

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München

Phosphorylierung von NIPA
(nuclear interaction partner of ALK)

Michael Bernd Helmut Zech

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Phosphorylierung von NIPA (*nuclear interaction partner of ALK*)

Michael Bernd Helmut Zech

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
2. Priv.- Doz. Dr. K. S. Götze
3. Univ.- Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 01.08.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zellzyklus	1
1.2	Regulation des G ₂ /M-Kontrollpunktes	3
1.3	Zellzyklus-spezifische Proteolyse: E3-Ligasen	5
1.4	NIPA (<i>nuclear interaction partner of ALK</i>)	7
1.5	NPM-ALK (<i>nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase</i>)	10
1.6	Aufgabenstellung	11
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Chemikalien und biogene Substanzen	13
2.1.2	Medien und Supplemente für die Zellkultur	15
2.1.3	Enzyme	15
2.1.4	Antikörper	16
2.1.5	Radiochemikalien	17
2.1.6	Kinaseinhibitoren	17
2.1.7	Zelllinien	17
2.1.8	Bakterienstämme	18
2.1.9	Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	18
2.1.10	Vektoren	18
2.1.11	Oligonukleotide für das microRNA-System	18
2.1.12	Mäuse und tierexperimentelle Materialien	19
2.1.13	Kitsysteme zur Bearbeitung von DNA und Proteinen	19
2.1.14	Standard Geräte	19
2.1.15	Standard Lösungen und Puffer	20
2.2	Methoden	23
2.2.1	Molekularbiologische Arbeitstechniken	23
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	23

2.2.1.2	Agaroseelektrophorese.....	24
2.2.1.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	25
2.2.1.4	Restriktionsverdau	25
2.2.1.5	5´-Dephosphorylierung von DNA.....	26
2.2.1.6	Ligation von DNA	26
2.2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA	27
2.2.2	Arbeiten mit Bakterien	27
2.2.2.1	Kulturbedingungen	27
2.2.2.2	Kompetente Bakterien.....	27
2.2.2.3	Transformation von Bakterien.....	28
2.2.2.4	Kultivierung von Bakterien	28
2.2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini- und Maxi- Präparation).....	28
2.2.2.6	Herstellung rekombinanter GST-Fusionsproteine.....	29
2.2.3	Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien.....	30
2.2.3.1	Kultivierung von Zelllinien	30
2.2.3.2	Kryokonservierung von Zellen	31
2.2.3.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen.....	31
2.2.3.4	Zellzählung	31
2.2.3.5	Transfektion von Zellen.....	32
2.2.3.6	Lipofektion und Gewinnung von Retrovirus	32
2.2.3.7	Retrovirale Transduktion.....	33
2.2.3.8	Bestimmung der EGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie .	34
2.2.3.9	Bestimmung des Virustiters	34
2.2.3.10	Synchronisation von Zellen.....	35
2.2.4	Biologische Untersuchungen	36
2.2.4.1	Statische Zellzyklusanalyse.....	36
2.2.4.2	Dynamische Zellzyklusanalyse.....	37
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden.....	38
2.2.5.1	Gewinnung von Zelllysaten.....	38
2.2.5.2	Proteinbestimmung	39

2.2.5.3	Immunpräzipitation	39
2.2.5.4	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.5.5	Transfer aufgetrennter Proteine auf eine PDVF-Membran (Western Blot).....	41
2.2.5.6	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	42
2.2.5.7	Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine	42
2.2.5.8	Entfernen des gebundenen Erstantikörpers von der Membran.....	43
2.2.5.9	<i>In vitro</i> Kinasierung von Proteinen (<i>In vitro</i> Kinase Assay)	43
2.2.6	Arbeiten mit Mäusen	44
2.2.6.1	Gewinnung von Knochenmarkzellen aus Spendermäusen.....	44
2.2.6.2	Retrovirale Transduktion von Mäuseknochenmark	44
2.2.6.3	Knochenmarktransplantation	45
2.2.6.4	Betreuung der transplantierten Mäuse	46
2.2.6.5	Hypotone Erythrozytenlyse	46
2.2.6.6	Aufarbeitung verstorbener Tiere.....	46
2.2.6.7	Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung von Zellen	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	NIPA-Phosphorylierung <i>in vitro</i>	48
3.2	Physiologische Phosphorylierung von NIPA	50
3.2.1	Inhibition der ERK-Aktivität am G ₂ /M-Übergang	51
3.2.2	Das microRNA-System	53
3.2.3	Spezifischer ERK-Knockdown am G ₂ /M-Übergang	56
3.2.4	Korrelation der NIPA-Phosphorylierung mit der Aktivität von ERK	58
3.2.5	Auswirkungen der ERK-Inhibition auf den Zellzyklus	59
3.2.6	Auswirkungen des ERK2-Knockdowns auf den Zellzyklus.....	61
3.2.7	Struktur des SCF ^{NIPA} -Komplexes am G ₂ /M-Übergang ohne ERK-Aktivität	64
3.3	Onkogen-vermittelte Phosphorylierung von NIPA und die Rolle des Proteins in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese	66
3.3.1	Inhibition der ERK-Aktivität in NPM-ALK positiven Zellen	66

3.3.2	<i>In vivo</i> -Rolle von NIPA in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese	68
3.3.2.1	Das murine Knochenmarktransplantationsmodel	69
3.3.2.2	Phänotyp NPM-ALK-induzierter Erkrankungen bei Fehlen und Vorhandensein von NIPA.....	71
3.3.2.3	Progress NPM-ALK-induzierter Erkrankungen bei Fehlen und Vorhandensein von NIPA.....	74
3.3.2.4	Progress NPM-ALK-induzierter Erkrankungen bei Expression der phospho-defizienten NIPA-Mutante S353A	75
4	Diskussion.....	77
4.1	NIPA-Phosphorylierung <i>in vitro</i>	77
4.2	Physiologische Phosphorylierung von NIPA	78
4.3	Onkogen-vermittelte Phosphorylierung von NIPA und die Rolle des Proteins in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese	83
5	Zusammenfassung.....	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Abbildungsverzeichnis	103
8	Danksagung	105
9	Posterpräsentationen	106

Abkürzungsverzeichnis

µg	10 ⁻⁶ Gramm
µl	10 ⁻⁶ Liter
µmol	10 ⁻⁶ Mol
µM (µmol/l)	10 ⁻⁶ Mol/Liter
A	Alanin
Abb.	Abbildung
A.d.	Aqua destillata
APC	<i>Anaphase-promoting-complex</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BBMM	<i>Basal Bone Marrow Medium</i>
BMK	<i>big mitogen-activated kinase</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
C	Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CK2	<i>casein kinase 2</i>

CKI	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor</i>
CRS	<i>cytoplasmatic retention signal</i>
Cul1	<i>Cullin Protein 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleosid-5´-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N´,N´-tetraessigsäure
EGFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
et al	<i>et alii</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell scan</i>)
FBP	F-Box-Protein
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
5-FU	5-Fluoruracil
G	<i>Gap</i>
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s ²), Gramm

GSK-3 β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
Gy	Gray (1 Gy = 1 J/kg)
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxydase</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>internal ribosomal entry site</i>)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDA	Kilodalton
KM	Knochenmark
Ko	<i>Knock out</i>
LB	Luria-Bertani
lin	linear
log	logarithmisch
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	murin
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen activated protein kinase</i>)

MEK	<i>Mitogen activated ERK-activating kinase</i>
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
mM (mmol/l)	10 ⁻³ Mol/Liter
MPF	<i>Mitosis promoting factor, CyclinB1-CDK-1-Komplex</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
ng	10 ⁻⁹ Gramm, Nanogramm
NIPA	<i>nuclear interaction partner of ALK</i>
NLS	nukleäres Translokationssignal (<i>nuclear localisation signal</i>)
nm	10 ⁻⁹ Meter, Nanometer
Noc	Nocodazol
NP-40	Nonidet P-40
NPM-ALK	<i>nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> (neg. dek. Logarithmus der Protonenkonzentration)
PI	Propidiumiodid
Plk1	<i>Polo like kinase 1</i>

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
Roc1	<i>RING-Finger Protein 1</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Synthese, Serin
SCF	Skp1-cullin-F-Box-Protein-Komplex, Stammzellefaktor (<i>stem cell factor</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Skp1	<i>S-Phase-kinase-associated Protein 1</i>
SS	Seitwärtsstreuung (<i>sideward scatter</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt

WT

Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Zellzyklus

Der Zellzyklus beschreibt das Leben einer einzelnen Zelle von ihrer Entstehung aus einer Mutterzelle bis zu ihrer eigenen Teilung. Bei eukaryoten Zellen folgt der Zellzyklus strengen, jedoch in Dauer von Zellart zu Zellart unterschiedlich langen Phasen. Die G_1 -Phase ($G = gap$) folgt einer Zellteilung und ist die Phase, in der die Zelle wächst und reift. Von hier aus hat sie prinzipiell zwei Möglichkeiten: entweder sie geht in die G_0 -Phase über, einen ruhenden, teilungsinaktiven Zustand (meist als Folge von Wachstumsfaktormangel) oder sie teilt sich erneut, d.h. sie durchläuft die weiteren Phasen des Zellzyklus, die für die regelrechte Zellteilung unabdingbar sind: die S-Phase ($S = Synthese$), in der das genetische Material (DNA) verdoppelt wird, die G_2 -Phase, in der vor allem Kontrollen und Korrekturen am replizierten Erbgut vorgenommen werden (G_1 -, S-, und G_2 -Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet), und schließlich die Mitose (M-Phase), in der die eigentliche Zellteilung stattfindet (Abb. 1).

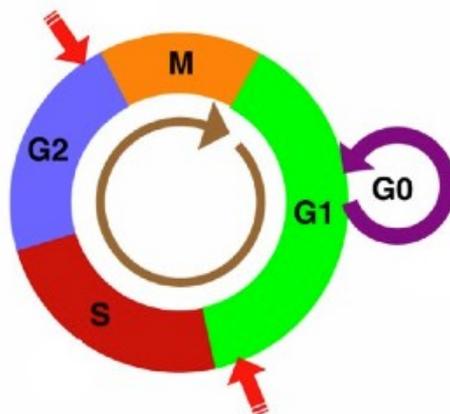


Abb. 1: Organisation des Zellzyklus (nach Noguchi, 2004-2006).

G_1/S - und G_2/M -Kontrollpunkt sind durch rote Pfeile markiert.

Die Mitose wiederum unterteilt sich in die Pro-, Prometa-, Meta-, Ana-, und Telophase und die Zytokinese, aus welcher zwei Tochterzellen in G_1 -Phase hervorgehen. Im menschlichen Organismus brauchen rasch proliferierende Zellen

etwa 12-24 h zum Durchlaufen eines kompletten Zyklus. Hierbei können insbesondere G₁- und G₂-Phase zeitlich stark variieren, während S-Phase und Mitose relativ konstant bleiben (Norbury & Nurse, 1992; Oshima & Campisi, 1991; Vermeulen et al, 2003).

Die Regulation des Zellzyklus und damit der Zellteilung ist im vielzelligen Organismus von entscheidender Bedeutung. Schon die unkontrollierte Proliferation einer einzelnen Zelle kann den gesamten Organismus gefährden, wie dies z.B. bei malignen Tumoren der Fall ist (Hartwell, 1992; Hartwell & Kastan, 1994; Sherr, 1996). Damit sich eine Zelle teilen kann, muss sie im Rahmen des Zellzyklus bestimmte Kontrollpunkte überwinden. Diese sind insbesondere am Übergang von einer Phase des Zyklus in die nächste gelegen (Elledge, 1996; Hartwell & Weinert, 1989). Die wichtigsten sind der G₁/S-Kontrollpunkt und der G₂/M-Kontrollpunkt (Molinari, 2000; Murray, 1994) (Abb. 1). Um diese Kontrollpunkte zu passieren, müssen bestimmte äußere (Umweltfaktoren etc.) und bestimmte innere (durch die Zelle selbst bestimmte) Faktoren gegeben sein. Andernfalls kann die Zelle die "Qualitätsprüfung" an diesen Kontrollpunkten nicht bestehen und den Zellzyklus nicht weiter durchlaufen, die Zellteilung wird gestoppt. Am G₁/S-Übergang ist es beispielsweise entscheidend, dass die Zelle eine gewisse Größe erreicht hat, günstige Nährstoffbedingungen herrschen, Wachstumsfaktoren vorhanden sind und keine DNA-Schäden vorliegen, die in der nachfolgenden S-Phase repliziert und somit an Tochterzellen weitergegeben würden. Der G₂/M-Übergang ist von äußeren Faktoren wie Wachstumsfaktoren weitgehend unabhängig, hier ist insbesondere die Integrität der in der S-Phase verdoppelten DNA wichtig. Zum Übergang von der G₂-Phase in die Mitose muss die DNA komplett und fehlerfrei repliziert worden sein (Murray, 1992; Skehan, 1988).

Wie die genannten äußeren und inneren Faktoren die Zelle auf molekularer Ebene beeinflussen und somit für Voranschreiten oder Stopp im Zellzyklus verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch kommt drei Proteinklassen und deren Regulation eine entscheidende Bedeutung zu: den Cyclin-dependent-Kinasen (CDK's), den Cyclinen sowie den Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitoren (CKI's) (Pines, 1999; Tyson et al, 1995). Ein wichtiges Regulationsprinzip dieser Proteine und damit des gesamten Zellzyklus auf molekularer Ebene beruht auf zyklisch-oszillierender Neusynthese und Abbau sowie Aktivierung und Inaktivierung dieser

Proteine (Arellano & Moreno, 1997; Pines, 1995). CDK's werden konstitutiv exprimiert, d.h. sie sind kontinuierlich während aller Zellzyklusphasen vorhanden. Sie werden jedoch nur an bestimmten Punkten des Zellzyklus (an den Kontrollpunkt-Übergängen) aktiviert. Zum Einen müssen sie dafür an bestimmten Hydroxyl-Gruppen phosphoryliert und z.T. an anderen dephosphoryliert werden. Zum Anderen müssen sie sich mit Cyclinen verbinden, so dass der Cyclin-CDK-Komplex entsteht (Morgan, 1995). Cycline werden nicht konstitutiv exprimiert. Sie werden hochspezifisch in den Phasen des Zellzyklus synthetisiert, in denen sie benötigt werden, und anschließend durch gezielte Proteolyse abgebaut. Zyklus-abhängige Neusynthese und Degradation stellt den entscheidenden Regulationsmechanismus der Cycline und somit ein wichtiges Prinzip der Zellzykluskontrolle dar (Evans et al, 1983; Pines, 1991). Der aktivierte Cyclin-CDK-Komplex ist der entscheidende molekulare Faktor zur Überwindung der Kontrollpunkte. Durch die Kinase-Aktivität des Komplexes werden Proteine und Transkriptionsfaktoren aktiviert, die den Übergang von einer Zellzyklusphase in die nächste ermöglichen (Nurse, 1994). Die CKI's werden ähnlich wie die Cycline über Neusynthese und Abbau reguliert und können den Cyclin-CDK-Komplex hemmen. Dies hat einen Stopp im Zellzyklus zur Folge, so z.B. wenn Schäden an der DNA festgestellt werden (Biggs & Kraft, 1995; Coffman & Studzinski, 1999).

1.2 Regulation des G₂/M-Kontrollpunktes

Da die Regulation des G₂/M-Überganges im Zentrum dieser Arbeit steht, wird diese im Einzelnen genauer betrachtet.

Am G₂/M-Punkt kommt eine entscheidende Bedeutung CDK-1 und ihrem Cyclin CyclinB1 zu. Der daraus resultierende CyclinB1-CDK-1-Komplex wird auch "*Mitosis promoting factor*" (MPF) genannt und ist nur am Übergang von der G₂-Phase in die Mitose aktiv. Dies ist von großer Wichtigkeit für einen kontrollierten Mitoseeintritt und die Integrität der Zelle (Minshull et al, 1989; Ohi & Gould, 1999; Stark & Taylor, 2006). Eine vor dem G₂/M-Punkt-gelegene Aktivierung des MPF kann zu verfrühtem Mitoseeintritt und damit über Umgehung der in der G₂-Phase bis zu G₂/M-Punkt stattfindenden „DNA-Qualitätskontrolle“ zu genomischer Instabilität führen (Bassermann et al, 2005).

Die auf den G₂/M-Übergang abgestimmte Aktivität des MPF wird durch Kontrolle des nukleären CyclinB1-Spiegels sowie regulierte CDK-1-Phosphorylierung erreicht (King et al, 1994). In der Interphase erfährt CDK-1 hemmende Phosphorylierungen durch die Kinasen Wee1 und Myt1 (Heald et al, 1993; Liu et al, 1997). Am G₂/M-Übergang überwiegt die Aktivität der Phosphatase CDC25, die die inhibierenden Phosphatreste entfernt und CDK-1 in einen aktiven Zustand überführt (Borgne & Meijer, 1996; Gautier et al, 1991; Krek & Nigg, 1991). Die nukleäre CyclinB1-Konzentration ist in der Interphase niedrig und steigt am G₂/M-Übergang. Dies wird über mehrere Mechanismen bewirkt. Nach dem Prinzip der regulierten Neusynthese erhöht sich die CyclinB1-Konzentration in der Zelle nach Beginn der S-Phase mit einem Maximum bei Mitoseeintritt. In den restlichen Zellzyklusphasen ist die Expression gering (Gallant & Nigg, 1992). Zusätzlich wird bis zum G₂/M-Übergang eine Akkumulation von CyclinB1 im Zellkern durch nukleären Export des Proteins ins Zytoplasma verhindert (Hagting et al, 1998; Pines & Hunter, 1991). Der zytoplasmatische Konzentrationsanstieg hat keine funktionellen Konsequenzen, da nur nukleäres CyclinB1 die Aktivität des MPF beeinflusst. Der Export wird durch eine bestimmte Aminosäure-Sequenz, das CRS (*cytoplasmatic retention signal*), vermittelt (Pines & Hunter, 1994). An G₂/M kommt es zur Phosphorylierung und damit Inaktivierung des CRS, wodurch ein nukleärer CyclinB1-Anstieg ermöglicht wird (Hagting et al, 1999; Li et al, 1997). Desweiteren wird ein nicht zeitgerechter nukleärer CyclinB1-Anstieg durch einen erstmals in unserem Labor beschriebenen Mechanismus verhindert. CyclinB1, das sich vor dem G₂/M-Übergang im Kern befindet und nicht exportiert wird, wird der proteosomalen Degradation zugeführt. Diese Abbaumöglichkeit wird am G₂/M-Übergang durch Inaktivierung der zuständigen E3-Ligase beendet (Bassermann et al, 2005).

Sind die entsprechenden Kriterien für den Übergang in die Mitose erfüllt, d.h. insbesondere die Sicherung der genetischen Integrität, werden über verschiedene Signalkaskaden die nötigen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen vermittelt, die zur Aktivierung des MPF, und durch die Aktivierung von dessen Zielmolekülen zum Übergang von der G₂-Phase in die Mitose führen (Smits & Medema, 2001). Nach Mitosebeginn wird der MPF rasch inaktiviert: sämtliches nukleäres CyclinB1 wird proteasomal abgebaut und die Phosphorylierungsmodifikationen rückgängig gemacht (Smits & Medema, 2001).

Wichtige CKI's des G₂/M-Überganges sind unter anderem p21 und p27. Werden Schäden an der DNA festgestellt, wird durch sie ein Arrest im Zellzyklus vermittelt noch bevor die Zelle in die Mitose gehen kann (Harper et al, 1995; Polyak et al, 1994).

1.3 Zellzyklus-spezifische Proteolyse: E3-Ligasen

Zyklisch-oszillierende Neusynthese und Degradation von Regulatorproteinen (insbesondere der Cycline) stellen einen essentiellen Mechanismus der Zellzyklus-Kontrolle dar (King et al, 1996; Pines, 1991). Die Neusynthese an einem bestimmten Punkt des Zellzyklus wird über Transkriptionsfaktoren gesteuert, die über vorangehende Signalkaskaden aktiviert werden (Dynlacht, 1997; Pines, 1995). Der gezielte Abbau der Proteine erfolgt über deren Ubiquitinierung, eine Modifikation, die zur Degradation des Proteins im Proteasom führt (Glotzer et al, 1991). Zellzyklus-spezifische Ubiquitinierungen verlaufen entlang einer Enzymkaskade. Dabei wird freies Ubiquitin über das Ubiquitin-bindende Enzym (E1) an das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) gekoppelt. Dieses wiederum bindet eine Ubiquitin-Ligase (E3), welche ihrerseits ein spezifisches Substrat bindet und den Ubiquitintransfer katalysiert (Hochstrasser, 1996). Vor diesem Hintergrund nimmt die E3-Ligase eine herausragende Stellung ein, da sie zum Einen die Substratspezifität determiniert, und zum Anderen die eigentliche Ubiquitinligation vermittelt (Weissman, 2001). Zwei Klassen von E3-Ligasen kommt im Zellzyklus eine besondere Bedeutung zu: dem Anaphase-promoting-complex (APC) und dem Skp1-cullin-F-Box-Protein-Komplex (SCF-Komplex) (Peters, 1998). Der APC ist ein Multiproteinkomplex aus über 20 Untereinheiten. Seine Ligaseaktivität beschränkt sich vor allem auf Mitose und G₁-Phase des Zellzyklus. Ein wichtiges Protein, das im Rahmen des Zellzyklus durch APC-Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut wird, ist nukleäres Cyclin B1 nach Überschreiten des G₂/M-Überganges und Beginn der Mitose. Es muss an dieser Stelle rasch entfernt werden, um die Aktivität des MPF zu beenden (King et al, 1995; Sudakin et al, 1995; Zachariae & Nasmyth, 1999). Die Regulation des APC, vor allem seine auf bestimmte Zellzyklusphasen abgestimmte Aktivität, ist noch nicht genau geklärt, jedoch scheinen das Andocken und Abdissoziieren regulatorischer Untereinheiten sowie Phosphorylierungsprozesse eine wichtige Rolle zu spielen (Zachariae et al, 1998). SCF-Komplexe bestehen aus den Proteinen Skp1 (S-Phase-

kinase-associated Protein 1), Cul1 (Cullin Protein 1) und Roc1 (RING-Finger Protein 1), sowie aus einem variablen F-Box-Protein (FBP) (Abb. 2).

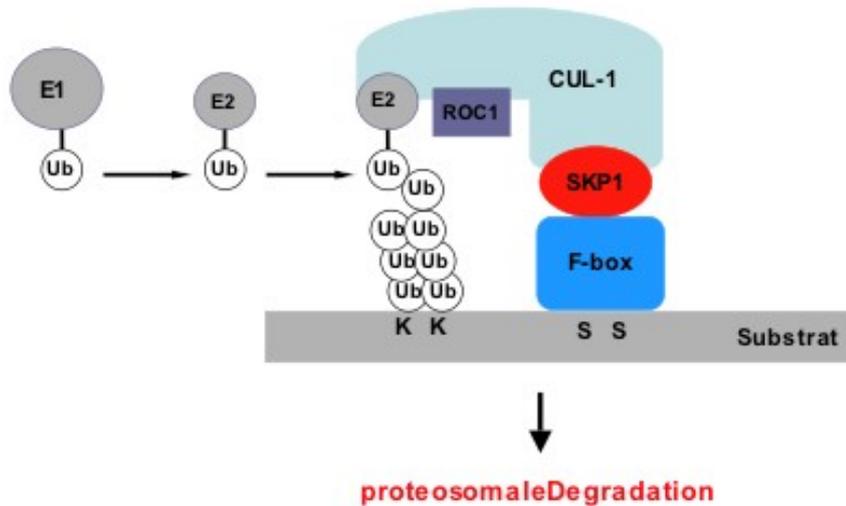


Abb. 2: Schematische Darstellung der SCF-gesteuerten Ubiquitinierungsreaktion (mit freundlicher Überlassung durch F. Bassermann).

Der SCF-Komplex, bestehend aus den Proteinen Cul1, Skp1, Roc1 und dem variablen F-Box-Protein (FBP), fungiert als E3-Ligase und ubiquitiniert mit Hilfe der Enzyme E1 und E2 Substrate, die so dem proteosomalen Abbau zugeführt werden können.

Die ersten drei genannten Komponenten sind in verschiedenen SCF-Komplexen stets gleich (Cardozo & Pagano, 2004), lediglich das für die Substratspezifität verantwortliche F-Box-Protein ist variabel (Cardozo & Pagano, 2004). F-Box-Proteine besitzen eine Skp1-Bindungsstelle (die sogenannte F-Box-Domäne) sowie eine spezifische Substrat-Bindungsdomäne. Nach dieser werden die F-Box-Proteine klassifiziert (Cenciarelli et al, 1999; Winston et al, 1999). So sind F-Box-Proteine mit einer WD-40-Wiederholungsdomäne, sogenannte FBW's, bekannt, die spezifisch Ser/Thr-Phosphorylierungen ihrer Substrate erkennen. Zu ihnen gehören z.B. β -Trcp1, Fbw4 und CDC4 (Smith et al, 1999). Desweiteren gibt es sogenannte FBL's mit einer Leucin-reichen Wiederholungsstruktur, die ihre Substrate unabhängig von Phosphorylierungen erkennen (z.B. Skp2) (Enkhbayar et al, 2004; Kobe & Kajava, 2001). Die dritte große Gruppe der F-Box-Proteine (FBX's) beinhaltet alle F-Box-Proteine, die keine WD-40- oder Leucin-reiche Wiederholungen aufweisen, jedoch andere spezifische Substratdomänen wie Cyclin-Box, Zinkfinger oder Sec7 (z.B. Cyclin F und Emi1). Voraussetzung für deren Substratbindung sind neben Phosphorylierungen weitere Proteinmodifikationen wie Methylierung, Acetylierung

oder Farnesylierung (Yoshida et al, 2002; Yoshida et al, 2003). Bis jetzt sind im menschlichen Organismus 78 F-Box-Proteine bekannt, 73 konnten in der Maus nachgewiesen werden (Cardozo & Pagano, 2004). Für die wenigsten dieser F-Box-Proteine sind Substrate identifiziert. Besser untersuchte F-Box-Proteine wie β -Trcp1 oder Skp2 haben insbesondere Zellzyklus-regulierende Funktionen, funktionelle Daten anderer humaner F-Box-Proteine lassen jedoch auf ein breites Spektrum organspezifischer Funktionen schließen (Koepp et al, 2001; Kossatz et al, 2004; Watanabe et al, 2004). Ursprünglich wurde vermutet, die Aktivität der SCF-Komplexe im Zellzyklus beschränke sich auf den G₁/S-Übergang, heute aber weiß man, dass sie sich von der späten G₁- bis in die frühe Mitose erstreckt (Bassermann et al, 2005; Nakayama et al, 2004). Zu den wichtigen Proteinen, die als Folge der Ubiquitinierung durch SCF-Komplexe im Rahmen des Zellzyklus abgebaut werden, zählen sowohl Cycline des G₁/S-Überganges (Cyclin D, E) als auch das für den Mitoseeintritt bedeutende Cyclin B1 (Bassermann et al, 2005; Nakayama & Nakayama, 2005). Der Regulation von SCF-Komplexen liegen nach heutigem Stand der Forschung folgende Prinzipien zugrunde: einerseits gibt es SCF-Komplexe, die während des gesamten Zellzyklus aktiv sind und deren Ubiquitinierungsvorgänge nur durch den Phosphorylierungszustand ihrer Substrate bestimmt werden (Jackson & Eldridge, 2002). Andererseits können SCF-Komplexe auch auf Ebene ihrer jeweiligen F-Box-Proteine reguliert werden, so z.B. durch Zellzyklus-abhängigen Anstieg und Abbau oder durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung des F-Box-Proteins mit konsekutiv verändertem Aktivitätsgrad des Komplexes (Bassermann et al, 2005; del Pozo & Estelle, 2000).

1.4 NIPA (*nuclear interaction partner of ALK*)

Kürzlich konnte in unserem Labor NIPA als ein neues F-Box-Protein identifiziert werden. Ursprünglich wurde das 60 kDA große Protein bei der Suche nach möglichen Interaktionspartnern der onkogenen Tyrosinkinase NPM-ALK (*nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase*) in einem *Yeast-two Hybrid Screen* mit NPM-ALK als „*Bait*“ entdeckt (Ouyang et al, 2003). Es stellte sich heraus, dass es sich um ein hoch konserviertes, ausschließlich nukleär lokalisiertes Protein handelt, das in zahlreichen menschlichen Gewebearten exprimiert wird. So war es möglich, insbesondere in stark proliferierendem Gewebe hohe NIPA-Spiegel nachzuweisen.

Die streng nukleäre Lokalisation von NIPA konnte auf ein nukleäres Translokationssignal (NLS) zurückgeführt werden, welches sich im C-terminalen Ende des Proteins befindet (Ouyang et al, 2003). In weiteren Untersuchungen konnte im N-terminalen Ende von NIPA eine F-Box-Domäne gefunden werden, die NIPA als F-Box-Protein eines SCF-Komplexes charakterisierte. Es gelang, CyclinB1 als ein Substrat dieses SCF^{NIPA}-Komplexes zu identifizieren und dem Komplex eine wichtige Rolle in der Regulation des G₂/M-Überganges und damit des kontrollierten Mitoseintritts zuzuschreiben (Bassermann et al, 2005). Hierbei ist SCF^{NIPA} für den proteasomalen Abbau von nukleären, nicht exportierten CyclinB1 bis zum G₂/M-Punkt verantwortlich. Dadurch verhindert der Komplex einen vorzeitigen CyclinB1-Anstieg im Kern und eine nicht zeitgerechte Aktivierung des MPF. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von NIPA in Zellen über eine vorzeitige nukleäre CyclinB1-Akkumulation zu verfrühtem Mitoseintritt führen kann (Bassermann et al, 2005).

