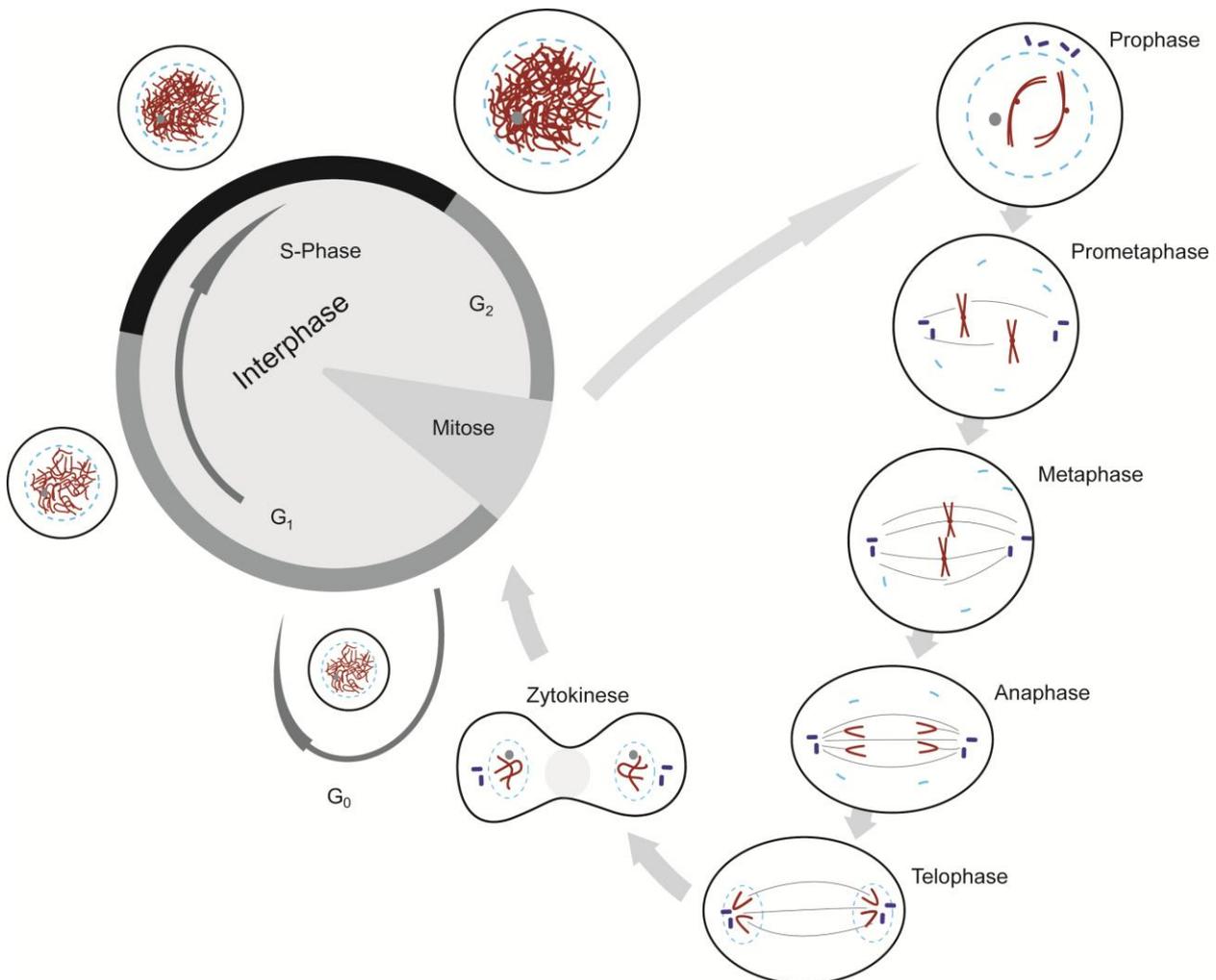


Abb. 3.1.: Zellzyklus

Grafische Darstellung des Zellzyklus und der verschiedenen Zellstadien.

Maßgeblich an der Kontrolle und Regulation des Zellzyklus sind unterschiedliche, so genannte Cyclin/Cdk-Komplexe beteiligt, deren Zusammensetzung für die verschiedenen Phasen des Zellzyklus spezifisch ist (Abb. 3.2.). Sie bestehen aus einer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin und einer katalytischen Untereinheit, der Cyclin abhängigen Kinase (cdk – cyclin dependent kinase). Durch Bindung des Cyclins wird die Kinase aktiviert und phosphoryliert ihrerseits Substrate, die den Zellzyklus regulieren und vorantreiben [Sherr 1996, Übersax *et al.* 2003]. Der Bestand der Cdks bleibt während des Zellzyklus weitgehend konstant, die Cycline hingegen werden phasenspezifisch exprimiert [Hunt 1991]. Hierdurch wird ein geregelter Ablauf des Zellzyklus gewährleistet, da die Cdks nur dann ihre katalytische Wirkung entfalten können, wenn sie von dem für sie zuständigen Cyclin aktiviert werden. Die Cycline

stellen jedoch nicht die einzige regulatorische Komponente dar. Inhibitorische Untereinheiten, die an die Cdks binden können, und aktivierende oder inhibierende Phosphorylierungen sorgen für eine zusätzliche Koordination der Aktivität der Cyclin abhängigen Kinasen [Nigg 1996, Morgan 1997].

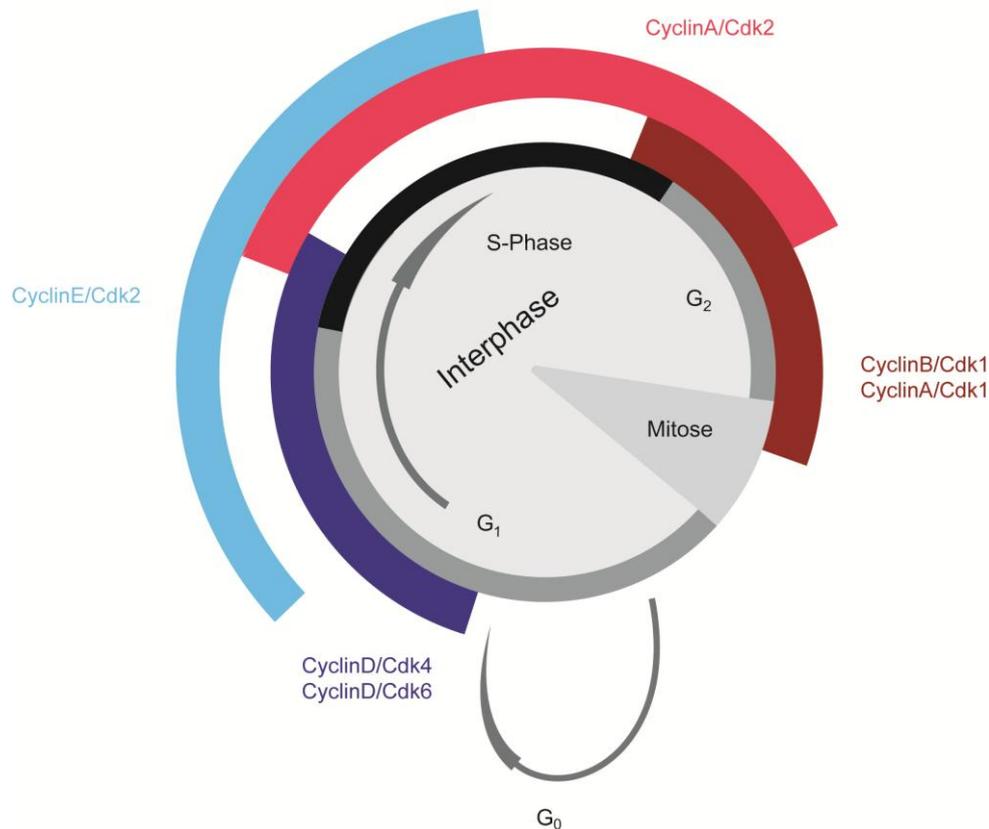


Abb. 3.2.: Zellzyklus

Grafische Darstellung der Verteilung der verschiedenen Cyclin/Cdk-Komplexe im Zellzyklus

3.2. Zellschädigung

Ein regelrechter Ablauf des Zellzyklus kann durch diverse endogene und exogene Prozesse, wie mangelnde Sauerstoffversorgung, Stoffwechseldefekte, immunologische Schädigungen, Erreger und physikalische oder chemische Noxen, gestört werden. Eine Fehlregulation des Zellzyklus kann, je nach Schwere des Schadens, zu einem vorübergehenden Wachstumsstopp mit Schadensbehebung, einer Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) aber auch zur Krebsentstehung führen [Sandell und Zakian 1993, Hartwell und Kastan 1994].

Oft manifestieren sich die durch endogene und exogene Prozesse hervorgerufenen Schäden an der DNS. Das Spektrum an DNS Schäden reicht von einzelnen Basenschäden bis hin zu komplexeren Läsionen.

Einen Schaden an der DNS stellen Brüche in der Doppelhelix dar. Wenn sich diese auf einen

Strang begrenzen, so spricht man von Einzelstrangbrüchen. Zu derartigen Einzelstrangbrüchen kann es zum Beispiel durch die Entstehung von Pyrimidindimeren kommen. UV-Strahlung aus dem Sonnenlicht führt zur Ausbildung von Zyklobutanpyrimidin- und Pyrimidin 6-4 Pyrimidon-Dimeren [Mitchell *et al.* 1989, Mitchell *et al.* 1991]. Diese stören durch Querverbindungen benachbarter DNS Basen [Ravanat *et al.* 2001] die helikale Konfiguration der DNS, verhindern damit eine korrekte Basenpaarung bei der Replikation und der Transkription und führen hierdurch letztendlich zu DNS-Strangbrüchen [Tornaletti und Hanawalt 1999].

Ebenfalls zu Quervernetzungen durch Interstrang- und Intrastrangverbindungen (crosslinks) und damit einer Blockierung der DNS-Replikation kommt es durch kovalente Bindung des Platinatoms aus dem Ursprungskomplex der Platinanaloge Cisplatin an die DNS [Takahara *et al.* 1995, Jung und Lippard 2003, Wang und Lippard 2005].

Durch das Alkylanz Methylmethansulfonat (MMS) hervorgerufene Schäden verhindern das Fortschreiten der Replikationsgabel [Tercero und Diffley 2001] und führen damit auch zu einer Ausbildung von Einzelstrangbrüchen [Sogo *et al.* 2002].

Doppelstrangbrüche sind ein eher seltener DNS-Schaden, der jedoch, wenn eine Reparatur nicht möglich ist, zu schwerwiegenden Mutationen in der Zelle führen kann. Ionisierende Gammastrahlen rufen Doppelstrangbrüche in der DNS hervor [Bresler *et al.* 1984]. Zu medikamenteninduzierten Doppelstrangbrüchen kommt es zum Beispiel durch die Topoisomerase II Hemmer Doxorubicin (Anthrazyklin) und Etoposid [Markovits *et al.* 1987].

Viele Enzyme besitzen ein Temperaturoptimum, in dem sie ihre Arbeit aufnehmen. Steigen die Temperaturen in einem Organismus an, wie es beim Fieber der Fall ist, denaturieren die Proteine und werden funktionslos. Temperaturerhöhungen bis zu 42°C führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS – reactive oxygen species) in der Zelle, die unter anderem DNS-Strangbrüche hervorrufen können [Cerutti 1985].

Auch Substanzen, die natürlicherweise im menschlichen Körper vorkommen, können, wenn sie nicht mehr dem physiologischen Haushalt entsprechen, eine schädliche Wirkung auf den Organismus ausüben. Hohe Konzentrationen an Natriumchlorid (NaCl) setzen die Zelle hyperosmolarem Stress [Zhang *et al.* 2004, Yang *et al.* 2005] aus und führen unter anderem zu Doppelstrangbrüchen [Kültz und Chakravarty 2001, Dmitrieva *et al.* 2003], die erstaunlicherweise nicht repariert werden. Die Zellen arretieren zunächst ihren Zellzyklus, unabhängig davon, in welcher Zellzyklusphase sie sich gerade befinden [Burg *et al.* 2007], sind dann jedoch in der Lage sich an die erhöhten Konzentrationen anzupassen und ihren Zellzyklus fortzusetzen. Sie proliferieren und gehen wenn überhaupt nur kaum in Apoptose [Capasso *et al.* 2001, Santos *et al.* 2003, Dmitrieva *et al.* 2004].

Nicht alle Zellschäden nehmen jedoch einen direkten Einfluss auf die DNS. Missverhältnisse im

Proteinhaushalt der Zelle können, ohne auf das Erbgut einzuwirken, ebenfalls den Zellzyklus durcheinander bringen und zum Arrest führen.

Tunicamycin, ein Nukleosidantibiotikum, stellt ein solch toxisches Agens dar, welches durch Hemmung der N-Acetyl-Glucosamin-Phosphotransferase (GlcNAc-Phosphotransferase) die Glykoprotein-Biosynthese stoppt. Dies führt zur Anreicherung von falsch gefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum [Singh *et al.* 2008] und im Anschluss daran zur Apoptoseinduktion in der Zelle [Szegezdi *et al.* 2006].

3.3. Kontrollpunkte – Checkpoints

Die Teilung einer Zelle in zwei funktionstüchtige Tochterzellen setzt einen fehlerfreien Verlauf des Zellzyklus voraus. Um zu vermeiden, dass sich Fehler im Erbgut auf die Tochterzellen vererben, ist es für die Zelle wichtig, nur dann mit dem Zellzyklus fortzufahren, wenn sie keinen Schaden genommen hat. Hierfür stehen der Zelle in den verschiedenen Zellzyklusphasen Kontrollpunkte, so genannte Checkpoints, zur Verfügung [Hartwell und Weinert 1989, Hartwell und Kastan 1994, Nurse 1997, Paulovich *et al.* 1997]. Diese dienen unter anderem dazu DNS-Schäden, Replikationsfehler und Störungen bei der Ausbildung des Spindelapparates zu entdecken und zu beheben [Elledge 1996, Zhou und Elledge 2000, Nyberg *et al.* 2002]. Je nach Zeitpunkt und Art des Schadens im Zellzyklus wird eine Schadensantwort in der Zelle hervorgerufen (Kapitel 3.4.). Hierbei wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die dafür sorgt, dass die Zelle ihren Zyklus vorübergehend verlangsamt oder arretiert und Reparaturmechanismen angekurbelt werden [Hartwell und Weinert 1989]. Gelingt es der Zelle nicht, den aufgetreten Schaden zu beheben, organisiert sie ihren eigenen Zelltod und geht in Apoptose [King und Cidlowski 1998, Blagosklonny 1999, Guo und Hay 1999].

Die wichtigsten Kontrollpunkte der DNS-Schadensantwort sind der G1/S-Kontrollpunkt, der S-Phase-Kontrollpunkt und der G2/M-Kontrollpunkt [Zhou und Elledge 2000]. Die Vorgänge an diesen Kontrollpunkten nach einem DNS-Schaden sind so komplex, dass sie sich nicht auf einen Signalweg beschränken lassen. In den Kapiteln 3.4.1. und 3.4.2. werden einige Signalwege am G1/S-Kontrollpunkt und am G2/M-Kontrollpunkt, wie sie sich nach einem DNS-Schaden abspielen, näher betrachtet.

Ausfälle im Bereich der Kontrollpunkte führen zur Instabilität des Genoms und begünstigen die Krebsentstehung.

3.4. DNS-Schadensantwort Signalweg

Die Aktivierung und die Aufrechterhaltung der DNS-Schadensantwort werden durch mehrere Proteine ermöglicht. Je nach Aufgabe, die diese Proteine im Signalweg übernehmen, werden

sie als Sensoren, Transduktoren oder Effektoren bezeichnet [Zhou und Elledge 2000].

Die direkte und indirekte Erkennung des DNS-Schadens und die daraus resultierende Generierung der Schadensantwort erfolgen durch Sensorproteine. Häufig führen schädigende Agenzien nicht nur zu einem Schaden in der Zelle, es kommt viel mehr zur Aktivierung mehrerer Sensoren und damit zu Überschneidungen innerhalb der DNS-Schadensantwort. Welche Proteine tatsächlich als Sensoren fungieren, ist noch weitgehend unbekannt.

Bei den Transduktorproteinen handelt es sich meist um Proteinkinasen, die das von den Sensoren kommende Signal weiterleiten und verstärken können, indem sie ihnen untergeordnete Proteine phosphorylieren. Zu den Transduktoren werden zum Beispiel die beiden Phosphoinositol-3-kinase-ähnlichen Kinasen (PIKKs) ATM (ataxia telangiectasia mutated) und ATR (ATM-Rad3-related) und die ihnen nachgeschalteten Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 gezählt.

Im Rahmen der DNS-Schadensantwort wird ATM vorrangig durch Doppelstrangbrüche [Shiloh 2003], ATR durch Einzelstrangbrüche oder blockierte Replikationsgabeln aktiviert [Zhou und Elledge 2000, Nyberg *et al.* 2002]. Im Anschluss daran kommt es unter anderem zur Phosphorylierung und Aktivierung der nachgeschalteten Checkpointkinasen. Die Signaltransduktion auf Chk2 erfolgt hierbei vor allem durch ATM [Matsuoka *et al.* 1998, Matsuoka *et al.* 2000, Melchionna *et al.* 2000], die Phosphorylierung von Chk1 hauptsächlich durch ATR [Sanchez *et al.* 1997, Liu *et al.* 2000]. Es kann jedoch auch zu Überschneidungen dieser Signalwege kommen [Kastan und Lim 2000, Zhou und Elledge 2000]. ATM, ATR, Chk1 und Chk2 gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen.

Als Effektoren werden jene Proteine bezeichnet, die die Umsetzung des DNS-Schadens in eine adäquate Antwort im Zellzyklus bewirken. Ein sehr wichtiges Effektorprotein ist das Tumorsuppressorprotein p53. Mit seiner Fähigkeit nach einem DNS-Schaden den Zellzyklus zu regulieren und die Proliferation geschädigter Zellen zu verhindern, übernimmt p53 eine Art Wächterstellung im Zellzyklus. Sein Ausfall kann schwerwiegende Konsequenzen nach sich ziehen. Es ist daher verständlich, dass das p53-Gen eines der am häufigsten mutierten Gene in der Krebsentstehung beim Menschen ist.

Im intakten Zellzyklus ist p53 nicht aktiv. Durch Degradation wird das Proteinlevel von p53 solange niedrig gehalten, bis es zu einem Schaden an der DNS kommt. Dieser führt dazu, dass der Abbau von p53 gestoppt wird und das Protein in der Zelle akkumuliert [Morgan und Kastan 1997, Schwartz und Rotter 1998, Chaturvedi *et al.* 1999]. Im Anschluss daran fungiert p53 unter anderem als Transkriptionsfaktor in der Zelle und bewirkt damit, dass der Zellzyklus entweder bis zum Beheben des Schadens verlangsamt oder angehalten wird, die Zelle in Seneszenz (permanenter Zellarrest) geht oder ihren programmierten Zelltod (Apoptose)

induziert [Levine 1997, Prives und Hall 1999].

3.4.1. G1/S-Kontrollpunkt

Nach einem DNS-Schaden kommt es am G1/S-Kontrollpunkt zu einer zweiphasigen Schadensantwort, bestehend aus einer schnellen, vorübergehenden, p53 unabhängigen und einer verzögerten, anhaltenden, p53 abhängigen Schadensantwort [Bartek und Lukas 2001 a, Bartek und Lukas 2001 b] (Abb. 3.3.).

Bei der p53 unabhängigen DNS-Schadensantwort phosphoryliert ATM Chk2 am Threoninrest 68 und ATR Chk1 an den Serinresten an Position 317 und 345 [Costanzo *et al.* 2000, Zhou und Elledge 2000, Abraham 2001, Falck *et al.* 2001, Shiloh 2001, Nyberg *et al.* 2002]. Die durch die Phosphorylierung aktivierten Checkpointkinasen phosphorylieren ihrerseits die Phosphatase Cdc25A, die hierdurch für ihren Abbau über den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg markiert wird [Mailand *et al.* 2000, Falck *et al.* 2001]. Im ungeschädigten Zellzyklus aktiviert Cdc25A den CyclinE/Cdk2-Komplex durch Dephosphorylierung am Threoninrest 14 und Tyrosinrest 15 und ermöglicht der Zelle damit den Übergang von der G1- in die S-Phase. Durch den Abbau von Cdc25A bleibt die inhibierende Phosphorylierung des CyclinE/Cdk2-Komplexes erhalten und die Zelle arretiert in der G1-Phase [Bartek und Lukas 2001 b].

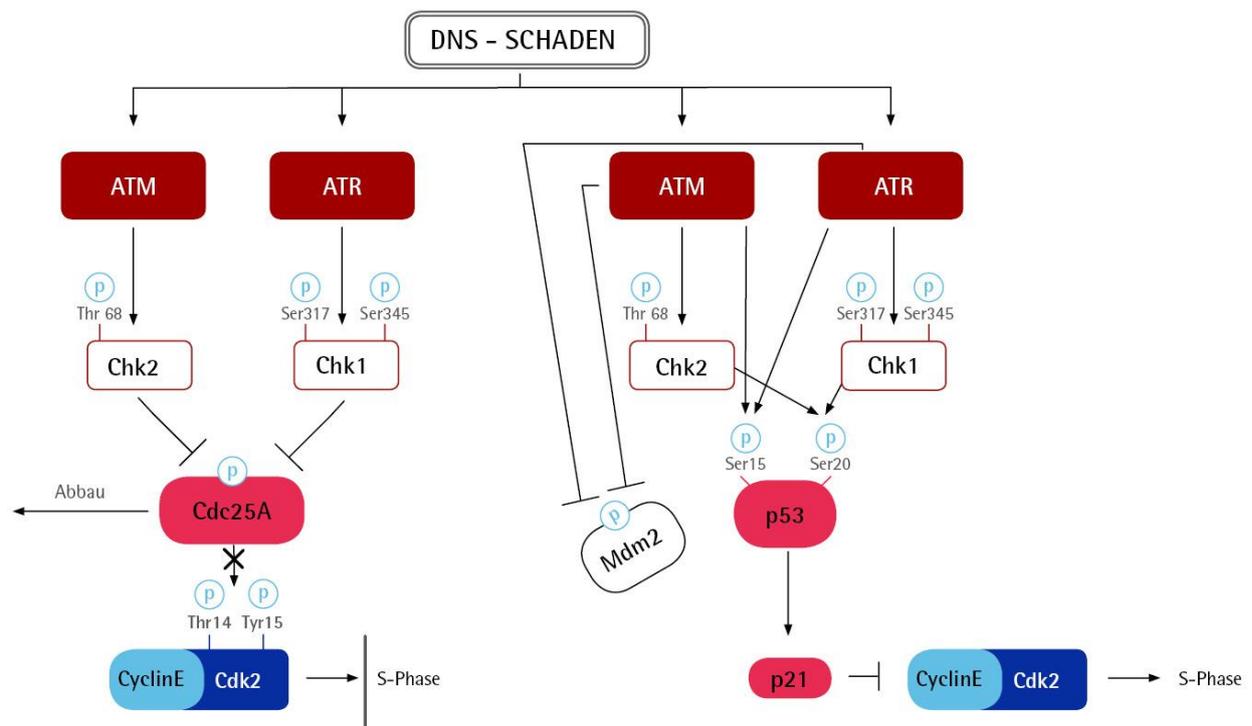


Abb. 3.3.: G1/S-Kontrollpunkt

Schematische Darstellung einzelner Vorgänge am G1/S-Kontrollpunkt nach DNS-Schädigung.

Im parallel verlaufenden p53 abhängigen Signalweg wird p53 durch Chk2 und Chk1 am

Serinrest 20 phosphoryliert. Dies führt dazu, dass p53 von der Ubiquitin-Ligase Mdm2 dissoziiert, somit nicht mehr zum Abbau markiert ist und in der Zelle akkumuliert [Chehab *et al.* 2000, Hirao *et al.* 2000]. p53 wird zusätzlich stabilisiert, indem Mdm2 daran gehindert wird, p53 aus dem Zellkern zu schleusen. Dies geschieht über direkte Phosphorylierung der Ubiquitin-Ligase durch ATM und ATR [Maya *et al.* 2001, Khosravi *et al.* 1999]. Des Weiteren wird p53 durch ATM und ATR am Serinrest 15 phosphoryliert [Shieh *et al.* 1997, Siliciano *et al.* 1997] und in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor aktiviert [Dumaz und Meek 1999]. Das so in der Zelle aktivierte und angereicherte p53 stimuliert unter anderem die Expression des Cyclin abhängigen Kinase-Inhibitors p21 [Kastan und Bartek 2004]. Dieser bewirkt durch Bindung an den CyclinE/Cdk2-Komplex dessen Inaktivierung und damit einen Zellzyklusarrest [Kuerbitz *et al.* 1992, Dulić *et al.* 1994, Adams *et al.* 1996].

3.4.2. G2/M-Kontrollpunkt

Ein entscheidendes Ereignis für den Eintritt der Zelle in die Mitose ist die Aktivierung des CyclinB/Cdk1-Komplexes durch Entfernung inhibierender Phosphorylierungen von Cdk1 [Nurse 1990]. Die Phosphorylierung der Aminosäurereste der Cdk-Untereinheit erfolgt durch die Kinasen Wee1 (Threonin 14) und Myt1 (Threonin 14 und Tyrosin 15) [Parker und Piwnicka-Worms 1992, Booher *et al.* 1997, Liu *et al.* 1997], die Dephosphorylierung hauptsächlich durch die Phosphatase Cdc25C.

Nach einem DNS-Schaden wird Cdc25C von den durch ATM und ATR aktivierten Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 phosphoryliert [Peng *et al.* 1997, Sanchez *et al.* 1997, Matsuoka *et al.* 1998, Guo *et al.* 2000, Zhou *et al.* 2000, Lopez-Girona *et al.* 2001]. Hierdurch entsteht eine Bindungsstelle für die Familie der 14-3-3 Proteine, die dafür sorgen, dass Cdc25C aus dem Zellkern geschleust wird und im Zytoplasma verbleibt [Peng *et al.* 1997, Lopez-Girona *et al.* 1999]. Die Inaktivierung von Cdc25C bewirkt, dass die inhibierenden Phosphorylierungen von Cdk1 aufrechterhalten werden, der CyclinB/Cdk1-Komplex also inaktiv ist [Sanchez *et al.* 1997] und die Mitose nicht eingeleitet wird [Blasina *et al.* 1999, Raleigh und O'Connell 2000]. Einen ergänzenden Einfluss auf die Aufrechterhaltung der inhibierenden Phosphorylierungen und des Zellzyklusarrests werden den Phosphatasen Cdc25A und Cdc25B zugeschrieben [Zhao *et al.* 2002, Xiao *et al.* 2003, Boutros *et al.* 2006].

Eine zusätzliche Inhibierung des Eintritts der Zelle in die Mitose soll durch direkte Phosphorylierung von Wee1 durch Chk1 gewährleistet sein [O'Connell *et al.* 1997]. Diese Phosphorylierung verstärkt die inhibitorische Aktivität von Wee1 gegenüber der Cdk-Untereinheit [Raleigh und O'Connell 2000].