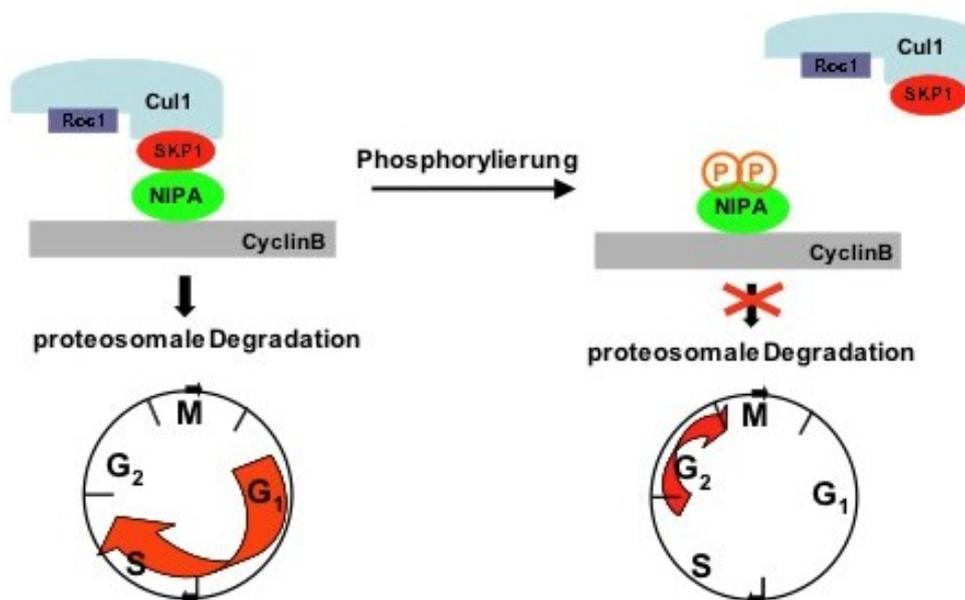


Abb. 3: Model der SCF^{NIPA}-Aktivität während des Zellzyklus (mit freundlicher Überlassung durch F. Bassermann).

Spezifische Phosphorylierung von NIPA am G₂/M-Übergang des Zellzyklus inhibiert die Ubiquitinierungsaktivität des SCF^{NIPA} und ermöglicht so eine zeitgerechte nukleäre Akkumulation von Cyclin B1.

Als bisher einziges Regulationsprinzip konnte für den SCF^{NIPA}-Komplex Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung nachgewiesen werden. In der Interphase liegt NIPA

unphosphoryliert vor und SCF^{NIPA} ist aktiv. An G₂/M kommt es zur Phosphorylierung von NIPA, was zu dessen Abdissoziation von den übrigen SCF-Proteinen und zur Inaktivierung des Komplexes führt. In der Folge kann der CyclinB1-Spiegel im Kern ansteigen und die Mitose eingeleitet werden (Bassermann et al, 2005) (Abb. 3). Zellen, die eine nicht-phosphorylierbare NIPA-Mutante tragen, weisen einen verspäteten Mitoseeintritt auf (Bassermann et al, 2005). Desweiteren konnten im C-terminalen Ende von NIPA drei Serinreste als Hauptphosphorylierungsstellen identifiziert werden (Bassermann et al, 2007). Die Serinreste befinden sich an den Positionen 354, 359 und 395 und waren in den Aminosäuresequenzen von humanem, murinem und *Xenopus laevis* entstammenden NIPA nachweisbar (Abb. 4).

	354	359		395
	*	*		*
Mensch	T R S W D S S S P V D R P E P	E A A S P T T R T	R P V T R S M G T G D T P G L . .	E V P S S P L R K A K R
Maus	T R S W E S S S P V D R P E L	E A A S P T T R S	R P V T R S M G T G D S A G V . .	E V P S S P L R R T K R
<i>X. laevis</i>	T R S S D L L S P A D	S E A V R N	R P V T R S M G Q G E N T G L G N E L H S S P H R R A K R	

Abb. 4: Aminosäuresequenzen von humanem, murinen und *Xenopus laevis* entstammenden NIPA (nach Bassermann et al, 2007).

Die bedeutenden Phosphorylierungsstellen von NIPA (Serinreste 354, 359 und 395) sind markiert.

Der hohe Konservierungsgrad der Phosphorylierungsstellen bei unterschiedlichen Lebewesen deutete auf deren funktionelle Bedeutung hin. In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Phosphatgruppenübertragung auf NIPA alle drei der erwähnten Serinreste miteinbezieht. Es zeigte sich, dass der NIPA-Phosphorylierungsprozess sequentiell erfolgt. Am G₂/M-Übergang kommt es initial zur Phosphorylierung der NIPA-Serinreste 354 und 359, was für die Inaktivierung von SCF^{NIPA} von herausragender Bedeutung ist. Anschließend kommt es zur zusätzlichen Phosphorylierung von Serinrest 395 durch den MPF. Dieser verstärkt auf diese Weise nach dem Prinzip der positiven Rückkopplung seine eigene Aktivität (Bassermann et al, 2007). Die Kinase, die die bedeutende, initiale Phosphorylierung von NIPA an den Serinresten 354 und 359 vermittelt, konnte bisher nicht identifiziert werden. Mehrere für den Phosphorylierungsprozess in Frage kommende Kinasen, darunter GSK-3 β , CK2 und Plk1, wurden bezüglich ihrer Aktivität gegenüber NIPA *in*

in vitro getestet. Keines der Enzyme konnte jedoch die Phosphatgruppenübertragung auf NIPA katalysieren (Bassermann et al, 2007). Um weitere der bisher unbekannt *in vivo*-Funktionen von NIPA zu untersuchen, wurde in unserem Labor eine NIPA-Knockout-Maus generiert. Die NIPA-Knockout-Maus ist viabel und weist eine normale Lebenszeit auf. Erste Untersuchungen zeigten eine geringere Körpergröße und ein geringeres Gewicht der NIPA-defizienten Mäuse im Vergleich zu NIPA-Wildtyp-Mäusen. Als zusätzliche phänotypische Auffälligkeit stellte sich die Infertilität der NIPA-Knockout-Maus heraus. Dauerverpaarungen von NIPA-defizienten Weibchen mit NIPA-defizienten Männchen konnten keine Nachkommen erbringen. Die Suche und Charakterisierung weiterer phänotypischer Merkmale und Abnormalitäten wird in unserem Labor bereits durchgeführt.

1.5 NPM-ALK (*nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase*)

NIPA wurde als nukleärer Interaktionspartner des Onkogens NPM-ALK identifiziert (Ouyang et al, 2003). NPM-ALK ist eine pathogene Tyrosinkinase mit hohem onkogenem Potential. Sie entsteht durch eine t(2;5) Translokation, welche zur Fusion N-terminaler NPM (*nucleophosmin*)- an C-terminale ALK (*anaplastic lymphoma kinase*)- Sequenzen führt (Morris et al, 1994). Dabei gehen C-terminale Sequenzen von NPM sowie die transmembranöse und extrazelluläre Domäne von ALK verloren (Duyster et al, 2001). Das resultierende Fusionsprotein NPM-ALK ist eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase, die über Auto- und Substratphosphorylierungen zahlreiche promotogene Signalwege in der Zelle aktiviert (Amin & Lai, 2007). Die Expression von NPM-ALK wird häufig (40-60%) in einem Subtyp der Non-Hodgkin-Lymphome, dem Anaplastisch-großzelligen Lymphom gefunden (Amin & Lai, 2007). Ouyang et al (2003) gelang es, in NPM-ALK positiven Zellen eine konstitutive Phosphorylierung von NIPA nachzuweisen. Durch das Einbringen von NPM-ALK in Zellen konnte der Phosphorylierungsgrad von NIPA erheblich verstärkt werden. Weiterführende Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die durch NPM-ALK induzierte Phosphorylierung von NIPA insbesondere NIPA-Serinrest 354 miteinbezieht (Bassermann et al, 2007). In tierexperimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe stellte sich heraus, dass retrovirale Infektion von Mäuseknochenmark mit NPM-ALK zur Entwicklung Lymphom-ähnlicher Erkrankungen führt (Miething et al, 2003). Es zeigte sich, dass die durch NPM-ALK in der Maus ausgelöste Erkrankung der NPM-

ALK-assoziierten Lymphomkrankung des Menschen ähnlich ist. Das Mausmodell kann somit als Beispiel für die humane Erkrankung dienen. Die durch NPM-ALK induzierte Tumorentstehung ist in ihren molekularen Mechanismen noch nicht ausreichend aufgeklärt. NPM-ALK-Inhibitoren stehen in der Klinik derzeit nicht zur Verfügung und werden nur im experimentellen Bereich eingesetzt.

1.6 Aufgabenstellung

NIPA ist als F-Box-Protein Teil eines SCF-Komplexes, welchem eine wichtige Bedeutung in der Regulation des G₂/M-Überganges und damit des kontrollierten Mitoseeintritts zukommt (Bassermann et al, 2005). CyclinB1 stellt ein Substrat des SCF^{NIPA}-Komplexes dar. Bis zum G₂/M-Punkt führt SCF^{NIPA} nukläres CyclinB1 durch Ubiquitinierung der proteasomalen Degradation zu und verhindert einen nicht zeitgerechten CyclinB1-Anstieg im Zellkern. Der Knockdown von NIPA kann zu vorzeitiger nukleärer CyclinB1-Akkumulation und dadurch zu verfrühtem Mitoseeintritt führen (Bassermann et al, 2005).

Die Regulation des SCF^{NIPA}-Komplexes erfolgt über Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung des F-Box-Proteins NIPA. In der Interphase liegt NIPA unphosphoryliert vor und der SCF^{NIPA}-Komplex ist aktiv. Am G₂/M-Übergang wird NIPA phosphoryliert. Dies führt zur Inaktivierung von SCF^{NIPA} und in der Folge zu nukleärer CyclinB1-Akkumulation. Kann NIPA am G₂/M-Punkt nicht phosphoryliert werden, resultiert ein verzögerter Eintritt in die Mitose (Bassermann et al, 2005). Der Phosphorylierung von NIPA kommt somit eine entscheidende Bedeutung in der Regulation des SCF^{NIPA}-Komplexes zu.

Hauptaufgaben dieser Arbeit sollen daher sein:

Identifikation der Kinase, die für die Phosphorylierung von NIPA verantwortlich ist. Hierfür sollen zunächst G₂/M-aktive Kinasen bezüglich ihrer *in vitro* Aktivität gegenüber NIPA untersucht werden.

Anschließend soll die funktionelle und strukturelle Analyse der NIPA-Phosphorylierung in lebenden Zellen unter physiologischen Bedingungen erfolgen. Dabei soll die *in vivo*-Relevanz der *in vitro* getesteten Kinasen überprüft werden.

Funktionelle Konsequenzen des Phosphorylierungsprozesses für den Zellzyklus, insbesondere den G₂/M-Übergang, sollen analysiert werden.

Zuletzt soll auf die Phosphorylierung von NIPA unter pathologischen Umständen im Zusammenhang mit der onkogenen Tyrosinkinase NPM-ALK eingegangen werden. Im Rahmen dessen wird zudem die Rolle von NIPA in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese mit Hilfe eines murinen Knochenmarktransplantationsmodells betrachtet.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/ Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Benzamidin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromdesoxyuridin (BrdU)	BD-Pharmingen, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
BSA, Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Complete™ Protease Inhibitor	
Cocktail Tabletten	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliantblau	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka, Deisenhofen
5-Fluorouracil (5-FU, Ribofluor®)	Ribosepharm GmbH, München
Glutathion Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg

Glycerol	Fluka, Deisenhofen
Glycerol-2-Phosphat	Aldrich Chemical Company, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Lysozym	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Nocodazol	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Protein A Sepharose-Lösung	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ribonuklease (RNAse)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SuperSignal® Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Deisenhofen
Thymidin	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Trockenmilchpulver	Fluka-Chemie, Deisenhofen

Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka-Chemie, Deisenhofen

2.1.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
IMDM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Muriner, rekombinanter Stammzellofaktor (mSCF)	R&D Systems, Wiesbaden
Murines, rekombinantes Interleukin (mIL)-3	R&D Systems, Wiesbaden
Murines, rekombinantes Interleukin (mIL)-6	R&D Systems, Wiesbaden
Opti-MEM®I, Serum-reduziertes Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, steril	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Puromycin, 2 mg/ml	Merck, Darmstadt
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zeocin, 100 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme:

<i>EcoRI</i> , 10 U/μl	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i> , 10 U/μl	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Polymerase:

<i>Pfu-Turbo</i> , 2,5 U/μl	Stratagene, La Jolla, USA
-----------------------------	---------------------------

Alkalische Phosphatase:

<i>CIAP</i> , 20-30 U/μl	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
--------------------------	----------------------------

Kinasen:

<i>ERK1</i> , 0,5 mg/ml	Biaffin GmbH, Kassel
<i>ERK2</i> , 0,16 mg/ml	Biaffin GmbH, Kassel

2.1.4 Antikörper

Anti- β -Aktin (AC-15), monoklonal, Maus IgG1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-ALK	zur Verfügung gestellt von Stephan W. Morris, Memphis, USA
Anti-BrdU, FITC-konjugiert, Maus IgG1	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Cul1 (AS97), monoklonal, Maus IgG	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Cyclin A (H-432), polyclonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-Cyclin B1 (GNS1), monoklonal, Maus IgG	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
Anti-ERK, p44/p42 MAP Kinase, monoklonal, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Frankfurt/ Main
Anti-Flag (M2), monoklonal, Maus IgG	Stratagene, Heidelberg
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus CD11b (M1/70), Mac1, Integrin α_M chain, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD16/CD32 (2.4G2), F _c III/II Receptor, Ratte IgG (Maus BD F _c -Block™)	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD45 (30-F11), LCA, Ly-5, PE-Cy5-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD45/B220 (RA3-6B2), B220, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD90.2 (53-2.1), Thy-1.2, PE-konjugiert, Ratte IgG	BD-Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig

Anti-Maus Ly-6G (Gr-1)/Ly-6C (RB6-8C5),
 Gr-1, PE-konjugiert, Ratte IgG BD-Pharmingen, Heidelberg
 Anti-phospho-ERK, p44/p42 MAP Kinase
 (Thr202/Tyr204), polyclonal, Kaninchen IgG Cell Signaling, Frankfurt/ Main

2.1.5 Radiochemikalien

[γ -³²P]- ATP Amersham, Braunschweig

2.1.6 Kinaseinhibitoren

PD98059 2'-Amino-3'-methoxy-flavon
 (Cell Signaling, Frankfurt/ Main)
 U0126 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-
 aminophenylthio]butadien
 (Cell Signaling, Frankfurt/ Main)

2.1.7 Zelllinien

NIH/3T3 murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie
 D1 murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie mit konstanter
 Überexpression von Flag-markiertem NIPA; NIH/3T3-
 Zellen, stabil transfiziert mit pcDNA-hNIPAwT Konstrukt
 (Bassermann et al, 2005)
 φNX-Eco (Phoenix E) retrovirale ecotrope Virusverpackungs-Zelllinie
 (Helfervirus-frei);
 293T (humane embryonale Nierenkarzinom)-Zellen, stabil
 transfiziert mit Moloney *GagPol-IRES-Lyt2* Konstrukt unter
 der transkriptionellen Kontrolle des RSV-Promoters
 (Selektion mit Hygromycin B) und Moloney *ecotropic
 envelope* Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des
 CMV-Promoters (Selektion mit Diphtherietoxin).

Die Zelllinie NIH/3T3 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen) in Braunschweig erworben. D1-Zellen wurden in unserem Labor generiert (Bassermann

et al, 2005). Die Virusverpackungs-Zelllinie Phoenix E wurde unserem Labor von Gary P. Nolan, Stanford, USA zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5 α TM Invitrogen GmbH, Karlsruhe

F- ϕ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169,
deoR, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *phoA*,
supE44, λ -*thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

BL21 StarTM (DE3) Invitrogen GmbH, Karlsruhe

F-, *ompT*, *hsdS_B* (r_B^- , m_B^-), *dcm*, *gal*, *rne131*

2.1.9 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Page RulerTM Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.1.10 Vektoren

Name	Resistenzen	Firma
MSCV MigR1	Ampicillin	J. Miller/ W. Pear, Philadelphia, USA (Pear et al, 1998)
MSCV-LMP	Ampicillin, Puromycin	Open Biosystems, Heidelberg (Dickins et al, 2005)

2.1.11 Oligonukleotide für das microRNA-System

Name	Sequenz
ERK1-miRNA	5'-TTCCGCCATGAGAATGTTATA-3'
ERK2-miRNA	5'-CAGGAAGATCTGAATTGTATA-3'
Kontrollsequenz	Open Biosystems, Heidelberg

2.1.12 Mäuse und tierexperimentelle Materialien

Mausstamm

Eigenzucht

Tierexperimentelle Materialien

Animal Bedding Fibre	Altromin Gmbh, Lage-Lippe
Caesium 137- Strahlenquelle (33300 GBq)	Buchler Gmbh, Braunschweig
Discardit™ II Spritze, steril	Becton-Dickinson, Heidelberg
Falcon™ Zellsieb (100 µm)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Global Rodent Breeding (25 kGy bestrahlt)	Harlan Tekland, Blackthorn, England
Infrarotlampe	Royal Philips Elektronik, Hamburg
Käfigsystem	Thoren, PA, USA
Microlance™ Injektionskanüle, steril (27G 3/4)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Objektträger (ISO Norm 8037/1)	Roth, Karlsruhe
S-Monovette®, EDTA	Sarstedt, Nümbrecht
Sub-Q, sterile PP Spritze, 1 ml, 26G 1/2	Becton-Dickinson, Heidelberg
VetABC Blood Counter	Scil, Viernheim

2.1.13 Kitsysteme zur Bearbeitung von DNA und Proteinen

BioRad Protein Assay	BioRad, München
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Penzberg

2.1.14 Standard Geräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Kodack, New Haven, USA
Analysenwaage BP 221S	Satorius, Göttingen
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
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg

Geltrockner SG200	Savant
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg
Incubator-Shaker Innova 4000	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckman, Fullerton, USA
Kühlzentrifugen 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
LKB Ultraspec III, Spektralphotometer	Pharmacia, Uppsala, Schweden
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	Beckman, Fullerton, USA
Refrigerated Incubator-Shaker Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydevang, Dänemark
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hofer, San Francisco, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Lampe TI 2	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Varioklav Dampfsterilisator	H+PLabortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

2.1.15 Standard Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung (1000-fach):	50 mg/ml in A.d.
Basales Knochenmarksmedium (BBMM):	325 ml IMDM 150 ml FCS 25 ml BSA (10% in IMDM)

	5 ml L-Glutamin-Lösung (200 mM)
	100 μ M 2-Mercaptoerthanol
	2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung
Coomassie-Färbelösung:	0,25% Coomassie-Brillantblau
	45% Methanol
	10% Essigsäure in A.d.
Coomassie-Entfärbelösung:	45% Methanol
	10% Essigsäure in A.d.
DNA-Probenpuffer (10-fach):	50% Glycerol
	0,2% Bromphenolblau
	0,5 M EDTA in A.d.
FACS-Puffer:	0,1% BSA in PBS
Kinase-Puffer (5-fach):	250 mM Tris/ HCL (pH 7,5)
	50 mM MgCl ₂ in A.d.
Luria-Bertani (LB)-Medium (flüssig):	1% Bacto-Trypton
	0,5% Bacto-Hefeextrakt
	1% NaCl in A.d.
	Mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt
	autoklaviert
LB-Medium (flüssig):	1,5% Bactoagar in LB-Medium
Lysis-Puffer:	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 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette
	ad 10 ml A.d.

NETN-Puffer:	100 mM NaCl 1 mM EDTA 20 mM Tris/ HCL (pH 8,0) 0,5% NP-40 1 mM PMSF 1 mM Benzamidin 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
Red Blood Cell-Lysis-Puffer:	150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH 7,3 in A.d.
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8) 0,4% SDS in A.d.
SDS-Gelelektrophorese-Puffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS in A.d.
SDS-Probenpuffer (2-fach):	1 M Tris/ HCL (pH 6,8) 200 mM DTT 4% SDS 0,2% Bromphenolblau 20% Glycin in A.d.
Stripping-Lösung:	0,2 M NaOH in A.d.
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 2% 0,5 M EDTA (pH 8,0) in A.d.
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS 20% Methanol in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4% SDS in A.d.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) können bestimmte Nukleotidsequenzen selektiv und schnell in großen Mengen vervielfältigt werden (Mullis et al, 1986). Die PCR basiert auf der Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen, die DNA-Stränge durch semikonservative Replikation verdoppeln und gleichzeitig zyklische Temperaturänderungen unbeschadet überstehen können. Zu Beginn eines jeden Amplifikationszyklus wird die doppelsträngige Matrizen-DNA (*template*) durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Anschließend wird der Reaktionsansatz abgekühlt, so dass die spezifische Anlagerung der eingesetzten Startermoleküle an die Zielregion ermöglicht wird (*annealing*). Als Startermoleküle dienen synthetische DNA-Oligonukleotide (*Primer*), die die zu amplifizierende Region einrahmen. Im nächsten Schritt verlängert die DNA-Polymerase unter Verwendung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP's) die Primer (*extension*). Somit entstehen doppelsträngige Kopien der ursprünglich eingesetzten DNA. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte kommt es zur exponentiellen Amplifikation der Matrize. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Polymerase handelt es sich um die thermostabile, aus dem marinen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isolierte *Pfu*-Polymerase. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase besitzt die *Pfu*-Polymerase neben der 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 3'→5'-Exonuklease-*Proofreading*-Aktivität (Lundberg et al, 1991). Die 3'→5'-Exonukleaseaktivität ermöglicht eine höhere Genauigkeit der DNA-Synthese, da sie falsch eingebaute Nukleotide entfernt und an deren Stelle das richtige Nukleotid einsetzt.

Die PCR wird in einem Thermozykler durchgeführt, in dem ein individuell einstellbares zyklisches Temperaturprogramm automatisch geregelt wird.

In dieser Arbeit wurde die PCR-Methode zur Amplifikation von DNA-Sequenzen für das microRNA-System verwendet.

PCR-Ansatz:

10 µl ds DNA-Template
2 µl dNTP-Mix
5 µl 3'-Primer
5 µl 5'-Primer
5 µl DMSO
10 µl 10x Reaktionspuffer
1 µl *Pfu*- DNA-Polymerase
62 µl A.d.

PCR-Programm:

1x 95°C, 1 min
30x 95°C, 30 sec
30x 54°C, 30 sec
30x 72°C, 30 sec
1x 72°C, 10 min

2.2.1.2 Agaroseelektrophorese

TAE-Puffer (10-fach): 0,4 M Tris, 1,1% Essigsäure, 2% 0,5 M EDTA (pH 8,0) in A.d.

DNA-Probenpuffer (10-fach): 50% Glycerol, 0,5% Bromphenolblau, 0,5 M EDTA in A.d.

Durch Agaroseelektrophorese ist die Auftrennung, Charakterisierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten möglich. Sie basiert auf Wanderungseigenschaften der negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld. Die Polydesoxynukleotide der DNA stellen aufgrund ihrer Phosphatgruppen Polyanionen dar. Daher wandern DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit durch die angelegte Spannung bestimmt wird. Agarose ist ein aus Algen gewonnenes Polysaccharid. Sie bildet nach Aufkochen eine Matrix aus, die kleinere DNA-Fragmente schneller und leichter durch sie hindurch lässt als größere. Durch Variation der Agarosekonzentration können unterschiedliche Trennbereiche erzeugt werden. Niedrigprozentige Agarosegele (0,5-1%) dienen zur Auftrennung größerer DNA-Fragmente (>1000bp), hochprozentigere Gele (1,5-2%) zur Separation kleinerer Fragmente (<500bp). Zur Visualisierung der aufgetrennten Fragmente werden dem Gel interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie

beispielsweise Ethidiumbromid zugesetzt. Diese lagern sich an die DNA an und besitzen zudem die Eigenschaft, unter UV-Licht zu fluoreszieren. Somit ist es möglich, DNA-Fragmente unter Verwendung einer UV-Lampe der Wellenlänge 320 nm als Banden im Gel sichtbar zu machen. Zur Charakterisierung der Fragmente ist es außerdem wichtig, gleichzeitig Größenstandards (DNA-Molekulargewichtsmarker) elektrophoretisch aufzutrennen.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf 50°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Agarose wird in eine Gelform gegossen und bei Raumtemperatur abgekühlt. Das erstarrte Gel wird in eine Elektrophoresekammer überführt und die DNA-Fragmente in TAE-Puffer bei einer Spannung von 20-120 V aufgetrennt.

2.2.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Das gewünschte DNA-Fragment wird nach Auftrennung in der Agaroseelektrophorese mittels UV-Licht als Bande sichtbar gemacht und mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Um UV-Schäden der DNA zu vermeiden wird hierbei eine UV-Quelle mit niedriger Bestrahlungsstärke verwendet. Zudem sollte auf eine möglichst kurze Expositionszeit der DNA mit UV-Strahlung geachtet werden. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgt mit Hilfe des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers. Für die Elution der DNA aus dem Säulenmaterial werden 35 µl A.d. verwendet und die DNA bei -20°C gelagert.

2.2.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen besitzen die Fähigkeit, definierte DNA-Sequenzen zu erkennen, an diese zu binden und die DNA an der Bindungsstelle zu zerschneiden. Sie ermöglichen die gezielte Fragmentierung doppelsträngiger DNA. Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die man für die vollständige Fragmentierung von 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde benötigt. Um sicherzugehen, dass die Verdauung quantitativ abläuft, sollte das Restriktionsenzym im Überschuss zugesetzt werden. Zur Durchführung des Restriktionsverbaus wird die zu schneidende DNA mit den

entsprechenden Restriktionsenzymen und den zugehörigen Restriktionspuffern für 2 h bei 30°C inkubiert.

2.2.1.5 5'- Dephosphorylierung von DNA

Werden Plasmidvektoren mit nur einem einzigen Restriktionsenzym geschnitten, so entstehen identische Restriktionserkennungssequenzen am 5'- und am 3'-Ende der DNA. Die Ligase bevorzugt die Religation dieser Sequenzen. Dadurch wird der Vektor zirkularisiert, ohne dass ein DNA-Fragment eingefügt wird. Durch Dephosphorylierung der DNA am 5'-Ende kann diese Zirkularisierung verhindert werden. Die Effizienz der Klonierung kann hierdurch entscheidend verbessert werden, da die Ligation nun nur zwischen freier 5'-Phosphatgruppe der Fremd-DNA und 3'-OH-Ende des Vektors möglich ist. Zur Dephosphorylierung wird die aus Schrimps gewonnene alkalische Phosphatase CIAP verwendet. Die Reaktion wird direkt im Restriktionsansatz des Vektors durchgeführt, indem dieser mit 10x Dephosphorylierungspuffer und A.d. verdünnt und mit 2-5 U Phosphatase versetzt wird.

2.2.1.6 Ligation von DNA

Rekombinante DNA-Moleküle werden durch Verknüpfung des linearisierten Vektors mit dem zu klonierenden DNA-Fragment hergestellt. Diese ATP-verbrauchende Reaktion wird durch die T4-Ligase katalysiert, die Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-OH- und 5'-Phosphat-Gruppen der DNA knüpft. Vektor und Insertions-DNA sollten hierfür in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:7 vorliegen, wobei die Menge der eingesetzten DNA mittels Gelelektrophorese abgeschätzt werden kann. Zur Ligation wird das Protokoll des „Rapid DNA Ligation Kit“ verwendet. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit gleicher Menge an linearisiertem Vektor, aber ohne DNA-Fragmente. Die rekombinante DNA wird nach Ligation direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt (Kapitel 2.2.2.3) oder bei -20°C gelagert.

2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wird in wässriger Lösung durch photometrische Messung mit einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter und einer Wellenlänge von 260 nm ist die optische Dichte gleich eins, wenn doppelsträngige DNA in einer Konzentration von 50 µg/ml vorliegt. Durch gleichzeitige Bestimmung des Absorptionsmaximums von Proteinen ist es zudem möglich, die Reinheit der DNA zu überprüfen. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Das Verhältnis der Absorptionswerte zwischen 260 nm und 280 nm stellt somit ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure dar. Je größer der Quotient aus spezifischen (E_{260}) zu unspezifischen (E_{280}) Signal ist, desto reiner und hochwertiger ist die eingesetzte DNA-Probe. Bei Werten zwischen 1,7 und 2,0 liegt eine reine Nukleinsäurelösung vor. Bei Werten unter 1,7 muss von einer Verunreinigung durch Proteine ausgegangen werden. Konzentrationsbestimmung und Qualitätsprüfung der DNA erfolgte mit dieser Methode.

2.2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Kulturbedingungen

LB-Medium: 1% Bacto-Trypton; 1% NaCl; 0,5% Bacto-Hefeextrakt in A.d.; autoklaviert; pH 7,0

LB-Agarplatten: 1,5% Bactoagar in LB-Medium; autoklaviert

Ampicillin-Stammlösung (1000-fach): 50 mg/ml in A.d.; sterilfiltriert

Bakterien werden entweder auf LB-Agarplatten oder unter Schütteln in flüssigem LB-Medium bei 37°C inkubiert. Da die Kultur in Gegenwart des Antibiotikums Ampicillin stattfindet, können nur Bakterienzellen wachsen, die ein Resistenz-vermittelndes Plasmid aufgenommen haben.

2.2.2.2 Kompetente Bakterien

Unter „kompetenten“ Bakterien versteht man Bakterienstämme, die durch chemische oder physikalische Vorbehandlung effizient zirkuläre DNA aufnehmen können. Sie müssen bei -80°C gelagert und stets auf Eis aufgetaut werden, um diese Fähigkeit nicht zu verlieren. Der verwendete Stamm DH5α wurde bereits kompetent erworben.

2.2.2.3 Transformation von Bakterien

Transformation bezeichnet das Einbringen von Vektor-DNA in Bakterienzellen. Dies ist durch kurzzeitigen Hitzeschock möglich. 50 µl einer DH5α-Bakteriensuspension werden auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz oder 2 µl Plasmid-DNA (Retransformation) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt bei 37°C für 45 sec der Hitzeschock. Durch die plötzliche Erwärmung werden die Plasmide in die Zellen eingeschleust. Danach werden die Bakterien erneut für 2 min auf Eis gelagert und hierauf auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Durch Expression des im Plasmid lokalisierten β-Lactamasegens können nur die Bakterien Kolonien bilden, die erfolgreich transformiert werden konnten. Die Inkubation bei 37°C sollte jedoch die Dauer von 12-16 h nicht überschreiten, da sonst Gefahr der Satellitenkolonie-Bildung besteht.

2.2.2.4 Kultivierung von Bakterien

Zur Amplifikation der durch Transformation gewonnenen Bakterienkolonien werden diese in flüssigem LB-Medium mit Ampicillin vermehrt. Ein Klon wird von der Agarplatte in 5 ml LB-Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und mit 225 rpm schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag kann die Plasmid-DNA wie in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben isoliert und aufgereinigt werden.

2.2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini- und Maxi-Präparation)

Zur Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien werden unterschiedliche Präparationskits verwendet. Mit Hilfe des „QIAprep® Spin Miniprep Kit“ können kleinere DNA-Mengen (< 20 µg) gewonnen werden. Dafür wird ein Klon in 5 ml LB-Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wird die Kultur bei 5000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment dem Protokoll entsprechend weiterverarbeitet. Um größere Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 500 µg) zu isolieren, wird das „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ verwendet. Hierbei wird ebenfalls ein Klon in 5 ml LB-Amp-Medium angeimpft, jedoch als Vorkultur nur für 1-4 h inkubiert. Danach wird die Vorkultur in 200 ml LB-Amp-Medium überführt und diese über Nacht weiterkultiviert. Am nächsten Tag erfolgt nach Zentrifugation die Aufarbeitung nach dem Maxi-Präparationsprotokoll.

2.2.2.6 Herstellung rekombinanter GST-Fusionsproteine

1 mM IPTG

10 mg/ml Lysozym

Glutathion Sepharose

NETN-Puffer: 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 20 mM Tris/ HCL (pH 8,0); 0,5% NP-40; 1 mM PMSF; 1 mM Benzamidin

1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/ 10 ml A.d.

Um rekombinante GST-Fusionsproteine herzustellen, wird deren Expression in Bakterienzellen induziert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung.

Zur Induktion wird der *E. coli*-Stamm BL21 verwendet, der den GST-Expressionsvektor pGEX-KG trägt. Dieser enthält ein induzierbares *lacZ*-Operon, das in *E. coli* die Transkription des *lacZ*-Gens reguliert. Das *lacZ*-Gen kodiert für die β -Galaktosidase. Ohne Gegenwart von Laktose ist das *lacZ*-Operon inaktiv. Durch Zugabe des Galaktosederivats IPTG wird das *lacZ*-Operon aktiviert. Im Gegensatz zu Laktose kann IPTG nicht durch den natürlichen Metabolismus von Bakterien umgesetzt werden, so dass seine Konzentration konstant und das Gen aktiv bleibt. Im pGEX-KG-Vektor folgt dem *lacZ*-Operon die Sequenz des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) und dieser die cDNA des zu exprimierenden Proteins. Durch Aktivierung des *lacZ*-Operons mittels IPTG wird sowohl die Expression des Enzyms als auch des gewünschten Proteins induziert. Es entsteht ein GST-Fusionsprotein. Zur Expression der Fusionsproteine werden mit dem entsprechenden Vektor transformierte Bakterien in 5 ml LB-Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese Vorkultur wird am nächsten Tag in 200 ml LB-Amp-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ dieser Größenordnung liegen die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase vor, in welcher Bakterienvermehrung und Proteinexpression optimal sind. Die Induktion mit 1mM IPTG sollte daher in diesem Zeitraum erfolgen. Nach Zugabe des IPTG werden die Bakterien weitere 2-4 h inkubiert. Anschließend wird die Kultur bei 4°C mit 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Sediment zur Proteinaufreinigung weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Zur Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wird das Bakteriensediment auf Eis in 1ml NETN-Puffer pro 100 ml ursprünglicher Bakterienkultur resuspendiert. Es ist wichtig, alle Aufreinigungsschritte gekühlt bei 4°C durchzuführen, um eine Degradation der exprimierten Fusionsproteine zu vermeiden. Der resuspendierten Bakterienkultur

wird 10 mg/ml Lysozym zugegeben und der Ansatz 20-30 min inkubiert. Lysozym bewirkt eine Andauung der bakteriellen Zellwand. Durch anschließende Ultraschallbehandlung mit 10 Impulsen bei 50% Leistung werden die Bakterienzellen vollständig lysiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4°C wird die unlösliche von der löslichen Proteinfraction abgetrennt. Die lösliche Proteinfraction wird mit 30 µl Glutathion-Sepharose für 30 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Hierbei wird das Sepharose-gekoppelte Glutathion an den GST-Abschnitt des Fusionsproteins gebunden. Nach dieser Inkubation kann das Sepharose-gebundene Protein durch Zentrifugieren für 1 min bei 4°C von der restlichen Lösung abgetrennt werden. Das Sediment wird dreimal mit NETN-Puffer gewaschen, um möglichen Verunreinigungen entgegenzuwirken. Anschließend wird das Sediment in 300 µl NETN-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert. Um eine erfolgreiche Induktion und Aufreinigung zu überprüfen, kann ein kleiner Teil der Probe in einem Test-SDS-Gel aufgetrennt und hierauf die Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden.

2.2.3 Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien

2.2.3.1 Kultivierung von Zelllinien

DMEM-Kulturmedium: DMEM; 10% FCS

Die Zellen werden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und relativer Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Medien und Lösungen werden im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Die verwendeten NIH3T3- und Phoenix E-Zellen sind adhärente Zelllinien. Sie werden in DMEM-Kulturmedium in liegenden Zellkulturflaschen oder -platten inkubiert. Wird eine Konfluenz von über 90% erreicht, müssen die Zellen passagiert werden. Hierfür werden NIH3T3-Zellen alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt. Da Phoenix E-Zellen besonders empfindlich auf zu hohe oder zu niedrige Zelldichten reagieren, werden diese jeden Tag im Verhältnis 1:2 aufgeteilt. Für die Passagierung wird das Medium vollständig abgenommen und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS werden die Zellen 3-5 min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Die Protease Trypsin führt zur enzymatischen

Lösung der adhärennten Zellen vom Boden der Kulturflaschen/platten. Es sollte jedoch nicht deutlich länger als 3-5 min auf die Zellen einwirken, da sonst die Gefahr eines Membranschadens für die Zellen besteht. Die abgelösten Zellen werden mit Medium abgespült und anschließend für 3-5 min bei 1300-1500 rpm zentrifugiert. Die Zugabe des serumhaltigen Mediums führt zur sofortigen Inaktivierung des Trypsins. Danach werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung auf neue Kulturflaschen/platten verteilt. Zur weiteren Analyse können die Zellen nach dem Zentrifugationsschritt bei -80°C gelagert oder gleich weiterverarbeitet werden.

2.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen

Einfriermedium (2-fach): 20% DMSO; 80% FCS

Zur dauerhaften Aufbewahrung können Zellen vital kryokonserviert werden. Dafür wird 1 ml einer dichten Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend mit der gleichen Menge Einfriermedium gemischt. Das Kryoröhrchen wird sofort bei -80°C eingefroren und nach 12-24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen und wieder in Kultur zu nehmen werden diese dem Stickstoff entnommen und sofort im 37°C -warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellen werden in Kulturmedium überführt und 3-5 min bei 1300-1500 rpm zentrifugiert, um das im Einfriermedium enthaltene und potentiell zelltoxische DMSO zu entfernen. Anschließend wird das Zellsediment in frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche/platte gegeben.

2.2.3.4 Zellzählung

Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu werden 30 μl der Zellsuspension mit der gleichen Menge 0,5%iger Trypanblaulösung vermischt und in die Zählkammer gegeben. Es werden vier der vorgegebenen Quadranten unter dem Mikroskop ausgezählt. Eine Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen ist durch Verwendung des Farbstoffs Trypanblau möglich, da nur tote Zellen und Zelltrümmer tiefblau gefärbt werden. Die absolute Zellzahl erhält man, indem

man die durchschnittliche Anzahl vitaler Zellen pro Quadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

2.2.3.5 Transfektion von Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen genetischen Materials in eukaryote Zellen bezeichnet. Man unterscheidet transiente und stabile Transfektion. Bei der transienten Transfektion wird die Fremd-DNA nach kurzer Zeit von den Zielzellen abgebaut und ist damit nur vorübergehend in diesen enthalten. Ist eine Zelle stabil transfiziert, so wird die eingeschleuste DNA dauerhaft in das Zell-Genom integriert. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Transfektion. Die verwendete Methode ist von der zu transfizierenden Zelllinie sowie von deren weiterer Verwendung abhängig. In dieser Arbeit wurde die Methode der Lipofektion und der retroviralen Transduktion verwendet.

2.2.3.6 Lipofektion und Gewinnung von Retrovirus

Lipofectamine™ 2000

Opti-MEM® I

Lipofektion eignet sich zur transienten Transfektion der Virusverpackungszelllinie Phoenix E. Bei dieser Methode wird genetisches Material mit Hilfe von Liposomen in die Zielzellen eingeschleust. Positiv geladene Lipidmoleküle umschließen die anionische DNA und die entstehenden liposomalen Vesikel fusionieren mit der lipophilen Membran der Zielzelle. Die Fremd-DNA kann in die Zelle aufgenommen werden. Um Phoenix E transient durch Lipofektion zu transfizieren werden 2×10^6 Zellen auf einer 60 mm Kulturplatte ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgt die Transfektion. Dafür werden in einem ersten Ansatz 500 µl Opti-MEM® I mit 10 µg Plasmid-DNA und in einem zweiten Reaktionsgefäß 500 µl Opti-MEM® I mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 vermischt. Beide Ansätze werden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ineinander überführt. Nach erneuter Inkubation für 40 min wird der gesamte Transfektionsansatz vorsichtig auf die ausplattierten Zellen getropft. Bei diesen wird zuvor das alte Kulturmedium entfernt und durch 3 ml frisches ersetzt. Da die Methode der Lipofektion ein hohes Maß an Stress für die Zellen bedeutet, sollten diese anschließend vorsichtig in den Brutschrank überführt und für 24 h ohne Störung inkubiert werden. Werden die Zellen

für proteinbiochemische Analysen transfiziert, werden sie 24-48 h nach Transfektion geerntet und bei -80°C eingefroren bzw. gleich weiterverarbeitet.

Für die Gewinnung von Retrovirus wird das Transfektionsmedium nach 24 h gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen werden weiter in Kultur gehalten. Die Virusverpackungszelllinie Phoenix E besitzt die Fähigkeit, aus der eingebrachten Vektor- DNA ein Retrovirus zu generieren und dieses ins Kulturmedium abzugeben. Phoenix E- Zellen enthalten dafür ein retrovirales Provirus, welches die für die viralen Proteine kodierenden Gene trägt. Nach Transfektion der Zellen wird die Vektor-DNA in komplementäre RNA umgeschrieben. Da der Vektor neben dem zu untersuchenden Gen ein Verpackungssignal aufweist, wird die RNA in der Phoenix E-Zelle mit den gebildeten viralen Proteinen zu rekombinanten Viruspartikeln zusammengebaut. Diese werden in das Kulturmedium sezerniert und können durch Abnahme des Mediums gewonnen werden. Bei den verwendeten Phoenix E-Zellen handelt es sich um eine ecotrope Verpackungszelllinie. Die sezernierten Retroviren können aufgrund ihrer retroviralen Hüllproteine nur murine Zellen infizieren. Um Retrovirus zu gewinnen wird der retrovirale Überstand 36, 48 und 60 h nach Phoenix E-Transfektion gesammelt. Anschließend wird der Überstand mit einem 0,45 µm Zellsieb steril filtriert und bei 4°C gelagert. Erwärmung und Einfrieren sollten vermieden werden, da die Hüllproteine des ecotropen Virus empfindlich auf thermische und mechanische Belastung reagieren. Die Bestimmung des Virustiters kann wie in Kapitel 2.2.3.9 beschrieben erfolgen.

2.2.3.7 Retrovirale Transduktion

Unter retroviraler Transduktion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen unter Verwendung von Retroviren. Retroviren können ihr einzelsträngiges RNA-Genom nach Infektion von Zielzellen mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in die komplementäre doppelsträngige DNA-Sequenz umschreiben und diese ins Wirtsgenom integrieren. Ein Vorteil der retroviralen Transduktion besteht in der dauerhaften und hoch effektiven Einschleusung fremder genetischer Information in ein Säugergenom. Retroviren können wie in Kapitel 2.2.3.6 beschrieben durch die Virusverpackungszelllinie Phoenix E generiert werden. Für die Transduktion muriner Zellen werden diese dreimal im Abstand von je 12 h mit retroviralem Überstand inkubiert. Zudem wird jeweils das Polykation Polybren in

einer Konzentration von 4 µg/ml zugesetzt, um die Interaktion zwischen viralem Bindungsprotein und Virusrezeptor der Zielzelle zu verbessern. Der Erfolg der Transduktion kann 12 h nach der letzten Infektion durchflusszytometrisch überprüft werden (Kapitel 2.2.3.8). In dieser Arbeit wurden die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 sowie murine Knochenmarkszellen retroviral transduziert.

2.2.3.8 Bestimmung der EGFP- Expression mittels Durchflusszytometrie

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren MSCV MigR1 und MSCV-LMP enthalten neben dem zu untersuchenden Gen ein weiteres Gen. Dieses kodiert für das grün fluoreszierende Protein EGFP, das ursprünglich in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt wurde. EGFP ist ein fluorochromes Protein, das durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt werden kann und anschließend grün fluoreszierendes Licht emittiert. Zwischen diesen beiden Genen tragen die Vektoren eine weitere Sequenz, die für eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) kodiert. Beide Gene werden zu einer gemeinsamen mRNA transkribiert und, vermittelt durch die IRES, zu einzelnen und in gleicher Menge vorhandenen Proteinen translatiert. Alle durch den Vektor transfizierten Zellen exprimieren das zu untersuchende Gen und in gleichem Maße EGFP. Somit lassen sich durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität des EGFP in Zellen Rückschlüsse auf den Erfolg der Transfektion und auf die Expressionsstärke des zu untersuchenden Gens ziehen. Die Messung erfolgt im Durchflusszytometer. Zellen werden in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in PBS aufgenommen und durch ein Zellsieb (40 µm) pipettiert, um größere Zellaggregate zu entfernen. Anschließend wird die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. EGFP wird mittels eines Lasers angeregt und das daraufhin emittierte Licht registriert. Der Anteil EGFP-positiver Zellen kann durch das Durchflusszytometer als Punktwolkendiagramm oder als Histogramm dargestellt werden.

2.2.3.9 Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter gibt die Anzahl retroviraler Partikel pro ml Virusüberstand an. Er stellt ein Maß für die Infektiosität des durch Lipofektion von Phoenix E-Zellen gewonnenen Retrovirus dar. Für die Bestimmung des Titers werden murine NIH3T3-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des retroviralen Überstandes inkubiert und anschließend der Anteil EGFP-positiver Zellen als Maß für die Transduktionseffizienz

durchflusszytometrisch ermittelt (Kapitel 2.2.3.8). Auf drei Schalen einer 6-Schalen-Zellkulturplatte werden dafür je $2,5 \times 10^4$ NIH3T3-Zellen ausplatiert. Am nächsten Tag wird der retrovirale Überstand im Verhältnis 1:20, 1:200 und 1:500 mit 4 µg/ml Polybren-haltigem Kulturmedium verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Nach weiteren 48-72 h erfolgt die Durchflusszytometrie. Der Virustiter kann wie folgt berechnet werden: zunächst werden die Einzeltiter der drei Verdünnungen durch Multiplikation des jeweiligen Verdünnungsfaktors (20, 200 oder 500) mit 5×10^4 (Zellzahl bei Infektion) und dem prozentualen Anteil EGFP-positiver Zellen der entsprechenden Verdünnungsstufe errechnet. Der Gesamttiter ergibt sich aus dem Mittelwert der drei unabhängig ermittelten Einzeltiter.

2.2.3.10 Synchronisation von Zellen

2 mM Thymidin

500 ng/ml Nocodazol

Es ist möglich, Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen oder an den Phasenübergängen zu synchronisieren. Sie können unabhängig davon, aus welcher Zellzyklusphase sie ursprünglich stammen, an einem bestimmten Punkt des Zyklus gestoppt werden. Um Zellen in der S-Phase zu arretieren, wird die Kultur mit 2 mM Thymidin versetzt und für 24 h inkubiert. Das im Überschuss vorhandene Thymidin bewirkt u.a. durch Enzymhemmung und p53-Induktion einen Arrest in der S-Phase. Zur proteinbiochemischen Analyse werden die Zellen nach 24 h geerntet und anschließend bei -80°C eingefroren bzw. gleich weiterverarbeitet. Sollen die Zellen synchron aus der S-Phase in den Zellzyklus eintreten, wird das Thymidin-haltige Medium entfernt, die Kultur dreimal mit sterilem PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben. Ein Arrest von Zellen am Übergang von der G1- in die S-Phase kann durch einen doppelten Thymidinblock erreicht werden. Dafür werden Zellen in niedriger Konfluenz von 40-50% ausplatiert, da die Kultur mindestens 2 Tage auf derselben Kulturplatte inkubiert werden muss. Die Zellen werden wie oben beschrieben durch Zugabe von Thymidin für 24 h in der S-Phase gestoppt und anschließend durch dreimaliges Waschen in den Zellzyklus entlassen. Nach 12 h wird erneut Thymidin zugegeben und für weitere 12-14 h auf den Zellen belassen. Danach wird die Kultur geerntet oder der G1/S-Block durch Waschen beendet. Für eine G2/M-Synchronisation werden Zellen nach 12 h währendem Thymidinblock mit

PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt. Durch Zugabe des Spindelgiftes Nocodazol in einer Konzentration von 500 ng/ml befindet sich nach weiteren 8-12 h ein Großteil der Zellen am G2/M-Übergang. Nocodazol verhindert die korrekte Formation des Spindelapparates und bewirkt dadurch einen reversiblen Arrest in der Prometaphase. Zellen, die am G2/M-Übergang vorliegen, können mikroskopisch identifiziert werden, da sie kugelig erscheinen. Ist dies beim überwiegenden Teil der Zellen der Fall, werden sie geerntet. Der Erfolg der Synchronisation kann mittels statischer oder dynamischer Zellzyklusanalyse durchflusszytometrisch überprüft werden.

2.2.4 Biologische Untersuchungen

2.2.4.1 Statische Zellzyklusanalyse

Fixationslösung: 70% Ethanol; 30% PBS

PI-Färbelösung: 25 mg/ml PI; 100 µg/ml RNase in PBS

Durch Messung des DNA-Gehaltes von Zellen ist ein Rückschluss auf deren momentane Zellzyklusphasen-Verteilung möglich. Zellen mit einfachem Chromosomensatz ($2n$) befinden sich in der G1-Phase, Zellen mit verdoppeltem Chromosomensatz ($4n$) haben die S-Phase passiert und liegen in G2-Phase oder am G2/M-Übergang vor (Abb.). Die DNA-Quantifizierung erfolgt durch Anfärben des Chromosomensatzes mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes Propidiumiodid (PI) und durchflusszytometrische Messung. PI ist nicht in der Lage, die intakte Membran vitaler Zellen zu durchdringen. Daher werden geerntete Zellen für die Färbung in eine -20°C -kalte 70% ige Ethanolösung getropft und über Nacht darin belassen. Die Zellen werden dadurch fixiert und die Membran für PI permeabel gemacht. Für die Färbung werden die fixierten Zellen 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Durch einen Waschschrift mit eisgekühltem PBS werden Ethanolreste entfernt. Danach werden die Zellen für 30 min bei 37°C und unter Lichtausschluss in PI-Färbelösung inkubiert. Die Lösung enthält neben 25 mg/ml PI 100 µg/ml RNase, um mögliche Interferenzen zwischen PI und RNA zu verhindern. In der anschließenden Durchflusszytometrie wird über die Fluoreszenzintensität des in die DNA eingelagerten PI der DNA-Gehalt der Zellen und somit die Zellzyklusphasen-Verteilung bestimmt (Abb. 5).

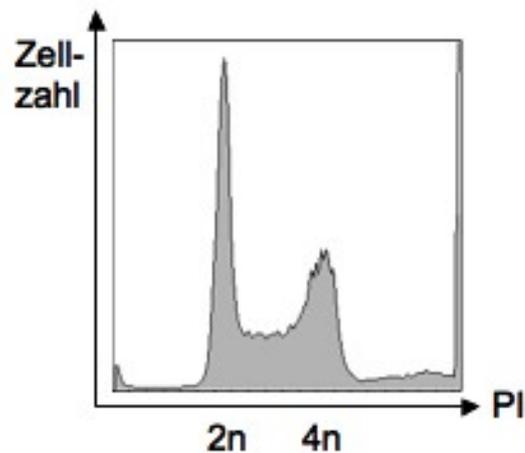


Abb. 5: Statische Zellzyklusanalyse.

Durchflusszytometrische Messung nach PI-Färbung. Der erste Gipfel entspricht Zellen mit einfachem Chromosomensatz ($2n$), die sich in G_1 -Phase befinden. Zellen in G_2 -Phase oder am G_2/M -Übergang tragen einen verdoppelten Chromosomensatz ($4n$) und erscheinen im zweiten Gipfel. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

2.2.4.2 Dynamische Zellzyklusanalyse

10 μM BrdU

Fixationslösung

2N HCL-0,5% Triton X-100- Lösung

0,1 M Natriumborat, pH 8,5

1% BSA-0,5% PBS-Tween-Lösung

Anti-BrdU-FITC-Antikörper

PI-Färbelösung

Das Voranschreiten einzelner Zellpopulationen im Zellzyklus kann durch den in der S-Phase stattfindenden Einbau des Thymidin-Analogons Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA sichtbar gemacht werden. Zellen, die BrdU in ihre DNA integriert haben, können durch Färbung mit fluoreszenzmarkierten, BrdU-spezifischen Antikörpern im Durchflusszytometer registriert werden. Durch gleichzeitige Darstellung der Zellzyklusphasen-Verteilung mittels des Farbstoffes PI (Kapitel 2.2.4.1) kann ein Voranschreiten BrdU-markierter und BrdU-negativer Zellen im Zellzyklus beobachtet werden. Zur Durchführung dieser dynamischen Zellzyklusanalyse wird eine Zellkultur für 40 min mit 10 μM BrdU inkubiert. Anschließend werden die Zellen geerntet und in 70% iger Ethanolösung fixiert. Am nächsten Tag erfolgt die Markierung des eingebauten BrdU durch einen Farbstoff-gekoppelten Antikörper sowie gleichzeitige PI-Färbung der Zellen. Die fixierten Zellen werden für 5 min mit 1200 rpm

zentrifugiert und der Ethanol-haltige Überstand abgesaugt. Das Zellsediment wird in 1 ml einer 2N HCL-0,5% Triton X-100-Lösung resuspendiert und der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Salzsäure führt zur Denaturierung der DNA und sollte nicht länger als 30 min auf die Zellen einwirken. Durch Zentrifugieren für 5 min bei 1400 rpm wird die Säure entfernt und das Sediment in 1 ml 0,1 M Natriumborat mit pH-Wert 8,5 aufgenommen. Dies bewirkt eine vollständige Neutralisation. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt wird die Natriumborat-Lösung abgetrennt und die Zellen mit 1 ml einer 1% BSA-0,5% PBS-Tween-Lösung vermischt. Es werden 25 µl einer Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten, BrdU-spezifischen Antikörperlösung zugegeben und der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugieren sedimentiert und einmal mit 1% BSA-0,5% PBS-Tween-Lösung gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgt die in Kapitel 2.2.4.1 beschriebene PI-Färbung. Im Durchflusszytometer werden die Zellpopulationen in den einzelnen Zellzyklusphasen sichtbar gemacht (Abb. 6).

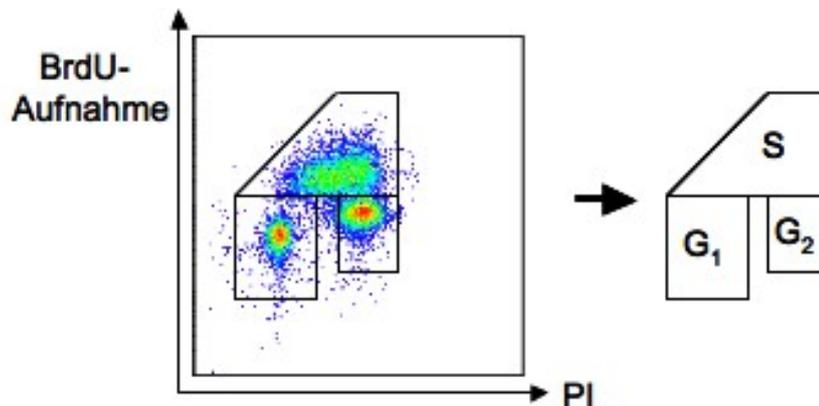


Abb. 6: Dynamische Zellzyklusanalyse.

Durchflusszytometrische Messung nach Markierung des in die DNA eingebauten BrdU und PI-Färbung. Die als Punktwolke dargestellten Zellen können wie gezeigt den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; BrdU (Bromdesoxyuridin)-Aufnahme: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Gewinnung von Zelllysaten

Lysis-Puffer: 10 mM Tris/ HCL, pH 7,5; 130 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% Triton X-100; 20 mM Na₂HPO₄/ NaH₂PO₄, pH 7,5; 10 mM Natriumpyrophosphat, pH 7; 1 mM Natriumorthovanadat; 20 mM NaF; 1 mM Glycerol-2-Phosphat; 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette/ 10 ml A.d.

SDS-Probenpuffer (2-fach): 1 M Tris/ HCL, pH 6,8; 200 mM DTT; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycerin in A.d.

Geerntete Zellen werden durch Zentrifugieren sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellsediment kann bei -80°C eingefroren oder gleich weiterverarbeitet werden. Alle Schritte zur Herstellung von Zelllysaten werden bei 4°C durchgeführt, um einer Degradation der Proteine entgegenzuwirken. Das Sediment wird in eiskaltem, frischen Lysis-Puffer resuspendiert, für 20 min inkubiert und anschließend 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Protein-haltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es kann eine Proteinbestimmung erfolgen (Kapitel 2.2.5.2) und die Konzentration verschiedener Lysate durch Verdünnung mit Lysis-Puffer angeglichen werden. Anschließend wird das Lysat mit gleicher Menge SDS-Probenpuffer versetzt und die Lösung für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Erhitzung in SDS-Probenpuffer führt zur Denaturierung der Proteine. Nach kurzer Zentrifugation wird das Proteingemisch durch SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.5.4) aufgetrennt. Zur gezielten Isolierung einzelner Proteine aus dem Gemisch kann das Lysat vor Zugabe des SDS-Probenpuffers einer Immunpräzipitation (Kapitel 2.2.5.3) zugeführt werden.

2.2.5.2 Proteinbestimmung

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wird die gängige Methode nach Bradford (Bradford, 1976) angewandt. Die Messung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau an Proteine. Durch die Bindung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschoben. Die Proteinbestimmung erfolgt unter Verwendung des „BioRad Protein Assays“ nach Herstellerangaben. Bovines Serumalbumin wird als Standard verwendet und die Proteinkonzentration anhand des linearen Bereiches einer Bovinalbumin-Eichgerade bestimmt.

2.2.5.3 Immunpräzipitation

Lysis-Puffer
Protein A-Sepharose-Lösung
Spezifische Antikörper
SDS-Probenpuffer (2-fach)

Die Immunpräzipitation ermöglicht es, bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch zu isolieren. Liegen in einer Zelle andere Proteine an das zu präzipitierende Protein

gebunden vor, werden auch sie durch die Präzipitation von der restlichen Lösung abgetrennt und eine Protein-Protein-Interaktion kann nachgewiesen und analysiert werden. Dies wird als Koimmunpräzipitation bezeichnet. Das Prinzip der Immunpräzipitation basiert darauf, ein zu isolierendes Protein mittels spezifischem Antikörper zu markieren und den Antigen-Antikörper-Komplex durch Sepharosegekoppeltes Protein A zu binden. Sepharose kann aufgrund seiner hohen Masse durch Zentrifugieren von der restlichen Proteinlösung separiert und dadurch die gebundenen Immunkomplexe isoliert werden. Zur Durchführung einer Immunpräzipitation wird ein Zellsediment wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben zum Lysat verarbeitet. Dieses wird zunächst für 20-60 min bei 4°C mit Protein A-Sepharose auf dem Rollrad inkubiert. Hierauf wird die Lösung für 2 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Protein A-Sepharose-haltige Sediment wird verworfen. Dieser als *Pre-clear* bezeichnete Schritt hilft, Proteine, die unspezifisch Protein A binden, aus dem Ansatz zu entfernen. Anschließend folgt die eigentliche Isolierung des zu untersuchenden Proteins. Das Lysat wird mit 2 µg des spezifischen Antikörpers versetzt und für 2-4 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach Antikörperbindung wird die Lösung für 30 min mit Protein A-Sepharose bei 4°C rotiert. Die gebundenen Immunkomplexe werden mit 14000 rpm für 2 min und bei 4°C sedimentiert und dreimal mit je 500 µl Lysis-Puffer gewaschen. Das Sediment wird mit 80 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C gekocht, um die präzipitierten Proteine zu denaturieren und von der Sepharose zu lösen. Nach kurzer Zentrifugation werden die Proteine in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.5.4 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel: 5-15% Polyacrylamid-Lösung; 375 mM Tris/ HCL, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

Sammegel: 5% Polyacrylamid-Lösung; 12,5 mM Tris/ HCL, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,3% APS; 0,1% TEMED

SDS-Gelelektrophorese-Puffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in A.d.