Für die Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrestes scheinen p53 und einige von ihm aktivierte Proteine eine entscheidende Rolle zu spielen [Bunz *et al.* 1998, Taylor und Stark 2001]. Durch direkte Bindung an den CyclinB/Cdk1-Komplex und Blockierung der für eine aktivierende Phosphorylierung zuständigen Position der Cdk-Untereinheit am Threoninrest 161, verhindert p21 die Aktivität des CyclinB/Cdk1-Komplexes [Smits *et al.* 2000, Li und Blow 2001]. Ebenfalls zu einer Inaktivierung des CyclinB/Cdk1-Komplexes kommt es durch die Bindung von Gadd45 und die damit verbundene Dissoziation des Komplexes [Zhan *et al.* 1999]. Mit seiner Fähigkeit den CyclinB/Cdk1-Komplex im Zytoplasma zurückzuhalten und damit seine Aktivierung im Zellkern zu unterbinden, unterstützt 14-3-3 σ nach Aktivierung durch p53 den Verbleib der Zelle im Zellzyklusarrest [Taylor und Stark 2001] (Abb. 3.4.).

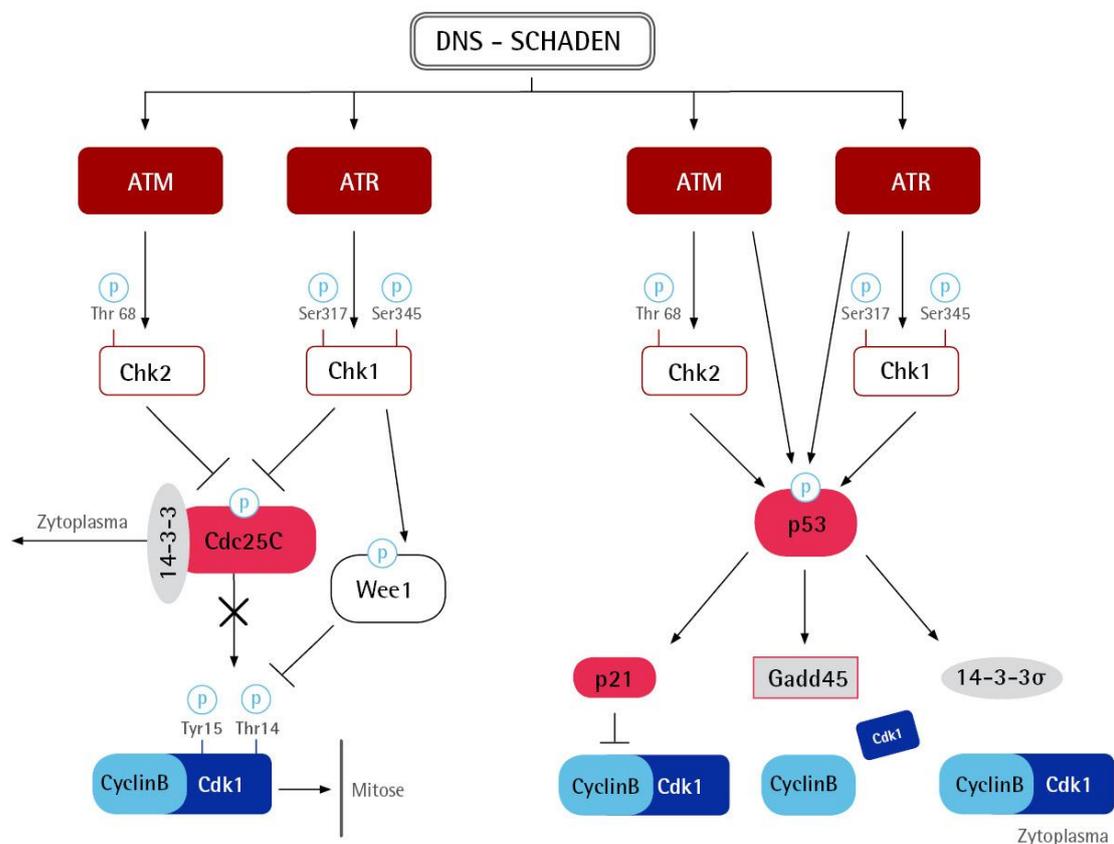


Abb. 3.4.: G2/M-Kontrollpunkt

Schematische Darstellung einzelner Vorgänge am G2/M-Kontrollpunkt nach DNS-Schädigung.

3.5. NIPA

Hauptgegenstand dieser Arbeit ist NIPA (nuclear interacting partner of ALK (anaplastic lymphoma kinase)), ein im Zellkern lokalisiertes, 60kDa großes Protein. Es besteht aus 502 Aminosäuren, die von einem 10 Exons umfassenden Gen kodiert werden. Seine Entdeckung gelang erstmals in einem Yeast-Two-Hybrid Screen mithilfe von NPM-ALK, einer onkogenen Tyrosinkinase als bait [Ouyang *et al.* 2003]. Neben anderen ALK-Fusionsproteinen ist NPM-

ALK entscheidend für die Lymphomentstehung bei einem Subtyp der Non-Hodgkin-Lymphome, dem Anaplastischen Großzelligen Lymphom, verantwortlich [Morris *et al.* 1994].

NIPA wird in verschiedenen Geweben exprimiert, seine Expression ist jedoch im Herz, im Skelettmuskel und im Hoden am größten. Während NIPA in der G1-Phase und auch in der Ruhephase des Zellzyklus (G0) nur schwach exprimiert wird, steigt die Expression von NIPA während der Synthesephase und der G2-Phase physiologischer Weise an [Bassermann *et al.* 2005].

Das Wissen über den Aufbau des NIPA-Gens trägt wesentlich zum Verständnis von NIPA bei. Im C-Terminus des Gens, im Bereich der Aminosäuren 396-402, befindet sich eine charakteristische nukleäre Transportsequenz (NLS – nuclear localization sequence), die für die Lokalisation von NIPA im Zellkern sorgt [Ouyang *et al.* 2003].

Im N-Terminus weist NIPA an den Aminosäuren 170-210 eine F-Box-ähnliche Domäne auf [Bassermann *et al.* 2005]. F-Box Proteine sind als ein Bestandteil des SCF-Komplexes an der Ausbildung der E3 Ubiquitin-Ligasen vom SCF-Typ beteiligt, die durch Ubiquitinierung verschiedener Substrate deren Abbau fördern. Der Kernkomplex (Skp1, Cul1, Roc1) des SCF-Komplexes ist bei den verschiedenen E3 Ubiquitin-Ligasen vom SCF1-Typ gleich aufgebaut, die variable Komponente stellen die verschiedenen F-Box Proteine dar [Bai *et al.* 1996]. Zum einen sorgt das F-Box Protein durch die Bindung seiner F-Box Domäne an Skp1 für eine Aktivierung der Ubiquitin-Ligase, zum anderen ist es über eine Proteininteraktionsdomäne für die Substraterkennung zuständig [Cardozo und Pagano 2004]. Im Falle von NIPA fällt die Sequenz für die Substratbindung von CyclinB1 in den Bereich der Aminosäuren 352-402. Die ebenfalls in diesen Bereich fallende nukleäre Transportsequenz (NLS) sorgt dafür, dass NIPA sein Substrat nur umsetzt, wenn es korrekt im Zellkern lokalisiert ist [Bassermann *et al.* 2007].

Ein wichtiges Substrat des SCF^{NIPA}-Komplexes ist das nukleäre CyclinB1, welches die regulatorische Untereinheit des CyclinB/Cdk1-Komplexes darstellt, der wie in Kapitel 3.4.2. beschrieben, nach seiner Aktivierung entscheidend für den Beginn der Mitose verantwortlich ist. Während der Interphase sorgt der aktive SCF^{NIPA}-Komplex für den Abbau von nukleärem CyclinB1 und verhindert damit die für den Mitoseeintritt wichtige Bindung an die Cdk-Untereinheit. Ein Verlust von NIPA führt zu einem verfrühten Eintritt der Zelle in die Mitose [Bassermann *et al.* 2005].

Im ungestörten Zellzyklus wird NIPA am G2/M-Übergang phosphoryliert. Es konnten bisher drei Phosphorylierungsstellen von NIPA identifiziert werden, die maßgeblich an der Regulierung von NIPA und seiner Phosphorylierung am Übergang von der G2-Phase zur Mitose beteiligt sind (Ser 354, Ser 359 und Ser 395) [Bassermann *et al.* 2007]. Initial kommt es zur Phosphorylierung von NIPA an den Serinresten 354 und 359. Phosphorylierung von NIPA an

Ser 354 am Übergang zur Mitose wird im ungestörten Zellzyklus durch die Serin-/Threoninkinase Erk2 vermittelt [Zech, Manuskript in Vorbereitung]. Wie auch andere Phosphorylierungen sorgt die Phosphorylierung an Ser 354 dafür, dass NIPA vom SCF-Komplex dissoziiert und dieser seine Ubiquitin-Ligase Aktivität verliert. Hierdurch wird CyclinB1 nicht mehr gebunden und sein Abbau gestoppt. Als Folge kann CyclinB1 im Zellkern akkumulieren, die Cdk-Untereinheit aktivieren und damit die Mitose einleiten [Bassermann *et al.* 2005]. Der aktive CyclinB/Cdk1-Komplex phosphoryliert seinerseits NIPA an Ser 395. Dies führt zur Aufrechterhaltung der Dissoziation von NIPA vom SCF-Kernkomplex und der Inaktivierung der Ubiquitin-Ligase [Bassermann *et al.* 2007].

Ergänzend dazu zeigen Ergebnisse aus Arbeiten dieses Labors, dass NIPA nicht nur im ungestörten Zellzyklus phosphoryliert wird, sondern dass auch Bestrahlung mit UV-Licht eine Phosphorylierung von NIPA bewirkt. Diese Phosphorylierung von NIPA nach UV-Bestrahlung ist phasenabhängig differenziert zu bewerten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von NIPA in der G1-Phase zur Degradation des Proteins führt, während es in der S-Phase und der G2-Phase zur Akkumulation der phosphorylierten Form kommt [von Klitzing, Manuskript in Vorbereitung].

Ein weiteres Merkmal des NIPA-Proteins sind die im C-Terminus und im N-Terminus gelegenen Zink-Bindungsdomänen ZC3HC1 [Kokoszynska *et al.* 2008]. Durch koordinative Bindung eines Zink-Ions und die dadurch bedingte Strukturänderung des Peptides, können an derartigen Zink-Bindungsdomänen so genannte Zinkfinger entstehen. Zinkfinger spielen unter anderem eine Rolle im Rahmen von Interaktionen mit der DNS, der RNS, Proteinen oder Lipiden [Klug 1999, Matthews und Sunde 2002, Brown 2005, Gamsjaeger *et al.* 2007]. Die Zink-Bindungsdomänen in NIPA weisen eine strukturelle Ähnlichkeit mit BIR-Domänen (Baculovirus of apoptosis repeat) auf. Dies sind Motive, die vor allem in Proteinen gefunden werden, die die Apoptose inhibieren (IAPs – inhibitors of apoptosis). Der BIR-Domäne in NIPA wird jedoch eine zu der in den antiapoptotischen Proteinen unterschiedliche und noch unbekannt Funktion zugeschrieben [Kokoszynska *et al.* 2008].

3.6. Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, das Wissen über NIPA ergänzend zu seiner entscheidenden Funktion im ungestörten Zellzyklus zu erweitern und seine Rolle nach DNS-Schädigung zu erforschen.

Zunächst sollte untersucht werden, ob NIPA nach DNS-Schädigung phosphoryliert würde. Erste Versuche mit UV-Bestrahlung konnten zeigen, dass diese Form der DNS-Schädigung zu einem Shift von NIPA im Western Blot führt. Dieses Wissen zog die Frage nach sich, ob es sich bei diesem Shift um Phosphorylierung handelt und ob andere schädigende Agenzien ebenfalls die

Phosphorylierung von NIPA induzieren würden und an welcher Position in der Aminosäureabfolge NIPA nach Zellschädigung phosphoryliert werde. Neuste Ergebnisse dieses Labors geben Aufschluss darüber, welche Proteinkinase für die Phosphorylierung von NIPA am G2/M-Übergang entscheidend ist. Diese und weitere wichtige Kinasen in der DNS-Schadensantwort sollten deshalb im Anschluss daran auf eine mögliche Zuständigkeit für die Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung hin untersucht werden.

Mithilfe des Vergleichs NIPA-exprimierender und NIPA-defizienter Zellen sollte erarbeitet werden, welche Rolle NIPA für das Überleben der Zelle spiele. Die wichtige Bedeutung von NIPA am G2/M-Übergang im ungestörten Zellzyklus ließ die Annahme zu, dass NIPA auch nach Zellschädigung eine Rolle im Zellzyklus übernehmen und als Kontrollpunktprotein fungieren könne. Daher sollte auch dieser Aspekt näher betrachtet werden.

Aus dem Wissen über die im Protein vorhandenen Zink-Bindedomänen ergab sich schließlich die Frage, ob NIPA eventuell eine direkte Bindung mit der DNS eingehen und damit in die Vorgänge der Zelle nach einem DNS-Schaden eingreifen könne.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Antikörper

Anti- β -Aktin (AC-15), monoklonal, Maus IgG ₁	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-CyclinE1 (HE12), monoklonal, Maus IgG _{2b}	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Erk, p44/p42 MAP Kinase, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Anti-Flag M2, monoklonal, Maus IgG	Sigma-Aldrich, München
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, München
Anti-Kaninchen, Ziege IgG-FITC	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, München
Anti-p53 (CM5), polyklonal, Kaninchen IgG	Novo Castra, Newcastle, UK
Anti-p-Chk1 (S317), polyklonal, Kaninchen IgG	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-p-Erk, p44/p42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204), polyklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Anti-Phospho-Histon H3, polyklonal, Kaninchen IgG	Upstate, Lake Placid, USA
Anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert, Affe IgG,	Santa Cruz, Heidelberg

4.1.2. Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cisplatin	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Doxorubicin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 1 %	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
Etoposid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Fluka, Deisenhofen
Glycerol-2-phosphat	Aldrich Ch. Comp., Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka-Chemie, Deisenhofen
Natriumdextransulfat	Farmacia, Freiburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phosphat buffered saline (PBS), 10fach, fest	Biochrom AG, Berlin
Phosphatase, sweet potatoe	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidiumiodid 95 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal™ Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, Deisenhofen

Thymidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen

4.1.3. DNS-Polymerasen

Pfu-DNS Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNS Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.4. Inhibitoren

U0126 (MEK1/2 Inhibitor)	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Caffeine	Calbiochem, Darmstadt

4.1.5. Medien und Supplemente für die Zellkultur

D10	DMEM 10 % FCS 2 % Penicillin/Streptomycin
D10 ohne Penicillin/Streptomycin (D 10 ohne Pen/Strep)	DMEM 10 % FCS
D10 + Zeocin	DMEM 10 % FCS 2 % Penicillin/Streptomycin 250 µg/ml Zeocin
Einfriermedium	50 % D10 40 % FCS 10 % DMSO

DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Diphtherietoxin	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
Hygromycin B, 50 mg/ml in PBS	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM® I, serumreduziertes Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phosphat buffered saline (PBS), 10fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Puromycin	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung, 10fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zeocin, 100 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

4.1.6. Molekularbiologische Kitsysteme

DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
-------------------	----------------

4.1.7. Molekulargewichtsmarker für DNS und Proteine

DNS-Lademarker 1 kb (Gene Ruler™), 0,5 µg/ml	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Lademarker (Page Ruler™ Prestained)	Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.8. Oligonukleotide

4.1.8.1. siRNAs

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Moleküle wurden bei der Firma Proligo (Paris) bestellt. Hierbei handelt es sich um synthetisch hergestellte, 21 Nukleotide lange doppelsträngige RNS Moleküle mit einzelsträngigen dTdT-Überhängen an den 3'-Enden.

Zielsequenzen:

Luziferase (Kontroll-siRNA)	CGUACGCGGAAUACUUCGA [Muratovska und Eccles 2004]
NIPA	GTCCACGTCACCTGCCTGTA [Bassermann <i>et al.</i> 2005]

4.1.8.2. Primer für die PCR

Die verwendeten Primer wurden bei der Firma MWG in Ebersberg in Auftrag gegeben. Nähere Angaben über die in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen (Primer C, G und J2) können der Arbeit von Illert *et al.* (bisher unveröffentlichte Daten) entnommen werden.

4.1.9. Standardgeräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Kodak, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
Cäsium137 Strahlenquelle (33300 GBq)	Buchler GmbH, Braunschweig
CO ₂ -Inkubator SW J 500 TV BB	Nunc, Wiesbaden
Digitalwaage LC 1200 S	Satorius, Göttingen

Durchflusszytometer (EPICS ® XL)	Beckman-Coulter, Krefeld
Entwickler Hyperprocessor	Amersham, Braunschweig
Falcon™ Zellsiebe	Becton-Dickinson, Heidelberg
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
IBI geneZapper 450/2500 Elektroporator	Eastman Kodak, New Haven
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Magnetrührgerät IKAMG RH	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroskop V 200	Hund, Wetzlar
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter Φ32	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova WT 12	New Brunswick Scientific. USA Schüttler
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Biometra, Göttingen
Stromgenerator, Powerpack P25	Holten, Gydewang, Dänemark
Tischzentrifuge 5417R	Biometra, Göttingen
Transphor Electrophoresis Unit	Eppendorf, Hamburg
Trio-Thermoblock	Hoefer, San Fransisco, USA
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
UV-Stratalinker (UVC 254 nm)	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Stratagene, Kalifornien, USA
Varioklav Dampfsterilisator	Heidolph, Nürnberg
Wasserbad 1083	H+P Labortechnik
Zentrifuge GS-6K	GFL, Burgwedel
	Beckman, Fullerton, USA

4.1.10. Standardlösungen und Puffer

Amidoschwarz-Entfärbelösung	80 % aqua dest. 10 % Methanol 10 % Essigsäure
Crystal-Violett-Färbelösung	0,5 % Crystal violett in 25 % EtOH
DNS-Probenpuffer (5fach)	30 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau

	0,1 M EDTA pH 8 in aqua dest.
Lysispuffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 130 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7) 1 mM Natriumorthovanadat 20 mM NaF 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Proteaseinhibitor Cocktail Tablette in 10 ml aqua dest.
Phosphatase-Puffer	40 mM PIPES pH 6 1 mM DTT 1 mM MnCl ₂ 100 µg/ml BSA 50 µM Leupeptin in aqua dest.
Puffer A	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,34 M Sucrose 10 % Glycerol 1 mM DTT 10 mM NaF 1 mM Na ₂ VO ₃ ½ Proteaseinhibitor Cocktail Tablette in aqua dest.
Puffer B	3 mM EDTA 0,2 mM EGTA 1 mM DTT ½ Proteaseinhibitor Cocktail Tablette in aqua dest.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4fach)	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4 % SDS in aqua dest.
SDS-Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS in aqua dest.
SDS-Ladepuffer (2fach)	1 M Tris/HCl (pH 6,8) 200 mM DTT 4 % SDS 0,2 % Bromphenolblau 20 % Glycin in aqua dest.

TAE-Puffer (10fach)	0,4 M Tris 1,1 % Essigsäure 2 % 0,5 M EDTA (pH 8) in aqua dest.
TNE-Puffer	10 mM Tris (pH 8) 100 mM NaCl 1 mM EDTA
TNN-Puffer	5fach TNN 1 M DTT PMSF Benzamidin IAA in aqua dest.
TNN (5fach)	250 mM Tris 1,25 M NaCl 25 mM EDTA pH 8 2,5 % NP-40
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol in aqua dest.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4fach)	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4 % SDS in aqua dest.

4.1.11. Vektoren und DNS-Konstrukte

pLMP	Open Biosystems, BioCat, Heidelberg
pcDNA 3.1 Zeo (+)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Flag-NIPA wt in pcDNA 3.1/Zeo	[Ouyang <i>et al.</i> 2003]
Flag-NIPA S354A in pcDNA 3.1/Zeo	[Bassermann <i>et al.</i> 2005]
p53	pLMP-p53.1224 [Dickins <i>et al.</i> 2005]
Erk1-miRNA	[Zech, Manuskript in Vorbereitung]
Erk2-miRNA	[Zech, Manuskript in Vorbereitung]
nonSilencing (Kontroll-miRNA)	[Zech, Manuskript in Vorbereitung]

4.1.12. Zelllinien

D1	NIH/3T3-Zellen, die stabil Flag-NIPA wt exprimieren [Bassermann <i>et al.</i> 2005]
MEFs NIPA +/+	immortalisierte murine embryonale Fibroblasten, Wildtyp
MEFs NIPA -/-	immortalisierte murine embryonale Fibroblasten, Knockout

NIH/3T3	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie
U2OS	humane Osteosarkom-Zelllinie, die endogen NIPA exprimiert
primäre MEFs	murine embryonale Fibroblasten
ΦNX-Eco (Phoenix E)	retrovirale ecotrope Verpackungs-Zelllinie (Helfervirus-frei); 293T (humane embryonale Nierenkarzinom) Zellen, stabil transfiziert mit Moloney <i>GagPol-IRES-Lyt2</i> Konstrukt unter der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promotors (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney <i>ecotropic envelope</i> Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promotors (Selektion mit Diphtherietoxin)

Die U2OS- und die NIH/3T3-Zelllinie wurde von der DSMZ, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich menschliche und tierische Zellkulturen) in Braunschweig bezogen, die Verpackungs-Zelllinie Phoenix E von Gary P. Nolan, Stanford, USA. Die D1-Zellen wurden in diesem Labor von F. Bassermann, die immortalisierten MEF-Zelllinien von A. L. Illert aus dem Mausstamm C57BL/6 NIPA^{wildtyp/ko} und die primären Mausembryofibroblasten eigenständig generiert.

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkultur und molekularbiologische Methoden

4.2.1.1. Primäre Mausembryofibroblasten (MEFs) generieren

Primäre Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Eigenschaften ihres Ursprungsgewebes besitzen. Somit kann man *in vitro* die *in vivo* ablaufenden Reaktionen nachvollziehen. Da die Zellen jedoch sterben, sobald sie aus ihrem Gewebeverband gerissen werden und man die Bedingungen, wie sie *in vivo* vorliegen nur teilweise *in vitro* nachahmen kann, lassen sich primäre Zellen lediglich für kurze Zeit kultivieren.

4.2.1.1.1. Gewinnung von Embryonen

Für die Gewinnung der Embryonen wurden heterozygote Mäuse für NIPA über drei Tage verpaart. 12 Tage nach der Verpaarung wurde das trüchtige Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und der Uterus chirurgisch entnommen. Anschließend wurden die Embryonen aus Uterus und Amnionhöhle herauspräpariert und in eine Petrischale mit 1fach PBS überführt.

Das Abtrennen und Überführen der Köpfe in je 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen erfolgte unter der Sterilbank. Die Köpfe dienten, wie in Kapitel 4.2.1.1.2. beschrieben, der Genotypisierung der Embryonen. Aus den übrigen Körpern wurden die blutreichen Organe wie Herz, Leber und Milz entfernt, um die Zielzellkultur frei von nicht adhärenen Blutzellen (Suspensionszellen) zu halten. Das restliche Gewebe wurde zerkleinert und in sterile Kolben mit Glaskugeln (3 mm \varnothing) überführt. Anschließend wurde jedem Embryo 5 ml einer 0,25%igen Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Kolben 15 min bei 37 °C mit 180 rpm geschüttelt.

Der nächste Schritt beinhaltete die Resuspension des Gewebes in 5 ml D10 Medium (genauere Angaben zu den verwendeten Medien in Kapitel 4.1.5.) und die Überführung in Falcon-Röhrchen. Diese wurden 4 min bei RT mit 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zum Vereinzeln der Zellen wurde das nach dem Absaugen entstandene Zellpellet in 10 ml D10 Medium aufgenommen und durch ein Mikrozellsieb (100 μm) in ein neues Falcon-Röhrchen gepresst. Danach konnten die Zellen auf einer 10 cm \varnothing Petrischale ausplattiert werden (Zellen sehr kleiner Embryonen wurden auf einer 6 cm \varnothing Petrischale ausplattiert).

Primäre MEFs können ungefähr bis Passage zehn kultiviert werden, bevor sie ihr Wachstum einstellen oder sich durch Mutationen so verändern, dass sie ihren Ursprungscharakter verlieren.

4.2.1.1.2. Genotypisierung

4.2.1.1.2.1. DNS Aufreinigung

Für die Genotypisierung wurde die DNS aus den abgetrennten Köpfen isoliert und mithilfe des DNeasy Tissue Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Die so aufgereinigte DNS ist zur Weiterverarbeitung bereit und kann bei 4 °C gelagert werden.

4.2.1.1.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR, die Polymerasekettenreaktion, imitiert das natürliche Prinzip der DNS-Replikation und dient der quantitativen Vervielfältigung von DNS-Abschnitten *in vitro* [Mullis *et al.* 1986]. Mit dieser Methode kann von kleinsten Mengen an Erbgut eine identische Kopie des zu untersuchenden Merkmals erstellt werden. In der Praxis macht man sich die PCR zum Beispiel zum Nachweis von Infektionserregern, zur Erkennung von Erbkrankheiten oder zum Nachweis der Vaterschaft zunutze. In dieser Arbeit wurde die PCR für die Genotypisierung von Mäusen verwendet. Das Prinzip der PCR besteht aus drei sich wiederholenden Schritten: Denaturierung, Primeranlagerung (Annealing), Verlängerung (Elongation). Die Denaturierung der DNS bei 90 °C – 95 °C führt dazu, dass aus doppelsträngiger DNS Einzelstrangmoleküle entstehen. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 55 °C – 60 °C lagern sich an die Einzelstränge gegenläufig orientierte Oligonukleotidsequenzen (Primer) an, die als Startmoleküle für die Amplifizierung der DNS dienen. Die Verlängerung dieser Startsequenz erfolgt bei 72 °C durch Anbau komplementärer Desoxynukleotide an die einzelsträngige DNS. Die in diesem ersten Zyklus entstandenen Doppelstränge dienen in den sich anschließenden Zyklen als Matrize und tragen damit zur exponentiellen Amplifizierung der durch die Primer markierten Sequenz bei.

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden zwei verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt. Für die PCR 250 und die PCR 278 wurden je 1,5 µl der aufgereinigten DNS in PCR-Röhrchen vorgelegt. Als Positivkontrolle diente DNS eines Wildtyps für NIPA, als Negativkontrolle DNS eines Knockouts für NIPA und als Leerwert der AE-Puffer (Elutions-Puffer) aus dem DNeasy Tissue Kit.

Der Mastermix für die beiden PCR-Ansätze setzte sich wie folgt zusammen:

- PCR 250 (Angaben für 1 Probe)
 - 5 µl Taq-Puffer
 - 1 µl 10 mM dNTPs
 - 3 µl 25 mM MgCl₂
 - 1 µl Primer G
 - 1 µl Primer J2

- 1,5 µl Taq-Polymerase (zuletzt hinzufügen)
- 36 µl aqua dest.
- PCR 278 (Angaben für 1 Probe)
 - 5 µl Taq-Puffer
 - 1 µl 10 mM dNTPs
 - 3 µl 25 mM MgCl₂
 - 1 µl Primer C
 - 1 µl Primer J2
 - 1,5 µl Taq-Polymerase (zuletzt hinzufügen)
 - 36 µl aqua dest.