Die SDS-Gelelektrophorese wird standardmäßig zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese in Anlehnung an Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Normalerweise wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld durch deren Größe, Form und elektrische Ladung beeinflusst. In der SDS-Gelelektrophorese ist für die Fortbewegung nur die molare Masse entscheidend. Dies wird durch die

Vorbehandlung des Zelllysates mit SDS-Probenpuffer bei gleichzeitigem Erhitzen auf 95°C erreicht. Kochen in SDS-haltigem Puffer führt zur Denaturierung der Proteine. Der Effekt wird durch die im Puffer enthaltene Thiolverbindung DTT verstärkt, die eine Reduktion von Disulfidbrücken in den Molekülen bewirkt. In den denaturierten Proteinen kann das anionische Detergens SDS die Eigenladungen der Polypeptide überdecken. Es entstehen Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit. Das Elektrophoresegel entsteht durch Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid in Anwesenheit von freien Radikalen. Die freien Radikale entstammen dem zerfallenen APS und werden durch die Zugabe von TEMED stabilisiert. Im diskontinuierlichen System überschichtet ein weitporiges Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert ein engmaschigeres Trenngel mit höherem pH-Wert. Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und des Sammelgels führen zu einer Fokussierung des Proteingemischs an der Sammelgel-Trenngel-Grenze. Beim Eintritt in das Trenngel wirkt nur die molare Masse der Proteine als Trennkriterium. Variation der Polyacrylamid-Konzentration (5-15%) im Trenngel bewirkt eine unterschiedliche Trennporengröße. Dadurch können verschiedene Auftrennungsbereiche für die Proteine erzielt werden.

Zur Herstellung eines Polyacrylamid-Gels wird ein Trenngel in der gewünschten Polyacrylamid-Konzentration gegossen und luftblasenfrei in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Zum Abschluss von Sauerstoff wird das Gel mit 500 µl Methanol überschichtet. Nach 30 min ist die Trenngellösung polymerisiert und das Methanol kann entfernt werden. Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingefügt. Nach Polymerisation des Sammelgels wird der Kamm entnommen und das Gel in eine SDS-Gelelektrophoresekammer überführt. Anschließend können die in SDS-Probenpuffer gekochten Proteine in die Geltaschen geladen und bei einer Spannung von 25-150 V aufgetrennt werden. Zudem wird für den späteren Massevergleich ein Protein-Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

2.2.5.5 Transfer aufgetrennter Proteine auf eine PVDF-Membran (Western blot)

Transferpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS; 20% Methanol in A.d.

Die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden über elektrophoretischen Transfer vom Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wird das Trenngel in einer mit Transferpuffer befüllten Schale direkt auf eine zuvor

mit Methanol angefeuchtete PVDF-Membran gelegt. Luftblasen zwischen Gel und Membran müssen vermieden werden. Gel und Membran werden an beiden Seiten von einem Cellulosefilterkarton (Whatman-Paper) und je einer grobporösen Schaumstoffplatte in einer Plastikhalterung umschlossen. Die Schichten werden in eine mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer überführt, wobei die PVDF-Membran in Richtung der Anode weisen muss. Durch Anlegen einer Spannung mit konstanter Stromstärke (1000 mA) wandern die Proteine in Richtung Anode und haften auf der Membran. Der Transfer erfolgt gekühlt. Die Dauer ist von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine abhängig.

2.2.5.6 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Coomassie-Färbelösung: 0,25% Coomassie-Brillantblau; 45% Methanol; 10% Essigsäure in A.d.

Coomassie-Entfärbelösung: 45% Methanol; 10% Essigsäure in A.d.

Durch Coomassie-Färbung können Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel unselektiv angefärbt werden. Nach SDS-Gelelektrophorese wird das Trenngel in eine Schale überführt und in Coomassie-Färbelösung für 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgt unter gleichen Bedingungen die Entfärbung mittels Coomassie-Entfärbelösung. Das entfärbte Gel wird für 1 h in A.d. gelegt und danach auf Cellulosefilterkarton in einem Geltrockner getrocknet.

2.2.5.7 Immunchemischer Nachweis transferierter Proteine

Blockier-Puffer: 10% Trockenmilchpulver (entfettet) in PBS- Tween-Puffer

PBS-Tween-Puffer: 0,1% Tween 20 in PBS

Proteine können nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Membran selektiv immunchemisch nachgewiesen werden. Dafür wird das zu untersuchende Protein mit einem spezifischen Antikörper markiert und durch ein Chemolumineszenz-System sichtbar gemacht. Die Membran wird unmittelbar nach dem Protein-Transfer in eine Schale mit Blockier-Puffer gegeben und für 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Durch den Blockier-Puffer werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran gesättigt und somit die Spezifität der Nachweisreaktion erhöht. Es folgt die Inkubation mit dem spezifisch gegen Epitope des zu untersuchenden Proteins gerichteten Primärantikörper. Dieser wird je nach Herstellerangaben in Blockier-Puffer oder in PBS-Tween-Puffer mit 5% BSA

angesetzt und über Nacht bei 4°C schüttelnd auf der Membran belassen. Nach Antikörperbindung wird die Membran dreimal für je 10 min in PBS-Tween-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörpermoleküle zu beseitigen. Der Zweitantikörper ist gegen den F_c-Teil des Erstantikörpers gerichtet und zusätzlich mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Die Membran wird für 30 min bei Raumtemperatur mit dem in Blockier-Puffer angesetzten Zweitantikörper geschüttelt. Anschließend wird die Membran zweimal mit PBS-Tween-Puffer und einmal mit PBS gewaschen und danach in Chemolumineszenz-Lösung geschwenkt. Das in der Lösung enthaltene Substrat wird durch die Peroxidase gebundener Zweitantikörper zu einer lumineszierenden Substanz umgesetzt und das erzeugte Signal kann mit einem Hyperfilm dokumentiert werden.

2.2.5.8 Entfernen des gebundenen Erstantikörpers von der Membran

Stripping-Lösung: 0,2 M NaOH in A.d.

Durch Entfernen des gebundenen Erstantikörpers von der Membran (Stripping) ist es möglich, nacheinander verschiedene Proteine auf derselben Membran nachzuweisen. Die Membran wird für 10 min bei Raumtemperatur schüttelnd in Stripping-Lösung inkubiert. Die Lösung bewirkt das Ablösen des gebundenen Erstantikörpers von der Membran. Anschließend kann die Membran in A.d. gewaschen und erneut einem immunchemischen Proteinnachweis zugeführt werden (Kapitel 2.2.5.7).

2.2.5.9 *In vitro* Kinasierung von Proteinen (*In vitro* Kinase Assay)

1 µCi [γ -³²P]-ATP

Kinase-Puffer (5-fach): 250 mM Tris/ HCL (pH 7,5); 50 mM MgCl₂ in A.d.

50 µM ATP

1 mM DTT

Um Substrate einer Kinase zu identifizieren, wird die Methode der *in vitro* Kinasierung verwendet. Die potentielle Phosphorylierung eines eingesetzten Proteins durch die Kinase kann durch Zugabe von radioaktivem [γ -³²P]-ATP mit anschließender Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Rekombinante GST-Fusionsproteine werden wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben hergestellt. In einem Reaktionsgefäß werden 10 µl Kinase-Puffer, 50 µM ATP und 19 µl A.d. mit 15 µl in NETN-Puffer gelöstem GST-Fusionsprotein vermischt. Der Kinase-Puffer wird zuvor

durch Zugabe von 1 mM DTT aktiviert. Anschließend werden 1 µl aktive Kinase und 1 µCi [γ -³²P]-ATP zugesetzt. Der Ansatz wird für 5 min bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 95°C-heißem SDS-Probenpuffer beendet und die Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.2.5.4). Das Polyacrylamid-Gel wird mit Coomassie gefärbt und getrocknet (Kapitel 2.2.5.6). Anschließend kann der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat durch Autoradiographie visualisiert werden.

2.2.6 Arbeiten mit Mäusen

2.2.6.1 Gewinnung von Knochenmarkzellen aus Spendermäusen

Basales Knochenmarkmedium (BBMM): 325 ml IMDM; 150 ml FCS; 25 ml BSA (10% in IMDM);
5 ml L-Glutamin-Lösung (200 mM); 100 µM 2-Mercaptoethanol;
2,5 ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung

Den Spendermäusen werden 150 mg/kg 5-Fluorouracil intravenös oder intraperitoneal verabreicht. Der Stoff bewirkt eine Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark der Mäuse. Nach 4 Tagen werden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Nach gründlicher äußerlicher Desinfektion mit 70% igem Ethanol werden Femur und Tibia beider Beine chirurgisch entnommen und bis zur Knochenmarkpräparation in HBSS aufbewahrt. Das Knochenmark wird zeitnah und unter sterilen Bedingungen gewonnen. Nach Anbohrung der Epiphysen wird jeder einzelne Knochen mehrfach unter Verwendung einer Injektionskanüle (27G 3/4) mit DMEM-Kulturmedium durchspült und die gewonnene Zellsuspension in einer Zellkulturschale aufgefangen. Die Zellen werden durch ein Zellsieb (100 µm) pipettiert, um größere Zellaggregate und Knochenrümpfer zu entfernen, und anschließend für 6 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Knochenmarksediment wird sofort in 1 ml BBMM aufgenommen, mit der gleichen Menge Einfriermedium vermischt und bei -80°C weggefroren.

2.2.6.2 Retrovirale Transduktion von Mäuseknochenmark

Zur Einschleusung genetischen Materials in murine Knochenmarkzellen wird mit Hilfe von Phoenix E-Zellen ein Retrovirus generiert (Kapitel 2.2.3.6) und der Virustiter bestimmt (Kapitel 2.2.3.9). Der retrovirale Überstand ist für die Infektion von

Mäuseknochenmark geeignet, wenn der Titer in einer Größenordnung von über 1×10^5 liegt. Das eingefrorene Knochenmark wird aufgetaut und nach Zentrifugation in 2,5 ml BBMM aufgenommen. Die Zellsuspension wird in eine Schale einer 6-Schalen-Zellkulturplatte überführt und unter Zugabe von 10 ng/ml mIL-3, 12 ng/ml mIL-6 und 50 ng/ml mSCF für 24 h inkubiert. Die Wachstumsfaktoren regen die Kultur zur Proliferation an. Dies ist für eine erfolgreiche retrovirale Transduktion essentiell, da nur sich teilende Zellen durch Retroviren infiziert werden können. An den folgenden beiden Tagen erfolgt je morgens und abends im Abstand von 12 h die retrovirale Transduktion des Knochenmarks. Zur Transduktion wird die Methode der „Spin“-Infektion verwendet. Die Knochenmarkzellen werden sedimentiert, in 1 ml frischem BBMM aufgenommen und in eine Schale einer 12-Schalen-Zellkulturplatte pipettiert. Es werden 2 ml retroviraler Überstand, 4 $\mu\text{g/ml}$ Polybren sowie die oben genannten Wachstumsfaktoren in denselben Konzentrationen zugefügt. Der Infektionsansatz wird für 90 min bei 32°C mit 2400 rpm zentrifugiert und anschließend unter den üblichen Bedingungen im Brutschrank weiterkultiviert. Vor jeder weiteren Infektion werden Medium, retroviraler Überstand und Supplemente erneuert. 12 h nach der vierten Infektion werden die Zellen zentrifugiert und der Anteil EGFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch ermittelt (Kapitel 2.2.3.8). Es folgt die Knochenmarktransplantation.

2.2.6.3 Knochenmarktransplantation

Für die Transplantation von Mäuseknochenmark werden 6-8 Wochen alte Empfängermause mit einer Dosis von 800 rad (8 Gy) letal bestrahlt. Die hohe Dosis der Bestrahlung bewirkt eine Myeloablation, d.h. die körpereigene Hämatopoese der Empfängermause kommt vollständig zum Erliegen. Nach Transplantation wird das Knochenmark durch die Donorstammzellen repopuliert und die Blutbildung ausschließlich von diesen übernommen. Die retroviral transduzierten Spenderzellen werden zentrifugiert und in der gewünschten Konzentration in HBSS resuspendiert. Die Transplantation erfolgt durch Injektion der Zellen in eine Schwanzvene der letal bestrahlten Mäuse. Etwa 10 Tage nach Transplantation ist mit einer Rekonstitution der Hämatopoese zu rechnen.

2.2.6.4 Betreuung der transplantierten Mäuse

Nach Transplantation werden die Mäuse hinsichtlich der Rekonstitution ihrer Hämatopoese sowie der Entwicklung einer hämatologischen Erkrankung überwacht. Die Tiere werden dafür in regelmäßigen Abständen begutachtet und gewogen. Zudem werden Blutproben aus einer Schwanzvene entnommen. Die Vene wird mit Hilfe einer Injektionskanüle punktiert und das austretende Blut in einem EDTA-beschichteten Blutröhrchen aufgefangen. Etwa 20 µl der Probe werden zur Gewinnung eines Blutbildes in ein Blutbildgerät (VetABC Blood Counter) überführt. Aus dem verbleibenden Teil des Blutes wird zum einen ein Blutausschlag angefertigt, zum anderen werden die enthaltenen Leukozyten nach hypotoner Erythrozytenlyse (Kapitel 2.2.6.5) einer durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung zugeführt (Kapitel 2.2.6.7).

2.2.6.5 Hypotone Erythrozytenlyse

Red Blood Cell-Lysis-Puffer: 150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,3 in A.d.

Zur Immunphänotypisierung von Leukozyten müssen die Erythrozyten aus der Blutprobe entfernt werden. Das frisch entnommene periphere Blut wird dafür mit dem zehnfachen Volumen Red Blood Cell-Lysis-Puffer vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugieren für 4 min bei 1400 rpm erfolgt die Immunphänotypisierung.

2.2.6.6 Aufarbeitung verstorbener Tiere

Die an einer hämatologischen Erkrankung verstorbenen Mäuse werden gewogen und anschließend die inneren Organe (insbesondere Milz und Knochenmark) auf Pathologien untersucht. Abdomen und Thorax werden vorsichtig eröffnet. Die Milz wird entnommen, gewogen und eine Vergrößerung fotografisch dokumentiert. Ein kleines Gewebestück wird abgetrennt und zur späteren histologischen Untersuchung in Formaldehyd-Lösung (4% in PBS) konserviert. Der restliche Teil wird bis zur weiteren Verarbeitung in HBSS gelagert. Die unteren Extremitäten werden vom Rumpf abgetrennt, Femur und Tibia zur Knochenmarkpräparation isoliert und in HBSS überführt. Anschließend erfolgt die Gewinnung von Einzelzellsuspensionen aus den entnommenen Geweben. Die Milz wird mit einem Skalpell zerkleinert und zur weiteren Zellisolierung durch ein Sieb (100 µm) pipettiert. Die

Knochenmarkzellen werden wie in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben entnommen. Es folgt die durchflusszytometrische Immunphänotypisierung der Zellen.

2.2.6.7 Durchflusszytometrische Immunphänotypisierung von Zellen

FACS-Puffer: 0,1% BSA in PBS

Spezifische Oberflächenmoleküle auf Zellen können durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper markiert und im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Durch diese Methode wird eine exakte Zuordnung von Zellen zu bestimmten Populationen ermöglicht. Die gewonnenen Zellen (aus den Kapiteln 2.2.6.4 und 2.2.6.6) werden in 200 µl FACS-Puffer pro spezifischem Antikörper aufgenommen und in eine 96-Loch-Mikrotitrierplatte überführt. Pro spezifischem Antikörper wird ein Loch verwendet. Die F_c-Block™-Lösung sowie alle Antikörperlösungen werden vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit FACS-Puffer verdünnt. Anschließend werden jeder Vertiefung mit Zellen 3 µl F_c-Block™-Lösung, 3 µl CyChrome™-gekoppelter CD45-Panleukozytenantikörper und 3 µl Phycoerythrin (PE)-gekoppelter, spezifischer Antikörper zugesetzt. Der Ansatz wird für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach Antikörperbindung wird die Platte für 3 min bei 1450 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wird dreimal mit je 180 µl FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach werden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer mit 1 µg/ml PI aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Analyse im Gerät erfolgt in mehreren Schritten, so dass letztendlich nur vitale Leukozyten bezüglich ihrer markierten Oberflächenmoleküle beurteilt werden. Dafür werden Zelltrümmer und -doubletten sowie tote Zellen bei der Auswertung ausgeschlossen. Zelltrümmer und -doubletten werden durch Messung von Größe und Granularität der Zellen im Vorwärtsstreulicht („forward light scatter“, FS) und Seitwärtsstreulicht („sideward light scatter“, SS) erkannt. Tote Zellen können durch Zugabe von PI identifiziert werden, da nur Zellen mit nicht intakter Membran den Farbstoff aufnehmen.

3 Ergebnisse

3.1 NIPA-Phosphorylierung *in vitro*

Um die Kinase zu identifizieren, die die bedeutende, initiale Phosphorylierung von NIPA an den Serinresten 354 und 359 vermittelt, wurden zunächst *in vitro* Kinasierungsversuche durchgeführt. Die Methode ermöglicht es, *in vitro* die Aktivität von Kinasen gegenüber möglichen Substraten abzuschätzen und dadurch gezielt Substrate bestimmter Kinasen zu ermitteln. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die G₂/M-aktiven Kinasen GSK-3 β , CK2 und Plk1 keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von NIPA *in vitro* besitzen (Bassermann et al, 2007). Untersuchungen gaben einen Hinweis darauf, dass es sich beim gesuchten Enzym um die Extracellulär-signal regulated Kinase (ERK) handeln könnte. ERK gehört zur Klasse der Mitogen-activated protein Kinasen (MAPK) und reguliert über Phosphorylierung verschiedenster Zielmoleküle grundlegende zellbiologische Prozesse wie Differenzierung und Proliferation (MacCorkle & Tan, 2005). Diverse externe Stimuli können über eine intrazelluläre Signalkaskade, in der insbesondere die G-Proteine Ras und Raf sowie die Kinase MEK eine Rolle spielen, zur Aktivierung von ERK führen (Pearson et al, 2001). Das Enzym weist mehrere Isoformen auf, von denen die bedeutendsten und am besten untersuchten ERK1 (p44, MAPK3) und ERK2 (p42, MAPK1) sind. ERK besitzt neben zahlreichen Zellzyklus-regulierenden Funktionen wichtige Aufgaben bei der Kontrolle des G₂/M-Überganges (Hayne et al, 2000; Liu et al, 2004; Wright et al, 1999). Zudem ist das Enzym bedeutsam für die Differenzierung von Hodenzellen. In Hodenzellen konnten hohe NIPA-Spiegel nachgewiesen werden und die Infertilität der NIPA-knockout Maus stellt ein weiteres Anzeichen für die Wichtigkeit des Proteins in diesem Gewebe dar. Um eine mögliche Phosphorylierung von NIPA durch ERK nachzuweisen, wurden zwei rekombinante GST-NIPA-Fusionsproteine für *in vitro* Kinase Assays hergestellt. Neben dem NIPA-Wildtyp-Protein (GST-NIPA WT) wurde in BL21-Bakterien eine phospho-defiziente NIPA-Mutante, bei der Serinrest 354 und 359 gegen Alanin ausgetauscht waren und die somit nicht mehr phosphoryliert werden konnte (NIPA S354,359A), exprimiert (GST-NIPA S354,359A). Die aufgereinigten Proteine wurden zusammen mit radioaktiv markiertem [γ -³²P]-ATP

und aktiver ERK1- bzw. ERK2-Kinase im Kinase Assay eingesetzt. Ein Ansatz mit reinem GST-Rest ohne fusioniertes Protein (GST-leer) diente als Negativkontrolle. Die Reaktion erfolgte für 5 min bei 30°C. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach Coomassie-Färbung getrocknet und der Einbau von radioaktivem Phosphat mittels Autoradiographie visualisiert. In Abb. 7 sind die beiden Assays für ERK1 und ERK2 dargestellt.

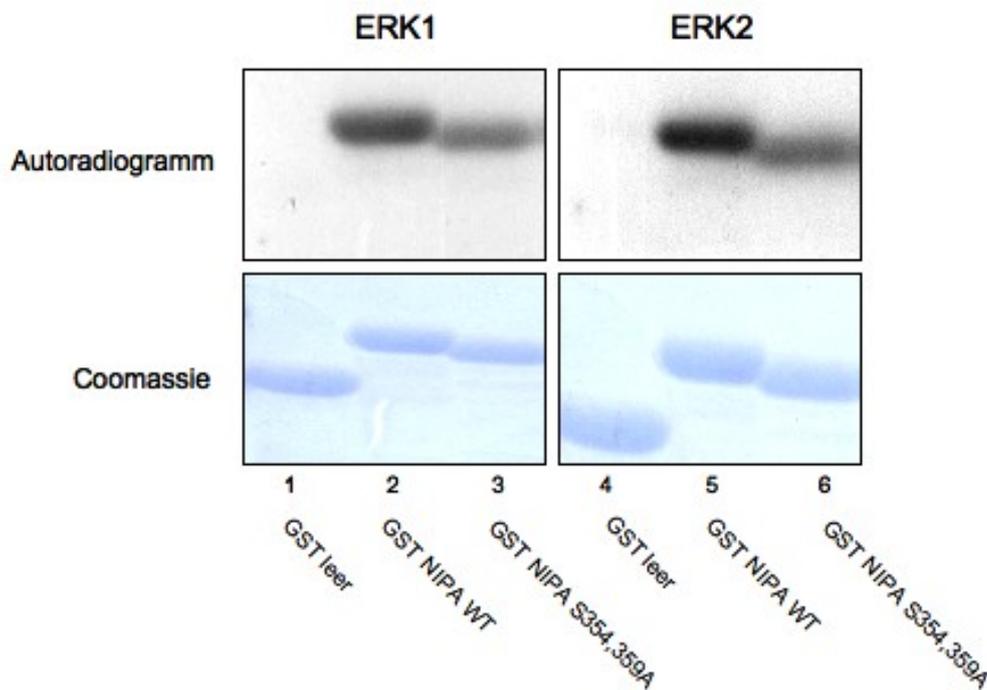


Abb. 7: ERK1 und ERK2 phosphorylieren NIPA *in vitro*.

GST-leer, GST-NIPA WT und GST-NIPA S354,359A wurden in BL21-Bakterien exprimiert und aufgereinigt. Die Fusionsproteine wurden zusammen mit [γ - 32 P]-ATP und aktiver ERK1- bzw. ERK2-Kinase in einen *in vitro* Kinase Assay (Reaktionszeit 5 min, Reaktionstemperatur 30°C) eingesetzt. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach Coomassie-Färbung getrocknet und der Einbau von radioaktivem Phosphat mittels Autoradiographie visualisiert. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Coomassie-gefärbten Proteine auf den getrockneten Gelen. Der obere Teil gibt den durch Autoradiographie sichtbar gemachten Einbau von radioaktivem Phosphat in die eingesetzten Proteine wieder.

Der untere Teil der Abbildung zeigt die Coomassie-gefärbten Proteine auf den getrockneten Gelen. Die Proteinmengen sind innerhalb der beiden Assays zwischen den verschiedenen Proben vergleichbar. Dies ist Voraussetzung für einen quantitativen Vergleich der Phosphorylierung von Wildtyp und Mutante. Der obere Teil der Abbildung gibt den durch Autoradiographie sichtbar gemachten Einbau von radioaktivem Phosphat in die eingesetzten Proteine wieder. Es ist zu erkennen, dass sowohl ERK1 als auch ERK2 die Phosphorylierung des NIPA-Wildtyp-Proteins

vermitteln kann (Spuren 2 und 5). Die vergleichsweise kurze Reaktionsdauer, die zum Erreichen des starken Phosphorylierungssignals benötigt wird, gibt einen Hinweis auf die hohe Affinität von ERK1 und 2 zu seinem *in vitro* Substrat NIPA. In beiden Assays weist die phospho-defiziente NIPA-Mutante im Vergleich zum NIPA-Wildtyp-Protein einen geringeren Einbau von radioaktivem Phosphat und damit ein schwächeres Signal in der Autoradiographie auf (Spuren 3 und 6). Dies deutet darauf hin, dass die *in vitro* Phosphorylierung von NIPA durch ERK1 und 2 an den Serinresten 354 und 359 erfolgt.

3.2 Physiologische Phosphorylierung von NIPA

Die *in vitro* Kinasierungsversuche wiesen auf die Bedeutung von ERK1 und 2 für die Phosphorylierung von NIPA hin. *In vitro* Kinase Assays können allerdings häufig zu falsch positiven Ergebnissen führen. Aufgrund der eingeschränkten Spezifität der Methode konnte somit noch keine Aussage über die NIPA-Phosphorylierung *in vivo* gemacht werden. Weitere Versuche zur Charakterisierung der Rolle von ERK1 und 2 bei der Phosphorylierung von NIPA in lebenden Zellen waren daher notwendig. Zunächst wurde diese Rolle im Rahmen des physiologischen Zellzyklus analysiert.

3.2.1 Inhibition der ERK-Aktivität am G₂/M-Übergang

Die Phosphorylierung von NIPA findet am G₂/M-Übergang des physiologischen Zellzyklus statt. Um die Bedeutung von ERK bei dieser Phosphatgruppenübertragung zu untersuchen, wurden D1-Zellen am G₂/M-Punkt synchronisiert und der Phosphorylierungsstatus von NIPA in An- und Abwesenheit von funktioneller ERK-Kinase mit Hilfe von Western blot-Analysen betrachtet. Zur Hemmung der Kinase-Aktivität von ERK wurden zwei verschiedene MEK-Inhibitoren verwendet. Die Kinase MEK überführt ERK durch direkte Phosphorylierung in den aktiven Zustand. Die Inhibition von MEK bewirkt daher einen verminderten Aktivitätsgrad von ERK. Die synthetische Verbindung PD98059 (Abb. 8) ist ein nicht-kompetitiver Hemmstoff der MEK-Isoform MEK1 und in geringerem Maße der MEK-Isoform MEK2 (Alessi et al, 1995; Dudley et al, 1995). PD98059 verhindert die Aktivierung von MEK1/2 durch Raf und setzt dadurch die Aktivität von ERK1 und

ERK2 herab (Alessi et al, 1995). Bei U0126 (Abb. 8) handelt es sich um eine organische Verbindung, die die MEK-Isoformen MEK1 und MEK2 in gleicher Weise inhibiert (Duncia et al, 1998; Favata et al, 1998).

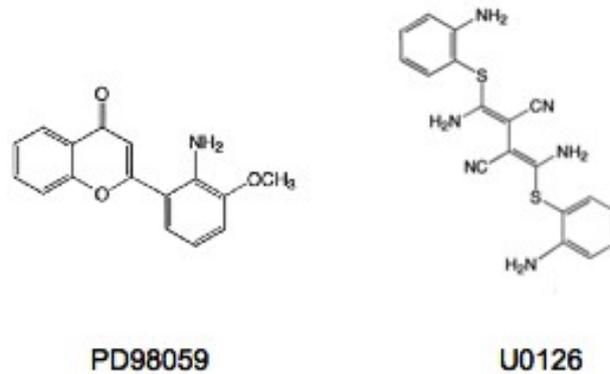


Abb. 8: Strukturformel von PD98059 (2'-Amino-3'-methoxy-flavon) und von U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien).

Im Gegensatz zu PD98059 hemmt U0126 die bereits aktivierte Form von MEK1/2 und blockiert damit die ERK1/2-Aktivierung auf einer tieferen Ebene der Signalkaskade (Favata et al, 1998). Die ERK1/2-inhibierende Wirkung von U0126 wurde als potenter und spezifischer beschrieben als die von PD98059 (Favata et al, 1998).

Bei der im Versuch verwendeten Zelllinie D1 handelt es sich um NIH3T3-Zellen, die eine konstante Überexpression von Flag-markiertem NIPA-Wildtyp-Protein aufweisen (Bassermann et al, 2005). Die Zellen wurden durch einen 24 h-währenden Thymidinblock mit anschließender Nocodazol-Behandlung (8-12 h) am G₂/M-Übergang synchronisiert. Bei Nocodazol-Zugabe wurde eine Kultur zusätzlich mit MEK-Inhibitor PD98059 (50µM) oder MEK-Inhibitor U0126 (10µM), die Kontrollkultur mit entsprechender Menge Lösungsmittel (DMSO) versetzt. Ein Aliquot der Zellen wurde zur Überprüfung des Synchronisationserfolges einer statischen Zellzyklusanalyse mittels PI-Färbung zugeführt. Der restliche Teil wurde für Western blot-Analysen verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurden unsynchronisierte D1-Zellen mitaufgetragen. In Abb. 9a sind die statischen Zellzyklusanalysen dargestellt. Bei der unsynchronisierten Kultur liegen die meisten Zellen in G₁-Phase vor, nur ein geringer Anteil befindet sich in S-Phase, G₂-Phase oder in Mitose (Diagramm 1). Durch 24 h währenden Thymidinblock mit anschließender Nocodazol-Zugabe werden die Zellen am G₂/M-Punkt arretiert (Diagramm 2 und 3). Die zusätzliche Behandlung

der Kultur mit MEK-Inhibitor PD98059 oder U0126 (Diagramm 3) verändert den Anteil G₂/M-synchronisierter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kultur (Diagramm 2) nicht. Dies erlaubt die vergleichende Betrachtung des Phosphorylierungsstatus von NIPA am G₂/M-Punkt.