Auf die Proben des einen Ansatzes wurden je 50 µl des Mastermixes für die PCR 250, auf die des anderen 50 µl des Mastermixes für die PCR 278 pipettiert. Anschließend erfolgte die PCR nach folgendem Schema:

- PCR 250

94 °C	2 min		
94 °C	30 s	}	9 Zyklen
65 °C – 56 °C	30 s		
72 °C	30 s		
94 °C	30 s		
55 °C	30 s	}	30 Zyklen
72 °C	30 s		
auf 4 °C herabkühlen			

- PCR 278

94 °C	2 min		
94 °C	30 s	}	30 Zyklen
57 °C	30 s		
68 °C	30 s		
auf 4 °C herabkühlen			

4.2.1.1.2.3. Elektrophoretische Auftrennung der DNS in Agarosegelen

Zum Analysieren der PCR werden die amplifizierten DNS-Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen und dann ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Größenauftrennung erfolgt mithilfe einer Netzstruktur, die die Agarose beim Aushärten innerhalb des Gels bildet. Die aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladenen DNS-Fragmente werden nach Anlegen einer Spannung durch die Gelmatrix in Richtung der Anode gezogen. Größere Fragmente laufen langsamer als kleine Fragmente. Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, welcher

sich in die DNS einlagert, können die DNS-Fragmente anschließend im UV-Licht sichtbar gemacht werden und zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse herangezogen werden.

Für die Auftrennung wurden 2%ige Agarosegele gegossen. Hierfür mussten 8 g Agarose in 400 ml TAE-Puffer durch Erhitzen zum vollständigen Auflösen gebracht werden. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beigemischt und das Gel mit taschenförmigen Aussparungen zum Auftragen der Proben gegossen und zum Aushärten gebracht.

Nach Zugabe eines Tropfens 5fach DNS-Ladepuffers zu der PCR-Reaktion schloss sich das Beladen des Gels mit den Proben an. Der Ladepuffer erhöht die Dichte der DNS-Lösung und sorgt damit für das zügige Absinken der Proben in die Taschen. Zur Größenbestimmung der DNS-Fragmente wurde parallel ein 1 kb DNS-Lademarker aufgetragen und das Gel anschließend bei einer konstanten Spannung von 140 V in einer Kammer mit TAE-Puffer laufen gelassen. Die Banden der Nukleinsäuremoleküle konnten zuletzt unter UV-Licht der Wellenlänge 320 nm sichtbar gemacht und mittels Foto festgehalten werden.

4.2.1.1.2.4. Auswertung des Genotyps

Detaillierte Angaben über das Wildtyp- und Knockout-Allel von NIPA, sowie die für die Genotypisierung wichtigen bei der PCR verwendeten Primer können der Arbeit Illert *et al.* (bisher unveröffentlichte Daten) entnommen werden.

Mithilfe beider PCRs lässt sich der Genotyp wie folgt bestimmen:

Wildtyp (wt): Bande in PCR 250, keine Bande in PCR 278

Knockout (ko): keine Bande in PCR 250, Bande in PCR 278

Heterozygoter: je eine Bande in PCR 250 und 278

4.2.1.2. Zellkultur

4.2.1.2.1. Kultivieren von Zellen

4.2.1.2.1.1. Primäre Mausembryofibroblasten

Nach dem ersten Mal Ausplattieren primärer MEFs wird solange gewartet, bis die Zellen adhärent geworden sind, danach erfolgt ein Mediumwechsel, um Zelldebris zu entfernen. Ab diesem Zeitpunkt müssen die Zellen täglich beobachtet werden. Primäre MEFs wachsen nur, wenn sie nicht zu dünn ausplattiert werden und immer noch in Kontakt zu Nachbarzellen stehen. Daher wird mit dem Umsetzen so lange gewartet, bis die Platte ganz dicht bewachsen ist (100 % Konfluenz). Die Zellen sollten maximal in einem Verhältnis 1:2 bis 1:3 umgesetzt werden, damit sie optimal weiter wachsen können.

Zum Ablösen der Zellen wurden die Platten zunächst 1 x mit 1fach PBS gewaschen und dann für einige Minuten in einer 2,5fachen Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Dieser Vorgang wurde durch vorsichtiges Abklopfen unterstützt. Sobald sich die Zellen gelöst hatten, wurden sie in ausreichend Medium sehr gründlich resuspendiert, damit sich die Zellen vereinzeln und dann auf neue Platten überführt. Die Zugabe des Mediums ist wichtig, damit die lysierende Wirkung des Trypsins gestoppt wird.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank. Primäre MEFs können bis etwa Passage zehn gehalten werden, bevor sich die Zellen in ihrem Verhalten ändern.

4.2.1.2.1.2. Übrige Zelllinien

Es sollte darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht zu dicht werden und anfangen, übereinander zu wachsen. Daher sollten die Zellen bei maximal 90 % Konfluenz großzügig in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 je nach Wachstumsgeschwindigkeit umgesetzt werden.

Das Umsetzen der Zellen und ihre Kultivierung im Brutschrank erfolgten wie bei den primären MEFs in Kapitel 4.2.1.2.1.1. beschrieben.

4.2.1.2.2. Auszählen von Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0,5%igen Trypanblaulösung gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Hierauf folgte das Auszählen viabler ungefärbter Zellen aus 2x16 Feldern unter dem Mikroskop. Die Anzahl viabler Zellen pro ml errechnete sich aus der Zahl der gezählten Zellen mit dem Faktor 10⁴ multipliziert.

4.2.1.2.3. Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren ermöglicht die dauerhafte Lagerung und spätere Weiterkultivierung der Zellen. Das Medium der trypsinisierten Zellen wurde nach zweiminütigem Zentrifugieren mit 1.300 rpm bei RT entfernt und die Zellen in Medium und Einfriermedium (Verhältnis 1:1) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Nach schonendem Runterkühlen der Zellen bei -80 °C in Isopropanol schloss sich 24 h später die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff an.

4.2.1.2.4. Auftauen von Zellen

Die Zellen in den Kryoröhrchen wurden in der Hand aufgetaut und die Zellsuspension in 15 ml-Falcon-Röhrchen mit 10 ml vorgelegtem Medium pipettiert. Anschließend wurden die Zellen 3 min bei RT mit 1.300 rpm abzentrifugiert und nach Absaugen des Mediums in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

4.2.1.3. Transfektion von Zellen

Die Transfektion dient dem Einbringen von genetischem Material in eukaryotische Zellen. Für die Transfektion von Zellen gibt es mehrere Möglichkeiten, wobei in dieser Arbeit die Methode der Lipofektion gewählt wurde. Bei der Lipofektion, auch Liposomen Transfektion genannt, wird das genetische Material in Liposomen integriert, die ihrerseits leicht mit der Zellmembran fusionieren können und samt des enthaltenen genetischen Materials von der Zelle aufgenommen werden. Der bei der Lipofektion von Phoenix E Zellen produzierte Virus kann anschließend zur stabilen Integration des genetischen Materials in das Zellgenom retroviral in die Zielzellen transduziert werden (retrovirale Transduktion).

4.2.1.3.1. Lipofektion

Für die Lipofektion wurden 1,5 Mio U2OS-Zellen auf 10 cm ø Platten oder 2 Mio. Phoenix E Zellen auf 6 cm ø Platten ausplattiert und nach Adhärenztransfiziert. Die Kultivierung der zu transfizierenden Zellen erfolgte in Antibiotika freiem Medium, da Lipofectamin 2000 und Antibiotika in Kombination zelltoxisch wirken. Das Auftauen der für die Transfektion benötigten DNS-Templates erfolgte bei RT.

Pro Ansatz wurden 10 µg DNS mit 500 µl Opti-MEM gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Des Weiteren wurde in einem extra Gefäß pro Ansatz 20 µl Lipofectamin 2000 mit 500 µl Opti-MEM gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Lipofectamin/Opti-MEM-Gemisch auf das DNS-Gemisch gegeben und weitere 20 min bei RT inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen wurden in der Zwischenzeit mit 5 ml bzw. 3 ml bei den Phoenix E Zellen an frischem D10 ohne Pen/Strep Medium versehen.

Die eigentliche Transfektion der Zellen schloss sich durch Behandlung der Platten mit 1 ml des Transfektionsgemisches an. 4 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel.

4.2.1.3.2. Retrovirale Transduktion

Bei der retroviralen Transduktion macht man sich zu nutze, dass Retroviren ihr einzelsträngiges RNS-Genom nach Infektion der Zielzelle in komplementäre doppelsträngige DNS umschreiben und anschließend in das Genom der Zielzelle integrieren können. Das Hüllprotein (envelope) des Virus besteht aus einem Transmembranprotein und einem Oberflächenprotein. Das Oberflächenprotein sorgt dafür, dass nur Zellen mit einem geeigneten Virusrezeptor an ihrer Oberfläche von dem Virus infiziert werden können. Der für die retrovirale Transduktion benötigte Retrovirus, wird durch Lipofektion eines retroviralen Vektors in die Virusverpackungszelllinie Phoenix E generiert. Diese trägt ein retrovirales Provirus, das die für die viralen Proteine codierenden Gene enthält. Der eingeschleuste Vektor enthält das transduzierende Gen und das Verpackungssignal ψ . Nach der Lipofektion produzieren die

Phoenix E Zellen retrovirale Partikel, die in das Kulturmedium sezerniert werden. Für die Gewinnung dieser retroviralen Partikel wird das Transfektionsmedium 24 h nach der Lipofektion abgenommen und durch 3 ml D10 ohne Pen/Strep Medium ersetzt. Der retrovirale Überstand wird 36 h, 48 h und 60 h nach der Transfektion gesammelt, filtriert (0,45 µm) und bei 4 °C gelagert. Die Transduktion der Zielzellen durch Retrovirus erfolgt durch dreimalige Inkubation der Zellen mit retroviralem Überstand, welchem zuvor 4 µg/ml Polybren zugesetzt wurde. Das Polykation Polybren sorgt hierbei, durch Verbesserung der Interaktion zwischen dem Oberflächenprotein des Virus und dem Virusrezeptor der Zielzelle, für eine höhere Transduktionseffizienz [Conti *et al.* 1991, Arcasoy *et al.* 1997].

4.2.1.3.3. miRNA

Bei miRNA (microRNA) handelt es sich um kurze einzelsträngige Ribonukleinsäuremoleküle, die sich spezifisch an die mRNA (messengerRNA) binden und damit die Synthese von Proteinen verhindern.

Das Einbringen der gewünschten miRNA (Kap. 4.1.11.) in die Zelle erfolgte wie in den Kapiteln 4.2.1.3.1. und 4.2.1.3.2. beschrieben. Bei den in dieser Arbeit verwendeten miRNAs handelt es sich genau genommen um in diesem Labor etablierte miR-30 basierte und vektorkodierte shRNAs. Diese sind mit einer Resistenzkassette für Puromycin gekoppelt und wurden in einen pLMP Vektor kloniert [Dickins *et al.* 2005]. Mit der Gabe von Puromycin (2 µg/ml) können die Zellen, die das Konstrukt stabil in ihr Genom eingebaut haben, selektioniert werden, sodass man fast ausschließlich Zellen erhält, die das durch die miRNA blockierte Gen nicht mehr exprimieren können.

4.2.1.3.4. siRNA

Der Effekt der siRNAs (Kap. 4.1.8.1.) ist ähnlich dem der miRNAs, ihr Ursprung und ihre Funktion jedoch unterschiedlich. Die siRNAs sind ursprünglich aus doppelsträngiger RNS entstanden. In geschnittener Form werden sie in bereits vorhandene Proteinkomplexe im Zytoplasma eingebaut. Diese Proteinkomplexe binden an mRNAs, die zu den siRNAs komplementär sind. Hierdurch verändert sich die Struktur der mRNAs und sie werden abgebaut. Die für die Proteinsynthese notwendige Translation an den mRNAs kann nun nicht mehr stattfinden. Somit verhindern die siRNAs die Neubildung derjenigen Proteine, die mithilfe komplementärer mRNAs synthetisiert würden. Die Transfektion der Zellen mit siRNAs erfolgte wie in Kapitel 4.2.1.3.1. beschrieben. Anstelle der 10 µg DNS wurden in etwa 1 nmol pro 10 cm ø Platte der siRNA eingesetzt.

4.2.1.4. Synchronisation von Zellen

In hohen Konzentrationen hemmt Thymidin die Ribonukleotidreduktase, ein Enzym, das in der Zelle zur Herstellung von DNS-Bausteinen genutzt wird. Hierdurch arretiert die Zelle in der S-Phase, da ihr die notwendigen Bausteine zur Verdopplung ihres Erbgutes fehlen. Dieser Vorgang ist reversibel. Sobald das Thymidin ausgewaschen wird, fängt die Zelle mit der Synthese an und setzt ihren Zellzyklus fort.

Um alle Zellen am G1/S-Übergang zu sammeln und nicht über die S-Phase verteilt zu haben, wurde die Behandlung mit Thymidin zweimal durchgeführt.

Möchte man die Zellen in Mitose anhalten, wird den Zellen nach Auswaschen der ersten Behandlung mit Thymidin Nocodazol zugegeben. Nocodazol ist ein Spindelgift, das den Aufbau der Mikrotubuli in der Mitose verhindert. Die Zelle kann daraufhin ihre Chromosomen nicht mehr aufteilen und stoppt ihren Zellzyklus in der Prometaphase der Mitose.

4.2.1.4.1. Mitose

Für die Synchronisation der Zellen in Mitose wurden Platten mit einer Konfluenz der Zellen von ca. 85 % mit 2 mM Thymidin behandelt. Die Behandlung mit Thymidin führt dazu, dass sich die Zellen in der S-Phase sammeln. 12 h später wurde das Thymidin 2 x mit 1fach PBS ausgewaschen und neues Medium mit 500 ng/ml Nocodazol auf die Zellen gegeben. Das Auswaschen sorgt dafür, dass die Zellen ihren Zellzyklus wieder aufnehmen. Sie verlassen die S-Phase, durchlaufen G2 und treten in die Mitose ein. Nocodazol verhindert an dieser Stelle, dass die Zellen die Mitose zu Ende führen können. 7 h – 12 h nach Auswaschen des Thymidins gehen die Zellen in Mitose über. Dies lässt sich mikroskopisch gut feststellen, da die in dieser Arbeit verwendeten Zellen ihre Adhärenz verlieren, wenn sie in Mitose gehen und sich infolge dessen abkugeln und im Medium schwimmen.

4.2.1.4.2. S-Phase

Um die Zellen am G1/S-Übergang zu synchronisieren, erfolgte die Behandlung mit 2 mM Thymidin bei einer Konfluenz der Zellplatten von ca. 50 %. Hierauf folgten 24 h später zwei Waschschriffe mit 1fach PBS und ein Mediumwechsel. Durch die erste Thymidinbehandlung wurden die Zellen einmal in der S-Phase gesammelt, aus dieser jedoch wieder entlassen und ihr erneuter Eintritt in die Mitose ermöglicht.

Nach Durchlaufen der Mitose, ca. 12 h nach Wiedereintritt in den Zellzyklus, wurde den sich nun verdoppelten Zellen ein weiteres Mal 2 mM Thymidin zugegeben. Die Zellen sammelten sich erneut am G1/S-Übergang und konnten für Versuche herangezogen werden oder durch Auswaschen des Thymidins synchronisiert wieder in den Zellzyklus eintreten.

4.2.1.5. Behandlung von Zellen mit zellschädigenden Agenzien

4.2.1.5.1. UV-Licht

Die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht erfolgte nach Abnahme des Deckels der Kulturplatte auf den von Medium befreiten Zellen in einem UV-Stratallinker 2400 mit UVC-Strahlung der Wellenlänge 254 nm. Anschließend wurde das abgenommene Medium wieder auf die Zellen gegeben und die Zellen bis zu ihrer Ernte im Brutschrank weiter kultiviert.

Die Intensität und die Dauer der Weiterkultivierung der Zellen nach Exposition wurden versuchsabhängig gewählt. Die Auswirkungen von UV-Licht auf die Zelle sind in Kapitel 3.2. detailliert beschrieben.

4.2.1.5.2. Ionisierende Gammastrahlung

Die Bestrahlung der Zellen mit ionisierenden Gammastrahlen erfolgte mit einer Cäsium¹³⁷ Strahlenquelle. Hierfür wurden die Zellen auf 6 cm ø Zellkulturschalen ausplattiert und die übereinander gestapelten Platten in den Cäsiumstrahler gestellt.

Angaben über die Expositionsdauer und die Strahlenintensität der ionisierenden Gammastrahlung können den einzelnen Versuchen entnommen werden. Die Wirkung ionisierender Gammastrahlen auf die Zellen wird in Kapitel 3.2. näher erläutert.

4.2.1.5.3. Zytostatika

Bei der Behandlung der Zellen mit Zytostatika wurden verschiedene Substanzgruppen zytostatisch wirksamer Medikamente angewandt. Methylmethansulfonat (MMS) wurde als Vertreter für die Gruppe der Alkylantien, Etoposid und Doxorubicin als Topoisomerase II Hemmer verwendet. Cisplatin fand seine Anwendung als Ursprungskomplex der Platinanaloge.

Die Konzentration der Zytostatika und die Dauer der Weiterkultivierung der Zellen nach der Behandlung sind in den jeweiligen Versuchen beschrieben (Kap. 5). Angaben über ihren Wirkmechanismus werden in Kapitel 3.2. gegeben.

4.2.1.5.4. Weitere zellschädigende Stimuli

Steigert man die Temperatur der Kulturbedingungen einer Zelle auf Werte über 40 °C, führt dies zur Denaturierung ihrer Proteine. In den für diese Arbeit zugrunde liegenden Versuchen wurden die Zellen einer Temperatur von konstant 42 °C ausgesetzt.

Natriumchlorid (NaCl) liegt physiologischer Weise im Körper vor. In hohen Konzentrationen setzt es die Zellen jedoch hyperosmolarem Stress aus und führt unter anderem zu Doppelstrangbrüchen. In dieser Arbeit wurde NaCl in einer Endkonzentration von 10 mM auf die Zellen gegeben.

Tunicamycin ist ein Nukleosidantibiotikum, welches aus *Streptomyces lysosuperficus* isoliert wird und die GlcNAc-Phosphotransferase inhibiert, die ihrerseits eine wichtige Rolle im Rahmen der Glykoprotein-Biosynthese spielt. Tunicamycin wurde in einer Endkonzentration von 5 µg/ml verwendet.

Weitere Angaben über die Vorgänge in der Zelle nach Behandlung mit den schädigenden Stimuli und die Versuchsaufbauten sind in Kapitel 3.2. und Kapitel 5.1.1. aufgeführt.

4.2.1.6. Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

4.2.1.6.1. Caffeine

Caffeine ist ein Xanthinalkaloid, das die beiden Kinasen ATM und ATR inhibiert [Sarkaria *et al.* 1999]. Zwei Stunden vor der Behandlung mit den zellschädigenden Agenzien wurden die Zellen mit 2 mM Caffeine behandelt. Da sich Caffeine nur langsam löst, wurde es direkt in Medium aufgenommen und auf die zuvor von Medium befreiten Kulturplatten gegeben.

4.2.1.6.2. U0126

U0126 ist ein sehr selektiver Inhibitor für MEK [Favata *et al.* 1998, Duncia *et al.* 1998]. MEK, auch MAP-Kinase-Kinase (MAP-KK) genannt, ist eine von mehreren hintereinander geschalteten Kinasen im MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg. Die MAP-KK phosphoryliert im Rahmen der Phosphorylierungskaskade des MAP-Kinase-Weges die beiden Kinasen Erk1 und Erk2. Aufgrund der Hemmung von MEK durch U0126 können Erk1 und Erk2 nicht mehr mittels Phosphorylierung aktiviert werden und verlieren ihre eigene katalytische Aktivität. In dieser Arbeit wurde zwei Stunden vor Zugabe des zellschädigenden Agens U0126 in einer Endkonzentration von 5 mM auf die Zellen gegeben, um die Kinaseaktivität von Erk1 und Erk2 zu unterbinden und ihre potenzielle Eigenschaft als phosphorylierende Kinasen von NIPA zu untersuchen. Die Kontrollzellen wurden mit entsprechender Menge an DMSO behandelt.

4.2.1.7. Zellzyklusbestimmung und Apoptosemessung

4.2.1.7.1. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS – fluorescence activated cell sorting) fällt mit einem Laser generiertes Licht auf die Zellen, die nacheinander durch eine dünne Glaskapillare gesogen werden. Mithilfe dieses Lasers können zuvor in die Zelle eingebrachte oder an die Zelloberfläche bindende fluoreszierende Farbstoffe detektiert und zu einer Unterscheidung von apoptotischen und viablen Zellen herangezogen werden. Die fluoreszierenden Farbstoffe liegen entweder gekoppelt an Antikörper vor, die sich gegen ein zu untersuchendes Merkmal richten

oder binden an Zellbestandteile, die im Rahmen von Umbauvorgängen in die Zelle eingebaut werden. Das Aufleuchten der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen bei Durchtritt durch den Laserstrahl kann anschließend erfasst werden.

Die in der Durchflusszytometrie ermittelten Daten wurden mithilfe einer speziellen Computersoftware ausgewertet (FlowJo Flow Cytometry Analysis Software).

4.2.1.7.1.1. Propidiumiodid Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sowohl in die DNS als auch in die RNS interkalieren kann. Mithilfe der Einlagerung des Farbstoffes in die DNS kann man den DNS-Gehalt der Zelle erfassen und bestimmen, an welcher Stelle des Zellzyklus sich die Zelle gerade befindet (Abb. 4.3.).

Zellen in G0 und G1 haben einen einfachen Chromosomensatz ($2n$), Zellen in G2 und Mitose einen doppelten ($4n$). Die S-Phase Zellen besitzen einen DNS-Gehalt, der sich über die gesamte Breite zwischen dem von G1 und G2 erstreckt.

Bei apoptotischen Zellen liegt der DNS-Gehalt unter dem der G0- und G1-Phase Zellen (subG1). Dies liegt daran, dass die bei der Apoptose durch Degradation entstehenden DNS-Fragmente in einem der Färbung vorausgehenden Waschschriff aus den Zellen entfernt werden. Um ausschließlich den DNS-Gehalt der Zellen zu messen, müssen die Proben vorher mit RNase behandelt werden.

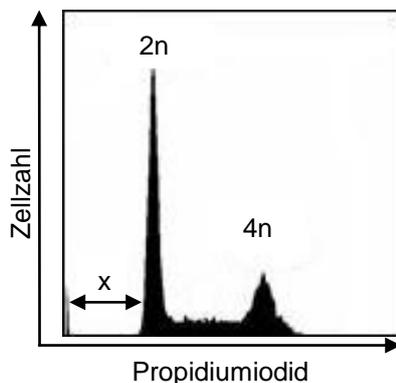


Abb. 4.3.: Zellzyklusbestimmung und Apoptosemessung mittels Propidiumiodid Färbung

Die Fluoreszenzintensität der PI Färbung ist proportional zum DNS-Gehalt der Zelle. Zellen in G0- und G1-Phase besitzen einen einfachen Chromosomensatz ($2n$), Zellen in G2-Phase und Mitose einen doppelten ($4n$), S-Phase Zellen haben einen DNS-Gehalt der zwischen $2n$ und $4n$ liegt, der DNS-Gehalt apoptotischer Zellen liegt unter dem von G0- und G1-Phase Zellen ($x = \text{subG1}$).

Frühe Schäden an der DNS im Rahmen der Apoptose, die sich noch nicht auf den DNS-Gehalt ausgewirkt haben, können mit der PI Färbung nicht erfasst werden.

Für die Bestimmung des Zellzyklus und die Messung der Apoptose mittels PI-Färbung wurden die durch Abschaben geernteten Zellen 3 min bei RT mit 1.500 rpm zentrifugiert und das Medium abgenommen. Hieran schloss sich ein Waschschriff mit 1fach PBS an, bevor die Zellen

für mindestens 12 h bei 4 °C in 5 ml 70%igem EtOH gelagert wurden.

Die durch Ethanol fixierten Zellen wurden 3 min bei RT mit 1.500 rpm zentrifugiert und die Zellpellets nach Absaugen des Überstandes auf Eis gestellt. Es folgte die Resuspension der Zellen in einer 200 µg/ml RNaseA-Lösung und ihre Inkubation für 30 min bei 37 °C.

Die in FACS-Röhrchen überführten Zellen wurden zuletzt mit 10 µg/ml Propidiumiodid versetzt und zügig im FACS analysiert. Nach Zugabe des Farbstoffes sollten die Proben im Dunklen gelagert werden.

4.2.1.7.1.2. Phospho-Histon H3 FITC/PI Färbung

Histon H3 ist ein Protein, das im Zellkern von eukaryotischen Zellen vorkommt. Zusammen mit weiteren Untereinheiten der Histonfamilie ermöglicht Histon H3 ein Aufwickeln der DNS zu so genannten Nukleosomen [Oudet *et al.* 1975, Kornberg 1977]. Diese und weitere Verpackungseinheiten sorgen dafür, dass das gesamte Erbgut im Zellkern Platz findet. Die meiste Zeit liegt Histon H3 in seiner nicht phosphorylierten Form vor. In mitotischen Zellen wird Histon H3 jedoch phosphoryliert [Gurley *et al.* 1978, Hendzel *et al.* 1997] und kann damit als Mitoseindex in der Durchflusszytometrie verwendet werden [Taylor 2004].

Für die Zellzyklusbestimmung und insbesondere zur Erfassung der mitotischen Zellen werden die Zellen mit einem Antikörper gegen Phospho-Histon H3 vorbehandelt. Über einen FITC-konjugierten Zweitantikörper können anschließend all jene Zellen sichtbar gemacht werden, die Phospho-Histon H3 positiv sind. Anhand ihres DNS-Gehaltes lassen sich mitotische Zellen nicht von G2-Phase Zellen abgrenzen. Mit Hilfe der Phospho-Histon H3 Färbung ist diese Unterscheidung möglich. Die PI Färbung dient wie in Kap. 4.2.1.7.1.1. beschrieben zur Bestimmung des Gesamt-DNS-Gehaltes der Zellen (Abb. 4.4.).

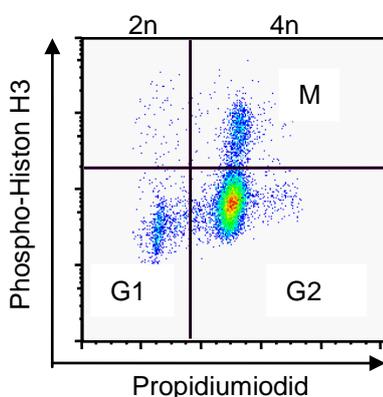


Abb. 4.4.: Zellzyklusbestimmung mittels Phospho-Histon H3 FITC/PI Färbung

Die Phospho-Histon H3 Färbung ermöglicht eine Unterscheidung im Bereich der Zellen mit doppeltem Chromosomensatz (4n) in Hinblick auf G2-Phase und Mitose (M).

Die Zellpellets wurden durch Abschaben gewonnen, anschließend in 5 ml 70%igem EtOH resuspendiert und mindestens 12 h bei -20 °C gelagert. Nach diesem Fixierschritt wurden die

Zellen 3 min bei RT mit 1.500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Hieran schloss sich ein Waschschrift mit 1fach PBS + 1%igem FCS an. Anschließend wurden die Proben in 100 µl PBS + 1%igem BSA aufgenommen und je 0,75 µg anti-Phospho-Histon H3 (Kaninchen) zugegeben. Die Inkubationszeit der Zellen mit dem Antikörper betrug 2 h bei RT. Dem sich hieran anschließenden Waschschrift mit 1fach PBS + 1%igem FCS folgte eine Inkubationszeit der Zellen für 30 min bei RT im Dunklen in 100 µl PBS + 1%igem BSA und 0,12 µg FITC-konjugiertem anti-Kaninchen Zweitantikörper (Ziege) und ein erneuter Waschschrift mit 1fach PBS + 1%igem FCS. Alle der Inkubation mit dem Zweitantikörper folgenden Schritte sollten im Dunklen erfolgen. Zuletzt wurden die Proben nach Zugabe von je 10 µg/ml Propidiumiodid im Durchflusszytometer analysiert.

4.2.1.7.2. Colony Assay

Mithilfe von Colony Assays kann man das Überleben von Zellen beurteilen. In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um die Auswirkung der NIPA-Expression auf die Sensitivität der Zelle gegenüber Zellschädigung zu untersuchen.

Für die Bestimmung des Überlebens wurden je 1.000 Zellen auf 6 well Platten ausplattiert. Die Bestrahlung der adhärennten Zellen erfolgte mit UV-Licht in einer Intensität von 10 J/m² bzw. 15 J/m², die anschließende Weiterkultivierung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Etwa zwei Wochen nach UV-Bestrahlung, abhängig von der Größe der Kolonien auf den unbestrahlten Kontrollplatten, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit einigen Tropfen Crystal-Violett-Färbelösung angefärbt. Anschließend wurden die Platten sorgfältig mit 1fach PBS gewaschen, bis die Kolonien deutlich voneinander abzugrenzen waren.

Die in die Auswertung eingehenden Kolonien hatten einen Mindestdurchmesser von 1,5 mm.

4.2.2. Biochemische Methoden

4.2.2.1. Lysatgewinnung

4.2.2.1.1. Ganzzelllysate

Die geernteten und in ein Falcon-Röhrchen überführten Zellen wurden 3 min bei RT mit 1.500 rpm zentrifugiert und nach Absaugen des Mediums je nach Größe des Zellpellets in 50 µl – 70 µl Lysispuffer resuspendiert und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Hieran schloss sich eine Inkubation von mindestens 20 min auf Eis an. Fünfzehnminütiges Zentrifugieren bei 4 °C mit 14.000 rpm sorgte dafür, dass sich das Zytoplasma von den übrigen Zellbestandteilen trennte. Es folgten das Vermischen der Proben mit 4fach SDS-Ladepuffer, kurzes Denaturieren für 5 min bei 95 °C und das Beladen des Gels oder Einfrieren der Proben bei -20 °C.

4.2.2.1.2. Behandlung der Zelllysate mit alkaliner Phosphatase

Die durch Abschaben gewonnenen Zellpellets wurden in 50 µl TNN-Puffer resuspendiert und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach zwanzigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben 15 min bei 4 °C mit 14.000 rpm zentrifugiert.

Darauf erfolgte die Herstellung von zwei Ansätzen. Für Ansatz 1 wurden 10 µl des Lysats mit 90 µl Phosphatase-Puffer und 7 Units alkaliner Phosphatase 15 min bei 30 °C inkubiert. Ansatz 2 diente als Kontrollansatz und wurde ohne Phosphatase angesetzt. Phosphatase ist ein Enzym, das Phosphorsäure von Proteinen abspaltet und ihren nicht phosphorylierten Zustand herstellt. In dieser Arbeit wurde die Phosphatase eingesetzt, um zu prüfen, ob es sich bei der posttranslationalen Modifikation um Phosphorylierung handelt.

Im Anschluss daran wurden die Proben mit 4fach SDS-Ladepuffer gemischt, 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen oder bei -20 °C eingefroren.

4.2.2.1.3. Fraktionierung

Die Fraktionierung (Abb. 4.5.) ermöglicht eine Aufreinigung der Zelle in einzelne Komponente. Hypotone Lösung bringt die Zelle zum Platzen. Nach Abzentrifugieren entspricht der Überstand dem Zytosol der Zelle, der Rest den Zellkernen. Durch Zufügen der Chelatbildner EGTA und EDTA wird der Zellkern zum Platzen gebracht und man erhält nach Abzentrifugieren zwei weitere Fraktionen der Zelle. Der flüssige Anteil entspricht der Karyolymphe (Kernplasma), der Rest der DNS, den festen Bestandteilen des Kerns und der Kernmatrix [Méndez und Stillman 2000].

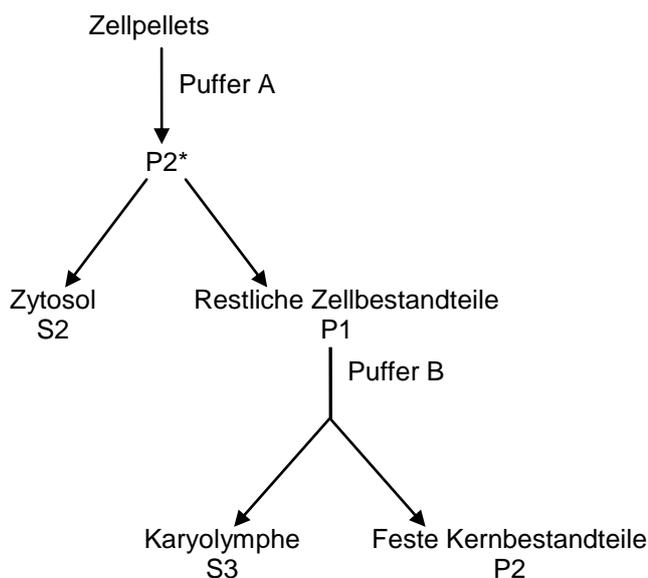


Abb. 4.5.: Fraktionierung

Schematische Darstellung der Zellaufreinigung

Für die Fraktionierung wurden die Zellen von der Petrischale geschabt und 3 min bei RT mit 1.000 rpm zentrifugiert. Hieran schloss sich ein zweifacher Waschschrift mit 1fach PBS an. Nach Aufnahme der Zellen in 100 µl Puffer A (Kap. 4.1.10.) und Überführen in ein Eppendorf-Röhrchen (P2*) wurden die Proben mit 0,5%igem Triton X-100 versetzt, 8 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 4 °C mit 1.300 rcf zentrifugiert, um das Zytosol (S1) vom Rest der Zelle (P1) zu trennen.

Der Überstand (S1) entspricht dem Zytosol. Dieser wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und 5 min bei 4 °C mit 20.000 rcf zentrifugiert, um Verunreinigungen durch übrige Bestandteile der Zelle zu entfernen. Das gereinigte Zytosol (S2) wurde erneut in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und der Rest verworfen.

Parallel dazu erfolgte das einmalige Waschen von P1 mit Puffer A, anschließend das Zentrifugieren der Proben für 5 min bei 4 °C mit 1.300 rcf und ihre Inkubation für 30 min auf Eis in 50 µl Puffer B (Kap. 4.1.10.). Danach wurden die Proben 5 min bei 4 °C mit 1.700 rcf zentrifugiert und der Überstand (S3), der der Karyolymphe entspricht, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Übrig bleiben die festen Bestandteile des Zellkerns (P2), die durch Waschen mit 50 µl Puffer B und Zentrifugieren für 5 min bei 4 °C mit 1.700 rcf gereinigt wurden.

Nach Versetzen der Fraktionen S2, S3 und P2 mit 4fach SDS-Ladepuffer erfolgte ihr Auftragen auf das Gel. Vor Beladen des Gels waren die Proben der Fraktion P2 für 10 s mit Ultraschall behandelt worden, um sie zum Auftragen auf das Gel löslicher zu machen.

4.2.2.2. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen. Die durch Hitze denaturierten Proteine verlieren ihre Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur und die Zugabe von SDS (Sodiumdodecylsulfat), welches die Eigenladung des Proteins überdeckt, führt dazu, dass bei allen Proteinen das gleiche Ladungs-/Massen-Verhältnis vorliegt. Das im SDS-Ladepuffer enthaltene DTT (Dithiotreitol) spaltet die Disulfidbrücken der Proteine und ermöglicht die Anlagerung der negativ geladenen SDS-Moleküle an die aufgefalteten Proteine. Die dadurch gleichmäßig negativ geladenen Proteine können in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes der Größe nach aufgetrennt werden [Laemmli 1970]. Hierzu durchlaufen die Proteine zwei nacheinander geschaltete Polyacrylamidgele, die sich in Porengröße und pH-Wert unterscheiden. Im ersten Gel (Sammelgel) werden die Proteine gesammelt, im zweiten Gel (Trenngel) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Porengröße des Trenngels kann je nach Molekülgröße des zu erwartenden Proteins mit unterschiedlichen Konzentrationen an Polyacrylamid (5 % – 15 %) variiert werden.

4.2.2.2.1. Elektrophoretische Auftrennung der Proteine

Je nach Größe des zu erwartenden Proteins wird ein Polyacrylamidgel mit passender Konzentration an Polyacrylamid (5 % – 15 %) in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit SDS-Elektrophoresepuffer vollständig übergossen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass sämtliche Blasen unter dem Gel beseitigt werden, sodass ein gleichmäßiges Laufen der Proteine gewährleistet ist.

Neben den Proben wurden 10 µl eines Proteinlademarkers, der zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine dient, in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 60 V, die Auftrennung im Trenngel bei 150 V, wenn das Gel über Tag oder bei 23 V, wenn es über Nacht lief.

4.2.2.3. Western Blot

Die Methode des Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wird der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran durchgeführt, auf der man die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern markieren kann. Hieran schließt sich die Detektion der Proteine durch die an sie gebundenen Erst- und Zweit-Antikörper an.

Nach vollendeter Entwicklung können die Antikörper von der Membran entfernt und die Membran kann zur Untersuchung weiterer Proteine herangezogen werden.

4.2.2.3.1. Transfer

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran fand in einer Kammer mit Transferpuffer konstant bei 1 A statt. Die Nitrocellulose-Membran wurde vor dem Transfer durch Schwenken in Methanol aktiviert. Die benötigte Zeit für den Transfer ergab sich in Abhängigkeit der Molekülmasse des zu beobachtenden Proteins (1 kDa \triangleq 1 min). Für NIPA mit seinen 60 kDa bedeutet dies eine Stunde Transfer.

4.2.2.3.2. Entwicklung

4.2.2.3.2.1. Blocken unspezifischer Proteine

Nach dem Transfer wurde die Membran 30 min bei 37 °C in Abhängigkeit des Erstantikörpers (Angabe durch den Hersteller) entweder in 5%iger Milch mit 0,1%igem Tween in PBS oder in 5%igem BSA mit 0,1%igem Tween in PBS geblockt. Die Milchproteine und das Rinder-Serum-Albumin (BSA) binden an die Membran und verhindern damit die unspezifische Bindung der Antikörper.

4.2.2.3.2.2. Erster und zweiter Antikörper

Der Erstantikörper wurde für 1 h – 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Er richtet sich direkt gegen ein Epitop des nachzuweisenden Proteins. Anschließend wurde die Membran 3 x für je 10 min in 1fach PBS mit 0,1%igem Tween gewaschen, um ungebundene Erstantikörper zu entfernen. Der Zweitantikörper wurde in Abhängigkeit des Erstantikörpers entweder in 5%iger Milch mit 0,1%igem Tween in PBS oder in 5%igem BSA mit 0,1%igem Tween in PBS in einer 1:10.000 Verdünnung angesetzt und für 30 min bei RT auf die Membran gegeben. Er richtet sich gegen den F_C-Teil des Erstantikörpers und ist an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. An die Behandlung mit dem Zweitantikörper schloss sich das zweimalige Waschen der Membran für je 10 min in 1fach PBS mit 0,1%igem Tween an und einmal für 10 min in 1fach PBS ohne Tween, um überschüssige Zweitantikörper zu entfernen.

4.2.2.3.2.3. Entwickeln

Die Visualisierung der durch den Erstantikörper gebundenen Proteine erfolgte mithilfe einer Chemolumineszenz-Substratlösung, die durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase umgesetzt wird. Das dabei emittierte Licht kann mithilfe eines Hyperfilms detektiert werden.

Nach der Entwicklung kann die Membran durch zehninütiges Inkubieren in einer Amidoschwarz-Entfärbelösung von den gebundenen Antikörpern befreit und anschließend erneut zur Bestimmung weiterer Proteine herangezogen werden.

5. Ergebnisse

5.1. Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung

5.1.1. Regulation von NIPA nach Zellschädigung

Im ungestörten Zellzyklus wird NIPA am Übergang der G2-Phase in die Mitose phosphoryliert. Die Phosphorylierung von NIPA spielt an dieser Stelle eine entscheidende Rolle, um der Zelle den Eintritt in die Mitose zu ermöglichen (Kap. 3.5.). Auch nach Zellschädigung sind Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen häufige Mechanismen, um Proteine in ihre aktive oder inaktive Form zu überführen.

Daraus ergab sich die Fragestellung, ob NIPA auch nach zellschädigenden Stimuli oder unterschiedlichen Stresseinwirkungen phosphoryliert werden würde. Hinweise hierfür liefern Arbeiten dieses Labors, in denen gezeigt werden konnte, dass es nach UVC-Bestrahlung zu einem Shift von NIPA im Western Blot kommt. In dieser Arbeit galt es nun zu klären, ob es sich bei diesem Shift um einen UV-spezifischen Effekt handle und ob es sich bei diesem Shift tatsächlich um die phosphorylierte Form drehe.

Zur Untersuchung, welchen Einfluss nicht UV-induzierte Zellschädigung auf NIPA habe, wurden unsynchronisierte NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPA wt exprimieren (D1-Zellen, Kap. 4.1.12.), verschiedenen zellschädigenden Stimuli ausgesetzt und im Verlauf nach 10 min, 30 min, 2 h und 4 h geerntet und im Western Blot analysiert. Als zellschädigende Stimuli dienten verschiedene Zytostatika, ionisierende Gammastrahlung und weitere Stressfaktoren, deren Wirkmechanismen in den Kapiteln 3.2. und 4.2.1.5. näher erläutert sind.

Zunächst wurden D1-Zellen mit dem Alkylanz MMS (Methylmethansulfonat) (Abb. 5.1. a) mit einer Konzentration von 10 µg/ml behandelt. 10 min nach Behandlung der Zellen kam es zu keiner deutlichen Veränderung von NIPA im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Nach 30 min konnte jedoch ein deutlicher Shift von NIPA in Form einer zusätzlichen, höher laufenden Bande im Western Blot festgestellt werden, der im Verlauf nach 2 h deutlich abnahm.

Eine ähnliche Beobachtung konnte nach Behandlung der Zellen mit dem Topoisomerase II Hemmer Etoposid (Abb. 5.1. b) in einer Konzentration von 50 µM und nach Behandlung mit der Platinverbindung Cisplatin (Abb. 5.1. c) in einer Konzentration von 50 µM gemacht werden. Hier kam es, wie auch nach der Behandlung mit MMS, nach 30 min zu einem deutlichen Shift der Bande. Dieser Shift war im Gegensatz zu dem mit MMS behandelten Zellen länger sichtbar. Er war nach 2 h etwas schwächer ausgeprägt und verschwand nach 4 h fast vollständig. In der Abbildung 5.1. c. weisen bereits die unbehandelten Zellen einen Shift auf, sodass nur die im

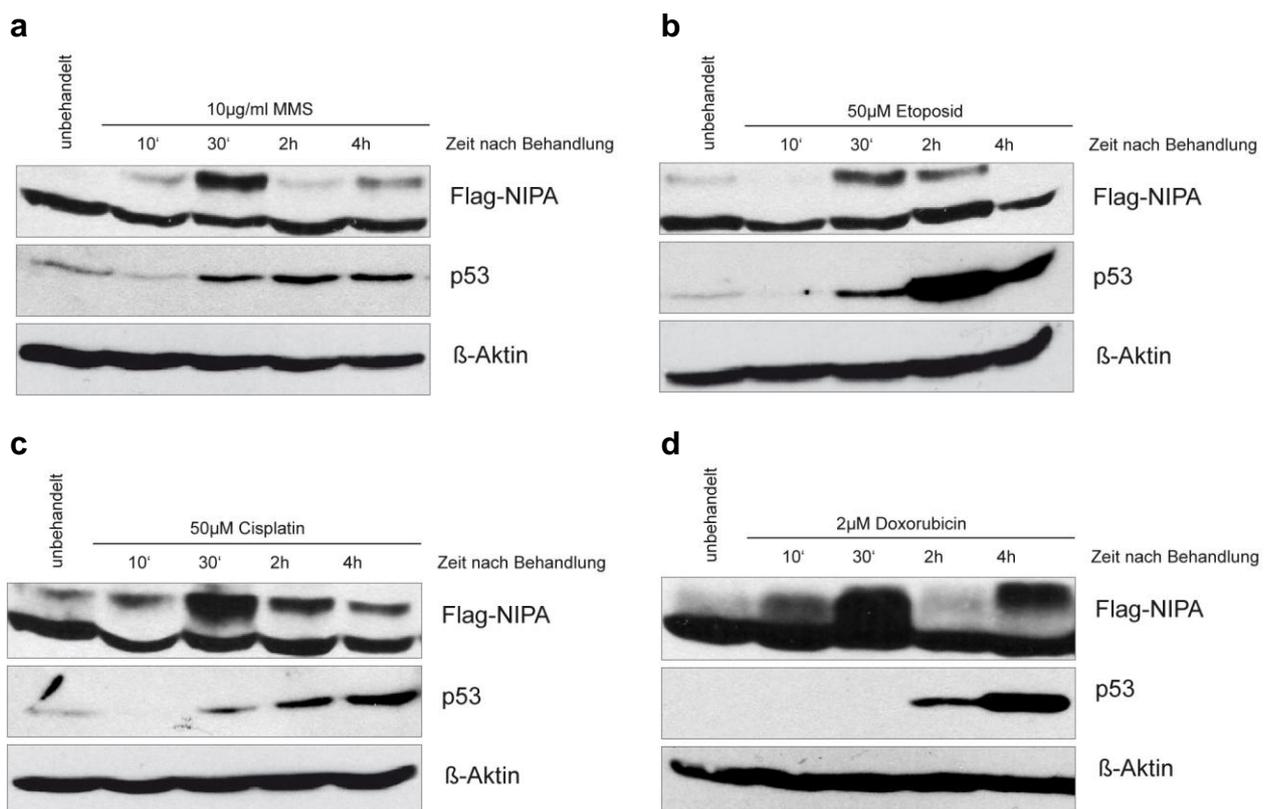
Vergleich zu den unbehandelten Zellen eindeutig stärkeren Shifts der übrigen Zeitpunkte als Einfluss des Zytostatikums gewertet werden sollten.

Nach Behandlung der Zellen mit 2 μM des Anthrazyklins Doxorubicin (Abb. 5.1. d) kam es zu einem zweizeitigen Shift von NIPA. Eine erste zusätzliche Bande konnte nach 10 min beobachtet werden. Diese wurde nach 30 min deutlich stärker. 2 h nach der Behandlung war der Shift komplett verschwunden und trat wieder nach 4 h auf. Dieser Shift am 4h-Wert lag noch oberhalb der Bande, die zum Zeitpunkt der 30min-Ernte beschrieben wurde.

Eine zusätzliche höhermolekulare Bande von NIPA wurde ferner beobachtet, wenn Zellen ionisierender Gammastrahlung (5 Gy) ausgesetzt wurden (Abb. 5.1. e). Im Vergleich zu den Abbildungen 5.1. a.-d. trat der Shift hier bereits nach 10 min auf und dauerte über den 30min-Wert hin an, war jedoch im Vergleich zu den anderen Stimuli wesentlich schwächer ausgeprägt.

Auch nach hyperosmolarem Stress in Form von 100 mM NaCl-Lösung (Abb. 5.1. f) kam es nach 10 min und 30 min zu einer geshiftete Bande im Western Blot. Zusätzlich fiel auf, dass es 4 h nach Behandlung der Zellen mit der NaCl-Lösung nicht zu einer zusätzlichen Bande dafür aber zu einer starken Zunahme des Proteinlevels der nicht geshifteten Bande kam.

Zwei weitere Stresstimuli, Tunicamycin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ein Inhibitor für das Enzym GlcNAc-Phosphotransferase (Abb. 5.1. g) und eine konstante Temperatureinwirkung von 42 °C (Abb. 5.1. h) bewirkten ebenso 10 min nach Behandlung der Zellen eine Proteinverschiebung von NIPA im Western Blot. Dieser Shift wurde jedoch bereits nach 30 min deutlich schwächer und war danach vollständig verschwunden.



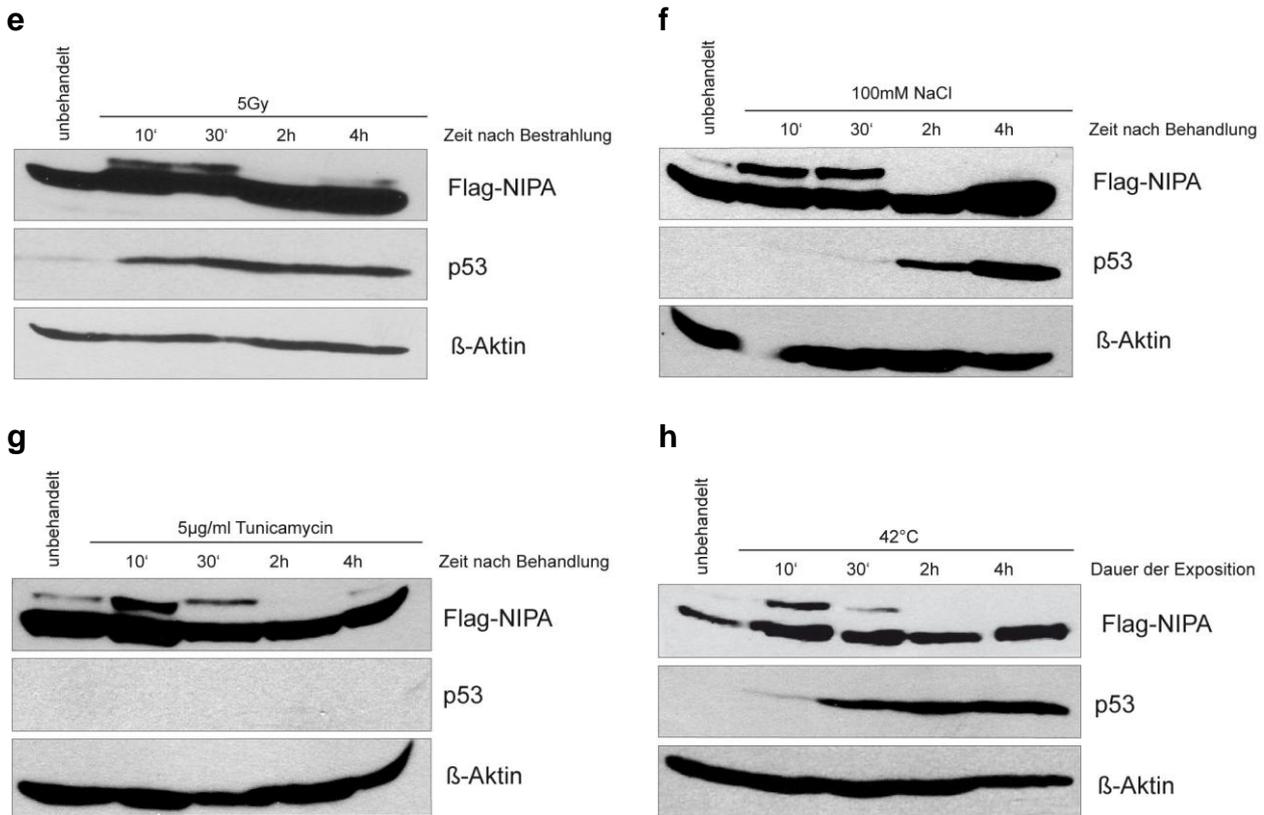


Abb. 5.1. a-h: Regulation von NIPA nach Zellschädigung

Unsynchronisierte D1-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Zytostatika und zellschädigenden Agenzien. MMS 10 µg/ml (a), Etoposid 50 µM (b), Cisplatin 50 µM (c) und Doxorubicin 2 µM (d), 5 Gy (e), NaCl 100 mM (f), Tunicamycin 5 µg/ml (g) sowie 42° C (h). Die Analyse im Western Blot erfolgte nach 10 min, 30 min, 2 h und 4 h. Den stärksten Shift der Bande erkennt man in den Abbildungen a-d nach 30 Minuten in Abbildungen e-h nach 10 Minuten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die verschiedenen Agenzien, Stresse und die ionisierenden Gammastrahlen in der Zelle einen Shift von NIPA im Western Blot hervorrufen. Dieser Shift unterliegt bei den einzelnen Stimuli unterschiedlichen Dynamiken, ist ungleich stark und nie so deutlich ausgeprägt, wie er nach Bestrahlung mit UV-Licht beobachtet werden konnte [von Klitzing, Manuskript in Vorbereitung].

Betrachtet man das Tumorsuppressorgen p53, sieht man mit Ausnahme nach der Behandlung mit Tunicamycin, dass es im Zeitverlauf zu einer Anreicherung von p53 kam. Wie in Kapitel 3.4. beschrieben stellt die Akkumulierung von p53 eine Reaktion der Zelle auf einen DNS-Schaden dar. Diese Anreicherung bewirkt im Rahmen der Vorgänge bei der Schadensantwort, dass der Zellzyklus angehalten wird bis der Fehler behoben werden konnte oder die Zelle bei Irreparabilität in Apoptose geht. Bei den hier gezeigten Versuchen sieht man, dass die Akkumulierung von p53 zeitlich gesehen nach dem Auftreten der durch die Behandlung mit den zellschädigenden Stimuli provozierten höhermolekularen Bande von NIPA stattfand (Abb. 5.1. a-h). Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass der Shift von NIPA nicht durch p53 reguliert wird.

5.1.2. Phosphorylierung von NIPA

In den ersten Versuchen konnte nach Behandlung mit verschiedenen zellschädigenden Stimuli ein Shift von NIPA im Western Blot nachgewiesen werden. Ob diese Bandenverschiebung auf Phosphorylierung zurückzuführen sei, wurde mithilfe einer Behandlung der Zelllysate mit Phosphatase überprüft (Kap. 4.2.2.1.2.). Ein Ausbleiben des Shifts der mit Phosphatase behandelten Zelllysate gegenüber den unbehandelten Kontrollzelllysaten sollte dabei darauf hinweisen, dass es sich bei der im Western Blot höher laufenden Bande um die phosphorylierte Form von NIPA handelt.

Untersucht wurden unsynchronisierte D1-Zellen nach Behandlung mit 100 J/m² UV-Strahlung, 5 Gy ionisierender Gammastrahlung (Abb. 5.2. a) oder nach Gabe von 10 µg/ml MMS, 2 µM Doxorubicin, 50 µM Etoposid oder 50 µM Cisplatin (Abb. 5.2. b).