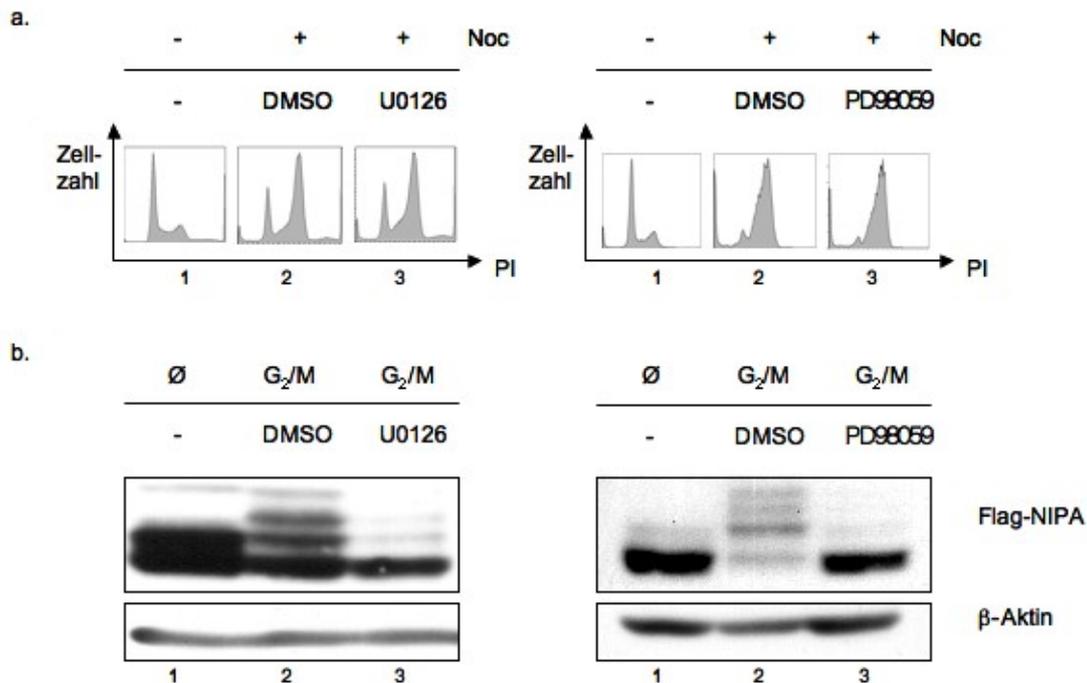


Abb. 9: Inhibition der ERK-Aktivität führt zu verminderter Phosphorylierung von NIPA am G₂/M-Übergang.

D1-Zellen (NIH3T3-Zellen mit konstanter Überexpression von Flag-markiertem NIPA-Widtyp-Protein) wurden durch 24 h währenden Thymidinblock mit anschließender Nocodazol-Behandlung (8-12 h) am G₂/M-Übergang synchronisiert (+ Noc). Bei Nocodazol-Zugabe wurde eine Kultur zusätzlich mit MEK-Inhibitor U0126 (10 μ M) oder MEK-Inhibitor PD98059 (50 μ M), die andere mit entsprechender Menge Lösungsmittel (DMSO) versetzt. Als Kontrolle wurden unsynchronisierte D1-Zellen verwendet (- Noc).

a.: Statische Zellzyklusanalyse: Ein Aliquot der Zellen wurde in Ethanol fixiert und anschließend mit PI-Färbelösung inkubiert. Die Abbildung zeigt die durchflusszytometrischen Analysen der PI-gefärbten Zellen. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

b.: Western blot-Analyse: Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist der immunchemische Nachweis von Flag-markiertem NIPA und β -Aktin mittels spezifischer Antikörper auf der Western blot Membran.

Die Detektion des Flag-markierten NIPA auf der Western blot-Membran mittels spezifischem Antikörper zeigt die Auswirkungen einer ERK-Inhibition auf die NIPA-Phosphorylierung am G₂/M-Übergang (Abb. 9b). In unsynchronisierten Zellen mit Überwiegen der G₁-Fraktion liegt NIPA zum größten Teil im unphosphorylierten Zustand vor. Daher stellt sich das Protein in der Western blot-Analyse als isolierte Bande dar (Blot: Flag-NIPA, Spur 1). Befinden sich Zellen vorwiegend am G₂/M-

Übergang wird NIPA verstärkt phosphoryliert. Bei phosphoryliertem NIPA zeigen sich im Western blot mehrere abgestufte Banden unterschiedlicher Höhe (Blot: Flag-NIPA, Spur 2). Die Verwendung von MEK-Inhibitor und damit eine Verminderung der ERK-Aktivität bewirkt einen Wegfall dieser Abstufungen am G₂/M-Übergang (Blot: Flag-NIPA, Spur 3). Dies zeigt eine herabgesetzte Phosphorylierung von NIPA an und ist durch beide Inhibitoren zu erreichen. Der Nachweis von β -Aktin dient als Ladungskontrolle. Der Versuch weist eindeutig darauf hin, dass ERK auch *in vivo* eine Bedeutung für den NIPA-Phosphorylierungsprozess zukommt.

3.2.2 Das microRNA-System

Die Inhibitor-Versuche zeigten, dass Hemmung der ERK-Aktivität eine verringerte Phosphorylierung von NIPA am G₂/M-Übergang zur Folge hat. Die verwendeten Inhibitoren beeinflussen jedoch in geringem Maße auch andere Mitglieder der MAPK-Familie, so dass ein Einfluss unspezifischer Enzymhemmungen nicht ausgeschlossen werden konnte (Alessi et al, 1995; Favata et al, 1998). Zusätzlich war es mit den Inhibitoren nicht möglich, eine selektive ERK1- mit einer selektiven ERK2-Inhibition zu vergleichen. Um die Rolle von ERK bei der NIPA-Phosphorylierung spezifischer untersuchen zu können, wurde ein selektiver Protein-Knockdown mittels eines microRNA-Systems durchgeführt. MicroRNAs (miRNAs) werden zusammen mit small interfering RNAs (siRNAs) und einigen anderen kurzen RNA-Molekülen zur Gruppe der sogenannten kleinen RNAs (small RNAs) gerechnet (Eddy, 2001; Finnegan & Matzke, 2003; Voinnet, 2002). Durch das Einbringen von kleinen RNAs in Zellen kann die Expression bestimmter Zielgene selektiv verringert werden (Protein-Knockdown) (Elbashir et al, 2001; Elbashir et al, 2002). Ein wichtiges Prinzip dabei ist die Interferenz mit der mRNA des zu regulierenden Proteins (Denli & Hannon, 2003). Kleine RNAs können komplementär an den Nukleinsäurestrang der mRNA binden und dadurch den Knockdown des entsprechenden Proteins induzieren (Denli & Hannon, 2003). In dieser Arbeit wurden spezifische miRNAs zum Knockdown von ERK1 und ERK2 verwendet. Dafür wurden die zur Expression einer ERK1 bzw. ERK2-spezifischen miRNA benötigten DNA-Sequenzen in den Vektor MSCV-LMP kloniert. Zur Kontrolle wurde ein LMP-Vektor mit einer nicht-interferierenden Sequenz (Kontrollsequenz) hergestellt. Anschließend

wurden die rekombinanten Vektoren zur Transfektion von Phoenix E-Zellen eingesetzt. Die gewonnenen retroviralen Partikel wurden zur Infektion von D1- und NIH3T3-Zellen verwendet und die Zellen mit Hilfe einer Puromycin-Resistenzkassette selektioniert. Dadurch konnte eine stabile Transduktion von Zellen mit den rekombinanten DNA-Konstrukten erreicht werden. Abb. 10 veranschaulicht das Prinzip der RNA-Interferenz zwischen den miRNAs und den mRNA-Strängen (hier als entsprechende cDNA dargestellt) von ERK1 und ERK2.

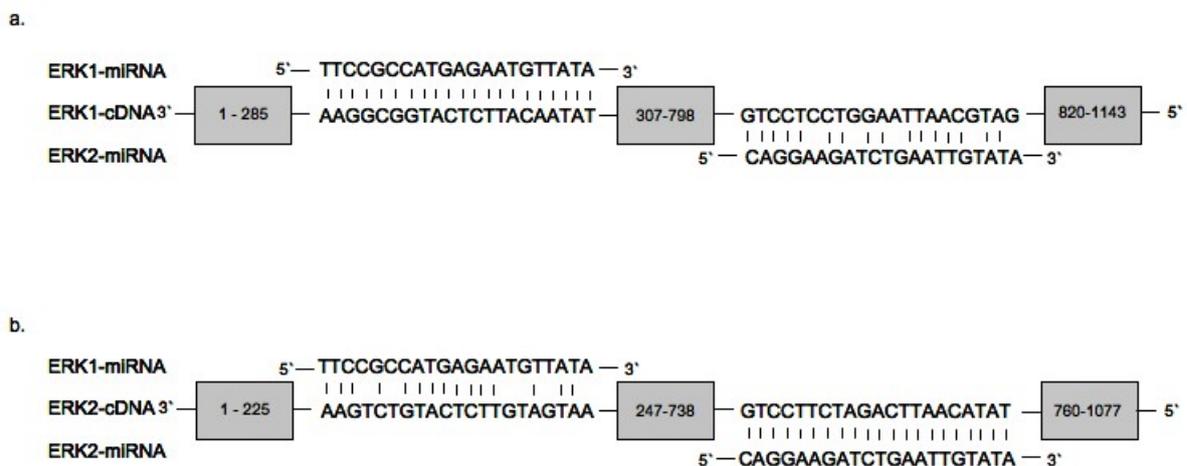


Abb. 10: Prinzip der RNA-Interferenz zwischen ERK-miRNAs und den mRNA-Strängen von ERK (hier als entsprechende cDNA dargestellt).

a.: ERK1-cDNA mit ERK1-miRNA und ERK2-miRNA

b.: ERK2-cDNA mit ERK1-miRNA und ERK2-miRNA

Die 21 Basen lange ERK1-miRNA bindet von Position 286 bis 306 an die mRNA von ERK1 (Abb. 10a). Die komplementäre Sequenz für die ebenfalls 21 Basen umfassende ERK2-miRNA befindet sich zwischen Position 738 und 760 der ERK2-mRNA (Abb. 10b). Wechselwirkungen zwischen ERK1-bzw. ERK2-miRNA und der jeweils nicht zugehörigen mRNA sind trotz struktureller Ähnlichkeit von ERK1 und ERK2 nicht zu erwarten. Wie Abb. 10 zeigt, ähnelt die Basenabfolge 286 bis 306 der ERK1-mRNA der Sequenz zwischen Position 225 und 247 im Nukleinsäurestrang der ERK2-mRNA. Eine Interferenz zwischen ERK1-miRNA und der mRNA von ERK2 kommt jedoch nicht zustande, da sich mehrere Basen beider Stränge nicht komplementär zueinander verhalten (Abb.10b). Desweiteren weist Position 799 bis 819 der ERK1-mRNA Ähnlichkeiten mit Position 739 bis 759 der ERK2-mRNA auf. Da allerdings auch hier keine vollständige Übereinstimmung besteht, kann keine

Interferenz zwischen ERK2-miRNA und ERK1-mRNA stattfinden (Abb.10a). In Abb. 11 ist die durchflusszytometrische Analyse der mit den Vektoren transduzierten Zellen dargestellt. Der verwendete LMP-Vektor enthält neben dem eingefügten DNA-Konstrukt die Information für das grün fluoreszierende Protein EGFP. Durch Messung des EGFP-Gehaltes der Zellen lassen sich Rückschlüsse auf den Erfolg der Infektion sowie auf die Expressionsstärke des eingefügten Konstruktes ziehen. Wie Abb. 11 zeigt, wurden alle drei verwendeten Konstrukte (ERK1-miRNA, ERK2-miRNA, Kontrollsequenz) von annähernd 100% der transduzierten Zellen exprimiert.

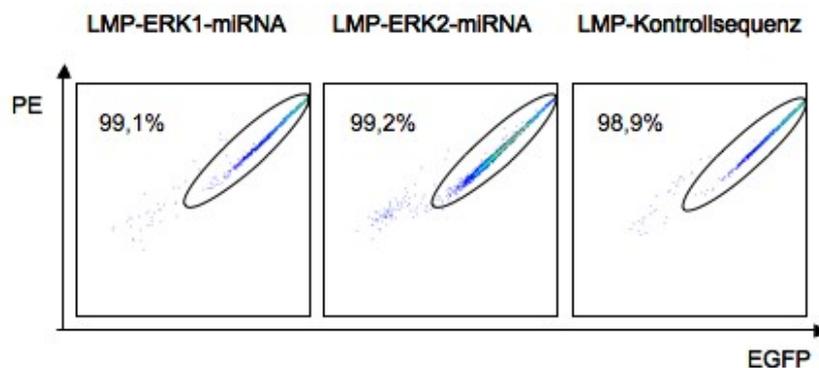


Abb. 11: Stabile Transfektion von D1-Zellen mit ERK1-miRNA, ERK2-miRNA und Kontrollsequenz.

D1-Zellen wurden retroviral mit den angegebenen Konstrukten transduziert. Zur Beurteilung des Transfektionserfolges wurde 12 h nach der letzten Infektion der EGFP-Gehalt der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil EGFP-positiver Zellen (schwarze Ellipsen). EGFP (enhanced green fluorescent protein): grün fluoreszierendes Protein (Kanal 1 des Durchflusszytometers); PE: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

Die Funktionalität der miRNAs innerhalb der Zellen wurde durch Western blot-Analysen überprüft. Wie Abb. 12 zeigt, erwies sich der Protein-Knockdown als sehr effektiv. Die Expression der ERK1-miRNA bewirkt eine starke und selektive Verringerung der ERK1 (p44)-Gesamtproteinmenge im Vergleich zur Kontrollsequenz (Blot: ERK1/2, Spuren 1 und 2). In gleicher Weise wird die aktive phospho-Form des Proteins herabgesetzt (Blot: phospho-ERK1/2, Spuren 1 und 2). Ähnlich wirksam stellt sich die ERK2-miRNA dar. Sowohl die ERK2 (p42)-Gesamtproteinmenge als auch die aktive phospho-Form von ERK2 können durch Einsatz der miRNA deutlich reduziert werden (Blots: ERK1/2, phospho-ERK1/2, Spuren 3 und 4). Als Ladungskontrolle wurde β -Aktin detektiert. Wie die Western blot-Analysen verdeutlichen, stand für folgende Untersuchungen ein System zur Verfügung, mit dem die Kinaseaktivität von ERK1 und ERK2 sehr effektiv und hochselektiv herunterreguliert werden konnte.

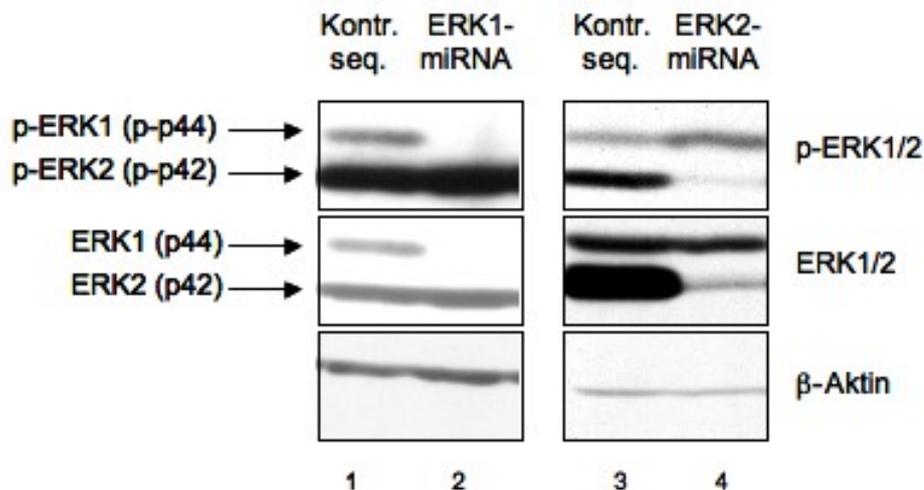


Abb. 12: Spezifischer Knockdown von ERK1 und ERK2 durch das microRNA-System.

ERK1-miRNA-, ERK2-miRNA- und Kontrollsequenz exprimierende D1-Zellen wurden zu Lysaten verarbeitet und die Proteine gelelektrophoretisch separiert. Die Proteinmengen von phospho (p)-ERK1/2, ERK1/2 und β -Aktin wurden mittels spezifischer Antikörper auf der Western blot Membran detektiert. Die molare Masse von ERK1 beträgt 44 kDA, die von ERK2 42 kDA.

3.2.3 Spezifischer ERK-Knockdown am G₂/M-Übergang

Durch Verwendung des miRNA-Systems war es möglich, die Bedeutung von ERK für die NIPA-Phosphorylierung am G₂/M-Übergang hochspezifisch zu untersuchen. Dafür wurden die mit den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Konstrukten transduzierten D1-Zellen am G₂/M-Punkt synchronisiert. Anschließend wurde die Zellzyklusphasen-Verteilung der Kulturen mittels PI-Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt und der Phosphorylierungsstatus von NIPA in Western blot-Analysen betrachtet. Unsynchronisierte D1-Zellen mit Kontrollsequenz dienten als Kontrolle. Der Einsatz der ERK-miRNAs veränderte den Synchronisationserfolg der Zellen nicht. Wie in Abb. 13a zu sehen, weisen die miRNA exprimierenden Zellen (Diagramm 3 und 4) eine zu Kontrollsequenz-Zellen (Diagramm 2) vergleichbare G₂/M-Synchronisation auf. Dies ist Voraussetzung für die vergleichende Betrachtung des Phosphorylierungsstatus von NIPA an G₂/M. Die unsynchronisierte Kultur liegt vorwiegend in G₁-Phase vor (Diagramm 1). In der Western blot-Analyse (Abb. 13b) erscheint NIPA in G₂/M-synchronisierten Zellen mit Kontrollsequenz in deutlich phosphoryliertem Zustand (Blot: Flag-NIPA, Spur 2). In unsynchronisierten Zellen

lässt sich erwartungsgemäß nicht phosphoryliertes NIPA detektieren (Blot: Flag-NIPA, Spur 1).

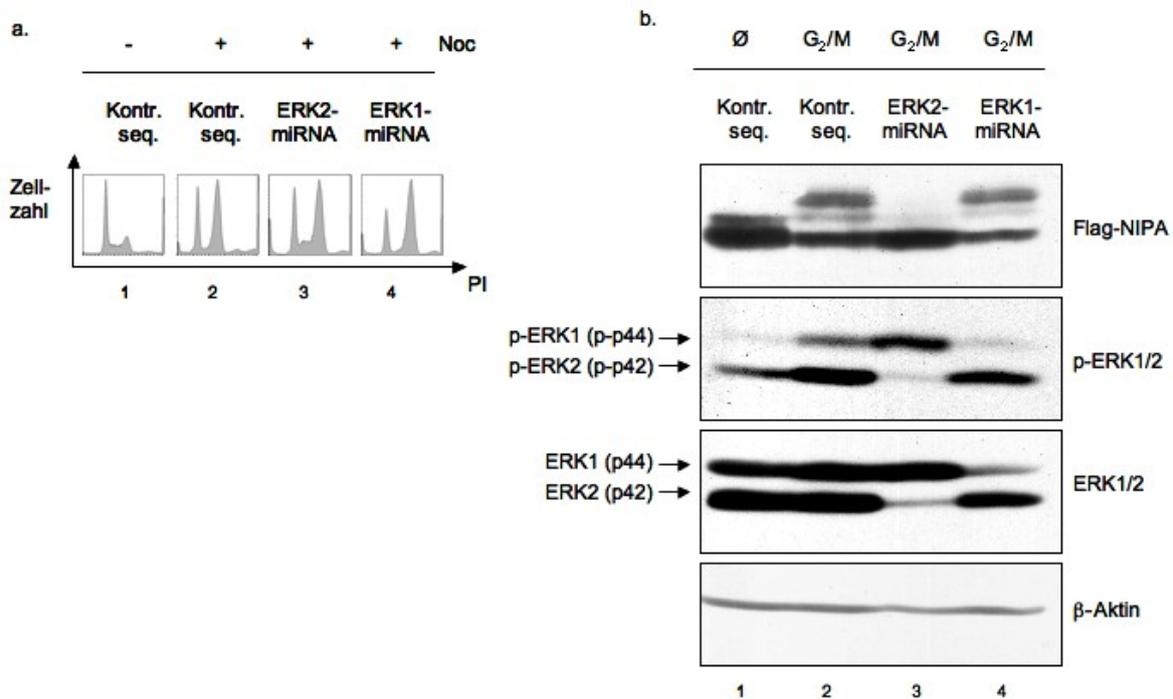


Abb. 13: Knockdown von ERK2, nicht aber von ERK1 führt zu verminderter Phosphorylierung von NIPA am G₂/M-Übergang.

ERK1-miRNA-, ERK2-miRNA- und Kontrollsequenz exprimierende D1-Zellen wurden durch 24 h währenden Thymidinblock mit anschließender Nocodazol-Behandlung (8-12 h) am G₂/M-Übergang synchronisiert (+ Noc). Als Kontrolle diente eine Kultur unsynchronisierter D1-Zellen mit Kontrollsequenz (- Noc).

a.: Statische Zellzyklusanalyse: Ein Aliquot der Zellen wurde in Ethanol fixiert und anschließend mit PI-Färbelösung inkubiert. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen der PI-gefärbten Zellen. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

b.: Western blot-Analyse: Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist der immunchemische Nachweis von Flag-markiertem NIPA, phospho (p)-ERK1/2, ERK1/2 und β-Aktin mittels spezifischer Antikörper auf der Western blot Membran.

Hervorzuheben ist, dass Expression der ERK2-miRNA eine starke Herabsetzung des Phosphorylierungsgrades von NIPA am G₂/M-Übergang bewirkt. NIPA liegt in ERK2-defizienten Zellen an G₂/M nahezu unphosphoryliert vor (Blot: Flag-NIPA, Spur 3). Die Wirksamkeit der ERK2-miRNA wird durch die Blots ERK1/2 und phospho-ERK1/2 in Spur 3 verdeutlicht, in denen der selektive Knockdown von ERK2 dargestellt ist. Interessanterweise führt der Knockdown von ERK1 nicht zu verminderter Phosphorylierung von NIPA an G₂/M. Der verstärkte NIPA-Phosphorylierungsstatus bleibt bestehen (Blot: Flag-NIPA, Spur 4), obwohl sich die ERK1-Proteinmenge als deutlich reduziert erweist (Blots: ERK1/2, phospho-ERK1/2,

Spur 4). Zum Nachweis einer gleichmäßigen Ladung aller Spuren wurde β -Aktin detektiert. Der Versuch zeigt, dass spezifischer Knockdown von ERK2, nicht aber von ERK1 die Phosphorylierung von NIPA an G2/M verhindern kann.

3.2.4 Korrelation der NIPA-Phosphorylierung mit der Aktivität von ERK

Mit Hilfe der bisher durchgeführten Experimente gelang es, ERK2 als die Kinase zu identifizieren, die die Phosphorylierung von NIPA am Übergang in die Mitose vermittelt. Im nächsten Schritt sollten funktionelle Analysen die Plausibilität der bisherigen Ergebnisse überprüfen. Zunächst wurde untersucht, ob im Rahmen des Zellzyklus eine Zunahme der ERK-Aktivität mit einer verstärkten Phosphorylierung von NIPA einhergeht (Abb. 14).

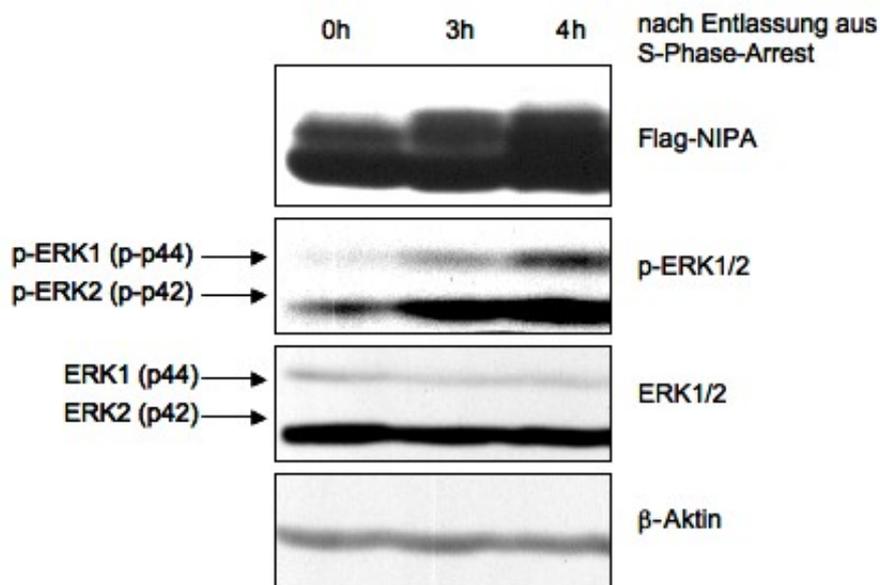


Abb. 14: Phosphorylierung von NIPA korreliert mit dem Aktivitätsgrad von ERK.

D1-Zellen wurden durch 24 h währenden Thymidinblock in der S-Phase arretiert. Eine Kultur wurde sofort geerntet (0 h), zwei andere wurden synchron in den Zellzyklus entlassen und erst nach weiteren 3 bzw. 4 h weiterverarbeitet. In der Abbildung ist die Western blot-Analyse der gewonnenen Zellen dargestellt. Flag-markiertes NIPA, phospho (p)-ERK1/2, ERK1/2 und β -Aktin wurden mit spezifischen Antikörpern auf der Membran nachgewiesen.

Dafür wurden D1-Zellen mittels Thymidinblock in der S-Phase arretiert. Eine Kultur wurde sofort geerntet (0 h), zwei weitere wurden durch Waschen und Zugabe von frischem Medium synchron in den Zellzyklus entlassen und erst nach weiteren 3 bzw. 4 h weiterverarbeitet. 3 bzw. 4 h nach Arrest haben die Zellen die S-Phase verlassen und befinden sich in G₂-Phase bzw. am Übergang in die Mitose. Im Western blot

zeigt sich, dass das Voranschreiten der Zellen in Richtung Mitose mit einer Zunahme der aktiven, phosphorylierten Form von ERK einhergeht (Blot: phospho-ERK1/2). Die Gesamtproteinfraktion von ERK bleibt konstant (Blot: ERK1/2). Die ansteigende ERK-Aktivität ist durch die Bedeutung des Enzyms für den G2/M-Übergang zu erklären. Gleichzeitig korreliert der verstärkte Aktivitätsgrad von ERK mit einer anwachsenden Phosphorylierung von NIPA (Blot: Flag-NIPA). Der β -Aktin-Nachweis dient als Ladungskontrolle. Durch den Versuch kann ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von ERK und der Phosphorylierung von NIPA im Zellzyklus nachgewiesen werden.

3.2.5 Auswirkungen der ERK-Inhibition auf den Zellzyklus

Zellen, die eine phospho-defiziente NIPA-Mutante tragen, in der Serinrest 354 gegen Alanin ausgetauscht ist (NIPA S354A), weisen ein verlangsamtes Voranschreiten im Zellzyklus auf. Insbesondere der Mitoseeintritt ist verzögert. Man nimmt an, dass dies auf die fehlende Phosphorylierung von NIPA zurückzuführen ist, die über ausbleibende Inaktivierung des SCF-Komplexes zu verspätetem Cyclin B1-Anstieg im Kern führt (Bassermann et al, 2005). Daher wurde untersucht, ob Hemmung der Kinase, die diese Phosphorylierung vermittelt, ähnliche Auswirkungen auf den Zellzyklus hat. NIH/3T3-Zellen wurden mit Hilfe eines doppelten Thymidinblock am G₁/S-Übergang synchronisiert. Eine Kultur wurde sofort geerntet. Die restlichen Zellen wurden unter Zugabe des MEK-Inhibitors U0126 (Kapitel 3.2.1) synchron aus dem Arrest entlassen und nach 5, 7 bzw. 9 h zur weiteren Verarbeitung gewonnen. Als Kontrolle dienten G₁/S-synchronisierte und in den Zellzyklus entlassene NIH3T3-Zellen, denen anstelle Inhibitor die entsprechende Menge Lösungsmittel (DMSO) zugesetzt wurde. Jede Kultur wurde vor Ernte für 40 min mit 10 μ M BrdU inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot der Zellen für dynamische Zellzyklusuntersuchungen verwendet, der restliche Teil wurde Western blot-Analysen zugeführt. Das Thymidin-Analogon BrdU wird während der S-Phase in die zelluläre DNA integriert. Zellen, die BrdU in ihr Erbgut eingebaut haben, können durch Färbung mit fluoreszenzmarkiertem, BrdU-spezifischen Antikörper im Durchflusszytometer registriert werden.