Für die Ernte wurden die Zeitpunkte gewählt, die in den vorausgegangenen Versuchen den stärksten Shift aufwiesen – in diesem Fall nach 30 min. Anschließend wurden die Zellpellets in TNN-Puffer lysiert und im Vergleich mit und ohne Phosphatasezugabe betrachtet.

Die Abbildungen 5.2. a+b zeigen, dass es nach Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht zu einem vollständigen Shift von NIPA kam. Dieser wurde durch Behandlung der Zellen mit Phosphatase vollständig unterbunden. Auch nach Behandlung der Zellen mit den übrigen zellschädigenden Stimuli kam es zu einer höhermolekularen Bande von NIPA. Allerdings führten die zellschädigenden Stimuli, wie schon in den Versuchen der Abbildungen 5.1. a-e zu sehen ist, nicht zu einem kompletten Shift von NIPA sondern nur zu einer teilweisen Umsetzung des Proteins. Durch die Phosphatase-Behandlung ließ sich dieser Shift vollständig aufheben.

Es bleibt festzuhalten, dass die Ausbildung des Shifts von NIPA nach DNS-Schädigung für alle untersuchten Stimuli durch Phosphatase-Behandlung inhibierbar und die höhermolekulare Bande im Western Blot demnach auf eine Phosphorylierung von NIPA zurückzuführen ist.

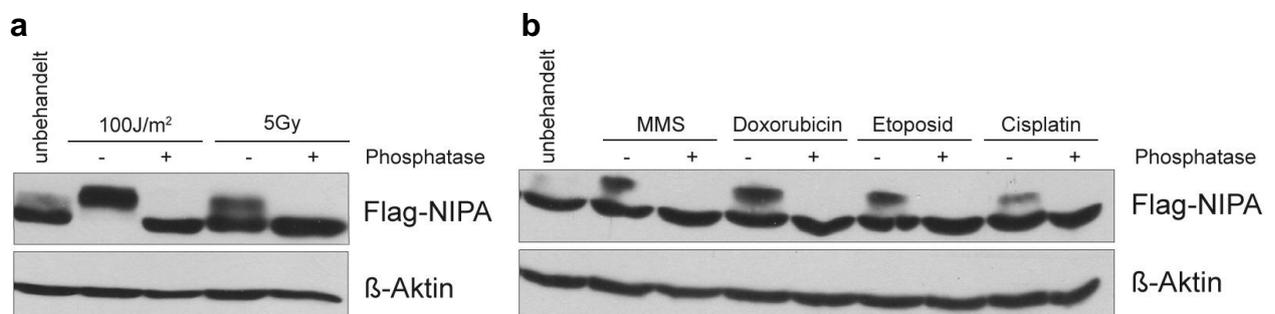


Abb. 5.2. a+b: Phosphorylierung von NIPA

Unsynchronisierte D1-Zellen nach Zellschädigung im Vergleich mit und ohne Phosphatasezugabe. Phosphatase dephosphoryliert die Proteine in den Zelllysaten. Die Zellen wurden Zellschädigung ausgesetzt und 30 min später geerntet. UV-Bestrahlung (100 J/m²), ionisierende Gammastrahlung (5 Gy), MMS (10 µg/ml), Doxorubicin (2 µM), Etoposid (50 µM), Cisplatin (50 µM).

5.1.3. Wird die Phosphorylierung von NIPA p53-unabhängig reguliert?

p53 ist ein Protein, das maßgeblich an den Vorgängen im Rahmen der DNS-Schadensantwort beteiligt ist (Kap. 3.4.). Wie in den vorausgehenden Versuchen gezeigt wurde, kommt es nach Zellschädigung zu einer Phosphorylierung von NIPA. Mit diesem Versuch galt es nun herauszufinden, ob die Phosphorylierung von NIPA nach einem Zellschaden durch p53 beeinflusst werde und p53 NIPA damit im Rahmen der Schadensantwort reguliere. Die Abbildungen 5.1. a-h liefern bereits einen Anhaltspunkt dazu, dass die Regulation von NIPA nach Zellschädigung nicht p53 abhängig ist. Um diese Vermutung zu festigen, wurde in D1-Zellen die p53 Expression mittels miRNA herunterreguliert. Hierfür wurden D1-Zellen mit einer p53-miRNA oder einer Kontroll-miRNA retroviral transfiziert und im Anschluss daran über Puromycinresistenz selektioniert (Kap. 4.2.1.3.3.). 30 min nach Bestrahlung mit 150 J/m² wurden diese beiden Zelllinien im Western Blot miteinander verglichen (Abb. 5.3.).

Die Abbildung 5.3. zeigt, dass NIPA sowohl in den Kontroll-miRNA Zellen, als auch in den p53-miRNA Zellen nach UV-Bestrahlung gleich stark phosphoryliert werden konnte und damit keiner Regulation durch p53 unterliegt.

Wie man im Blot anhand der p53 Expression sehen kann, hat die Transfektion mit der p53-miRNA gut funktioniert und p53 konnte erfolgreich herunter reguliert werden. Des Weiteren ist zu sehen, dass p53 bereits in den unbehandelten Zellen der Kontroll-miRNA hoch reguliert wurde und es nicht typischerweise erst nach einem Zellschaden zu einer Zunahme der Expression von p53 kam (Kap. 3.4.). Dieser Aspekt wird in der Diskussion näher beleuchtet.

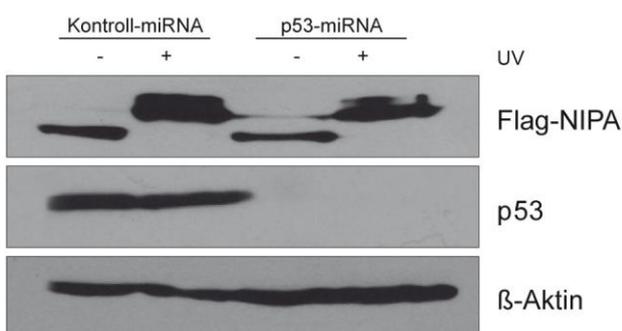


Abb. 5.3.: Zusammenhang von NIPA und p53

p53-miRNA und Kontroll-miRNA transfizierte D1-Zellen im Vergleich nach Bestrahlung mit 150 J/m². Die Lysate wurden 30 min nach UV-Behandlung gewonnen.

5.1.4. Phosphorylierungsstelle von NIPA

Mit den bisherigen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass NIPA nach einer Zellschädigung phosphoryliert wird. Um Aufschluss darüber zu erhalten, an welcher Position des Proteins die Phosphorylierung von NIPA stattfindet, wurde sich das Wissen um die im Rahmen des ungestörten Zellzyklus am Übergang in die Mitose und nach Zellschädigung durch UV-Bestrahlung beteiligten Phosphorylierungsstellen zunutze gemacht. Bisher konnten drei

Phosphorylierungsstellen von NIPA identifiziert werden, die bei der Phosphorylierung am Übergang von der G2-Phase zur Mitose eine entscheidende Rolle spielen (Ser 354, Ser 359 und Ser 395 [Bassermann *et al.* 2007]) (Kap. 3.2.). Tauscht man die für eine Phosphorylierung zur Verfügung stehenden Aminosäuren durch eine nicht phosphorylierbare Aminosäure, z.B. Alanin, aus, kann NIPA nicht oder nur noch ungenügend phosphoryliert werden. Nach UV-Bestrahlung erfolgt die Phosphorylierung nur an einem dieser drei Serinreste, an Position 354 des Proteins [von Klitzing, Manuskript in Vorbereitung]. Der Austausch des für die nach UV-Bestrahlung entscheidenden Serins an Position 354 durch Alanin führt dazu, dass NIPA nicht mehr phosphoryliert werden kann (S354A–Phosphorylierungsdefizienzmutante).

UV-Bestrahlung induziert überwiegend Einzelstrangbrüche an der DNS. Ob Serin 354 auch die Position für die Phosphorylierung von NIPA nach nicht strahleninduzierten Einzelstrangbrüchen (MMS) oder Doppelstrangbrüchen (Doxorubicin) sei, wurde durch den Vergleich von unsynchronisierten D1-Zellen mit Zellen, die die Phosphorylierungsdefizienzmutante S354A stabil exprimieren, getestet. Als zellschädigende Stimuli wurden 20 J/m², 150 J/m², 10 µg/ml MMS und 2 µM Doxorubicin gewählt.

Die Abbildung 5.4. zeigt, dass es bei den behandelten D1-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten D1-Zellen, 30 min nach der Behandlung zu einer deutlichen Phosphorylierung von NIPA kam („schwach exponiert“). Aufgrund der geringeren Exposition ist die Beurteilung der S354A-Zellen bei schwacher Exposition nicht möglich. Bei starker Exposition sieht man jedoch eindeutig, dass die Zellen mit der Phosphorylierungsdefizienzmutante nach DNS-Schädigung keinen Shift aufwiesen.

Dieser Versuch zeigt, dass auch nach Behandlung mit den hier verwendeten Agenzien, die zu unterschiedlichen Schäden an der DNS führen, NIPA an Ser 354 phosphoryliert wird.

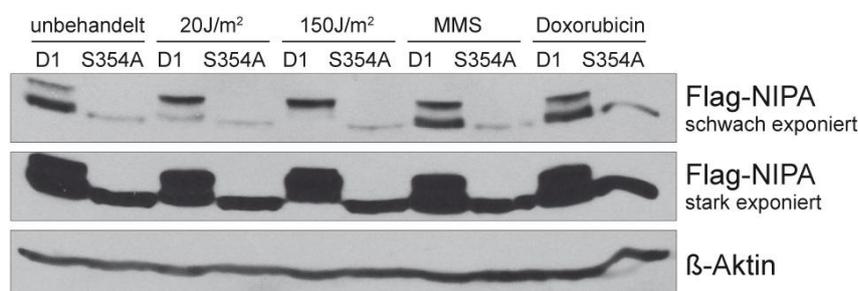


Abb. 5.4.: Phosphorylierungsstelle von NIPA

D1-Zellen und NIH/3T3 + S354A-Zellen im Vergleich nach Zellschädigung. Die Auswertung im Western Blot erfolgte 30 min nach der Behandlung mit UV-Bestrahlung (20 J/m², 150 J/m²), 10 µg/ml MMS oder 2 µM Doxorubicin.

5.1.5. Welche Proteinkinase phosphoryliert NIPA nach DNS-Schädigung?

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass NIPA nach Zellschädigung phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung an Serinrest 354 stattfindet. Diese Erkenntnisse zogen die Frage nach

sich, welche Proteinkinase für die Phosphorylierung von NIPA verantwortlich sein könne.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind häufige Mechanismen in der Zelle, um Proteine in ihren aktiven oder inaktiven Zustand zu überführen und ihre Bindungseigenschaft zu beeinflussen. Durch das Anhängen eines Phosphatrestes an eine OH-Gruppe kommt es zu einer kovalenten Esterbindung. Die Übertragung des Phosphatrestes auf die Hydroxylgruppe wird von Kinasen übernommen. Die drei häufigsten Aminosäuren, die in Proteinen phosphoryliert werden, sind Serin, Threonin und Tyrosin [Sefton 1998]. Im Falle von NIPA wird nach einer Kinase gesucht, die in der Lage ist Phosphatreste auf Serinreste zu übertragen.

Wie man weiß, spielen die Serin-/Threoninkinasen ATM und ATR und die von ihnen aktivierten Serin-/Threoninkinasen Chk1 und Chk2 eine wichtige Rolle im Rahmen der Schadensantwort in der Zelle (Kap. 3.4.). Außerdem liegt Ser 354 in NIPA in einer Konsensus-Phosphorylierungsstelle der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 [Chen *et al.* 2000, O'Neill *et al.* 2002]. Des Weiteren zeigen Arbeiten dieser Abteilung, dass Erk2 im Rahmen des normalen Zellzyklus für die Phosphorylierung von NIPA an Ser 354 verantwortlich ist [Zech, Manuskript in Vorbereitung]. Deshalb wurden in den folgenden Versuchen die genannten Kinasen und zusätzlich Erk1, das nahe Verwandtschaft mit Erk2 aufweist und ebenfalls im MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielt, auf Zuständigkeit für die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung hin überprüft.

5.1.5.1. Caffeine

Caffeine ist ein Inhibitor, der sowohl ATM als auch ATR inhibiert (Kap. 4.2.1.6.1.). Abhängig des durch die verschiedenen Agenzien hervorgerufenen Schadens, wird meist entweder der ATM- oder der ATR-Signalweg aktiviert. ATR vorwiegend bei Einzelstrangbrüchen, ATM hauptsächlich nach Doppelstrangbrüchen. Es gibt jedoch auch Überschneidungen in der Aktivierung dieser beiden Signalwege. Im Rahmen der Schadensantwort aktiviert ATM hierbei gewöhnlich Chk2, ATR hingegen in erster Linie Chk1 durch Phosphorylierung. Bestrahlung mit UV-Licht führt vor allem zu einer Aktivierung des ATR-Signalweges und damit zu einer Aktivierung der Serin-/Threoninkinase Chk1 (Kap. 3.4.).

In diesem Kapitel wurde untersucht, welchen Einfluss ATR und ATM auf eine Phosphorylierung von NIPA nach UV-Bestrahlung haben. Hierfür wurden unsynchronisierte D1-Zellen zwei Stunden lang mit dem Inhibitor Caffeine vorbehandelt, anschließend mit 20 J/m² oder 150 J/m² bestrahlt und 30 min später geerntet.

Die Abbildung 5.5. zeigt, dass die Behandlung der Zellen mit Caffeine zu einer vollständigen Inhibierung der Phosphorylierung von NIPA nach UV-Bestrahlung mit 20 J/m² führt. Bei den mit 150 J/m² bestrahlten Zellen ist dieser Effekt nicht ganz so ausgeprägt. Die Phosphorylierung

wird hier durch Caffeine nur teilweise inhibiert.

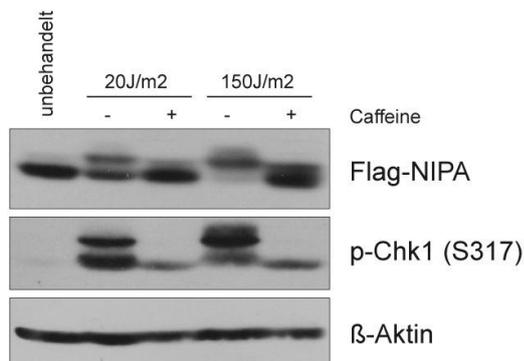


Abb. 5.5.: Caffeine

Unsynchronisierte D1-Zellen nach UV-Bestrahlung (20 J/m², 150 J/m²) mit und ohne vorausgegangener 10 mM Caffeine-Behandlung. Die Zellernte erfolgte 30 min nach Bestrahlung der Zellen.

Als Kontrolle für die Wirkung von Caffeine und damit eine erfolgreiche Inaktivierung von ATR wurde die phosphorylierte Form von Chk1 betrachtet. Da es sich bei Chk1 um ein Protein handelt, das direkt von ATR durch Phosphorylierung aktiviert wird, konnte seine Phosphorylierung als direktes Maß für die Aktivität von ATR genommen werden.

Das Ergebnis zeigt, dass die Kinasen ATM und ATR und durch sie die Kinasen Chk1 und Chk2 für die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung verantwortlich sein können. Durch UV-Bestrahlung wird hauptsächlich der ATR-Signalweg aktiviert, sodass bei diesem Experiment davon ausgegangen werden sollte, dass die schwächere oder ausbleibende Phosphorylierung durch Inhibierung von ATR und damit Inaktivierung von Chk1 zustande kommt. Da es jedoch vor allem nach Bestrahlung mit 150 J/m² zu keiner vollständigen Unterbindung der Phosphorylierung von NIPA kam, sollten in den sich anschließenden Versuchen weitere Kinase untersucht werden, die für eine Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung verantwortlich sein könnten.

5.1.5.2. U0126

Es gibt Hinweise, dass Erk2 am G2/M-Übergang für die Phosphorylierung von NIPA an Ser 354 verantwortlich ist, nicht jedoch Erk1 [Zech, Manuskript in Vorbereitung]. Eine mögliche Beteiligung dieser beiden Kinasen an der Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung wurde mithilfe des MEK Inhibitors U0126 (Kap. 4.2.1.6.2.) und der daraus resultierenden Inaktivierung von Erk1 und Erk2 untersucht.

Für den Versuch wurden D1-Zellen zwei Stunden vor Behandlung mit dem schädigenden Agens mit 5 mM U0126 vorbehandelt, um eine gute Inaktivierung von MEK zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit 20 J/m², 150 J/m² oder mit 10 µg/ml MMS behandelt und nach 30 min im Western-Blot mit D1-Zellen ohne U0126 Gabe verglichen. Abbildung 5.6. zeigt, dass die Phosphorylierung in den mit U0126 vorbehandelten Zellen deutlich schwächer war als

in den Kontrollzellen. Nach Behandlung mit MMS kam es sogar zu einer vollständigen Inhibierung der Phosphorylierung durch U0126.

Da Erk1 und Erk2 direkt durch MEK phosphoryliert und aktiviert werden und MEK durch U0126 inhibiert wird, konnte die phosphorylierte Form (p-Erk) von Erk1 und Erk2 als direkter Indikator für eine erfolgreiche Inhibition von MEK durch U0126 und somit auch eine vollständige Inhibierung von Erk1 und Erk2 herangezogen werden. Der p-Erk Blot zeigt, dass der Inhibitor gut funktioniert hat und Erk1 und Erk2 nicht mehr durch MEK aktiviert werden konnten. Die obere Bande zeigt in dieser Darstellung die phosphorylierte Form von Erk1, die untere Bande die phosphorylierte Form von Erk2.

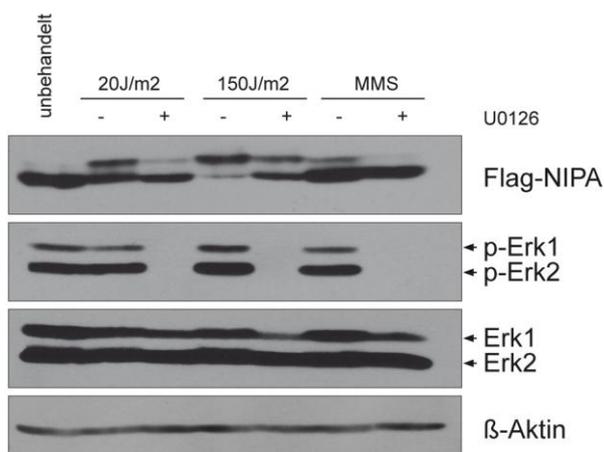


Abb. 5.6.: U0126

Unsynchronisierte D1-Zellen nach Zellschädigung mit und ohne vorausgegangene Behandlung mit dem Inhibitor U0126 (5 mM). UV-Bestrahlung (20 J/m², 150 J/m²), MMS (10 µg/ml). Die Zellernte erfolgte 30 min nach Behandlung.

5.1.5.3. Erk1-miRNA und Erk2-miRNA

U0126 inhibiert Erk1 und Erk2 durch die Inaktivierung von MEK gleichermaßen und macht eine Unterscheidung zwischen den beiden Kinasen unmöglich. Die meisten Inhibitoren können zudem unspezifisch wirken. Um genauer untersuchen zu können, welche der beiden Kinasen für die Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung verantwortlich sei, wurde für den folgenden Versuch in D1-Zellen spezifisch Erk1 oder Erk2 mit Hilfe von miRNAs herunterreguliert (Kap. 4.2.1.3.3.).

Die Erk1- oder Erk2-herunterregulierten Zellen wurden 30 min nach Behandlung mit 20 J/m², 150 J/m² oder 10 µg/ml MMS mit Kontroll-miRNA Zellen im Western Blot verglichen.

Das Ergebnis ist in den Abbildungen 5.7. a+b dargestellt. Bei den Erk1-miRNA Zellen sah man gegenüber den Kontroll-miRNA Zellen kaum einen Unterschied in der Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung (Abb. 5.7. a). Bei den Erk2-miRNA Zellen hingegen blieb bei 20 J/m² und 10 µg/ml MMS die Phosphorylierung fast vollständig aus, nach Bestrahlung mit 150 J/m² kam es nur zu einer Abnahme der phosphorylierten Form (Abb. 5.7. b). Die Erk Blots der

Abbildungen 5.7. a und b dienen der Effektivitätsüberprüfung der miRNAs und zeigen, dass entweder Erk1 (obere Bande) oder Erk2 (untere Bande) erfolgreich herunterreguliert werden konnte.

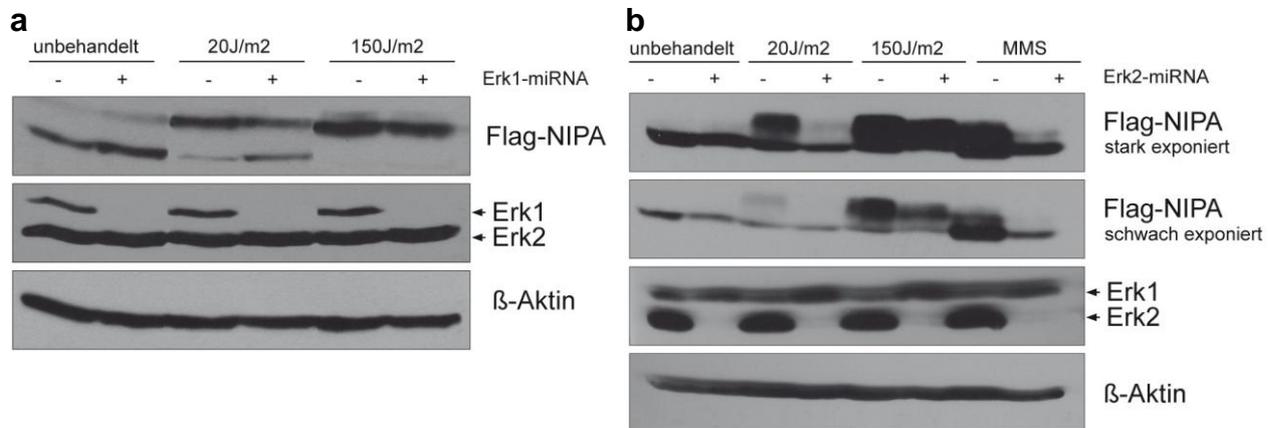


Abb. 5.7.: Erk1-miRNA und Erk2-miRNA

UV-Bestrahlung (20 J/m², 150 J/m²), MMS (10 µg/ml). Zellernte 30 min nach Behandlung der Zellen.

- a) Erk1-miRNA Zellen und Kontroll-miRNA Zellen im Vergleich
b) Erk2-miRNA Zellen und Kontroll-miRNA Zellen im Vergleich

Es bleibt an dieser Stelle festzuhalten, dass neben der bereits gezeigten Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung über den ATR-Signalweg, NIPA auch durch die Kinase Erk2 nach Zellschädigung phosphoryliert wird, eine Phosphorylierung durch Erk1 eher ausgeschlossen werden kann.

5.2. Welche Rolle spielt NIPA für die Zelle nach Zellschädigung?

Wie in Kapitel 3.5. beschrieben, ist NIPA entscheidend an der Regulation eines zeitgerechten Eintritts in die Mitose beteiligt. Dieser direkte Einfluss auf den Zellzyklus deutet darauf hin, dass NIPA auch eine funktionell wichtige Rolle im Zellzyklus nach Zellschädigung und damit für das Überleben der Zelle besitzen könnte. In diesem Kapitel sollte zunächst herausgearbeitet werden, welche Bedeutung NIPA nach Zellschädigung für die Zelle habe und wie sich der Verlust von NIPA auf die Zelle auswirke. Anschließend sollte überprüft werden, ob NIPA möglicherweise selbst als Checkpoint-Protein fungiere und damit eine direkte Beteiligung im Rahmen der DNS-Schadensantwort habe.

5.2.1. Einfluss der NIPA-Expression auf die Sensibilität der Zellen gegenüber Zellschädigung

In den folgenden Versuchen wurde untersucht, welchen Einfluss NIPA nach Schädigung der DNS für die Zelle als solche hat. Es galt zu klären, ob NIPA-defiziente oder NIPA-exprimierende Zellen einen Unterschied in Bezug auf ihre Anfälligkeit gegenüber Zellschädigung aufweisen, NIPA also eine Auswirkung auf das Überleben der Zelle habe. Hierfür wurde in

unterschiedlichen Experimenten die Apoptoserate oder das Überleben NIPA-defizienter und NIPA-exprimierender Zellen nach DNS-Schädigung erfasst und verglichen.

5.2.1.1. Apoptosemessung mittels PI Färbung

Mit der PI Färbung kann man anhand des DNS-Gehalts der Zelle sehen, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet (Kap. 4.2.1.7.1.1.). Apoptotische Zellen haben bei diesem Verfahren einen DNS-Gehalt der unter dem der Zellen in der G1-Phase liegt (subG1).

Die Anzahl der Zellen in subG1 wurde nach Behandlung mit UV-Bestrahlung in immortalisierten Mausembryofibroblastzelllinien (MEFs) ermittelt. Bei den verwendeten Zelllinien dreht es sich um zwei Knockout-Zelllinien und zwei Wildtyp-Zelllinien für NIPA, die aus dem Mausstamm C57BL/6 NIPA^{wildtyp/ko} generiert [Illert *et al.* bisher unveröffentlichte Daten] und bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber Zellschädigung miteinander verglichen wurden.

Die Zellen wurden mit 50 J/m² bestrahlt und nach 12 h, 24 h, 36 h und 48 h geerntet und im FACS-Gerät nach PI Färbung analysiert.

Nach 48 h wies die Knockout-Zelllinie (MEFs 14 NIPA -/-) mit 87,6 % eine deutlich höhere Anzahl subG1 Zellen gegenüber der Wildtyp-Zelllinie desselben Wurfs (MEFs 19 NIPA +/+) mit 47 % auf. Dieses Ergebnis nach 48 h konnte auch bei einem weiteren Geschwisterpaar mit Werten von 74,3 % für die Knockout-Zelllinie (MEFs 27 NIPA -/-) gegenüber 41,4 % für die Wildtyp-Zelllinie (MEFs 28 NIPA +/+) beobachtet werden (Abb. 5.8. a)

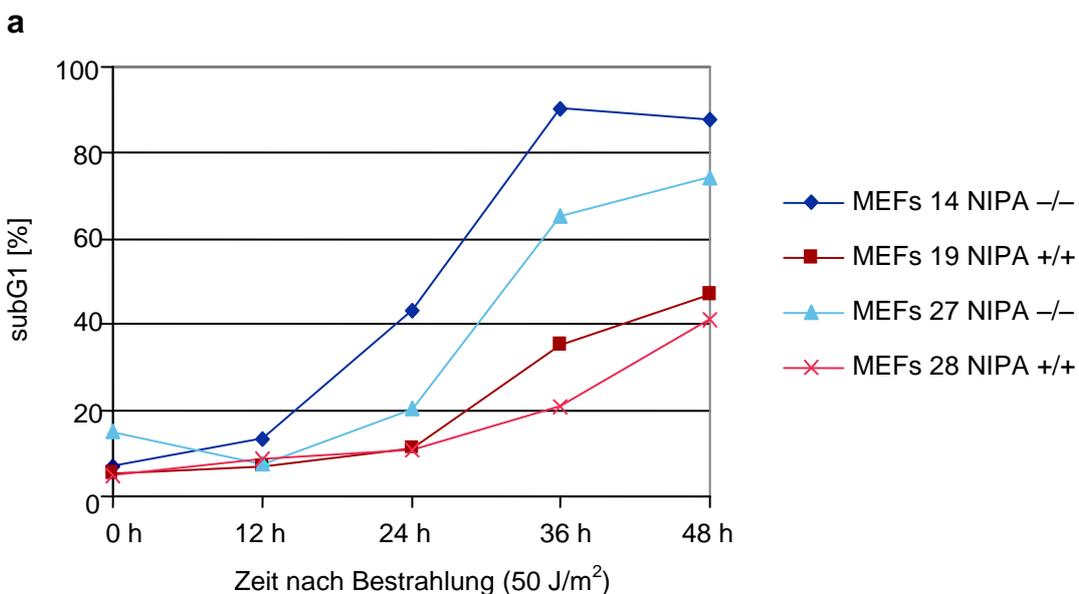


Abb. 5.8. a: Apoptosemessung mittels PI Färbung

Bestimmung von subG1 mittels PI Färbung in Wildtyp und Knockout MEFs-Zelllinien 12 h, 24 h, 36 h und 48 h nach Bestrahlung mit 50 J/m²

Ein weiterer Versuch zur Apoptosemessung wurde in primären Mausembryofibroblasten vorgenommen. In primären Zellen lassen sich gut zellphysiologische Vorgänge untersuchen, da

die Zellen der Primärkulturen noch weitgehend die spezifischen Eigenschaften ihres Ursprungsgewebes besitzen und gegenüber immortalisierten Zelllinien noch keine Veränderungen an Signaltransduktionsprozessen einen Einfluss auf Vorgänge wie zum Beispiel das Wachstumsverhalten und die Apoptoserate einer Zelle genommen haben.

Nach Gewinnung der Mausembryofibroblasten wurde zunächst mithilfe der PCR und anschließender Auftrennung der DNS-Fragmente im Agarosegel der Genotyp der einzelnen Embryonen ermittelt (Kap. 4.2.1.1.). Abbildung 5.8. b zeigt das Bandenmuster der DNS-Fragmente im Agarosegel, anhand dessen die Genotypisierung erfolgte. Hierdurch konnten drei Knockout-Embryonen (primäre MEFs 186, 190, 191 NIPA -/-), zwei Wildtyp-Embryonen (primäre MEFs 188, 189 NIPA +/+) und zwei heterozygote Embryonen (primäre MEFs 187, 192 NIPA +/-) bestimmt werden. Als Positivkontrolle diente ein Wildtyp-Embryo, als Negativkontrolle ein Knockout-Embryo einer früheren Mausembryofibroblastengenerierung und als Leerwertkontrolle wurde der AE-Puffer aus der DNS-Aufreinigung (Kap. 4.2.1.1.2.1.) verwendet. Zur Größenbestimmung wurde ein 1 kb DNS-Lademarkers (M) mit aufgetragen.

b

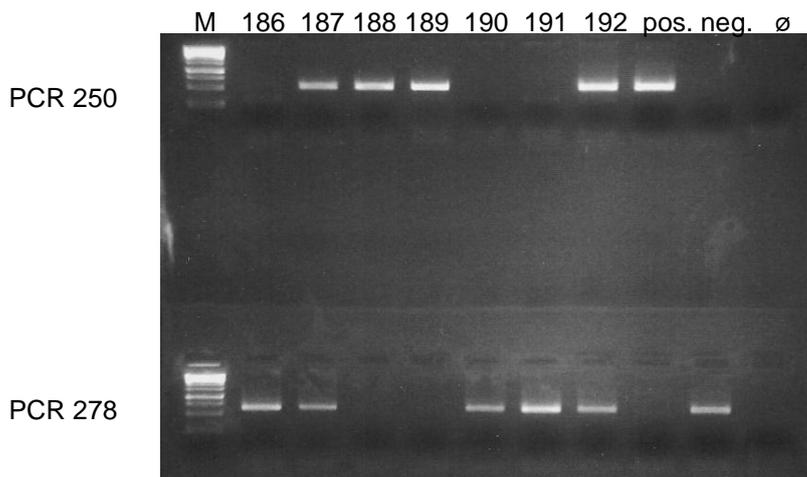


Abb. 5.8. b: Apoptosemessung mittels PI Färbung

Genotypisierung der Mäuse

MEFs	186	187	188	189	190	191	192	pos.	neg.	leer
PCR 250	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-
PCR 278	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Genotyp	-/-	+/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	-

Für den Apoptoserateversuch wurden zum einen primäre Mausembryofibroblasten eines Wildtyp-Embryos, zum anderen eines Knockout-Embryos herangezogen und mit 50 J/m² bestrahlt. Anschließend wurde der Anteil der Zellen in subG1 im FACS-Gerät bestimmt. Die Relation der 48h-Werte zu den 0h-Werten ist in der Grafik dargestellt (Abb. 5.8. c). Dabei sieht man, dass die NIPA-defizienten Zellen mit einer relativen subG1-Rate von 1,54 stärker auf eine Bestrahlung mit 50 J/m² reagierten, als die NIPA-exprimierenden Zellen mit einer relativen subG1-Rate von 1,31.

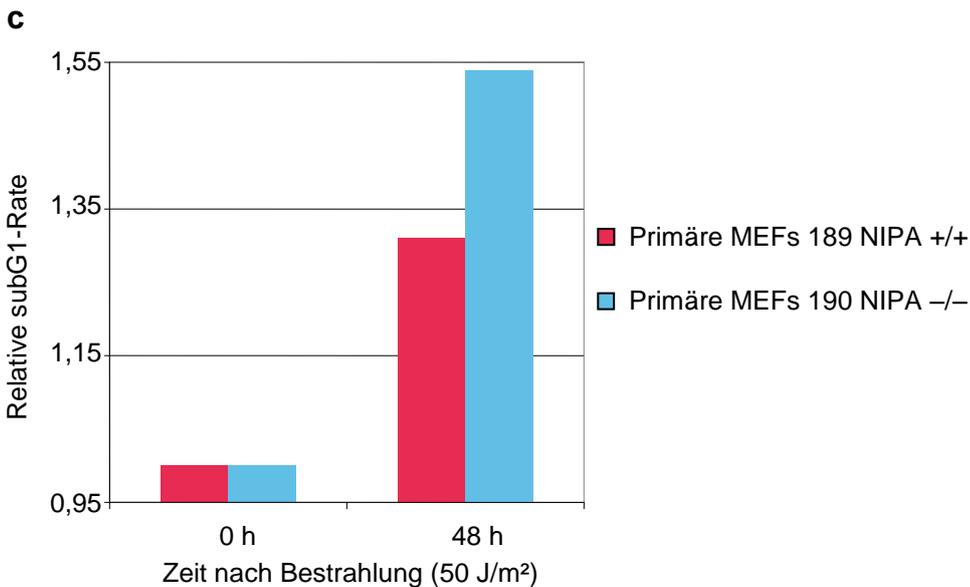


Abb. 5.8. c: Apoptosemessung mittels PI Färbung

Relative subG1-Rate in primären MEFs vom Wild-Typ und Knockout-Typ nach UV-Bestrahlung mit 50 J/m². Die Messung der 0h- und 48h-Werte erfolgte nach PI Färbung in der Durchflusszytometrie. Für die Auswertung wurde zunächst die Differenz der Werte vom 0h- und 48h-Wert der bestrahlten und unbestrahlten Mausembryofibroblasten vom Knockout-Typ, beziehungsweise die Differenz der Mausembryofibroblasten vom Wild-Typ gebildet. Anschließend wurden die 0h-Werte beider Zelllinien auf 1 normiert.

5.2.1.2. Colony Assay

Eine alternative Methode, um die Sensibilität von Zellen nach DNS-Schädigung zu untersuchen, ist die des Colony Assays, bei dem die aus jeder überlebenden Zelle entstehenden Kolonien ausgezählt werden. Hierfür wurden je 1000 U2OS-Zellen, die zuvor mit Kontroll-siRNA oder NIPA-siRNA transfiziert wurden, auf 6well Platten ausplattiert und nach Adhärenz werden bestrahlt. Die Auswertung erfolgte 2 Wochen nach der UV-Bestrahlung. Einschlusskriterium für die in die Auswertung eingehenden Kolonien war ein Mindestdurchmesser von 1,5 mm.

In Abbildung 5.9. a sieht man, dass die beiden unbehandelten Platten (Abb. 5.9. b) nur geringfügige Unterschiede in der Anzahl ihrer Kolonien aufwiesen. Bei den mit 10 J/m² behandelten Zellen (Abb. 5.9. c) kann man erkennen, dass die Zellen mit verminderter NIPA-Expression weniger Kolonien ausbildeten, als die Kontrollzellen. Dieses Ergebnis war bei einer Behandlung mit 15 J/m² noch ausgeprägter (Abb. 5.9. d).

Keinen Unterschied gab es bei Versuchen mit U2OS-Zellen, die NIPA überexprimieren, im Vergleich zu U2OS-Zellen mit normaler NIPA-Expression (Daten nicht gezeigt).

Primäre MEFs eignen sich für Colony Assays nicht, da bei einer für diesen Versuch erforderlichen sehr dünnen Ausplattierung schon die unbehandelten Zellen aufgrund des fehlenden Kontakts zu Nachbarzellen ihr Wachstum einstellen und in Apoptose gehen.

a

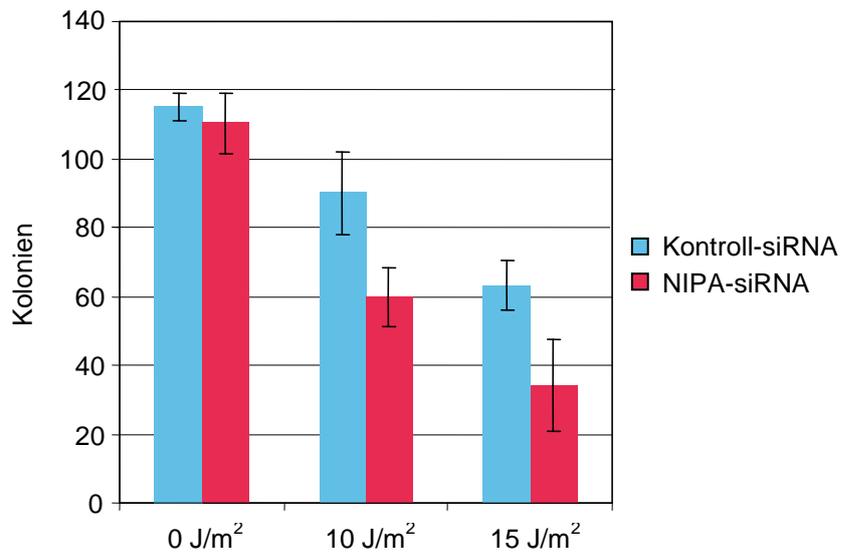
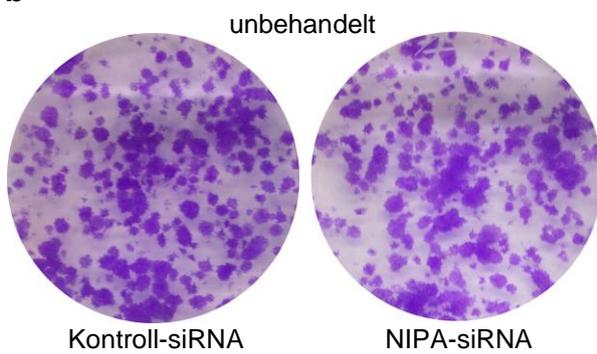


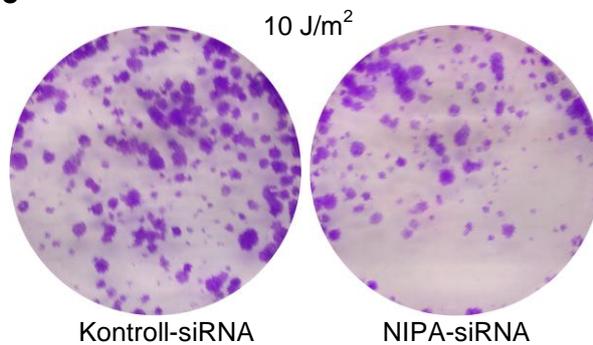
Abb. 5.9.: Colony Assay

U2OS-Zellen mit physiologischer oder verminderter NIPA-Expression 2 Wochen nach UV-Bestrahlung ($10 J/m^2$, $15 J/m^2$)
 a) Absolute Anzahl der sich bildenden Kolonien. Ausgezählt wurden Kolonien mit einem Durchmesser $\geq 1,5$ mm (Mittelwerte ($n=6$) mit Standardabweichung).

b



c



d

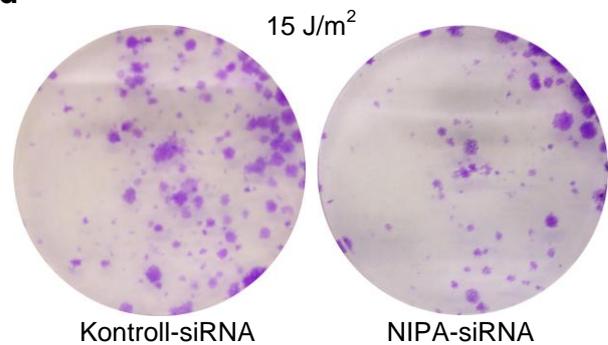


Abb. 5.9.: Colony Assay

U2OS-Zellen mit physiologischer oder verminderter NIPA-Expression 2 Wochen nach UV-Bestrahlung ($10 J/m^2$, $15 J/m^2$)
 b-d) Fotografische Darstellung der Kolonien nach Einfärbung mit Crystal-Violett-Färbelösung

Die in Kapitel 5.2.1. beschriebenen Experimente bezüglich des Einflusses der NIPA-Expression auf die Sensibilität der Zellen gegenüber DNS-Schädigung zeigen, dass der Verlust von NIPA die Zellen anfälliger gegenüber einem DNS-Schaden macht, NIPA also einen antiapoptotischen Effekt hat.

5.2.2. Spielt NIPA eine Rolle als Checkpoint-Protein?

Sobald ein Zellschaden in der Zelle festgestellt wird, reguliert die Zelle Proteine, die dafür sorgen, dass die Zelle in ihrem Zellzyklus arretiert. Mithilfe dieses Arrestes reagiert die Zelle auf die neue Situation. Um eine fehlerhafte Vererbung des Schadens zu verhindern, versucht die Zelle diesen wenn möglich zu reparieren oder gegebenenfalls ihren eigenen Tod einzuleiten. Im Verlauf des Zellzyklus gibt es mehrere so genannter Checkpoints (Kap. 3.3.), an denen die Zelle ihren Ist-Zustand überprüft und gegebenenfalls stoppt, wenn ein Fehler aufgetreten ist. Am Ablauf dieser Kontrollpunkte sind viele verschiedene Proteine beteiligt. Eine mögliche Funktion von NIPA in Bezug auf die Regulierung des Kontrollpunktes am Übergang der G2-Phase zur Mitose sollte im folgenden Versuch beleuchtet werden.

U2OS-Zellen wurden hierfür mit einem Leervektor oder mit einem Vektor für NIPA transfiziert und anschließend in der frühen S-Phase (G1/S-Übergang) synchronisiert. Abbildung 5.10. a zeigt die Überexpression von Flag-NIPA in den U2OS-Zellen im Western Blot. Anhand von CyclinE wurde der Zeitpunkt im Western Blot ermittelt, an dem die Zellen in die G2-Phase übergehen. CyclinE steigt am Übergang von der G1-Phase in die S-Phase an, nimmt im Verlauf der S-Phase ab und ist mit Beginn der G2-Phase vollständig abgebaut [Dulic *et al.* 1992, Koff *et al.* 1992, Ohtsubo *et al.* 1995].

In Abbildung 5.10. b sieht man, dass es 8 h nachdem die Zellen aus dem G1/S-Block entlassen wurden, zu einer Abnahme der CyclinE Konzentration kam. Die Zellen befanden sich hier in S-Phase und näherten sich mit weiterer Abnahme des Proteinlevels der G2-Phase. Der aus diesem Vorversuch ermittelte 8 h Wert wurde in den Folgeversuchen als Zeitpunkt für die Behandlung mit dem zellschädigenden Agens gewählt. Die Zellen standen hier kurz vor ihrem Übergang in die G2-Phase.

Die Zellen wurden 8 h nach G1/S Release für eine Stunde mit 0,5 μ M Doxorubicin behandelt. Nach einer Stunde wurde den Zellen Nocodazol hinzu gegeben, damit die Zellen in der Prometaphase der Mitose arretierten und den Zellzyklus nicht fortsetzten. 16 h, 21 h, 26 h und 31 h nach G1/S-Release wurden die Zellen geerntet, gegen Phospho-Histon H3 gefärbt und nach Zugabe von PI im FACS-Gerät analysiert. Phospho-Histon H3 wurde in diesem Versuch als Indikator dafür verwendet, dass sich die Zellen in Mitose befanden (Kap. 4.2.1.7.1.2.).

Die Abbildungen 5.10. c zeigen die Zellzyklusverteilung in der FACS-Analyse. Hierbei fällt auf,

dass die behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nicht oder nur kaum in Mitose übertraten. Sie arretierten am G2/M-Kontrollpunkt. Die Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden, oder NIPA überexprimierten durchwanderten den Zellzyklus jedoch gleichermaßen. In Abbildung 5.10. d ist der prozentuale Anteil der in Mitose befindlichen Zellen grafisch dargestellt.

Der gleiche Versuch wurde mit U2OS Zellen durchgeführt, in denen NIPA mittels siRNA herunterreguliert wurde. Die NIPA-siRNA Zellen ließen sich jedoch nicht so gut synchronisieren, wie die Kontroll-siRNA Zellen (Daten nicht gezeigt). Es war daher schwierig zu beurteilen, ob NIPA-defiziente Zellen einen Checkpoint-Defekt besitzen, da die Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung mit Doxorubicin eine unterschiedliche Ausgangsposition hatten und deshalb nicht direkt vergleichbar waren. Das Phänomen, dass NIPA-siRNA Zellen den Zellzyklus nicht normal durchlaufen und damit einer Synchronisierung schlechter zugänglich sind, wurde bereits früher beschrieben [Bassermann *et al.* 2005].

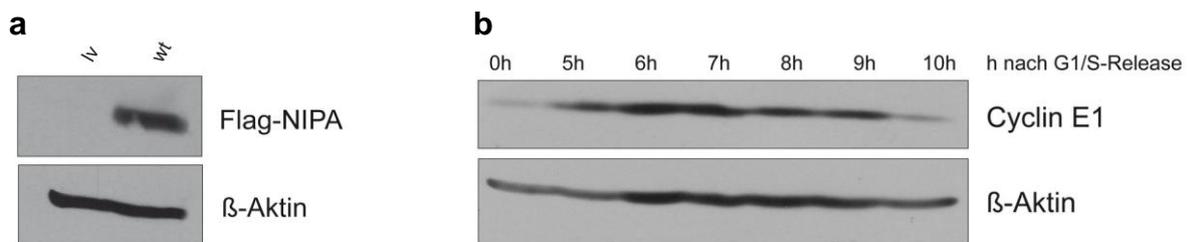


Abb. 5.10.: Spielt NIPA eine Rolle als Checkpoint-Protein?

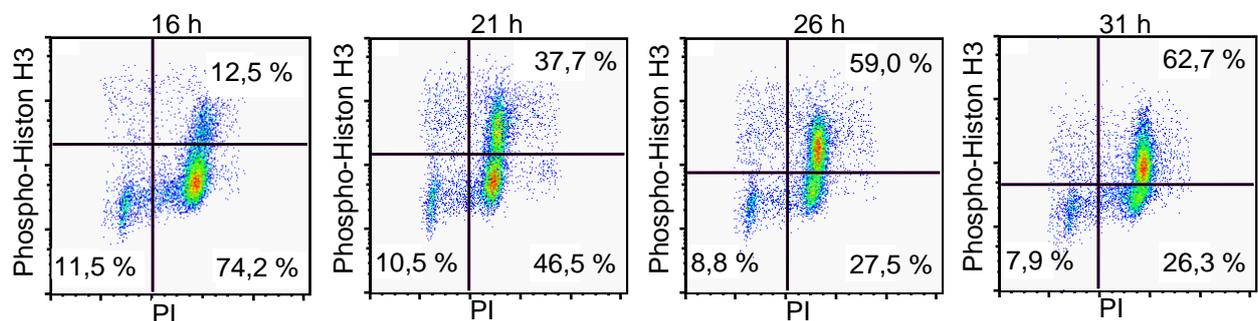
Durch doppelten Thymidinblock in G1/S synchronisierte U2OS-Zellen

a) Western Blot unbehandelter U2OS-Zellen mit und ohne NIPA-Überexpression (wt, lv) 16 h nach G1/S-Release

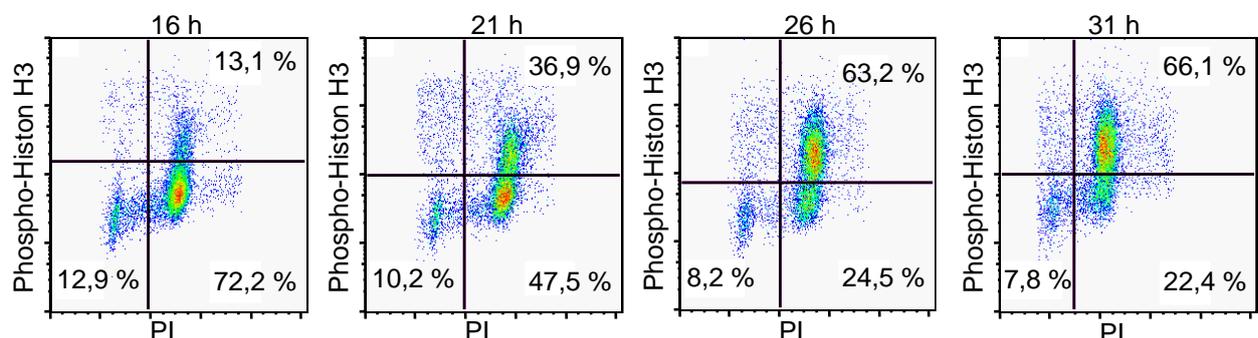
b) Western Blot: U2OS-Zellen 0 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h und 10 h nach G1/S-Release

c

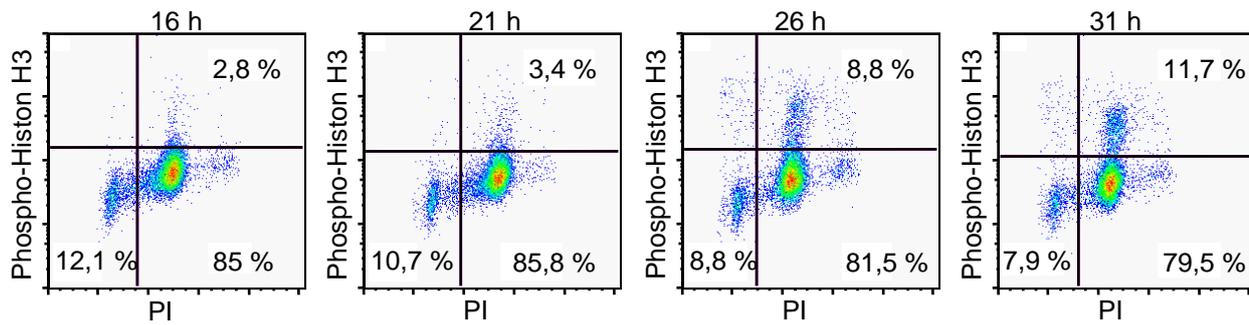
unbehandelt – Leervektor



unbehandelt – Wildtyp



behandelt (Doxorubicin) – Leervektor



behandelt (Doxorubicin) – Wildtyp

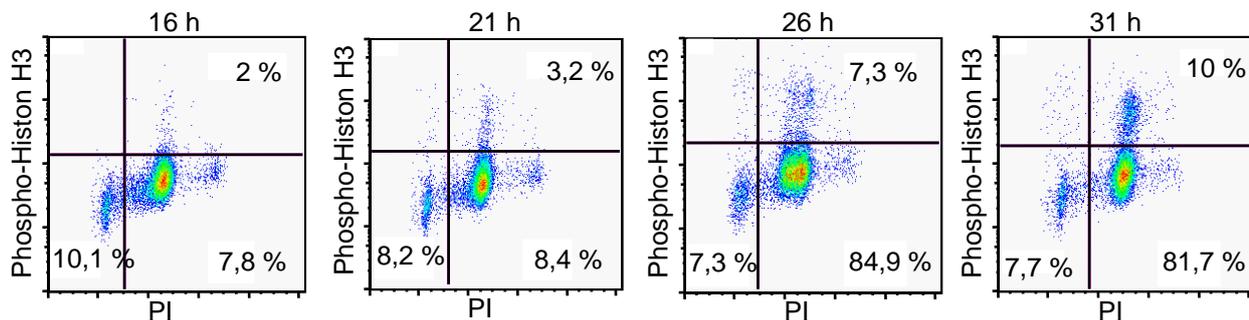


Abb. 5.10.: Spielt NIPA eine Rolle als Checkpoint-Protein?

Durch doppelten Thymidinblock in G1/S synchronisierte U2OS-Zellen

c) FACS-Analyse mittels Phospho-Histon H3-FITC/PI Färbung; Darstellung der Zellzyklusverteilung un behandelter und behandelter U2OS-Zellen mit und ohne NIPA-Überexpression (wt, lv) 16 h, 21 h, 26 h und 31 h nach G1/S-Release

d

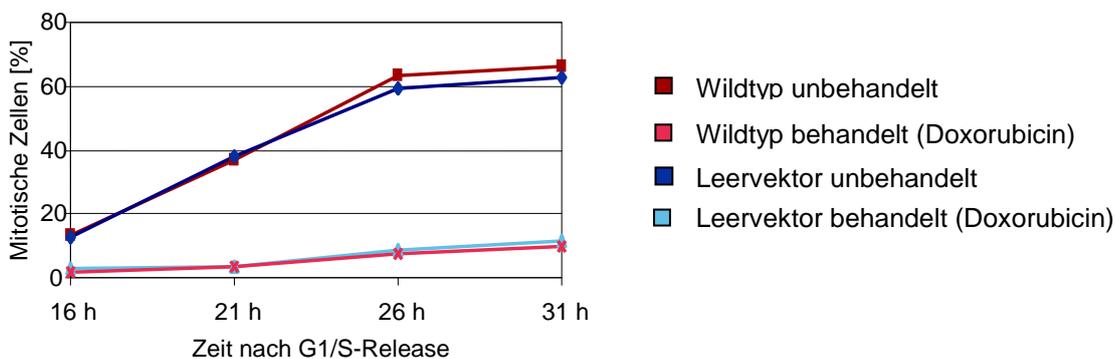


Abb. 5.10.: Spielt NIPA eine Rolle als Checkpoint-Protein?