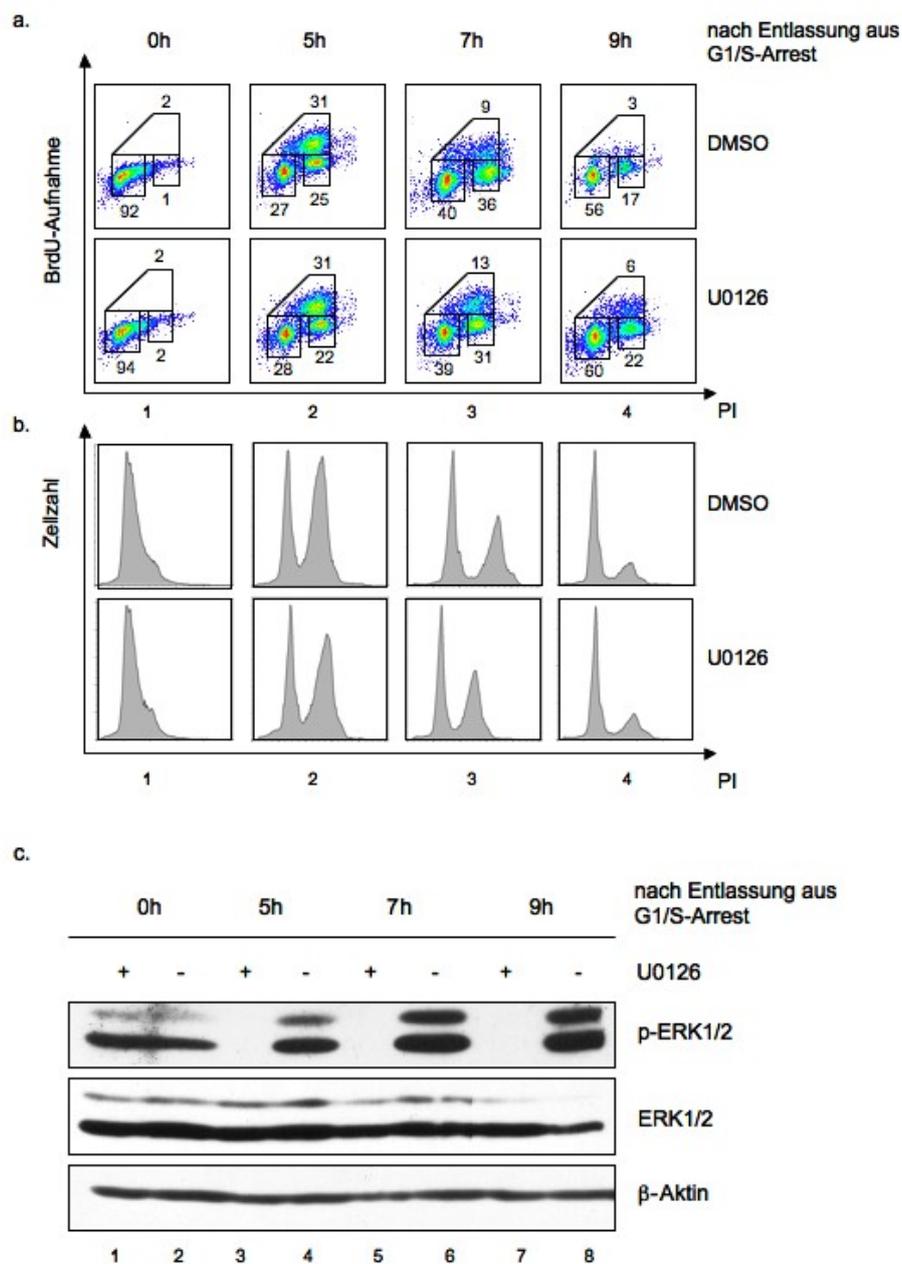


Abb. 15: Inhibition der ERK-Aktivität führt zu verzögertem Zellzyklus-Progress.

NIH3T3-Zellen wurden durch einen doppelten Thymidinblock am G₁/S-Übergang synchronisiert. Eine Kultur wurde sofort geerntet (0 h), die restlichen Zellen wurden unter Zugabe des MEK-Inhibitors U0126 (10µM) synchron aus dem Arrest entlassen und nach 5, 7 bzw. 9 h zur weiteren Verarbeitung gewonnen. Als Kontrolle dienten G₁/S-synchronisierte und in den Zellzyklus entlassene NIH3T3-Zellen, denen anstelle Inhibitor die entsprechende Menge Lösungsmittel (DMSO) zugesetzt wurde. Jede Kultur wurde vor Ernte für 40 min mit 10 µM BrdU inkubiert.

a.: Dynamische Zellzyklusanalyse: Die Zellen wurden in Ethanol fixiert und das in die zelluläre DNA integrierte BrdU wurde durch einen Farbstoff-gekoppelten Antikörper markiert. Nach PI-Färbung wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die angegebenen Zahlen geben den prozentualen Anteil von Zellen in der entsprechenden Zellzyklusphase wider. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; BrdU (Bromdesoxyuridin)-Aufnahme bzw. Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers

b.: Statische Zellzyklusanalyse: Die Zellen wurden in Ethanol fixiert und anschließend mit PI-Färbelösung inkubiert. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen der PI-gefärbten Zellen. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

c.: Western blot-Analyse: Ein Teil der synchronisierten Zellen wurde zu Lysaten verarbeitet und die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abgebildet ist die Detektion von phospho (p)-ERK1/2, ERK1/2 und β-Aktin auf der Western blot Membran.

Durch gleichzeitige Darstellung der Zellzyklusphasen-Verteilung mittels des Farbstoffes PI kann ein Voranschreiten BrdU-markierter und BrdU-negativer Zellen im Zellzyklus beobachtet werden. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt einen verzögerten Zellzyklus-Progress U0126 behandelter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 15a und b). Die nach doppeltem Thymidinblock geernteten Zellen liegen zu über 90% am G₁/S-Übergang vor (Abb.13a, Spalte 1). Unter Verwendung von MEK-Inhibitor befinden sich nach 7 h bei einer synchron aus dem Arrest entlassenen Kultur 13% der Zellen in S-Phase und 31% in G₂-Phase bzw. am G₂/M-Übergang. Kontrollzellen dagegen weisen nach 7 h einen S-Phasen-Anteil von 9% und einen G₂-,G₂/M-Phasen-Anteil von 36% auf (Abb. 15a, Spalte 3). Dieser Unterschied von ca. 5% zeigt sich auch 9 h nach G₁/S-Block (U0126-DMSO: 22%-17% in G₂-,G₂/M-Phase, Abb.13a, Spalte 4). Auch in der statischen Analyse ist eine Verlangsamung des Zellzyklus durch U0126 erkennbar (Abb. 15b, Spalte 1-4). Abb. 15c verdeutlicht anhand von Western blot-Analysen die Effektivität der ERK-Inhibition durch U0126. Die Behandlung der Zellen mit U0126 bewirkt eine hoch wirksame Reduktion der aktiven phospho-ERK-Form 5,7 und 9 h nach G₁/S-Arrest (Blot: phospho-ERK1/2, Spuren 3, 5 und 7). Die ERK1/2-Gesamtproteinmenge wird nicht beeinflusst (Blot: ERK1/2). Der β -Aktin-Nachweis zeigt eine gleichmäßige Ladung der Spuren an. Das beschriebene Experiment lässt erkennen, dass Inhibition der Aktivität von ERK1/2 zu verzögertem Zellzyklus-Progress (ca. 5% im Vergleich zu Kontrollzellen) führt.

3.2.6 Auswirkungen des ERK2-Knockdowns auf den Zellzyklus

Um die Auswirkungen einer Aktivitätsminderung der für die NIPA-Phosphorylierung verantwortlichen Kinase auf den Zellzyklus spezifischer untersuchen zu können, wurde im nächsten Schritt der in Kapitel 3.2.5 dargestellte Versuch mit ERK2-Knockdown-Zellen durchgeführt. Mit Kontrollsequenz bzw. ERK2-miRNA transduzierte NIH/3T3-Zellen (Kapitel 3.2.2) wurden durch doppelten Thymidinblock am G₁/S-Punkt synchronisiert. Je eine Kultur wurde sofort geerntet (0 h), die restlichen Zellen wurden synchron in den Zellzyklus entlassen und nach 3,4,5,7 bzw. 9 h aufgearbeitet. 40 min vor Ernte wurden der entsprechenden Kultur 10 μ M BrdU zugegeben.

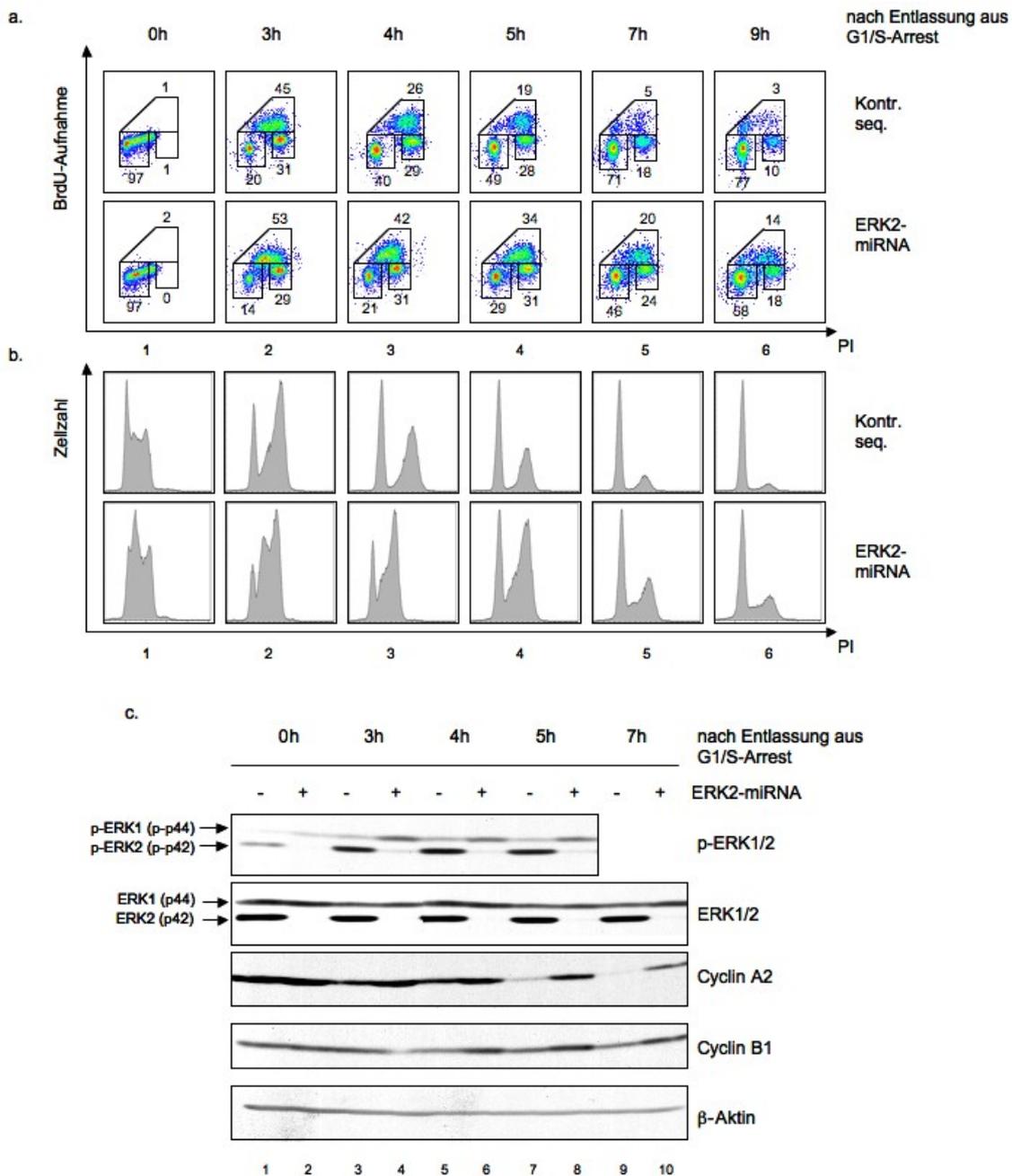


Abb. 16: Knockdown von ERK2 führt zu verzögertem Zellzyklus-Progress.

ERK2-miRNA- und Kontrollsequenz-exprimierende NIH3T3-Zellen wurden durch doppelten Thymidinblock am G₁/S-Übergang synchronisiert. Je eine Kultur wurde sofort geerntet (0 h), die restlichen Zellen wurden synchron in den Zellzyklus entlassen und nach 3,4,5,7 bzw. 9 h aufgearbeitet. Jede Kultur wurde vor Ernte für 40 min mit 10 μ M BrdU inkubiert.

a.: Dynamische Zellzyklusanalyse: Die Zellen wurden in Ethanol fixiert und das in die zelluläre DNA integrierte BrdU wurde durch einen Farbstoff-gekoppelten Antikörper markiert. Nach PI-Färbung wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Die angegebenen Zahlen geben den prozentualen Anteil von Zellen in der entsprechenden Zellzyklusphase wider. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; BrdU (Bromdesoxyuridin)-Aufnahme bzw. Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers

b.: Statische Zellzyklusanalyse: Die Zellen wurden in Ethanol fixiert und anschließend mit PI-Färbelösung inkubiert. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen der PI-gefärbten Zellen. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

c.: Western blot-Analyse: Ein Teil der in (a) analysierten Zellen wurde zu Lysaten verarbeitet und die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abgebildet ist die Detektion von phospho (p)-ERK1/2, ERK1/2, Cyclin A2, Cyclin B1 und β -Aktin auf der Western blot Membran.

Mit den gewonnenen Zellen wurden dynamische Zellzyklusuntersuchungen und Western blot-Analysen durchgeführt. Wie in Abb. 16a und b dargestellt, führt der Knockdown von ERK2 zu einer starken Verzögerung des Zellzyklus. Nach doppeltem Thymidinblock befinden sich über 90% der Zellen am G₁/S-Übergang (Abb. 16a, Spalte 1). Im weiteren Verlauf zeigt sich ein deutlich verlangsamter Zellzyklus-Progress ERK2-miRNA exprimierender Zellen im Vergleich zu Kontrollsequenz-Zellen. Die verlängerte Zellzykluspassage der Knockdown-Zellen ist zu jedem Zeitpunkt nach Arrest sowohl in der dynamischen (Abb. 16a, Spalte 2-6) als auch in der statischen Zellzyklusanalyse (Abb. 16b, Spalte 2-6) zu beobachten. So macht der S-Phasen-Anteil von Kontrollsequenz-Zellen 4 h nach Arrest-Entlassung 26% aus. ERK2-Knockdown-Zellen dagegen befinden sich nach 4 h noch zu 42% in S-Phase (Abb. 16a, Spalte 3). Dieser Unterschied von ca. 15% ist auch 5 bzw. 7 h nach Arrest registrierbar und weist auf eine prolongierte S-Phase ERK2miRNA-exprimierender Zellen hin (Abb.14a, Spalte 4 und 5). Die Differenz im G₂-,G₂/M-Phasen-Anteil zwischen Kontrollsequenz- und Knockdown-Zellen wächst von Untersuchungszeitpunkt zu Untersuchungszeitpunkt. Nach 4 h beträgt sie 2% (Kontr.seq.-ERK2miRNA: 29%-31%, Abb. 16a, Spalte 3), nach 5 h 3% (Kontr.seq.-ERK2miRNA: 28%-31%, Abb.16a, Spalte 4), nach 7 h 6% (Kontr.seq.-ERK2miRNA: 18%-24%, Abb. 16a, Spalte 5) und 9 h nach G₁/S-Arrest 8% (Kontr.seq.-ERK2miRNA: 10%-18%, Abb. 16a, Spalte 6). Dies zeigt an, dass in ERK2-Knockdown-Zellen neben der S-Phasen-Progression auch der Übergang von der G₂-Phase in die Mitose gestört ist. Der Western blot bestätigt den effektiven Knockdown von ERK2 in den miRNA-transfizierten Zellen (Abb. 16c, Blots: ERK1/2, phospho-ERK1/2, Spuren 2,4,6,8). Zudem wurden auf der Membran die Proteinmengen von CyclinA2 und CyclinB1 detektiert. CyclinA2 wird in Zellen insbesondere während der S-Phase exprimiert, CyclinB1 erreicht sein Maximum am Übergang von der G₂-Phase in die Mitose. In den restlichen Zellzyklusphasen ist die zelluläre Konzentration beider Cycline gering. ERK2-Knockdown-Zellen weisen zu allen Zeitpunkten nach G₁/S-Block höhere CyclinA2-Spiegel auf als Kontrollsequenz-Zellen (Blot: CyclinA2). Dies ist durch verlangsamtes Voranschreiten der Knockdown-Zellen im Zellzyklus mit verlängerter S-Phase bedingt. Auch beim Nachweis von CyclinB1 zeigen sich Unterschiede. Bei Fehlen von ERK2-Aktivität ist der Mitoseeintritt verzögert. Daher steigt die CyclinB1-Konzentration in Knockdown-Zellen später als in Kontrollzellen (Blot: CyclinB1). Die gleichmäßige Ladung der

einzelnen Spuren wurde durch den Nachweis von β -Aktin sichergestellt. Der Versuch zeigt, dass selektiver ERK2-Knockdown einen stark verzögerten Zellzyklus-Progress bewirkt. Der Effekt erweist sich als erheblich größer als bei Verwendung eines weniger spezifischen ERK1/2-Inhibitors. ERK2-defiziente Zellen zeichnen sich einerseits durch prolongierte S-Phase, andererseits durch nicht zeitgerechten Mitoseeintritt aus.

3.2.7 Struktur des SCF^{NIPA}-Komplexes am G₂/M-Übergang ohne ERK-Aktivität

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss der NIPA-Phosphorylierung durch ERK auf die Struktur von SCF^{NIPA} untersucht werden. In der Interphase liegt NIPA in unphosphoryliertem Zustand vor und bildet zusammen mit den Proteinen Skp1, Cul1 und Roc1 den aktiven SCF^{NIPA}-Komplex. Am G₂/M-Punkt kommt es zur Phosphorylierung von NIPA. Dies bedingt die Abdissoziation des Proteins von den übrigen SCF-Komplex-Komponenten und die Inaktivierung des Komplexes (Bassermann et al, 2005). Bei verminderter Phosphorylierung von NIPA an G₂/M müsste diese Abdissoziation herabgesetzt sein. Es ist anzunehmen, dass unphosphoryliertes NIPA an G₂/M weiterhin in Verbindung mit den restlichen SCF-Komplex-Proteinen steht. Um zu überprüfen, ob dies bei verminderter ERK-Aktivität der Fall ist, wurden Koimmunpräzipitationen durchgeführt. D1-Zellen wurden unter Verwendung von MEK-Inhibitor U0126 (Kapitel 3.2.1) bzw. mit entsprechender Menge Lösungsmittel (DMSO) am G₂/M-Punkt synchronisiert. Als Kontrolle diente eine Kultur unsynchronisierter Zellen. Ein kleiner Teil der Zellen wurde mit PI gefärbt, um den Erfolg der Synchronisation zu belegen (Abb. 17a). Der restliche Teil wurde zu Lysaten verarbeitet und mittels spezifischem Anti-Flag-Antikörper wurde Flag-markiertes NIPA immunpräzipitiert. Liegen in einer Zelle andere Proteine an das zu präzipitierende Protein gebunden vor, werden auch sie durch die Präzipitation von der restlichen Lösung abgetrennt und eine Protein-Protein-Interaktion kann nachgewiesen und analysiert werden (Koimmunpräzipitation). Abb. 17b zeigt die mit den präzipitierten Proteinen durchgeführten Western-blot-Analysen. Der Blot Flag-NIPA bestätigt eine gleichmäßige Präzipitation von Flag-markiertem NIPA in allen drei Proben. In unsynchronisierten Zellen mit Vorherrschen der G₁-Fraktion ist der SCF^{NIPA}-Komplex aktiv und NIPA bindet das SCF-Komplex-Protein Cul1 (Blot: Cul1,

Spur 1). Am G₂/M-Punkt ist diese Interaktion bei DMSO-behandelten Zellen aufgehoben, da NIPA vom Komplex abdissoziiert (Blot: Cul1, Spur 2). Unter Verwendung von MEK-Inhibitor ist dagegen weiterhin eine starke Bindung zwischen NIPA und Cul1 am G₂/M-Übergang zu beobachten (Blot: Cul1, Spur 3). Der gleiche Versuch wurde mit ERK2-miRNA- bzw. Kontrollsequenz-exprimierenden D1-Zellen (Kapitel 3.2.2) durchgeführt (Abb.15c und d).

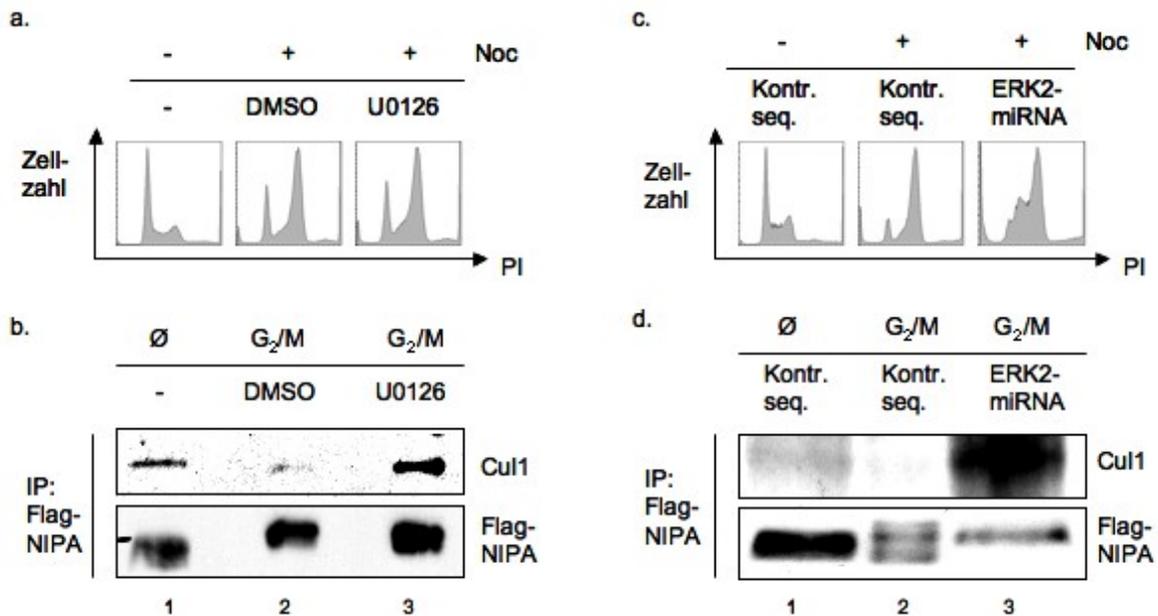


Abb. 17: ERK-Inhibition und ERK2-Knockdown beeinflussen die Struktur von SCF^{NIPA} am G₂/M-Übergang.

D1-Zellen wurden durch 24 h währenden Thymidinblock mit anschließender Nocodazol-Behandlung (8-12 h) am G₂/M-Übergang synchronisiert (+ Noc). Bei Nocodazol-Zugabe wurde eine Kultur zusätzlich mit MEK-Inhibitor U0126 (10µM), die andere mit entsprechender Menge Lösungsmittels (DMSO) versetzt. Als Kontrolle diente eine Kultur unsynchronisierter D1-Zellen (- Noc). Zudem wurden ERK2-miRNA- und Kontrollsequenz-exprimierende D1-Zellen an G₂/M arretiert (+ Noc) und unsynchronisierte Zellen mit Kontrollsequenz als Kontrolle verwendet (- Noc).

a. und c.: Statische Zellzyklusanalyse: Ein Aliquot der Zellen wurde in Ethanol fixiert und anschließend mit PI-Färbelösung inkubiert. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen der PI-gefärbten Zellen. PI (Propidiumiodid): Kanal 1 des Durchflusszytometers; Zellzahl: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

b. und d.: Immunpräzipitation (IP) und Western blot-Analyse: Die Zellen wurden zu Lysaten verarbeitet und Flag-markiertes NIPA wurde mittels spezifischem Antikörper immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden gelelektrophoretisch separiert und durch Western blot-Verfahren analysiert. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung von Cul1 und Flag-markiertem NIPA auf der Western blot Membran.

In Abb. 17c sind die statischen Zellzyklusanalysen dargestellt, die eine erfolgreiche Synchronisation anzeigen. Abb. 17d gibt die Western blot-Untersuchungen der isolierten Proteine wieder. Es wurden vergleichbare Mengen von Flag-markiertem NIPA präzipitiert (Blot: Flag-NIPA). Die Abbildung belegt, dass auch der selektive Knockdown von ERK2 zu anhaltender Interaktion zwischen NIPA und Cul1 am G₂/M-

Punkt führt (Blot: Cul1, Spur 3). In unsynchronisierten Kontrollsequenz-Zellen kann ebenfalls eine Bindung nachgewiesen werden (Blot: Cul1, Spur 1), in G₂/M-arretierten Zellen mit Kontrollsequenz ist eine solche nicht erkennbar (Blot: Cul1, Spur 2). Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Inhibition der Aktivität von ERK1/2 und selektiver ERK2-Knockdown die Struktur von SCF^{NIPA} an G₂/M beeinflussen können. Bei reduzierter ERK-Aktivität kann zu Mitoseeintritt weiterhin eine Bindung zwischen NIPA und dem SCF-Komplex-Protein Cul1 registriert werden.

3.3. Onkogen-vermittelte Phosphorylierung von NIPA und die Rolle des Proteins in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese

Wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, gelang es, ERK2 als die Kinase zu identifizieren, die für die Phosphorylierung von NIPA am G₂/M-Übergang des physiologischen Zellzyklus verantwortlich ist. Funktionelle Analysen konnten das Ergebnis bekräftigen. Als nächstes stellte sich die Frage, ob auch eine pathologische Phosphorylierung von NIPA über ERK vermittelt sein könnte. Onkogene aktivieren in der Zelle über Substratphosphorylierungen promotogene Signalwege und induzieren dadurch unkontrolliertes Zellwachstum. Auch das F-Box-Protein NIPA könnte durch seine Rolle bei der Zellzyklus-Regulation über verstärkte Phosphorylierung Zielmolekül einer solchen Kaskade sein. Daher wurde im Folgenden der Einfluss der pathogenen Tyrosinkinase NPM-ALK auf den Phosphorylierungsstatus von NIPA betrachtet und die Rolle von ERK bei dieser Phosphatgruppenübertragung untersucht. Zudem wurde die *in vivo*-Rolle von NIPA in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese mittels eines murinen Knochenmarktransplantationsmodell analysiert.

3.3.1 Inhibition der ERK-Aktivität in NPM-ALK positiven Zellen

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass NIPA in NPM-ALK exprimierenden Zellen konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Das Einbringen von NPM-ALK in Zellen bewirkt einen erheblich verstärkten Phosphorylierungsgrad von NIPA (Ouyang et al, 2003). Es ist jedoch anzumerken, dass NPM-ALK als Tyrosinkinase nicht für eine direkte Phosphatgruppenübertragung auf die Serinreste von NIPA in Frage kommt. Von der Einbindung einer zusätzlichen Ser/Thr-Kinase in die NPM-

ALK induzierte NIPA-Phosphorylierung war daher auszugehen. Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die Anwesenheit von NPM-ALK vorzugsweise zu verstärkter Phosphorylierung des NIPA-Serinrests 354 führt (Bassermann et al, 2007). Diesem Serinrest kommt auch bei der physiologischen Phosphorylierung von NIPA eine entscheidende Rolle zu. Es lag somit der Verdacht nahe, dass gleichfalls die pathologische NIPA-Phosphorylierung durch die Ser/Thr-Kinase ERK erfolgen könnte.

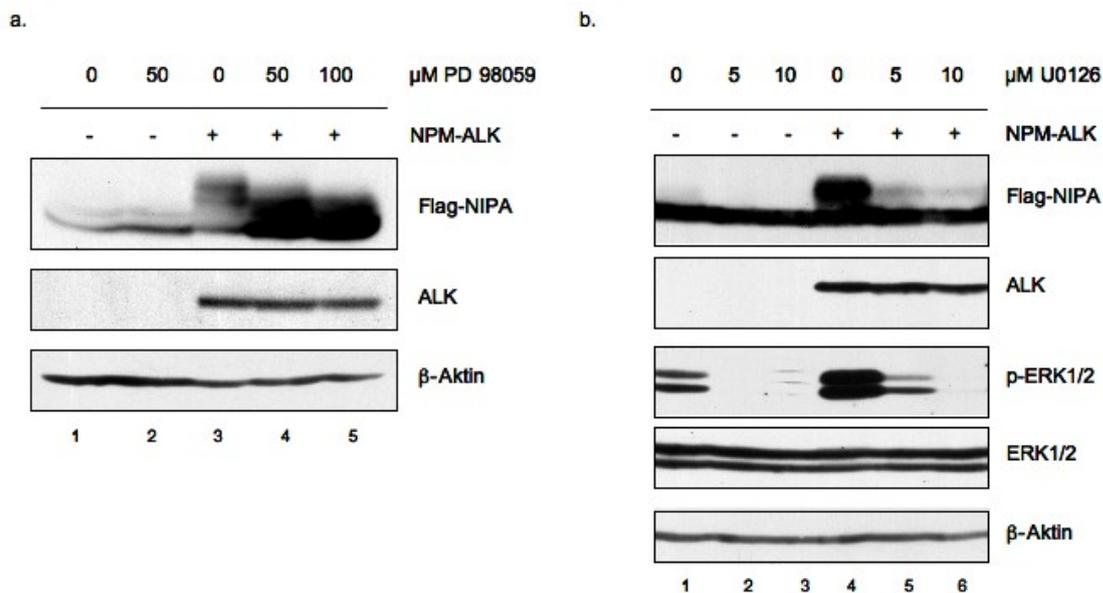


Abb. 18: Inhibition der ERK-Aktivität führt zu verminderter Phosphorylierung von NIPA in NPM-ALK-positiven Zellen.

Phoenix E-Zellen wurden mit dem Vektor Mig NPM-ALK transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für je 12 h mit MEK-Inhibitor PD98059 (50 bzw. 100μM), MEK-Inhibitor U0126 (5 bzw. 10μM) oder Lösungsmittel (DMSO) inkubiert. Als Kontrolle dienen mit Leervektor transfizierte Phoenix E-Zellen.

a.: Behandlung mit PD98059: Immunchemischer Nachweis von Flag-markiertem NIPA, ALK und β-Aktin durch Western blot-Analyse.

b.: Behandlung mit U0126: Immunchemischer Nachweis von Flag-markiertem NIPA, ALK, phospho (p)-ERK1/2, ERK1/2 und β-Aktin durch Western blot-Analyse.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Phoenix E-Zellen mit dem Vektor MSCV MigRI transfiziert, der die genetische Information für das Fusionsprotein NPM-ALK trug (Mig NPM-ALK). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für je 12 h mit unterschiedlichen Konzentrationen MEK-Inhibitor PD98059 (50 bzw. 100μM), MEK-Inhibitor U0126 (5 bzw. 10μM) oder nur mit Lösungsmittel (DMSO) inkubiert und danach geerntet. Als Kontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Phoenix E-Zellen, die ebenfalls mit den Inhibitoren bzw. nur mit DMSO behandelt wurden. Abb. 18 zeigt die Western blot-Analysen der verarbeiteten Zellen. Ohne NPM-ALK-Kinaseaktivität

liegt NIPA in unsynchronisierten Zellen im nicht phosphorylierten Zustand vor (Abb. 18a, Blots: ALK, Flag-NIPA, Spuren 1 und 2; Abb. 18b, Blots: ALK, Flag-NIPA, Spuren 1-3). Expression von NPM-ALK ohne gleichzeitige Verwendung von Inhibitor bewirkt dagegen einen stark erhöhten Phosphorylierungsgrad von NIPA (Abb. 18a, Blots: ALK, Flag-NIPA, Spur 3; Abb. 18b, Blots: ALK, Flag-NIPA, Spur 4). Es ist deutlich zu erkennen, dass die vermehrte NIPA-Phosphorylierung in NPM-ALK positiven Zellen mit verstärkter ERK-Aktivierung korreliert (Abb. 18b, Blot: p-ERK1/2, Spuren 1 und 4). Interessanterweise führt die Behandlung NPM-ALK positiver Kulturen mit 50 bzw. 100 μM PD98059 oder 5 bzw. 10 μM U0126 zu konzentrationsabhängiger Abnahme der NIPA-Phosphorylierung (Abb. 18a, Blots: ALK, Flag-NIPA, Spur 4 und 5; Abb. 18b, Blots: ALK, Flag-NIPA, Spuren 5 und 6). Die Effektivität der ERK-Inhibition wird in Abb. 18b verdeutlicht. MEK-Inhibitor U0126 bewirkt eine konzentrationsabhängige Reduktion der aktiven phospho-Form von ERK (Abb. 18b, Blots: p-ERK1/2, ERK1/2, Spuren 2, 3, 5 und 6). Durch den Nachweis von β -Aktin wurde die gleichmäßige Ladung der einzelnen Spuren sichergestellt. Der Versuch deutet darauf hin, dass ERK auch für die pathologische Phosphorylierung von NIPA verantwortlich sein könnte.

3.3.2 *In vivo*-Rolle von NIPA in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese

Das im vorherigen Kapitel beschriebene Experiment lässt vermuten, dass NPM-ALK über ERK zu verstärkter Phosphorylierung von NIPA führt. Dies könnte eine Rolle in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese spielen (Kapitel 4). Um die Bedeutung von NIPA bei der Entstehung NPM-ALK positiver Tumoren *in vivo* abschätzen zu können, wurde ein murines Knochenmarktransplantationsmodell verwendet. Einer Gruppe von Mäusen wurde NPM-ALK-transduziertes NIPA-Wildtyp-Knochenmark transplantiert (NIPA-Wildtyp-Mäuse), die andere Gruppe erhielt NPM-ALK-exprimierende NIPA-Knockout-Knochenmarkzellen (NIPA-Knockout-Mäuse). Anschließend wurden in beiden Gruppen die durch NPM-ALK induzierten Tumorerkrankungen bezüglich Phänotyp und Progress untersucht. Zusätzlich wurde analysiert, auf welche Weise die Expression einer nicht phosphorylierbaren NIPA-Mutante in den Knochenmarkzellen den Krankheitsprozess beeinflusst.

3.3.2.1 Das murine Knochenmarktransplantationsmodell

Das murine Knochenmarktransplantationsmodell ermöglicht die Analyse von Onkogenen *in vivo*. Zudem kann durch Verwendung von Knockout-Mäusen die Rolle eines bestimmten Proteins in der durch das Onkogen induzierten Erkrankung untersucht werden. In dieser Arbeit wurde das Onkogen NPM-ALK verwendet. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die retrovirale Infektion von Mäuseknochenmark mit NPM-ALK zur Entwicklung Lymphom-ähnlicher Erkrankungen führt (Miething et al, 2003). Die NIPA-Knockout-Maus wird seit 2005 in unserem Labor gezüchtet. In Abb. 19 ist der Ablauf einer murinen Knochenmarktransplantation schematisch dargestellt.

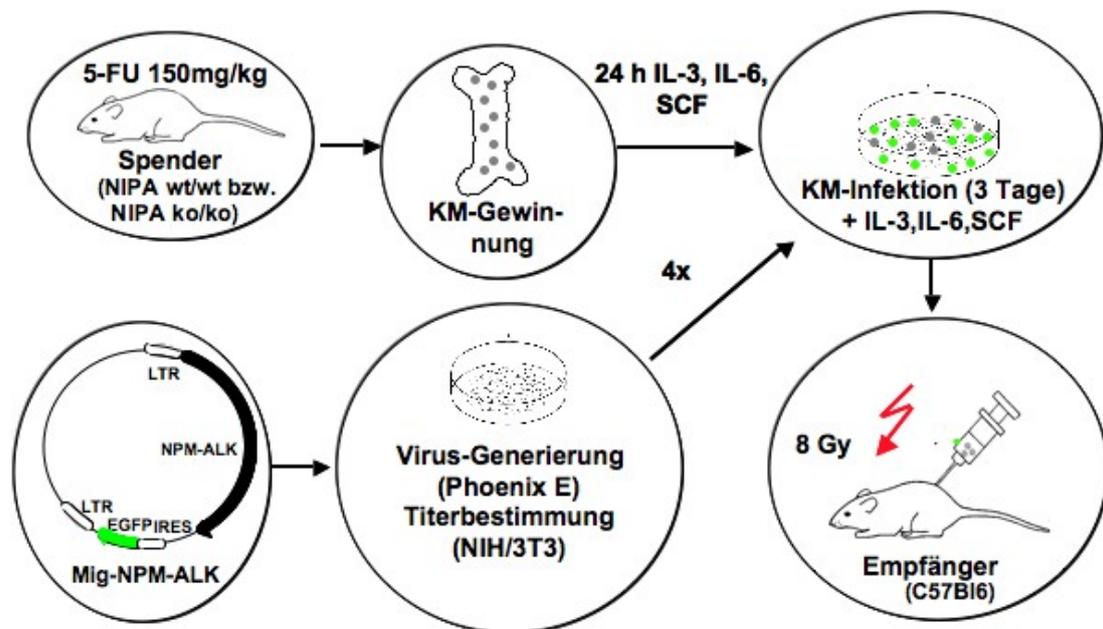


Abb. 19: Schematische Darstellung einer murinen Knochenmarktransplantation.

Die Generierung retroviraler Partikel, die die genetische Information zur Expression der pathogenen Tyrosinkinase NPM-ALK enthalten, erfolgt durch Transfektion von Phoenix E-Zellen mit dem Vektor Mig NPM-ALK. Der Vektor kodiert zusätzlich für das grün fluoreszierende Protein EGFP. Der Transfektionserfolg der Phoenix E-Zellen wird durch durchflusszytometrische Bestimmung der EGFP-Expression überprüft. Anschließend wird durch Titration die Anzahl infektiöser, retroviraler Partikel im gewonnenen Überstand ermittelt. Der Überstand ist für die Infektion von Mäuseknochenmark geeignet, wenn der Virustiter in einer Größenordnung von über 1×10^5 liegt. Die zu transduzierenden Knochenmarkszellen werden aus 5-Fluorouracil

(5-FU) vorbehandelten Spendermäusen gewonnen. Bei diesen Tieren handelte es sich um NIPA-Wildtyp (NIPA wt/wt) - bzw. NIPA-Knockout (NIPA ko/ko) -Mäuse, die über 10 Generationen auf den Stamm C57Bl6 zurückgekreuzt wurden. Nach retroviraler Transduktion der Knochenmarkzellen wird der Anteil EGFP-positiver und somit NPM-ALK-exprimierender Zellen gemessen. Die Transplantation erfolgt durch Injektion einer genau definierten Anzahl erfolgreich transduzierter Zellen in die Schwanzvene von Empfängerermäusen (C57Bl6). Diese werden zuvor mit einer Dosis von 800 rad (8 Gy) letal bestrahlt. Die hohe Dosis der Bestrahlung bewirkt eine Myeloablation, d.h. die körpereigene Hämatopoese der Empfängerermäuse kommt vollständig zum Erliegen. Nach Transplantation wird das Knochenmark durch die Donorstammzellen repopuliert und die Blutbildung ausschließlich von diesen übernommen. Zur Expression der murinen NIPA-Phosphorylierungs-Mutante S353A wird das Knochenmark vor Transplantation zusätzlich retroviral mit dem Vektor pBabe NIPA S353A transduziert.

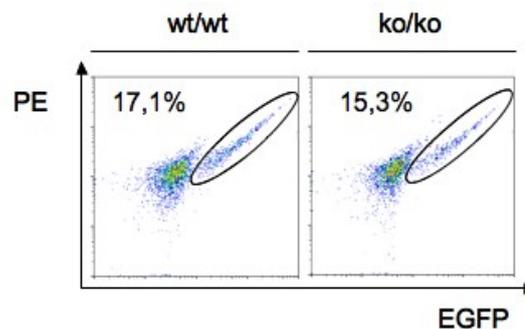


Abb. 20: Retroviraler Transfer von NPM-ALK in murine Knochenmarkzellen.

Murine NIPA-Wildtyp (NIPA wt/wt) - und NIPA-Knockout (NIPA ko/ko) -Knochenmarkzellen wurden retroviral mit Mig NPM-ALK transduziert. 12 h nach der letzten Infektion wurde der EGFP-Gehalt der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Prozentangaben entsprechen dem Anteil EGFP-positiver Zellen (schwarze Ellipsen). EGFP (enhanced green fluorescent protein): grün fluoreszierendes Protein (Kanal 1 des Durchflusszytometers); PE: Kanal 2 des Durchflusszytometers.

Das beschriebene Schema wurde mehrfach durchgeführt. In Abb. 20 ist der Erfolg des retroviralen Transfers von NPM-ALK in murine Knochenmarkzellen exemplarisch dargestellt. Der Titer des zur Transduktion verwendeten retroviralen Überstandes betrug in diesem Fall $1,95 \times 10^5$. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass nach Ausschluss von Erythrozyten und Zelltrümmern 17,1 % der NIPA-Wildtyp- und 15,3 % der NIPA-Knockout-Knochenmarkzellen EGFP-positiv sind, d.h. NPM-ALK exprimieren. Durch Bestimmung dieses Wertes wird die Transplantation einer genau

definierten Anzahl erfolgreich transduzierter Zellen ermöglicht. In den Transplantationsexperimenten dieser Arbeit wurden die Tiere mit 10.000 EGFP-positiven Zellen transplantiert.

3.3.2.2 Phänotyp NPM-ALK-induzierter Erkrankungen bei Fehlen und Vorhandensein von NIPA

Wie bereits beschrieben, führt die Transplantation NPM-ALK-transduzierter Knochenmarkszellen zur Entwicklung einer Lymphom-ähnlichen Erkrankung in der Maus (Miething et al, 2003). Die Tumorzellen sind durch Expression myeloproliferativer Marker gekennzeichnet und breiten sich bevorzugt in Milz und Knochenmark aus. Ein Befall von Lymphknoten sowie die Ausschwemmung maligner Zellen ins periphere Blut werden kaum beobachtet. Hinsichtlich dieser phänotypischen Merkmale der Erkrankung konnten zwischen NIPA-Wildtyp- und NIPA-Knockout-Mäusen keine wesentlichen Unterschiede gefunden werden. Beide Gruppen weisen eine durch Expansion maligner Zellen bedingte Splenomegalie auf (Abb. 21a). Der Vergleich der mittleren Milzgewichte von Wildtyp- und Knockout-Tieren, die ca. 1 Monat nach Transplantation infolge der Erkrankung verstarben (Kapitel 3.3.2.3), zeigt keine signifikanten Differenzen (Abb. 21b).

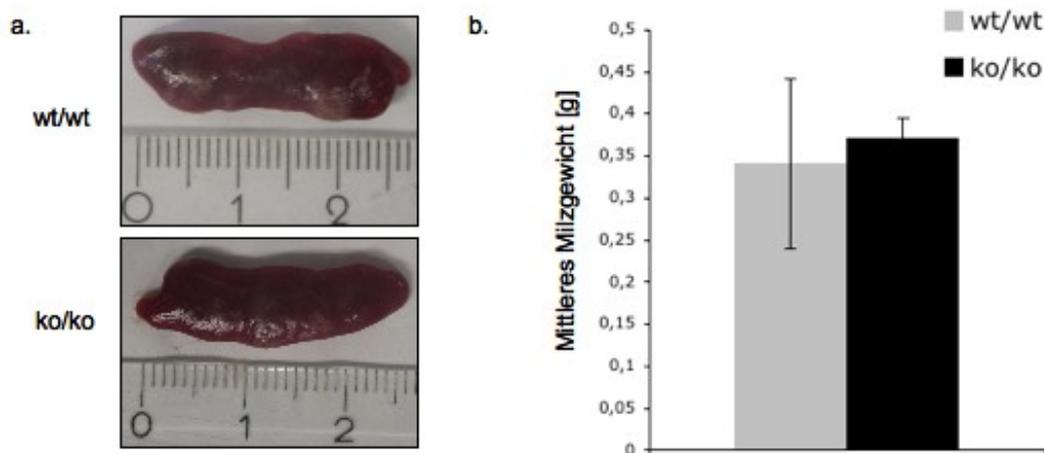


Abb. 21: NPM-ALK-induzierte Splenomegalie.

- a.: Exemplarischer Größenvergleich der Milzen einer Wildtyp- und einer Knockout-Maus.
- b.: Gewichtsvergleich der Milzen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen.

Auch die immunphänotypische Analyse von Zellen aus Milz und Knochenmark verstorbener Tiere sowie die Beurteilung der malignen Infiltration dieser Gewebe liefert für Wildtyp- und Knockout-Mäuse ähnliche Ergebnisse (Abb. 22).

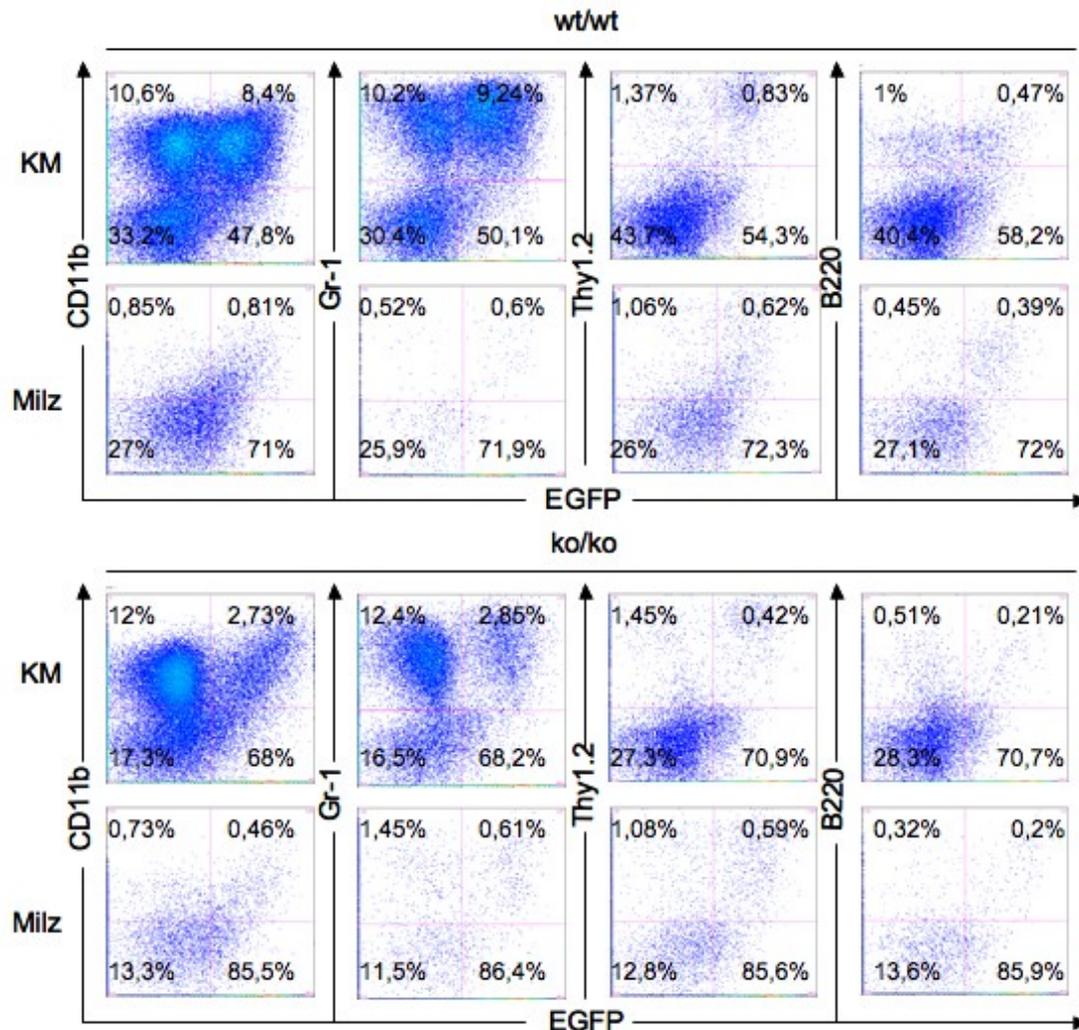


Abb. 22: Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark- und Milzzellen.

Exemplarische Gegenüberstellung der Messungen je einer Wildtyp- und einer Knockout-Maus. Die aus Knochenmark (KM) und Milz gewonnenen Zellen wurden mit den angegebenen, fluoreszenzgekoppelten Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden Antikörper-markierte Zellen und der EGFP-Gehalt aller Zellen im Durchflusszytometer registriert. Die angegebenen Zahlen entsprechen dem prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten.

Die Immunphänotypisierung erfolgte durch Markierung zellspezifischer Oberflächenmoleküle auf myeloiden Zellen, B- oder T-Lymphozyten mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern und anschließende Durchflusszytometrie. CD11b wurde dabei ebenso wie Gr-1 als charakteristischer Oberflächenmarker für myeloide Vorläuferzellen verwendet (Lagasse & Weissman, 1996; Leenen et al, 1994). Die Detektion von Thy1.2 bzw. B220 diente der spezifischen Identifikation von

Vorläufern der T- bzw. B-Zellreihe (Coffman, 1982; Ledbetter et al, 1980). Das Ausmaß der malignen Infiltration von Milz und Knochenmark konnte durch Bestimmung des Anteils EGFP-positiver Zellen abgeschätzt werden. In Abb.19 sind die durchflusszytometrischen Messungen je einer Wildtyp- und einer Knockout-Maus beispielhaft dargestellt. Sowohl bei Wildtyp- als auch bei Knockout-Maus stellen sich Tumorzellen aus dem Knochenmark positiv für myeloide (CD11b, Gr-1), nicht aber für lymphozytäre (Thy1.2, B220) Marker dar. Maligne Zellen der Milz können durch keinen der verwendeten Antikörper charakterisiert werden. Milz und Knochenmark beider Tiere weisen eine hochgradige Infiltration durch Tumorzellen auf. Bei der Wildtyp-Maus sind ca. 50 % der Knochenmarkszellen und ca. 70 % der Milzzellen EGFP-positiv. Die Knockout-Maus zeigt im verwendeten Beispiel noch höhere

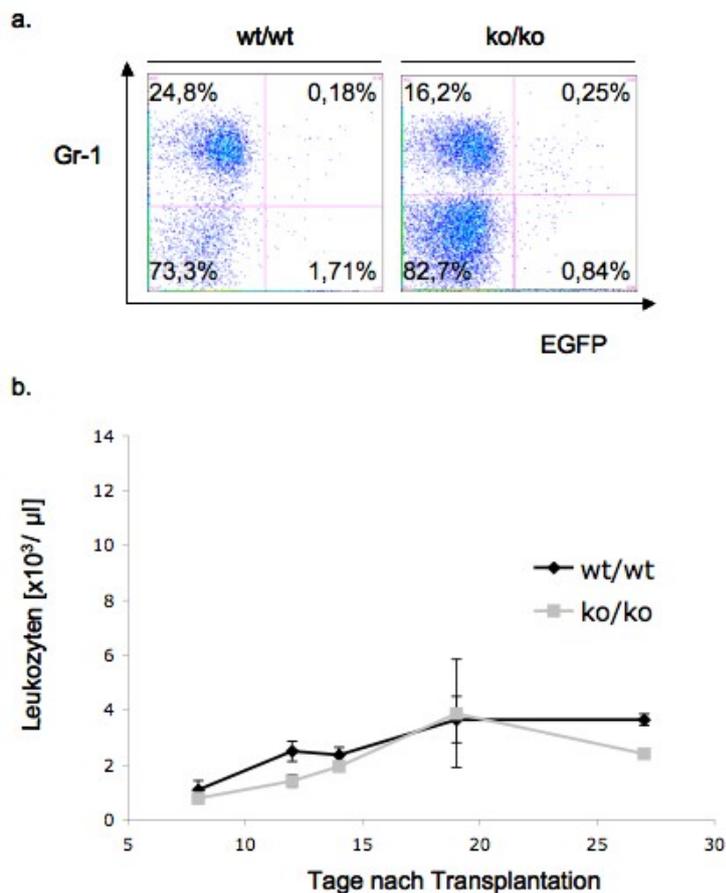


Abb. 23: Leukozyten im peripheren Blut.

Blutzellen wurden nach hypotoner Erythrozytenlyse mit dem myeloiden Marker Gr-1 inkubiert und danach durchflusszytometrisch analysiert (a). Die Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut wurde durch regelmäßige Messungen im Blutbildgerät ermittelt (b).

Anteile EGFP-exprimierender Zellen (ca. 70 % im Knochenmark und ca. 85% in der Milz), dieser Unterschied erwies sich jedoch bei Analyse aller transplantierten Mäuse als statistisch nicht signifikant.

Im peripheren Blut können kaum EGFP-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23a). Die Leukozytenzahlen bleiben im Normbereich, weder Wildtyp- noch Knockout-Mäuse entwickeln ein leukämisches Blutbild (Abb. 23b).

3.3.2.3 Progress NPM-ALK-induzierter Erkrankungen bei Fehlen und Vorhandensein von NIPA

Zwar konnten zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen keine phänotypischen Unterschiede in der NPM-ALK-induzierten Erkrankung gefunden werden, der Progress der Erkrankung stellte sich jedoch bei beiden Gruppen verschieden dar. Bei allen durchgeführten Transplantationsexperimenten war der Krankheitsverlauf bei Knockout-Mäusen beschleunigt.

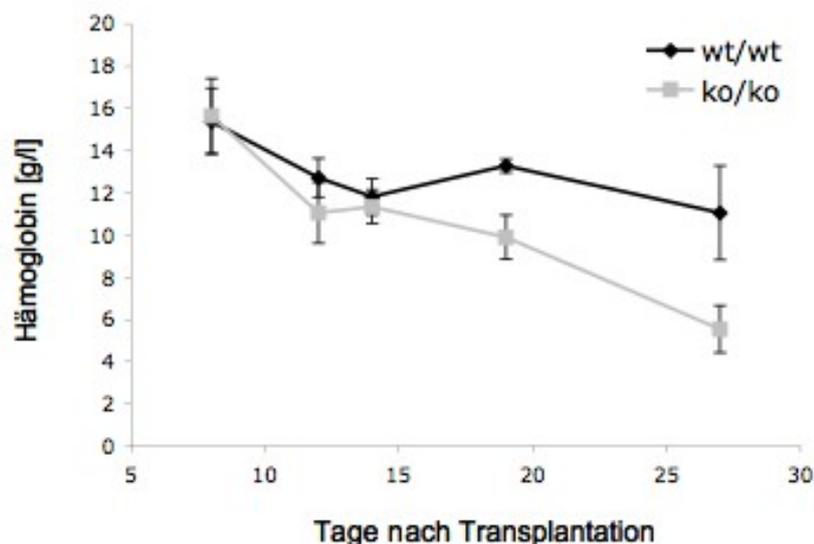


Abb. 24: Hämoglobin-Gehalt des peripheren Blutes.

Die Hämoglobinwerte wurden durch regelmäßige Messungen im Blutbildgerät bestimmt.

Durch Knochenmarkinfiltration entwickeln beide Gruppen eine progrediente Anämie. Wie Abb. 24 zeigt, erfolgt die Abnahme des Hämoglobin-Wertes bei Knockout-Mäusen schneller und stärker als bei Wildtyp-Mäusen. Parallel dazu weisen Knockout-Tiere eine verkürzte Latenzzeit der Erkrankung auf. NIPA-defiziente Mäuse

versterben früher an der NPM-ALK-induzierten Erkrankung als Wildtyp-Mäuse. Der in Abb. 25 dargestellte Abstand von ca. 5 d bei einer Gesamtkrankheitsdauer von etwa 1 Monat konnte durch insgesamt 3 Transplantationen bestätigt werden.

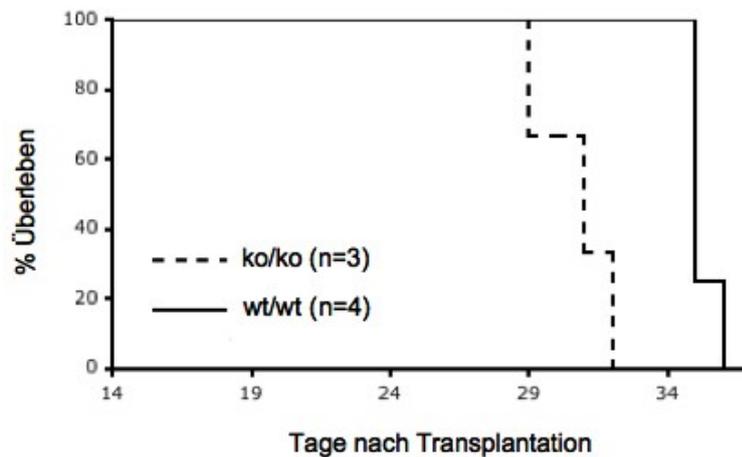


Abb. 25: Kaplan-Meier Überlebenskurve von NIPA-Wildtyp- und NIPA-Knockout-Mäusen.

Die Mäuse verstarben an einer hämatologischen Erkrankung oder wurden aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes als Folge der Erkrankung getötet. Der prozentuale Anteil überlebender Tiere wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die durchgehende Linie symbolisiert NIPA-Wildtyp-, die gestrichelte Linie NIPA-Knockout-Mäuse.

3.3.2.4 Progress NPM-ALK-induzierter Erkrankungen bei Expression der phospho-defizienten NIPA-Mutante S353A

Die unterschiedliche Latenzzeit NPM-ALK-induzierter Erkrankungen bei Fehlen und Vorhandensein von NIPA deutete auf eine Einbindung des Proteins in die durch NPM-ALK verursachte Tumorentstehung hin. Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von NIPA in diesem Prozess eine Rolle spielt, wurde für ein weiteres Transplantationsexperiment in NPM-ALK-transduzierten NIPA-Wildtyp-Knochenmarkzellen zusätzlich die murine, phospho-defiziente NIPA-Mutante S353A exprimiert. Dem humanen NIPA-Serinrest 354 entspricht im murinen NIPA-Molekül Serinrest 353. Zur Expression der Mutante wurden die Knochenmarkzellen zeitgleich mit NPM-ALK und NIPA S353A transduziert. Wie Abb. 26 verdeutlicht, führt die Expression von NIPA S353A bei Wildtyp-Mäusen zu verlängerter Latenzzeit der Erkrankung.

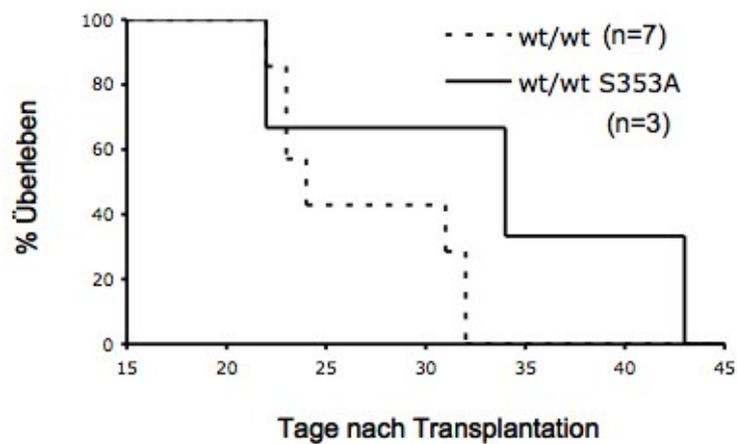


Abb. 26: Überleben bei Expression von NIPA S353A.

Kaplan-Meier Überlebenskurven. Der prozentuale Anteil überlebender Tiere wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Vorhandensein oder Fehlen von NIPA keinen Einfluss auf den Phänotyp, jedoch Auswirkungen auf den Progress NPM-ALK induzierter Tumorerkrankungen in der Maus hat. Ein rascheres Ableben NIPA-defizienter Mäuse im Vergleich zu NIPA-Wildtyp-Mäusen ist zu beobachten. Durch Expression der phospho-defizienten NIPA-Mutante S353A in den entarteten Knochenmarkzellen ist eine verlängerte Überlebensspanne von Wildtyp-Mäusen zu erreichen.

4 Diskussion

Die umfassende Aufklärung Zellzyklus-regulierender Prozesse stellt eine wichtige Grundlage für das Verständnis von Tumorentstehung dar. NIPA kommt als Teil eines SCF-Komplexes eine bedeutende Rolle in der Regulation des G₂/M-Kontrollpunktes im Zellzyklus zu. Während der SCF^{NIPA}-Komplex in der Interphase die Akkumulation des Mitose-einleitenden CyclinB1 im Kern verhindert, ermöglicht die Phosphorylierung von NIPA an G₂/M über Inaktivierung von SCF^{NIPA} den nukleären Cyclin B1-Anstieg und damit den Mitoseeintritt (Bassermann et al, 2005). Der auf den G₂/M-Punkt abgestimmte Phosphorylierungsprozess von NIPA ist ein wichtiger Bestandteil der Zellzykluskontrolle. Identifikation der zuständigen Kinase *in vitro* und *in vivo* sowie funktionelle und strukturelle Analyse der Phosphorylierung unter physiologischen und pathologischen Umständen standen im Zentrum dieser Arbeit.