Durch doppelten Thymidinblock in G1/S synchronisierte U2OS-Zellen

d) Grafische Darstellung der in Mitose befindlichen, un behandelten und behandelten U2OS-Zellen mit und ohne NIPA-Überexpression (wt, lv)

5.3. Bindet NIPA an die DNS?

Das NIPA-Protein besitzt zwei potenzielle Zinkbindungsdomänen (Kap. 3.5.), die zur Ausbildung von Zinkfingern führen können. Diese Motive dienen häufig der Bindung an die DNS. Zusammen mit der Tatsache, dass NIPA im Zellkern lokalisiert ist, ergab sich die Frage, ob NIPA nach einem DNS-Schaden direkt an die DNS binde. Um dies zu untersuchen, wurden

unsynchronisierte D1-Zellen mit 150 J/m^2 behandelt und zwei Stunden später geerntet (Abb. 5.11.). Die DNS wurde, wie in Kapitel 4.2.2.1.3. beschrieben, aufgereinigt und die dabei entstandenen Fraktionen einzeln im Western Blot aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen stellten das Zytoplasma, das Karyoplasma und die festen Bestandteile des Zellkerns (Kernmembran und DNS) dar.

Im Zytoplasma ist kein NIPA vorhanden. Im Karyoplasma konnte NIPA nachgewiesen werden und auch in der Fraktion mit den festen Bestandteilen des Kerns war NIPA zu sehen. Im Vergleich zum Kernplasma ist die Menge von NIPA unter den festen Kernbestandteilen jedoch um einiges geringer. Bei den unbehandelten Zellen sieht man in der Fraktion mit den festen Bestandteilen zwei Banden, wobei die obere Bande wahrscheinlich der phosphorylierten Form entspricht. Die eine bei der Bestrahlung mit 150 J/m^2 entstandene Bande stellt vermutlich ausschließlich die phosphorylierte Form von NIPA dar.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass NIPA nicht im Zytoplasma, dafür aber sehr stark im Kernplasma und auch mit einem geringeren Anteil unter den festen Kernbestandteilen zu finden ist und seine direkte Bindung an die DNS damit in Erwägung gezogen werden kann.

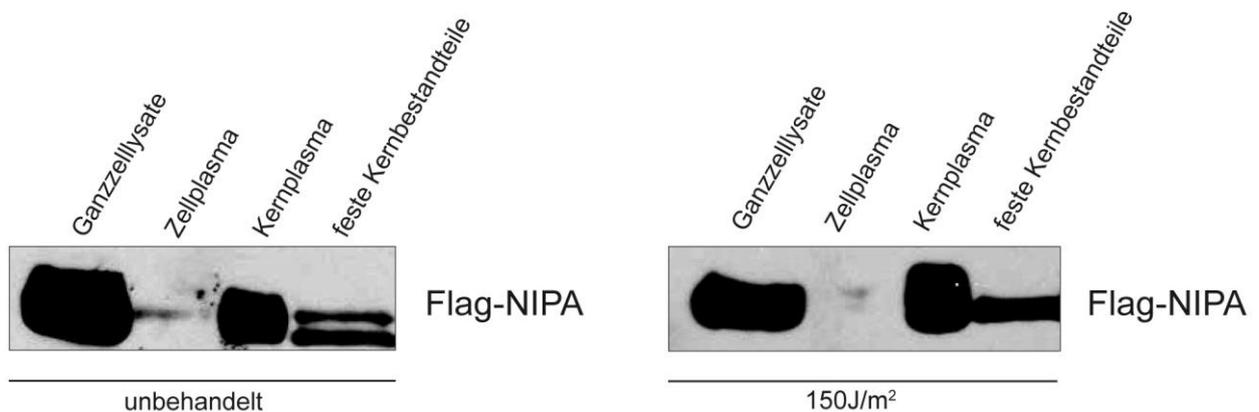


Abb. 5.11.: Bindet NIPA an die DNS?

Fraktionierung von D1-Zellen mit und ohne UV-Bestrahlung (150 J/m^2). Die Zelllysate wurden 30 min nach Behandlung gewonnen.

6. Diskussion

Das Wissen über die Funktion von NIPA im ungestörten Zellzyklus ist bereits sehr umfassend. Im ungestörten Zellzyklus wird NIPA am G2/M-Übergang phosphoryliert [Bassermann *et al.* 2005]. Die Phosphorylierung von NIPA bewirkt hier, dass NIPA vom SCF^{NIPA}-Komplex dissoziiert und dieser seine Ubiquitin-Ligase-Aktivität verliert. Das nun nicht mehr durch den SCF^{NIPA}-Komplex für seinen Abbau markierte CyclinB1 akkumuliert im Zellkern und ermöglicht der Zelle den Eintritt in die Mitose (Kap. 3.5.).

Noch nicht ausreichend verstanden wird die Rolle von NIPA nach DNS-Schädigung. Arbeiten dieses Labors konnten zeigen, dass UV-Bestrahlung einen Shift von NIPA im Western Blot hervorruft [von Klitzing, Manuskript in Vorbereitung]. Damit wurde ein erster Hinweis geliefert, dass NIPA auch eine entscheidende Funktion nach Zellschädigung besitzen könnte.

Gegenstand dieser Arbeit war es daher, dem Thema um eine Bedeutung von NIPA nach DNS-Schädigung nachzugehen und damit das Verständnis über NIPA auszubauen.

6.1. Posttranslationale Modifikation von NIPA nach Zellschädigung

Zunächst wurden verschiedene Zytostatika, ionisierende Gammastrahlung und weitere Stressfaktoren eingesetzt, um zu untersuchen, ob Zellschädigungen als solche einen Einfluss auf die Expression oder den Phosphorylierungsstatus von NIPA haben. In einem ersten Versuch wurden hierfür unsynchronisierte NIH/3T3 Zellen, die stabil NIPA exprimieren (D1-Zellen), unterschiedlichen, zellschädigenden Stimuli ausgesetzt und anschließend die Auswirkung auf NIPA im Zeitverlauf im Western Blot analysiert. Wie in vorausgegangenen Arbeiten nach Bestrahlung mit UVC-Licht gezeigt werden konnte [von Klitzing, Manuskript in Vorbereitung], kommt es auch nach anderen zellschädigenden Agenzien, ionisierender Strahlung und weiteren Stressen zu einem Shift der Proteinbande von NIPA im Western Blot. Es scheint sich hierbei also nicht um einen UV-spezifischen Effekt zu handeln, sondern vielmehr um eine spezifische Reaktion der Zelle auf einen Zellschaden. Eine wie im Western Blot auftretende höher laufende Bande kann durch posttranslationale Modifikationen hervorgerufen werden. So führt zum Beispiel in vielen Fällen die Phosphorylierung von Proteinen zu einem solchen Shift im Western Blot. Dies kann jedoch nicht ausreichend erklärt werden, da durch alleinige Anlagerung eines Phosphates eine derartig starke Molekülmassenzunahme nicht zu erklären ist und eventuelle durch Phosphorylierung entstandene Strukturänderungen eines Proteins bei der in dieser Arbeit angewandten SDS-Gelelektrophorese keine Rolle spielen, da die Proteine zuvor denaturiert werden. Es wäre daher

auch denkbar, dass durch reduzierte SDS-Bindungen entstandene Artefakte zu einer derartigen Bande führen.

Im Laufe dieser Arbeit kann dann jedoch erstmals belegt werden, dass der Shift von NIPA nach Zellschädigung im Western Blot die phosphorylierte Form darstellt. Versuche bei denen die Zelllysate von D1-Zellen mit alkaliner Phosphatase (Abb. 5.2.) behandelt wurden, zeigen, dass ein durch die verschiedenen Stimuli induzierter Shift von NIPA im Western Blot vollständig unterbunden werden kann. Dies kann als Hinweis dafür herangezogen werden, dass es sich bei der posttranslationalen Modifikation von NIPA nach DNS-Schädigung tatsächlich um Phosphorylierung handelt.

Nähere Details über die Ausprägung und Kinetik einer Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung erhält man aus den Abbildungen 5.1. a-h. Hier zeigt sich, dass ein sehr breites Spektrum an unterschiedlichen Zellschäden eine Phosphorylierung von NIPA bewirkt. So führen sowohl Agenzien, die Einzelstrangbrüche in der DNS provozieren, wie zum Beispiel Cisplatin durch Quervernetzung und MMS durch Alkylierung des DNS-Stranges, als auch Doppelstrangbruch-induzierende Stimuli, wie Doxorubicin, Etoposid, Natriumchlorid (NaCl) und ionisierende Gammastrahlung und auch nicht direkt die DNS angreifende Stresse, wie Tunicamycin, zu einer Phosphorylierung von NIPA. Auffallend ist hierbei, dass es im Gegensatz zur UV-Bestrahlung zu keiner vollständigen Phosphorylierung von NIPA kommt, sondern dass nur ein Teil des Substrates umgesetzt wird. Außerdem rufen die in dieser Arbeit verwendeten Stimuli eine zeitlich nur kurz anhaltende Phosphorylierung hervor, wohingegen die Phosphorylierung nach UVC-Bestrahlung noch bis 8h nach Bestrahlung im Western Blot zu sehen ist [von Klitzing, Manuskript in Vorbereitung].

Die Phosphorylierung von NIPA unterliegt bei den einzelnen Stimuli unterschiedlichen Dynamiken. Ionisierende Strahlung, NaCl, Tunicamycin und Hitze rufen bereits nach 10 min eine Phosphorylierung von NIPA hervor, die untersuchten Zytostatika erst nach 30 min. Für diesen zeitlichen Unterschied könnten eine unterschiedlich schnelle Aufnahme der Substanzen in die Zelle und eine ungleich starke Ausprägung des Schadens verantwortlich sein. Des Weiteren könnte eine derartig verzögerte Wirkung auch darauf zurückzuführen sein, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika erst im Rahmen der Replikation auftreten, wohingegen die übrigen Agenzien und Gammastrahlen einen direkten Schaden an der DNS oder in der Zelle verursachen könnten. Keine Rolle für diese zeitliche Diskrepanz scheint die Art des Schadens zu spielen. Einzelstrangbrüche aktivieren in der Regel den ATR-Signalweg [Zhou und Elledge 2000], Doppelstrangbrüche vor allem den ATM-Signalweg [Shiloh 2003]. Die Phosphorylierung von NIPA erfolgt aber zeitlich unabhängig davon, welcher Schadensantwort-Signalweg vorwiegend aktiviert wird. Doppelstrangbruch-induzierende ionisierende Gammastrahlung und NaCl zeigen 10 min nach Behandlung der Zellen den stärksten Shift im

Western Blot. Die durch die Zytostatika Doxorubicin und Etoposid provozierten Doppelstrangbrüche führen erst nach 30 min zu einer Phosphorylierung von NIPA. Bei den Einzelstrangbruch-induzierenden Zytostatika Cisplatin und MMS ist der Shift ebenfalls erst nach 30 min am stärksten ausgeprägt. Diese Feststellung stützt die Annahme, dass der Zeitpunkt, an dem der Schaden provoziert und erkannt wird, für eine Phosphorylierung von NIPA von Bedeutung ist und nicht die Tatsache welcher Schadensantwort-Signalweg aktiviert wird.

Es ist interessant zu sehen, dass vollkommen unterschiedliche Schäden an der DNS und auch DNS-unabhängige Stresse eine Phosphorylierung von NIPA induzieren. NIPA könnte somit unabhängig von der Art eines Schadens einen Einfluss auf die Regulation der Zelle nach Zellschädigung nehmen.

Noch ist nicht bekannt, welche Auswirkung die Phosphorylierung von NIPA nach Zellschädigung hat und ob es wichtig ist, dass besonders viel Substrat in seiner phosphorylierten Form vorliegt, damit eine adäquate Antwort in der Zelle hervorgerufen werden kann. Festzuhalten ist jedoch, dass die Bestrahlung mit UVC-Licht dazu führt, dass NIPA vollständig phosphoryliert wird, die übrigen Stimuli dagegen nur einen Teil von NIPA umsetzen. Es bleibt jedoch zu untersuchen, ob andere Konzentrationen der verwendeten Agenzien und eine unterschiedlich starke Gammastrahlung ebenfalls eine vollständige Phosphorylierung von NIPA erzielen könnten.

Im ungestörten Zellzyklus bewirkt die Phosphorylierung von NIPA am G2/M-Übergang die Dissoziation von NIPA vom SCF^{NIPA}-Komplex und damit, dass dieser seine Ubiquitin-Ligase-Aktivität verliert und Substrate nicht mehr für ihren Abbau markiert [Bassermann *et al.* 2005]. Sollte die Inaktivierung des SCF^{NIPA}-Komplexes und eine damit verbundene Anreicherung von Substraten auch eine Schlüsselfunktion nach einem DNS-Schaden einnehmen, wäre vermutlich eine möglichst vollständige Umsetzung von NIPA notwendig, um eine effektive Inaktivierung der Ubiquitin-Ligase zu erlangen. Wenn jedoch die phosphorylierte Form von NIPA selbst aktiv in das Geschehen des Schadensantwort-Signalweges eingreifen könnte, ist davon auszugehen, dass auch schon die Phosphorylierung eines Teils von NIPA eine Auswirkung haben könnte.

Für die Versuche dieser Arbeit wurden unsynchronisierte Zellen verwendet und außerdem führen die verwendeten Agenzien nicht dazu, dass das gesamte Substrat in seine phosphorylierte Form umgesetzt wird. Es kann daher nicht differenziert werden, in welcher Zellzyklusphase sich die Zellen mit phosphoryliertem NIPA befinden und ob die Phosphorylierung vielleicht nur in einer bestimmten Phase stattfindet. Der sehr kurze Zeitraum von nur 10 min nach dem es bei einigen Stimuli bereits zu einer Phosphorylierung kommt, weist jedoch darauf hin, dass die Phosphorylierung nicht auf einen sekundären Effekt durch Akkumulierung der Zellen am G2/M-Übergang zurückzuführen ist, sondern dass NIPA als

Antwort auf den Zellschaden hin reguliert wird.

Nach der Behandlung mit Doxorubicin kommt es zu einer zweiphasigen Antwort (Abb. 5.1. d). Eine erste Phosphorylierung von NIPA tritt nach 30 min auf und verschwindet nach 2 h wieder vollständig. Dann kommt es zu einer erneuten Phosphorylierung nach 4 h. Diese Phosphorylierung von NIPA ruft im Western Blot eine im Vergleich zum 30min-Wert höher gelegene Bande hervor. Diese Feststellung legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem zweiten Shift nach 4 h um eine zum ersten Shift unterschiedliche Phosphorylierung handelt, die unter Umständen durch andere Signalwege induziert sein und verschiedene Funktionen von NIPA im Rahmen der Schadensantwort regulieren könnte.

Eine weitere interessante Beobachtung konnte bei Betrachtung des Proteinlevels von NIPA nach Behandlung der Zellen mit NaCl gemacht werden. In Abbildung 5.1. f zeigt sich, dass es 4 h nach der Behandlung der Zellen zu einer Akkumulierung der nicht phosphorylierten Form von NIPA kommt. Hierfür könnte eine Neusynthese von NIPA oder eine verminderte Degradation infrage kommen. Im nicht phosphorylierten Zustand bindet NIPA an den SCF^{NIPA}-Komplex und aktiviert diesen dadurch in seiner Funktion als Ubiquitin-Ligase, die den Abbau von Substraten fördert [Bassermann *et al.* 2005]. Eine Akkumulierung von nicht phosphoryliertem NIPA könnte darauf hindeuten, dass die Zelle nach Behandlung mit NaCl mit einer Hochregulierung der Ubiquitin-Ligase reagiert, um den Abbau von noch unbekanntem Substraten zu fördern. Allerdings wird auch p53 im Vergleich zum vorausgehenden Zeitpunkt hochreguliert, sodass für die Akkumulierung von NIPA ebenso ein allgemeiner Anstieg der Transkription oder Translation infrage käme.

6.2. NIPA wird nach DNS-Schädigung an Serin 354 phosphoryliert

In einem weiteren Schritt wurde untersucht an welcher Position NIPA nach DNS-Schädigung phosphoryliert wird. In früheren Arbeiten konnten drei Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, die am Übergang der Zelle in die Mitose an der Phosphorylierung von NIPA beteiligt sind [Bassermann *et al.* 2007]. Erste Versuche nach DNS-Schädigung haben jedoch gezeigt, dass nach UVC-Strahlung nur die Phosphorylierung an Serin 354 entscheidend zu sein scheint [von Klitzing in Vorbereitung]. Experimente mit der Phosphorylierungsdefizienzmutante S354A sollten Aufschluss darüber geben, ob diese Position von NIPA auch nach Behandlung der in dieser Arbeit verwendeten Stimuli eine entscheidende Rolle spiele. Abbildung 5.4. zeigt, dass die Position Ser 354 nicht nur nach UV-induzierten Einzelstrangbrüchen sondern auch nach andersartigen DNS-Schäden die relevante Phosphorylierungsstelle von NIPA ist. Es ist interessant zu sehen, dass die unterschiedlichen Agenzien und Stresse immer eine Phosphorylierung von NIPA an S354 hervorrufen, obwohl durch die Stimuli verschiedene Signalwege aktiviert werden. Dies deutet darauf hin, dass NIPA unabhängig von der Art des

Schadens in all diesen Situationen die gleiche Funktion haben könnte.

Weiterhin ist zu bemerken, dass sich der Shift von NIPA durch Mutation eines einzigen Serinrestes (Ser 354) vollständig inhibieren lässt. Man kann deshalb davon ausgehen, dass Ser 354 in diesen Fällen die einzige Phosphorylierungsstelle von NIPA nach DNS-Schädigung ist, oder aber, dass die Phosphorylierung an dieser Position Voraussetzung für weitere Phosphorylierungen an anderen Positionen darstellt.

Einen ersten Hinweis auf eine weitere zu Ser 354 unterschiedliche Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung liefert die Abbildung 5.1. d. Wie bereits im vorausgehenden Kapitel erwähnt, kommt es 4 h nach der Behandlung der Zellen mit Doxorubicin zu einem Shift der Bande, der höher liegt, als der Shift nach 30 min. Es ist möglich, dass es sich bei dieser Bandenverschiebung nach 4 h um eine zu Ser 354 unterschiedliche oder zusätzliche Phosphorylierung des Proteins handelt. Ein höher gelegener Shift von NIPA wurde teilweise auch nach Bestrahlung der Zellen mit 150 J/m² UVC-Licht bemerkt. Versuche mit der Phosphorylierungsdefizienzmutante S354A und weiteren Phosphorylierungsdefizienzmutanten für die beiden anderen Hauptphosphorylierungsstellen von NIPA am G2/M-Übergang könnten zukünftig Aufschluss darüber geben, ob es sich bei dieser Phosphorylierung um eine vom 30min-Wert unterschiedliche Phosphorylierung handelt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant herauszufinden, ob die Phosphorylierungen aufeinander aufbauen, eine Phosphorylierung an Position 354 also Voraussetzung für weitere Phosphorylierungsschritte an anderen Positionen des Proteins ist, so wie es am G2/M-Übergang vermutet wird [Bassermann *et al.* 2007].

6.3. p53-unabhängige Phosphorylierung von NIPA

Nach DNS-Schädigung kommt es zu verschiedenen Vorgängen in der Zelle, die dafür sorgen, dass ein entstandener Fehler erkannt und behoben werden kann. Eine zentrale Rolle in der DNS-Schadensantwort spielt das Effektorprotein p53 (Kap. 3.4.). Die Abbildungen 5.1. weisen darauf hin, dass p53 jedoch keinen unmittelbaren Einfluss auf die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigungen zu haben scheint. Die Akkumulierung von p53 nach Behandlung der Zellen mit den zellschädigenden Substanzen erfolgt zeitlich erst, nachdem NIPA bereits phosphoryliert worden ist. Nach Behandlung der Zellen mit Tunicamycin wird p53 sogar überhaupt nicht aktiviert, NIPA jedoch trotzdem phosphoryliert.

Ein weiterer Versuch (Abb. 5.3.), in dem p53-exprimierende D1-Zellen mit solchen verglichen werden, in denen p53 mithilfe von miRNA herunter reguliert werden konnte, festigt diese Aussage. Die D1-Zellen, in denen p53 herunter reguliert wurde, weisen eine gleich starke Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung auf wie die p53-exprimierende D1-Zellen.

Hiermit wird gezeigt, dass die Regulierung von NIPA innerhalb der Schadensantwort p53-unabhängig erfolgt.

Angemerkt werden muss jedoch, dass das Proteinlevel von p53 unter normalen Umständen in der Zelle niedrig ist und erst nach Zellschädigung akkumuliert [Oren 1999]. Bei diesem Versuch ist die p53-Expression allerdings bereits bei den unbehandelten Kontroll-miRNA Zellen (p53-exprimierende D1-Zellen) im Western Blot nachweisbar und nimmt nach Bestrahlung nicht weiter zu. Dies kann daran liegen, dass die Zellen auf die Manipulation durch retrovirales Einbringen der Fremd-miRNA bereits mit einer Hochregulierung von p53 reagieren.

Wie bereits gezeigt wurde, kommt es 4 h nach Behandlung der D1-Zellen mit Doxorubicin zu einer erneuten Phosphorylierung von NIPA. Diese tritt zeitlich nach der Akkumulierung von p53 auf und könnte damit einen Hinweis darauf geben, dass neben der p53-unabhängigen andere Phosphorylierungen existieren können, die einer p53-abhängigen Antwort unterliegen. Es wäre daher aufschlussreich sich den Shift nach 4 h in weiterführenden Experimenten genauer anzuschauen.

6.4. Regulierung von NIPA in der DNS-Schadensantwort

Erste Versuche am G2/M-Übergang zeigen, dass die Phosphorylierung von NIPA an Ser 354 im ungestörten Zellzyklus durch die Kinase Erk2 des MAP-Kinase Signaltransduktionswegs vermittelt wird [Zech, Manuskript in Vorbereitung]. Außerdem ist bekannt, dass die Transduktorkinasen ATR und ATM und die von ihnen aktivierten Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 eine wichtige Rolle im Rahmen der DNS-Schadensantwort spielen (Kap. 3.4.). Im Rahmen dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob eine dieser Kinasen für eine Phosphorylierung von NIPA an Ser 354 nach DNS-Schädigung verantwortlich sein könnte.

Zunächst wurden Versuche mit dem Inhibitor Caffeine für ATR und ATM (Abb. 5.5.) und dem Inhibitor U0126 für Erk1 und Erk2 (Abb. 5.6.) durchgeführt. Hierbei ist zu sehen, dass sowohl eine Inhibierung von ATR und ATM, als auch von Erk1 und Erk2 zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von NIPA nach UV-Bestrahlung beziehungsweise MMS Behandlung führt.

Die getrennte Betrachtung von Erk1 und Erk2 erfolgte mithilfe von Zellen, in denen entweder Erk1 oder Erk2 mittels miRNA herunterreguliert wurde (Abb. 5.7.). Hier kann gezeigt werden, dass Erk1 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht die Aufgabe der phosphorylierenden Kinase übernimmt, Erk2 hingegen einen sehr eindeutigen Effekt besitzt.

Die in diesem Versuch verwendeten DNS schädigenden Stimuli (UVC und MMS) induzieren in erster Linie Einzelstrangbrüche und aktivieren damit vor allem den ATR-Signalweg. In der Aminosäureabfolge von NIPA wird der Serinrest an Position 354 von einem Valin

(Position 349), einem Arginin (Position 351) und einem Tryptophan (Position 355) flankiert. Die an Position 349 und 351 befindlichen Aminosäuren sind ebenfalls in einer Konsensus-Phosphorylierungsstelle der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 zu finden. Hier geht dem phosphorylierten Serinrest an Position -3 ein Arginin und an Position -5 eine Aminosäure mit hydrophober Seitenkette voraus [Chen *et al.* 2000, O'Neill *et al.* 2002]. Die beiden Transduktorkinasen ATR oder ATM besitzen hingegen keine für NIPA passende Konsensus-Phosphorylierungsstelle, da in ihrer Sequenz dem phosphorylierten Serin ein Glutamin folgt [Kim *et al.* 1999, O'Neill *et al.* 2000]. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht ATR oder ATM direkt, sondern die von ihnen aktivierten Checkpointkinasen Chk1 oder Chk2 NIPA phosphorylieren.

Zusammenfassend kann an dieser Stelle gesagt werden, dass sowohl der ATR-Signalweg, als auch die Kinase Erk2 an der Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung beteiligt sind. ATM und Chk2 wurden im Rahmen des Caffeine-Versuches mit untersucht, ihre direkte Beteiligung an einer Phosphorylierung jedoch nicht einzeln erfasst. ATM wird vor allem durch Doppelstrangbrüche aktiviert [Shiloh 2003]. Es ist deshalb möglich, dass der ATM-Signalweg nach adäquater Aktivierung ebenfalls für die Phosphorylierung zuständig sein könnte. Die in dieser Arbeit verwendeten Doppelstrangbruch-induzierenden Agenzien und Gammastrahlung führen jedoch zu keiner vollständigen Phosphorylierung von NIPA. Da es zu Überschneidungen der ATR- und ATM-Signalwege kommt [Kastan und Lim 2000, Zhou und Elledge 2000] und ATR in geringerem Maße auch durch Doppelstrangbrüche aktiviert wird, wäre es möglich, dass die Phosphorylierung von NIPA nach Doppelstrangbrüchen ebenfalls ATR vermittelt ist.

Die Abbildungen 5.5. – 5.7. betrachten den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg und den ATM/ATR-Signalweg getrennt voneinander. Es kann also keine Aussage darüber getroffen werden, ob die angesprochenen Signalwege parallel verlaufen und unabhängig voneinander die Phosphorylierung bewirken, oder ob sie sich nach Ausfall des einen Signalweges ergänzen und die Phosphorylierung der gehemmten Kinasen übernehmen. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang sowohl den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg als auch den ATM/ATR-Signalweg zu unterbinden und anschließend die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung zu untersuchen. Bei vollständiger Unterdrückung der Phosphorylierung von NIPA könnte hiernach die Beteiligung weiterer Kinasen ausgeschlossen werden.

Die aufgeführten Versuche untersuchen alle die Phosphorylierung an Ser 354 von NIPA. In Kapitel 6.2. wurde bereits diskutiert, dass es nach Behandlung der Zellen mit Doxorubicin oder nach einer Bestrahlung mit 150 J/m² neben der Phosphorylierung an Ser 354 zu weiteren Phosphorylierungen von NIPA kommen könnte. Es wäre interessant herauszufinden, ob die Phosphorylierung weiterer Positionen des Proteins durch andere Kinasen vermittelt wird. Dies könnte eventuell auch ein Erklärungsansatz dafür sein, dass es nach Inhibition mit U0126

(Abb. 5.6.) und nach Herunterregulierung von Erk2 (Abb. 5.7. b) zwar zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von NIPA nach Bestrahlung mit 20 J/m² oder Behandlung mit MMS kommt, dieser Effekt nach Bestrahlung mit 150 J/m² jedoch abgeschwächt ist.

6.5. Antiapoptotische Wirkung von NIPA

Über die Regulierung auf molekularer Ebene hinaus, sollte anhand verschiedener Versuche die Bedeutung von NIPA nach DNS-Schädigung für die Zelle als Ganzes untersucht werden.

Mithilfe der Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffes Propidiumiodid in die DNS und Messung des DNS-Gehaltes mittels FACS wurde das Überleben von NIPA-exprimierenden und NIPA-defizienten Mausembryofibroblasten (MEFs) nach DNS-Schädigung verglichen. Die Abbildungen 5.8. a+c zeigen in Versuchen mit immortalisierten Zelllinien und primären Mausembryofibroblasten, dass die Zellen der NIPA-defizienten Mäuse sensibler auf eine Bestrahlung mit UV-Licht reagieren als die Zellen der Wildtyp Mäuse. Mit einem zusätzlichen Rescue Experiment, bei dem NIPA retroviral in die Knockout MEF-Zelllinien transfiziert wurde, sollte gezeigt werden, dass sich die Knockout MEF-Zelllinien nach Einbringen von NIPA in Bezug auf ihr Überleben wieder an die Wildtyp-Zelllinien angleichen würden. Leider wurden die Zellen durch die Virusinfektion so beeinträchtigt, dass sie nicht für Versuche verwendet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Die protektive Wirkung von NIPA für das Überleben der Zelle kann auch in U2OS-Zellen beobachtet werden. Hierbei wurde unter Anwendung von Colony Assays die Sensibilität von NIPA-exprimierenden U2OS-Zellen und U2OS-Zellen mit durch Transfektion von siRNA verminderteter NIPA-Expression nach UV-Bestrahlung untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass eine verminderte Expression von NIPA zu einer verminderten Überlebensrate nach UV-Bestrahlung führt (Abb. 5.9.). Eine Überexpression von NIPA in den U2OS-Zellen führt zu keinem weiteren Anstieg an überlebenden Zellen im Colony Assay (Daten nicht gezeigt).

Es wird gezeigt, dass NIPA der Zelle nach einem Zellschaden einen Überlebensvorteil verschafft. Dabei ist es jedoch nicht von Bedeutung wie viel NIPA von der Zelle exprimiert wird. Eine Überexpression zeigt keinen deutlicheren Effekt. Die genauen Mechanismen, auf die eine antiapoptotische Wirkung von NIPA zurückzuführen ist, sind jedoch noch nicht entschlüsselt und sollten in weitergehenden Experimenten untersucht werden.

6.6. Funktion von NIPA am G2/M-Kontrollpunkt

Das Wissen über den verfrühten Eintritt NIPA-defizienter Zellen in die Mitose [Bassermann *et al.* 2005] und die antiapoptotische Wirkung des Proteins legen die Vermutung nahe, dass NIPA neben einer direkten Funktion nach einem Zellschaden auch eine

entscheidende Funktion am G2/M-Übergang nach DNS-Schädigung haben und eventuell als Kontrollpunktprotein fungieren könne.

Es sollte verglichen werden, ob der Verlust von NIPA, oder eine Überexpression des Proteins einen Einfluss auf den Eintritt der Zelle in die Mitose nach DNS-Schädigung nehmen würde. Hierfür wurden synchronisierte Zellen 8 h nach G1/S-Release, in der G2-Phase, mit Doxorubicin behandelt und im Zeitverlauf im FACS-Gerät analysiert. Die Erfassung des Eintritts der Zellen in die Mitose erfolgte mithilfe der Färbung der Zellen mit einem anti-Phospho-Histon H3 Antikörper und Propidiumiodid. Die Phosphorylierung von Histon H3 beim Eintritt der Zelle in die Mitose macht es möglich die phosphorylierte Form von Histon H3 als Mitosemarker zu verwenden (Kap. 4.2.1.7.1.2.).

Zunächst wurden U2OS-Zellen, die NIPA überexprimieren, mit U2OS-Zellen mit physiologischer NIPA-Expression, die mit einem Leervektor transfiziert wurden, verglichen. Die Abbildungen 5.10. c verdeutlichen, dass die Behandlung mit Doxorubicin zu einer Aktivierung des G2/M-Kontrollpunkts führt. Die behandelten Zellen gehen kaum oder nur deutlich verzögert in Mitose. Der Versuch zeigt jedoch, dass die Überexpression von NIPA keinen Einfluss auf die Integrität des G2/M-Kontrollpunkts nimmt. Auch im Colony Assay scheint eine Überexpression von NIPA keine Auswirkung zu haben (Kap. 6.5. Daten nicht gezeigt).

Daher wurde dieser Versuch im Anschluss mit U2OS-Zellen durchgeführt, die NIPA normal exprimieren oder in denen NIPA herunterreguliert wurde, um herauszufinden, ob eine verminderte NIPA-Expression einen Einfluss auf die Integrität des G2/M-Kontrollpunkts hat. In vorausgehenden Arbeiten wird bereits beschrieben, dass ein Verlust von NIPA zu einem verfrühten Eintritt der Zelle in die Mitose führt [Bassermann *et al.* 2005]. Dieses abweichende Verhalten NIPA-defizienter Zellen, den Zellzyklus zu durchlaufen, erklärt die Tatsache, dass sich die Zellen, in denen NIPA fast vollständig herunterreguliert wurde und die NIPA-exprimierenden Zellen nicht gleichmäßig synchronisieren ließen und damit einer Vergleichbarkeit für den Versuch entzogen. Aufgrund der genannten Schwierigkeiten kann leider keine Aussage darüber getroffen werden, ob NIPA eine Funktion als Kontrollpunktprotein übernimmt. Eine mögliche Beteiligung von NIPA am G2/M-Kontrollpunkt bleibt weiterhin bestehen und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Da der beschriebene Zellzyklusdefekt in primären NIPA Knockout-MEFs (NIPA $-/-$) nicht zu sehen ist [Illert *et al.* bisher unveröffentlichte Daten], ließe sich eventuell in diesem System ein Einfluss der NIPA-Expression auf die Integrität des G2/M-Kontrollpunktes untersuchen.

Die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung ist, wie in Kapitel 6.1. beschrieben, nicht ausschließlich auf einen sekundären Effekt aufgrund einer Akkumulierung der Zellen am G2/M-Übergang zurückzuführen, sondern stellt auch eine direkte Antwort auf DNS-Schädigung

dar. Deshalb ist davon auszugehen, dass es neben einer Regulation am G2/M-Übergang weitere Komponenten für die protektive Wirkung von NIPA gibt. Auch die Tatsache, dass eine Überexpression von NIPA keinen Unterschied zu machen scheint, wie schnell die Zelle den G2/M-Kontrollpunkt passiert, legt die Vermutung nahe, dass NIPA neben einer Regulation am Übertritt in die Mitose eine zusätzliche Funktion nach einem DNS-Schaden besitzt, die der Zelle einen Überlebensvorteil verschafft. Es wäre interessant herauszufinden, ob NIPA direkt an der Schadenserkenkung beteiligt ist. Um Aufschluss darüber zu erlangen sollte NIPA in weiterführenden Experimenten im Zusammenspiel mit an der DNS-Schadensantwort beteiligten Proteinen betrachtet werden.

6.7. Bindung von NIPA an die DNS

Viele Proteine besitzen Motive in ihrer Aminosäurenabfolge, die ein Binden an die DNS und damit eine Interaktion mit dieser ermöglichen. Ein solches Motiv ist das des Zinkfingers [Klug und Schwabe 1995]. NIPA besitzt ebenfalls Sequenzen, die Homologie zu Zinkfingern besitzen [Kokoszynska *et al.* 2008]. Noch ist nicht bekannt, welche Funktion das Zinkfingermotiv von NIPA besitzt. Es ist jedoch möglich, dass NIPA als Sensorprotein fungieren und direkt an der Schadenserkenkung und Reparatur von DNS-Schäden beteiligt sein könnte. Nach DNS-Schädigung werden diese sogenannten Sensorproteine an die Stelle des Schadens rekrutiert und sorgen dafür, dass der Schadensantwort Signalweg aktiviert wird und Reparaturmechanismen in Kraft treten. Zu untersuchen bleibt, ob NIPA nach DNS-Schädigung für eine derartige Rekrutierung und oder Aktivierung anderer Proteine verantwortlich sein könnte. Seine direkte Bindung an die DNS könnte damit eine entscheidende Bedeutung für eine Funktion von NIPA nach DNS-Schädigung haben.

Mit dem Vorhandensein der Zinkfinger motive erfüllt NIPA die Voraussetzung für eine potenzielle Bindung an die DNS. Erste Versuche dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine direkte Bindung von NIPA an die DNS möglich sein könnte (Abb. 5.11.). Durch Auftrennung der einzelnen Zellkomponenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die phosphorylierte Form als auch die nicht phosphorylierte Form von NIPA unter den festen Kernbestandteilen zu finden ist. Somit scheint die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigungen nicht Voraussetzung für eine Bindung von NIPA an diese Zellkomponente zu sein.

In weiterführenden Experimenten wurde versucht die Fraktion der festen Kernbestandteile weiter aufzuschlüsseln. Mithilfe von Mikrokokken-Nuklease, einem Enzym, das die DNS in kleinere Fragmente zerschneidet, sollte überprüft werden, ob NIPA direkt an die DNS oder an Membranbestandteile binde. Leider konnte diese Aufgabe bislang nicht zufriedenstellend umgesetzt werden. Es sollten daher weitere Methoden erarbeitet werden, um der spannenden Frage einer Bindung von NIPA an die DNS und der damit verbundenen Funktion von NIPA

nach DNS-Schädigung nachzugehen. Mithilfe einer Zinkfinger-Mutante, die nicht mehr in der Lage ist an die DNS zu binden, könnten eine Bindung von NIPA und eine eventuelle, damit verbundene Funktion nach DNS-Schädigung in zukünftigen Versuchen näher beleuchtet werden.

6.8. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch verschiedene zellschädigende und DNS-schädigende Substanzen zu einer Phosphorylierung von NIPA kommt. Diese Phosphorylierung scheint nicht sekundär durch Akkumulation der Zellen am G2/M-Übergang zu entstehen. Entscheidend für die Phosphorylierung des Proteins ist bei den untersuchten Stimuli die Position 354 der Aminosäureabfolge. Es gibt jedoch Anzeichen dafür, dass wie am G2/M-Übergang auch nach DNS-Schädigung weitere Phosphorylierungsstellen eine Rolle spielen könnten. Eine einzige für die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung zuständige Kinase konnte nicht ermittelt werden. Es sieht viel mehr danach aus, dass das Zusammenspiel des ATM/ATR-Signalwegs mit der MAP-Kinase Erk2 für eine Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung sorgt.

Neben der posttranslationalen Modifikation von NIPA war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Aufschluss über die Rolle von NIPA im Zellzyklus nach DNS-Schädigung zu erhalten. Leider ist es bisher nicht gelungen, diese Funktion von NIPA vollständig zu entschlüsseln. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von NIPA nach DNS-Schädigung unabhängig einer Aktivierung des im Rahmen der Schadensantwort wichtigen Effektorproteins p53 erfolgt. Um das Verständnis über eine Beteiligung von NIPA innerhalb der beschriebenen Signalwege zu verbessern, sollte NIPA zukünftig im Zusammenspiel mit weiteren, an der DNS-Schadensantwort beteiligten Proteinen betrachtet werden.

Für die Zelle als Ganzes wurde festgestellt, dass NIPA einen antiapoptotischen Effekt besitzt. Weiterhin ungeklärt bleibt jedoch, wie NIPA diese antiapoptotische Wirkung vermittelt. Einen Erklärungsansatz hierfür sollte die Funktion von NIPA als Kontrollpunktprotein liefern. Der für NIPA-defiziente Zellen beschriebene verfrühte Eintritt der Zellen in Mitose, führte jedoch dazu, dass erste Experimente, eine Beteiligung von NIPA am G2/M-Kontrollpunkt betreffend, nicht zufriedenstellend durchgeführt werden konnten.

Zuletzt wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob NIPA eine direkte Bindung mit der DNS eingehe und damit direkt an der Schadenserkenkung und Reparatur von DNS-Schäden beteiligt sein könnte. Auch hier gilt es, die auf den ersten Blick viel versprechenden Ergebnisse in weiterführenden Arbeiten zu reproduzieren und in einen Kontext mit dem bis dato erlangten Wissen zu bringen.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

'	Minuten
°	Grad
∅	Durchmesser
A	Ampère
Abb.	Abbildung
ALK	anaplastic lymphoma kinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM-Rad3-related
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serums-Albumin
C	Celsius
Cdc	Cell division cycle [Phosphatase]
Cdk	Cyclin abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
Chk1	Checkpointkinase 1
Chk2	Checkpointkinase 2
cm	Zentimeter (10^{-2})
Cul1	Cullin 1
dest.	destillata
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Erk	extracellular-signal regulated kinase
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G0	„Gap“-Phase 0 (Ruhephase)
G1	„Gap“-Phase 1 (Wachstumsphase)
G1/S	Übergang von der „Gap“-Phase 1 in die Synthesephase
G2	„Gap“-Phase 2 (Wachstumsphase)
G2/M	Übergang von der „Gap“-Phase 2 in die Mitose
Gadd45	growth arrest and DNA damage 45 [Gen]
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
h	Stunde (lat.: hora)
Ig	Immunglobulin
J	Joule
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
ko	Knockout
l	Liter
lv	Leervektor
m ²	Quadratmeter
M	Mitose

MAP	mitogen-activated protein
Mdm2	mouse double minute 2 [Ubiquitin-Ligase]
MEFs	Mausembryofibroblasten
MEK	MAP Kinase Kinase
min	Minute
Mio	Million
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	Boten-RNS (messenger RNA)
Myt1	myelin transcription factor 1 [Gen]
µg	Mikrogramm (10^{-6})
µl	Mikroliter (10^{-6})
µm	Mikrometer (10^{-6})
NaCl	Natriumchlorid
NIPA	nuclear interaction partner of ALK
ng	Nanogramm (10^{-9})
nm	Nanometer (10^{-9})
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PIKKs	Phosphoinositol-3-kinase-ähnlichen Kinasen
rcf	Relative Zentrifugationsbeschleunigung (relative centrifugation force) rcf = $0.00001118 \times r \times \text{rpm}^2$
RING	really interesting new gene
RNA	ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure (engl.: RNA – ribonucleic acid)
Roc1	(RING finger protein)
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	S-Phase (Synthesephase)
SCF	Skp, Cullin, F-box
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Skp1	s-phase kinase-associated protein 1
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
UV	ultraviolett
V	Volt
Wee1	[Gen]
wt	Wildtyp
w/o	without

7.2. Literaturverzeichnis

- Abraham RT** (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15(17): 2177-96
- Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG** (1996). Identification of a cyclin-Cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol* 16(12): 6623– 6633.
- Arcasoy SM, Latoche JD, Gondor M, Pitt BR, Pilewski JM** (1997) Polycations increase the efficiency of adenovirus-mediated gene transfer to epithelial and endothelial cells in vitro. *Gene Ther* 4(1): 32-8
- Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper J und Elledge S** (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86(2): 263-74
- Bartek J, Lukas J** (2001 a) Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13(6): 738-47
- Bartek J, Lukas J** (2001 b) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 490(3): 117-22
- Bassermann F, von Klitzing C, Illert AL, Münch S, Morris SW, Pagano M, Peschel C, Duyster J** (2007) Multisite phosphorylation of nuclear interaction partner of ALK (NIPA) at G2/M involves cyclin B1/Cdk1. *J Biol Chem* 282(22): 15965-72
- Bassermann F, von Klitzing C, Münch S, Bai RY, Kawaguchi H, Morris SW, Peschel C, Duyster J** (2005) NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell* 15; 122(1): 45-57
- Blagosklonny MV** (1999) A node between proliferation, apoptosis, and growth arrest. *Bioessays* 21(8): 704-9
- Blasina A, de Weyer IV, Laus MC, Luyten WH, Parker AE, McGowan CH** (1999) A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr Biol* 9(1): 1-10
- Booher RN, Holman PS, Fattaey A** (1997) Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* 272(35): 22300-6
- Boutros R, Dozier Z, Ducommun B** (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* 18(2): 185-91
- Bresler SE, Noskin LA, Suslov AV** (1984) Induction by gamma irradiation of double-strand breaks of Escherichia coli chromosomes and their role in cell lethality. *Biophys J* 45(4): 749-54
- Brown RS** (2005) Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol* 15(1): 94-8
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, Sedivy JM, Kinzler KW, Vogelstein B** (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282(5393): 1497-501

- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI** (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87(4): 1441-74
- Capasso JM, Rivard CJ, Berl T** (2001) Long-term adaptation of renal cells to hypertonicity: role of MAP kinases and Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(5): F768-76
- Cardozo T, Pagano M** (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 739-51
- Cerutti PA** (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227(4685): 375-81
- Chaturvedi P, Eng WK, Zhu Y, Mattern MR, Mishra R, Hurle MR, Zhang X, Annan RS, Lu Q, Faucette LF, Scott GF, Li X, Carr SA, Johnson RK, Winkler JD, Zhou BB** (1999) Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* 18(28): 4047-54
- Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD** (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14(3): 278-88
- Chen P, Luo C, Deng Y, Ryan K, Register J, Margosiak S, Tempczyk-Russell A, Nguyen B, Myers P, Lundgren K, Kan CC, O'Connor P** (2000) The 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1: implications for Chk1 regulation. *Cell* 100(6): 681-92
- Conti C, Mastromarino P, Riccioli A, Orsi N** (1991) Electrostatic interactions in the early events of VSV infection. *Res Virol* 142(1): 17-24
- Costanzo V, Robertson K, Ying CY, Kim E, Avvedimento E, Gottesman M, Grieco D, Gautier J** (2000) Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Mol Cell* 6(3): 649-59
- Dickins RA, Hemann MT, Zilfou JT, Simpson DR, Ibarra I, Hannon GJ, Lowe SW** (2005) Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet* 37(11): 1289-95
- Dmitrieva NI, Bulavin DV, Burg MB** (2003) High NaCl causes Mre11 to leave the nucleus, disrupting DNA damage signaling and repair. *Am J Physiol Renal Physiol* 285(2): F266-74
- Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB** (2004) Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2317-22
- Dulić V, Kaufmann W, Wilson S, Tlsty T, Lees E, Harper J, Elledge S, Reed SI** (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76: 1013-1023
- Dulić V, Lees E, Reed SI** (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257(5078): 1958-61
- Dumaz N, Meek DW** (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* 18(24): 7002-10
- Duncia JV, Santella JB 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL,**

- Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE** (1998). MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 8(20): 2839-44
- Elledge SJ** (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274(5293): 1664-72
- Falck J, Mailand N, Syljuåsen R, Bartek J, Lukas J** (2001) The ATM-Ck2 Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410(6830): 842-7
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feese WS, van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM** (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273(29): 18623-32
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP** (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* 32(2): 63-70
- Guo M, Hay BA** (1999) Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 11(6): 745-52
- Guo Z, Kumagai A, Wang SX, Dunphy WG** (2000) Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 14(21): 2745-56
- Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Daeven LL, Tobey RA** (1978) Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* 84(1): 1-15
- Hartwell LH, Kastan MB** (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* 266(5192): 1821-8
- Hartwell LH, Weinert TA** (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246(4930): 629-34
- Hendzel MJ, Wie Y, Mancini MA, van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD** (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106(6): 348-60
- Hirao A, Kong Y, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge S, Mak T** (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287(5459): 1824-7
- Hunt T** (1991) Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 2(4): 213-22
- Illert AL, Kawaguchi H, Bassermann F, Quintanilla-Martinez L, von Klitzing C, Schenk P, Barchi M, Hiwatari M, Peschel C, Morris SW, Duyster J** (submitted) Targeted inactivation of nuclear interaction partner of ALK (NIPA) disrupts meiotic prophase
- Jung Y, Lippard SJ** (2003) Multiple states of stalled T7 RNA polymerase at DNA lesions generated by platinum anticancer agents. *J Biol Chem* 278(52): 52084-92
- Kastan MB, Bartek J** (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015): 316-23

- Kastan MB, Lim DS** (2000) The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(3): 179-86
- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D** (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 14973-7
- Kim S, Lim D, Canman C, Kastan M** (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* 274(53): 37538-43
- King KL, Cidlowski JA** (1998) Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60: 601-17
- Klug A** (1999) Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J Mol Biol* 293(2): 215-8
- Klug A, Schwabe JW** (1995) Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J* 9(8): 597-604
- Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM** (1992) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257(5077): 1689-94
- Kokoszynska K, Rychlewski L, Wyrwicz LS** (2008) The mitotic entry regulator NIPA is a prototypic BIR domain protein. *Cell Cycle* 7(13): 2073-5
- Kornberg RD** (1977) Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46: 931-54
- Kuerbitz S, Plunkett B, Walsh W, Kastan M** (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7491-7495
- Kültz D, Chakravarty D** (2001) Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 1999-2004
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5
- Levine AJ** (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3): 323-31
- Li A, Blow J** (2001) The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol* 3: E182–184
- Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnica-Worms H** (1997) The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol Cell Biol* 17(2): 571-83
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ** (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14(12): 1448-59
- Lopez-Girona A, Furnari B, Mondesert O, Russell P** (1999) Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397: 172-175
- Lopez-Girona A, Kanoh J, Russell P** (2001) Nuclear exclusion of Cdc25 is not required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Curr Biol* 11(1): 50-4

- Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuåsen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J** (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 288(5470): 1425-9
- Markovits J, Pommier Y, Kerrigan D, Covey JM, Tilchen EJ, Kohn KW** (1987) Topoisomerase II-mediated DNA breaks and cytotoxicity in relation to cell proliferation and the cell cycle in NIH 3T3 fibroblasts and L1210 leukemia cells. *Cancer Res* 47(8): 2050-5
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ** (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282(5395): 1893-7
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ** (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19): 10389-94
- Matthews JM, Sunde M** (2002) Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life* 54(6): 351-5
- Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Martinez Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E, Oren M** (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15(9): 1067-77
- McIntosh JR, Koonce MP** (1989) Mitosis. *Science* 246(4930): 622-8
- Melchionna R, Chen XB, Blasina A, McGowan CH** (2000) Threonine 68 is required for radiation-induced phosphorylation and activation of Cds1. *Nat Cell Biol* 2(10): 762-5
- Méndez J, Stillman B** (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 20(22): 8602-12
- Mitchell DL, Jen J, Cleaver JE** (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol* 54(5): 741-6
- Mitchell DL, Nairn RS** (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* 49(6): 805-19
- Morgan DO** (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-91
- Morgan SE, Kastan MB** (1997) p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res* 71: 1-25
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT** (1994) Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263(5151): 1281-4
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73
- Muratovska A, Eccles MR** (2004) Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett* 558(1-3): 63-8

- Nigg EA** (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* 8(3): 312-7
- Nurse P** (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344(6266): 503-8
- Nurse P** (1997) Checkpoint pathways come of age. *Cell* 91(7): 865-7
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA** (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36: 617-56
- O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P** (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J* 16(3): 545-54
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M** (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15(5): 2612-24
- O'Neill T, Dwyer A, Ziv Y, Chan D, Lees-Miller S, Abraham R, Lai J, Hill D, Shiloh Y, Cantley L, Rathbun** (2000) Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J Biol Chem* 275(30): 22719-27
- O'Neill T, Giarratani L, Chen P, Iyer L, Lee CH, Bobiak M, Kanai F, Zhou BB, Chung J, Rathbun G** (2002) Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J Biol Chem* 277(18): 16102-15
- Oren M** (1999) Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 274(51): 36031-4
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P** (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4(4): 281-300
- Ouyang T, Bai RY, Bassermann F, von Klitzing C, Klumpen S, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J** (2003) Identification and characterization of a nuclear nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA). *J Biol Chem* 278(32): 30028-36
- Parker LL, Piwnica-Worms H** (1992) Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257(5078): 1955-7
- Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH** (1997) When checkpoints fail. *Cell* 88(3): 315-21
- Peng C, Graves P, Thoma R, Wu Z, Shaw A, Piwnica-Worms H** (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277: 1501-1505
- Prives C, Hall PA** (1999) The p53 pathway. *J Pathol* 187(1): 112-26
- Raleigh JM, O'Connell MJ** (2000) The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* 113 (Pt 10): 1727-36
- Ravanat JL, Douki T, Cadet J** (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63(1-3): 88-102
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, Elledge SJ**

- (1997) Conservation of Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277(5331): 1497-501
- Sandell LL, Zakian VA** (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75(4): 729-39
- Santos BC, Pullman JM, Chevaile A, Welch WJ, Gullans SR** (2003) Chronic hyperosmolarity mediates constitutive expression of molecular chaperones and resistance to injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(3): F564-74
- Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT** (1999) Inhibition of ATM and ATR Kinase Activities by the Radiosensitizing Agent, Caffeine. *Cancer Res* 59(17): 4375-82
- Schwartz D, Rotter V** (1998) p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin Cancer Biol* 8(5): 325-36
- Sefton BM** (1998) Overview of protein phosphorylation. *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 14.1.1-14.1.3
- Sherr CJ** (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274(5293): 1672-7
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C** (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91(3): 325-34
- Shiloh Y** (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11(1): 71-7
- Shiloh Y** (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3(3): 155-68
- Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB** (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev* 11(24): 3471-81
- Singh M, Fowlkes V, Handy I, Patel CV, Pate RC** (2008) Essential Role of PACT-Mediated PKR Activation in Tunicamycin-Induced Apoptosis. *J Mol Biol im Druck*
- Smits VAJ, Klompmaker R, Vallenius T, Rijksen G, Mäkelä TP, Medema RH** (2000) p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* 275(39): 30638-43
- Sogo JM, Lopes M, Foiani M** (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297(5581): 599-602
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A** (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7(9): 880-5
- Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ** (1995) Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 377(6550): 649-52
- Taylor WR** (2004) FACS-based detection of phosphorylated histone H3 for the quantitation of mitotic cells. *Methods Mol Biol* 281: 293-9

- Taylor WR, Stark GR** (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20(15): 1803-15
- Tercero JA, Diffley JF** (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* 412(6846): 553-7
- Tornaletti S, Hanawalt PC** (1999) Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81(1-2): 139-46
- Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, Shokat KM, Morgan DO** (2003) Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425(6960): 859-64
- von Klitzing C** Biologische Dissertation. München (in Vorbereitung ¹)
- Wang D, Lippard SJ** (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4(4): 307-20
- Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H** (2003) Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 278(24): 21767-73
- Yang T, Zhang A, Honeggar M, Kohan DE, Mizel D, Sanders K, Hoidal JR, Briggs JP, Schnermann JB** (2005) Hypertonic induction of COX-2 in collecting duct cells by reactive oxygen species of mitochondrial origin. *J Biol Chem* 280(41): 34966-73
- Zech M** Medizinische Dissertation. München (in Vorbereitung ²)
- Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace Jr AJ** (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18(18): 2892-900
- Zhang Z, Dmitrieva NI, Park JH, Levine RL, Burg MB** (2004) High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(25): 9491-6
- Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H** (2002) Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23): 14795-800
- Zhou BB, Chaturvedi P, Spring K, Scott SP, Johanson RA, Mishra R, Mattern MR, Winkler JD, Khanna K** (2000) Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *J Biol Chem* 275(14): 10342-8
- Zhou BB, Elledge SJ** (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408(6811): 433-9

¹ „mit freundlicher Genehmigung des Verfassers“

² „mit freundlicher Genehmigung des Verfassers“