4.1 NIPA-Phosphorylierung *in vitro*

In vitro Kinasierungsversuche gaben einen ersten Hinweis auf die für die Phosphorylierung von NIPA verantwortliche Kinase. Während die G₂/M-aktiven Kinasen GSK-3 β , CK2 oder Plk1 keine Phosphatgruppenübertragung auf NIPA *in vitro* katalysieren konnten (Bassermann et al, 2007), zeichneten sich beide Isoformen des Enzyms Extracellular-signal regulated Kinase (ERK1 und ERK2) durch hohe Aktivität gegenüber NIPA aus. Schon bei kurzen Reaktionszeiten konnte durch Zugabe von aktiver ERK1- oder ERK2-Kinase eine starke *in vitro* Phosphorylierung von NIPA erreicht werden. Die phospho-defiziente NIPA-Mutante S354,359A zeigte im *in vitro* Assay mit ERK1 bzw. ERK2 einen im Vergleich zum NIPA-Wildtyp-Protein verminderten Phosphorylierungsgrad. Dies weist darauf hin, dass die Phosphatgruppenübertragung auf NIPA durch ERK an den Serinresten 354 und 359 erfolgt. Anzumerken ist, dass das Phosphorylierungssignal bei Verwendung der Mutante reduziert, aber doch nachweisbar war. Dies könnte einerseits durch unspezifische Phosphatrest-Übertragungen bei sehr hoher Affinität von ERK zu seinem Substrat NIPA zu erklären sein. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass ERK die Phosphatgruppenübertragung auf weitere, bisher unbekannte Phosphorylierungsstellen von NIPA katalysiert. Für viele Proteinkinasen sind

bestimmte Motive in der Umgebung von Hydroxyl-Gruppen ihrer Substrate bekannt, die eine Interaktion zwischen Kinase und Substrat begünstigen. Durch diese sogenannten Konsensussequenzen wird die Phosphorylierung der jeweiligen Hydroxyl-Gruppe durch die Kinase ermöglicht. Substrate der Ser/Thr-Kinase ERK weisen häufig die Konsensussequenz Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro auf (Gonzalez et al, 1991). Diese Aminosäureabfolge ist im Bereich der Serinreste 354 und 359 von NIPA nicht vorhanden (Bassermann et al, 2007). In der Literatur wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Interaktion zwischen ERK und seinen jeweiligen Substraten nicht in der Weise durch das Vorhandensein der bevorzugten Konsensussequenz bestimmt wird wie dies bei vielen anderen Kinasen der Fall ist (Chuderland & Seger, 2005; Corbalan-Garcia et al, 1996). Vielmehr scheinen andere bestimmte Bindungsdomänen in den Substraten ebenfalls von Bedeutung zu sein, von denen bei weitem noch nicht alle identifiziert werden konnten (Chuderland & Seger, 2005). Zudem ist beschrieben, dass teilweise das kurze Motiv Ser/Thr-Pro für die Bindung zwischen ERK und seinem Substrat ausreichend ist (Pearson et al, 2001; Ramos, 2008; Shaul & Seger, 2007). Diese Erkennungsstruktur ist auch im Molekül NIPA nachweisbar, wobei ein Prolinrest auf den Serinrest 359 folgt (Bassermann et al, 2007). NIPA kann daher als ein potentielles Substrat von ERK angesehen werden. Mit Hilfe der *in vitro* Kinasierungsversuche konnte ERK eindeutig als eine für den NIPA-Phosphorylierungsprozess in Frage kommende Kinase identifiziert werden.

4.2 Physiologische Phosphorylierung von NIPA

Untersuchungen an Zellen zeigten, dass ERK auch *in vivo* von entscheidender Bedeutung für die Phosphorylierung von NIPA ist. Wurde die Aktivität von ERK am G₂/M-Übergang eines physiologischen Zellzyklus durch selektive Inhibitoren herabgesetzt, resultierte ein verminderter Phosphorylierungsgrad von NIPA. Diese Ergebnisse konnten durch hochspezifische Knockdown-Versuche bekräftigt werden. Selektiver Knockdown von ERK2 bewirkte, dass NIPA bei Mitoseeintritt nahezu unphosphoryliert vorlag. Desweiteren konnte eine Korrelation zwischen dem Phosphorylierungsstatus von NIPA und dem Aktivitätsgrad von ERK im Zellzyklus nachgewiesen werden. Die Einbindung von ERK in den NIPA-Phosphorylierungsprozess ist angesichts bisher veröffentlichter Daten gut vorstellbar.

NIPA stellt ein Regulatorprotein des G₂/M-Übergangs im Zellzyklus dar (Bassermann et al, 2005). Die Bedeutung von ERK für die Zellzyklusregulation ist seit langem bekannt und auch heute noch Gegenstand intensiver Forschung (Pearson et al, 2001; Seger & Krebs, 1995; Tamemoto et al, 1992). Die einzelnen Isoformen von ERK gehören zur Klasse der Mitogen-activated protein Kinasen (MAPK), der neben ERK weitere Zellzyklus-regulierende Kinasen wie JNK, BMK oder p38 angehören (MacCorkle & Tan, 2005). ERK kann über diverse externe Stimuli aktiviert werden und ist durch Phosphorylierung verschiedenster Zielmoleküle in eine Vielzahl grundlegender zellbiologischer Prozesse involviert (Pearson et al, 2001). Über 160 unterschiedliche ERK-Substrate konnten bisher identifiziert werden, von denen ein Großteil ebenso wie NIPA nukleär lokalisiert vorliegt (Yoon & Seger, 2006). Aktiviertes ERK kann in den Zellkern transloziert werden und dort Substratphosphorylierungen durchführen (Brunet et al, 1999; Ranganathan et al, 2006). In der Zellzyklusregulation kommt ERK an mehreren Stellen eine große Bedeutung zu. Zum Einen werden der Kinase wesentliche Funktionen am G₁/S-Übergang und während der S-Phase zugeschrieben (Meloche & Pouyssegur, 2007; Roovers & Assoian, 2000; Yamamoto et al, 2006). Zum Anderen wird in der Literatur vielfach auf die Wichtigkeit des Enzyms für den G₂/M-Übergang hingewiesen (Chambard et al, 2007; MacCorkle & Tan, 2005; Roberts et al, 2002; Tamemoto et al, 1992). Ursprünglich halfen insbesondere Untersuchungen an Oozyten von *Xenopus laevis*, die Relevanz von ERK für den G₂/M-Übergang zu erkennen (Abrieu et al, 1997; Guadagno & Ferrell, 1998; Kosako et al, 1994). Anschließend konnten mehrere Arbeitsgruppen in gleicher Weise für Säugetierzellen G₂/M-Funktionen von ERK nachweisen (Hayne et al, 2000; Liu et al, 2004; Wright et al, 1999). Auch wenn diese teilweise kontrovers diskutiert werden (Shinohara et al, 2006), können insbesondere neueste Veröffentlichungen den Einfluss von ERK in die G₂/M-Kontrolle eindeutig bestätigen (Dumesic et al, 2009; Kim et al, 2008; Wang et al, 2007). Behält man bisher veröffentlichte Daten im Überblick, so wird vorwiegend von promotogenen, Zellzyklus-vorantreibenden ERK-Effekten ausgegangen (Chambard et al, 2007; Roberts et al, 2002). Ein Großteil der Literatur verdeutlicht, dass die Kinase den Übergang der Zellzyklus-Kontrollpunkte begünstigt (Dumesic et al, 2009; Yamamoto et al, 2006). Passend hierzu hat ERK auch im Rahmen der NIPA-Phosphorylierung Effekte auf die Überleitung von der G₂-Phase in die Mitose (Bassermann et al, 2005). In dieser Arbeit konnten somit proliferationsfördernde

Einflüsse von ERK auf den Zellzyklus bekräftigt werden. Inhibition der Aktivität von ERK1/2 und in noch stärkerem Maße selektiver ERK2-Knockdown führten zu verlangsamten Voranschreiten von Zellen im Zellzyklus. Die Zellen zeichneten sich sowohl durch prolongierte S-Phase als auch durch verzögerten Mitoseeintritt aus. Dies deutet auf einen gestörten G₁/S-Übergang mit verlangsamter S-Phasen-Progression sowie auf ein verspätetes, nicht zeitgerechtes Überschreiten des G₂/M-Punktes bei Fehlen von ERK-Aktivität hin. Es wurden mehrere Modelle beschrieben, durch welche ERK im Einzelnen den Mitoseeintritt beeinflusst (Chambard et al, 2007). Die vorliegende Arbeit kann einen neuen Mechanismus aufdecken, über den ERK auf den G₂/M-Übergang einwirkt. Die Zellzyklusanalysen zeigten, dass Herabsetzung der Aktivität von ERK einen verzögerten Übergang von der G₂-Phase in die Mitose bewirkt. Ein identischer Phänotyp war bei Zellen zu beobachten, die eine phospho-defiziente NIPA-Mutante trugen (Bassermann et al, 2005). Bei den Immunpräzipitationsexperimenten stellte sich heraus, dass Inhibition der Aktivität von ERK1/2 und spezifischer ERK2-Knockdown die Struktur von SCF^{NIPA} am G₂/M-Übergang beeinflussen konnten. Bei Verminderung des Aktivitätsgrades von ERK wurde an G₂/M weiterhin eine Bindung zwischen NIPA und dem SCF-Komplex-Protein Cul1 registriert. Dies deutet darauf hin, dass der SCF^{NIPA}-Komplex ohne ERK-Aktivität am Übergang in die Mitose aktiv bleibt und somit die Akkumulation von CyclinB1 im Kern verzögern kann. Hierdurch lässt sich der bei reduzierter ERK-Aktivität beobachtete, verspätete Mitoseeintritt erklären. Folglich greift ERK durch Phosphorylierung von NIPA in die Regulation des Mitoseeintritts ein. Durch Phosphatgruppenübertragung auf NIPA mit konsekutiv herabgesetzter SCF^{NIPA}-Aktivität ermöglicht ERK den nukleären Anstieg von CyclinB1 an G₂/M und begünstigt dadurch die Aktivierung des MPF (*Mitosis promoting factor* oder CyclinB1-CDK-1-Komplex). Betrachtet man bisher veröffentlichte Daten, so ist der Einfluss von ERK auf die Regulation des MPF über NIPA gut vorstellbar. Es konnten mehrere Zielstrukturen von ERK identifiziert werden, über die das Enzym die Aktivierung des MPF an G₂/M beeinflusst (Abrieu et al, 2001; Chambard et al, 2007). Die MPF-Regulation erfolgt auf mehreren Ebenen (s. Einleitung). In der Interphase wird CDK-1 durch Wee1- und Myt1-vermittelte Phosphorylierung gehemmt (Heald et al, 1993; King et al, 1994; Liu et al, 1997). Am G₂/M-Übergang überwiegt die Aktivität der Phosphatase CDC25, die inhibierende Phosphatreste entfernt und somit CDK-1 in einen aktiven Zustand überführt (Borgne & Meijer, 1996; Gautier et al, 1991; Krek &

Nigg, 1991). Diese Vorgänge werden teilweise durch ERK gesteuert: ERK phosphoryliert und aktiviert CDC25, während Myt1 über ERK inaktiviert und somit CDK-1 aktiviert wird (Palmer et al, 1998; Wang et al, 2007). Eine weitere Eingriffsmöglichkeit von ERK in die G₂/M-Regulation besteht in der CyclinB1-Phosphorylierung, die spezifisch am *cytoplasmatic retention signal* erfolgt und dadurch den Export von CyclinB1 aus dem Kern beendet (Walsh et al, 2003). Passend hierzu bewirkt ERK unseren Daten zufolge über Phosphorylierung von NIPA einen verminderten nukleären Abbau von CyclinB1. Beide Vorgänge begünstigen somit die Akkumulation von CyclinB1 im Zellkern und dadurch die Aktivierung des MPF. Die Phosphatgruppenübertragung auf NIPA stellt somit einen weiteren, neuen Mechanismus dar, über den ERK in die Regulation des MPF und damit in die G₂/M-Kontrolle im Zellzyklus eingreift.

In den Knockdown-Versuchen stellte sich heraus, dass NIPA spezifisch durch die ERK-Isoform ERK2 phosphoryliert wird. Nur der selektive Knockdown von ERK2, nicht aber von ERK1 konnte einen verminderten Phosphorylierungsgrad von NIPA am G₂/M-Übergang herbeiführen. Diese Beobachtung bekräftigt die Vermutung, dass ERK1 und ERK2 unterschiedliche, nur für eine der beiden Isoformen spezifische Substrate besitzen und somit eine Divergenz in deren Kinase-Funktion besteht. Ursprünglich wurde über längere Zeit vermutet, ERK1 und ERK2 seien hinsichtlich ihrer Aufgaben identisch (Boulton et al, 1991; Seger & Krebs, 1995). Diese Auffassung war unter anderem auf strukturelle Ähnlichkeit (ca. 85% übereinstimmende Aminosäurestruktur), gleichartige Aktivierbarkeit sowie vergleichbare zelluläre Lokalisation beider Enzyme zurückzuführen (Boulton et al, 1991; Seger & Krebs, 1995). Neuere Daten verdeutlichen jedoch, dass von funktionellen Unterschieden zwischen ERK1 und ERK2 auszugehen ist (Lloyd, 2006; Marchi et al, 2008; Shaul & Seger, 2007). Erste Hinweise auf derartige Differenzen konnten Experimente mit ERK1- bzw. ERK2-Knockout-Mäusen erbringen. Während ERK1-Knockout-Mäuse einen nahezu unauffälligen Phänotyp aufwiesen, verstarben ERK2-defiziente Tiere in einem frühen Stadium der embryonalen Entwicklung (Hatano et al, 2003; Pages et al, 1999; Saba-El-Leil et al, 2003). Dies zeigt eine essentielle Bedeutung von ERK2 für Entwicklung und Zellwachstum an (Bessard et al, 2008). Andere Arbeitsgruppen konnten Verschiedenheiten zwischen beiden ERK-Isoformen bestätigen (Chuang & Ng, 1994; Fremin et al, 2007; Mazzucchelli et al, 2002). Inwiefern ERK1 und ERK2 Unterschiede hinsichtlich ihrer Zellzyklus-

regulierenden Funktionen aufweisen, wird in der Literatur abweichend diskutiert. Liu et al (2004) deuten an, dass Verminderung der Aktivität von ERK1 einen Zellzyklusarrest am G₂/M-Übergang bewirkt, während reduzierte ERK2-Aktivität eher zum G₁/S-Arrest führt. Im Gegensatz hierzu heben Vantaggiato et al (2006) hervor, dass sich Zellen mit herabgesetzter ERK2-Aktivität durch erheblich gestörten Zellzyklus-Progress auszeichnen. Selektive Verringerung der Aktivität von ERK1 dagegen verursacht keinen Arrest im Zellzyklus, sondern vielmehr verstärkte Zellproliferation. Die Autoren gehen davon aus, dass ERK2 vorwiegend promotogene Effekte besitzt, während ERK1 eher antiproliferativ wirkt, indem es ERK2-abhängige Wirkungen antagonisiert. Desweiteren beschreiben Wang et al (2007) einen wichtigen Mechanismus, über welchen ERK2 den Übergang von der G₂-Phase in die Mitose fördert. Vergewärtigt man sich diese Publikationen, so ist passend zu unseren Daten vor allem ERK2 und weniger ERK1 als Zellzyklus-Progress begünstigendes Enzym anzusehen (Lloyd, 2006; Vantaggiato et al, 2006). Zusätzlich kann gefolgert werden, dass ein Teil der Zellzyklus-vorantreibenden Effekte von ERK2 auf Beeinflussung des G₂/M-Übergangs zurückzuführen ist (Wang et al, 2007). Die spezifische Phosphorylierung des G₂/M-Kontrollproteins NIPA durch ERK2 und nicht durch ERK1 erscheint somit plausibel. Lloyd (2006) weist auf die Notwendigkeit hin, ERK-Substrate zu identifizieren, die nur einer der beiden Isoformen des Enzyms zugehörig sind. Durch die Resultate der vorliegenden Arbeit ist es möglich, das Zellzyklus-Regulatorprotein NIPA als ein rein ERK2-spezifisches Substrat zu charakterisieren. Es bleibt anzumerken, dass die beschriebenen Experimenten nicht die direkte Phosphorylierung von NIPA durch ERK2 nachweisen können. Zwar lassen die *in vitro* Daten eine unmittelbare Interaktion zwischen NIPA und ERK vermuten. Die Einbindung einer zusätzlichen Kinase, die, durch ERK2 aktiviert, die Phosphatrestübertragung auf NIPA katalysiert, kann jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Man weiß, dass ERK im Sinne einer Signalkaskade eine Vielzahl weiterer Kinasen in den aktiven Zustand überführt, die dann die eigentlichen Substratphosphorylierungen durchführen (Pearson et al, 2001). Die herausragende Rolle von ERK2 im NIPA-Phosphorylierungsprozess muss allerdings auch in diesem Falle hervorgehoben werden.

4.3 Onkogen-vermittelte Phosphorylierung von NIPA und die Rolle des Proteins in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese

Zellzykluskontrolle stellt einen essentiellen Mechanismus im vielzelligen Organismus dar. Dysregulation von Zellzyklus-Kontrollpunkten kann zur Entstehung maligner Tumoren beitragen (Hartwell, 1992; Paulovich et al, 1997). Ein typisches Charakteristikum entarteter Zellen besteht in der Fehlfunktion Zellzyklus-regulierender Proteine (Pines, 1995). Es ist vorstellbar, dass auch NIPA als G₂/M-Regulatorprotein in den Transformationsprozess von Zellen involviert ist. Auf die veränderte Aktivität Ubiquitin-übertragender E3-Ligasen in menschlichen Tumoren wurde unlängst hingewiesen (Pagano & Benmaamar, 2003). So könnte über Aktivitätsminderung von SCF^{NIPA} der kontrollierte Mitoseeintritt in malignen Zellen behindert werden. Die Funktion von SCF^{NIPA} könnte hierbei einerseits durch Mutationen von NIPA oder anderen SCF-Komponenten eingeschränkt sein. Andererseits ist auch eine Inaktivierung des Komplexes durch verstärkte Phosphorylierung des F-Box-Proteins NIPA denkbar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob die am physiologischen NIPA-Phosphorylierungsprozess beteiligte Kinase ERK auch eine pathologische Phosphorylierung von NIPA vermitteln kann. Die Untersuchungen wurden mit NPM-ALK-positiven Zellen durchgeführt, da das Onkogen einen erhöhten Phosphorylierungsgrad von NIPA induzieren kann (Ouyang et al, 2003). Die vermehrte Phosphorylierung von NIPA bei Anwesenheit von NPM-ALK konnte durch Verwendung spezifischer MEK-Inhibitoren verhindert werden. Dies deutet darauf hin, dass ERK auch für die unter pathologischen Umständen stattfindende Phosphatgruppenübertragung auf NIPA verantwortlich ist. Es ist allgemein anerkannt, dass ERK eine wichtige Bedeutung bei Zelltransformation und Tumorentstehung zukommt (Mansour et al, 1994; McCubrey et al, 2007; Sebolt-Leopold & Herrera, 2004). Bei ca. 30% aller malignen Erkrankungen kann eine verstärkte Aktivierung der ERK-Signalkaskade gefunden werden (Hoshino et al, 1999). Betroffen sind solide Tumoren ebenso wie hämatologische Neoplasien (Lee et al, 2004; Plataniias, 2003; Sivaraman et al, 1997; Towatari et al, 1997). Auch NPM-ALK vermittelt transformierende Effekte über erhöhten Aktivitätsgrad von ERK, wodurch der gesteigerte Phosphorylierungsgrad von NIPA in NPM-ALK-positiven

Zellen erklärt werden könnte (Marzec et al, 2007). Über unterschiedliche Rollen der ERK-Isoformen ERK1 und ERK2 im Transformationsprozess von Zellen ist bisher wenig bekannt. Vantaggiato et al (2006) berichten, dass Ras-induzierte Zellproliferation insbesondere über ERK2-Aktivierung erfolgt, während ERK1 eher negative Auswirkungen auf Ras-abhängiges Tumorwachstum besitzt. Auch Bessard et al (2008) heben die wichtige Rolle von ERK2 bei der Größenzunahme von Tumoren hervor. Es wird in weiteren Untersuchungen zu klären sein, ob auch die pathologische Phosphorylierung von NIPA spezifisch durch die ERK-Isoform ERK2 vermittelt wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die pathogene Tyrosinkinase NPM-ALK über ERK einen verstärkten Phosphorylierungsgrad von NIPA bewirkt. Dies könnte eine Rolle in der NPM-ALK-induzierten Onkogenese spielen. Über gesteigerte Phosphorylierung von NIPA mit konsekutiver SCF^{NIPA}-Inaktivierung könnte NPM-ALK eine Störung der G₂/M-Kontrolle in Tumorzellen verursachen. Um die Bedeutung von NIPA bei der Entstehung NPM-ALK positiver Tumoren *in vivo* abschätzen zu können, wurde ein murines Knochenmarktransplantationsmodell mit NIPA-Wildtyp- und NIPA-Knockout-Mäusen verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass Vorhandensein oder Fehlen von NIPA keinen Einfluss auf den Phänotyp, jedoch Auswirkungen auf den Progress NPM-ALK induzierter Tumorerkrankungen in der Maus hat. NIPA-Wildtyp- und Knockout-Mäuse zeichneten sich in gleichem Maße durch maligne Infiltration von Milz und Knochenmark aus. Die Latenzzeit der Erkrankung dagegen stellte sich in beiden Gruppen verschieden dar. NIPA-defiziente Mäuse verstarben früher an der NPM-ALK-induzierten Tumorerkrankung als Wildtyp-Mäuse. Der Unterschied von ca. 5 Tagen bei einer Gesamtkrankheitsdauer von ca. 1 Monat konnte durch 3 Transplantationen bestätigt werden. Diese Resultate weisen auf eine Rolle von NIPA in der durch NPM-ALK verursachten Tumorentstehung hin. Ob die Phosphorylierung von NIPA in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielt, sollte durch Expression der phospho-defizienten NIPA-Mutante S353A in NPM-ALK-exprimierenden NIPA-Wildtyp-Knochenmarkzellen in einem weiteren Transplantationsexperiment geklärt werden. Es zeigte sich, dass durch Expression der phospho-defizienten Mutante in den Knochenmarkzellen ein längeres Überleben von Wildtyp-Mäusen erreicht werden konnte. Daraus kann eine pathophysiologische Bedeutung des NIPA-Phosphorylierungsprozesses abgeleitet werden. Die Ergebnisse stützen die weiter oben erwähnte Vermutung, dass Onkogene wie NPM-ALK direkt über verstärkte

Phosphorylierung von NIPA die Zellzykluskontrolle stören und dadurch Tumorwachstum induzieren können. NPM-ALK-Inhibitoren stehen derzeit noch nicht für den klinischen Gebrauch zur Verfügung. Das genaue Verständnis NPM-ALK-vermittelter Zelltransformation ist daher für gezielte therapeutische Interventionen essentiell. Die Resultate der vorliegenden Arbeit deuten an, dass NPM-ALK durch ERK den Phosphorylierungsgrad von NIPA erhöhen und dadurch über Beeinflussung des G₂/M-Kontrollpunktes Tumorwachstum fördern kann. Der Einsatz von ERK- bzw. MEK-Inhibitoren könnte somit eine interessante Option zur Behandlung NPM-ALK-positiver Tumorerkrankungen darstellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Kinase ERK sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Umständen eine entscheidende Bedeutung für die Phosphorylierung des Zellzyklus-Regulators NIPA zukommt. Im Rahmen des physiologischen Zellzyklus reguliert ERK2 über NIPA-Phosphorylierung die Aktivität von SCF^{NIPA} an G₂/M und beeinflusst dadurch den kontrollierten Mitoseeintritt. In entarteten Zellen können Onkogene wie NPM-ALK über ERK den Phosphorylierungsgrad von NIPA verstärken und somit die Zellzykluskontrolle stören. Diese Erkenntnisse eröffnen die Möglichkeit, über ERK-Inhibition gezielt auf den Progress NPM-ALK-induzierter Tumorerkrankungen einzuwirken.

5 Zusammenfassung

Um die für den NIPA-Phosphorylierungsprozess verantwortliche Kinase zu identifizieren, wurden verschiedene G₂/M-aktive Kinasen bezüglich ihrer Aktivität gegenüber NIPA *in vitro* getestet. Bei Kinase Assays stellte sich heraus, dass beide Isoformen des Enzyms ERK (Extracellular-signal regulated Kinase 1 und 2) sehr effektiv die *in vitro* Phosphorylierung des NIPA-Wildtyp-Proteins katalysieren konnten. Die phospho-defiziente NIPA-Mutante S354,359A wies im Assay einen verminderten Phosphorylierungsgrad auf, was darauf hindeutet, dass die ERK-vermittelte Phosphorylierung von NIPA an den Serinresten 354 und 359 erfolgt.

Bei *in vivo* Experimenten zeigte sich, dass in Zellen durch Reduktion der Aktivität von ERK1 und 2 mit Hilfe spezifischer MEK1/2-Inhibitoren der Phosphorylierungsgrad von NIPA an G₂/M herabgesetzt werden konnte. Die Verwendung eines hochselektiven microRNA-Systems erbrachte das Ergebnis, dass selektiver Knockdown von ERK2, nicht aber von ERK1, die Phosphatgruppenübertragung auf NIPA an G₂/M verhindern konnte. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Kinase ERK auch *in vivo* die Phosphorylierung von NIPA vermittelt und dass die Phosphatgruppenübertragung spezifisch durch die Isoform 2 des Enzyms erfolgt. Weitere Untersuchungen konnten diese Resultate in einen funktionellen Zusammenhang bringen. Es war möglich, in Zellen eine Korrelation zwischen der Aktivität von ERK und dem Phosphorylierungsstatus von NIPA nachzuweisen. Weiterführende Zellzyklusanalysen bewiesen, dass ERK1/2-Inhibition und in noch stärkerem Maße selektiver ERK2-Knockdown den Zellzyklus-Progress behindern können. Die Zellen zeichneten sich durch verlängerte S-Phase sowie verzögerten Mitoseeintritt aus. Der beobachtete Phänotyp gleicht dem von Zellen, die eine phospho-defiziente NIPA-Mutante tragen. In Immunpräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass ERK1/2-Inhibition und ERK2-Knockdown die Struktur von SCF^{NIPA} am G₂/M-Übergang beeinflussen. Bei Verminderung der Aktivität von ERK konnte an G₂/M weiterhin eine Bindung zwischen NIPA und dem SCF-Komplex-Protein Cul1 registriert werden. Dies deutet darauf hin, dass SCF^{NIPA} ohne ERK-Aktivität am Übergang in die Mitose aktiv bleibt und somit die Akkumulation von CyclinB1 im Kern behindern kann. Der bei herabgesetzter ERK-Aktivität zu beobachtende verzögerte Mitoseeintritt kann dadurch erklärt werden.

NIPA liegt in Zellen, die die onkogene Tyrosinkinase NPM-ALK exprimieren, konstitutiv phosphoryliert vor. Bei Verwendung spezifischer MEK1/2-Inhibitoren konnte eine Reduktion dieser Onkogen-vermittelten Phosphorylierung beobachtet werden. Folglich kann der Kinase ERK auch für die unter pathologischen Umständen stattfindende Phosphorylierung von NIPA eine wichtige Bedeutung zugesprochen werden. Um diese Erkenntnis in einen pathophysiologischen Zusammenhang einordnen zu können, wurde schließlich die Rolle von NIPA in der NPM-ALK induzierten Tumorentstehung mit Hilfe muriner Knochenmarktransplantations-Experimente untersucht. Es zeigte sich, dass Fehlen oder Vorhandensein von NIPA keinen Einfluss auf den Phänotyp, jedoch Auswirkungen auf die Latenz NPM-ALK verursachter Tumorerkrankungen hat. NIPA-defiziente Tiere verstarben schneller als Wildtyp-Mäuse bei Transplantation mit NPM-ALK transfiziertem Knochenmark. Bei Expression einer phospho-defizienten NIPA-Mutante in den transformierten Knochenmarkzellen konnte dagegen ein längeres Überleben von Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle von NIPA in der NPM-ALK induzierten Onkogenese hin. Insbesondere dem NIPA-Phosphorylierungsprozess scheint eine pathophysiologische Bedeutung zuzukommen. Durch Identifikation der für diese Phosphorylierung zuständigen Kinase bietet sich die Gelegenheit zur gezielten therapeutischen Intervention bei NPM-ALK verursachten Neoplasien.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Kinase ERK sowohl unter physiologischen Bedingungen am G₂/M-Übergang des Zellzyklus als auch unter pathologischen Umständen im Zusammenhang mit der onkogenen Tyrosinkinase NPM-ALK eine entscheidende Bedeutung für die Phosphorylierung von NIPA zukommt.

6 Literaturverzeichnis

Abrieu A, Doree M, Fisher D (2001) The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *J Cell Sci* 114: 257-267

Abrieu A, Doree M, Picard A (1997) Mitogen-activated protein kinase activation down-regulates a mechanism that inactivates cyclin B-cdc2 kinase in G2-arrested oocytes. *Mol Biol Cell* 8: 249-261

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270: 27489-27494

Amin HM, Lai R (2007) Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 110: 2259-2267

Arellano M, Moreno S (1997) Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 559-573

Bassermann F, von Klitzing C, Illert AL, Munch 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: 15965-15972

Bassermann F, von Klitzing C, Munch 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* 122: 45-57

Bessard A, Fremin C, Ezan F, Fautrel A, Gailhouste L, Baffet G (2008) RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 27: 5315-5325

Biggs JR, Kraft AS (1995) Inhibitors of cyclin-dependent kinase and cancer. *J Mol Med* 73: 509-514

Borgne A, Meijer L (1996) Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J Biol Chem* 271: 27847-27854

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65: 663-675

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18: 664-674

Cardozo T, Pagano M (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 739-751

Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M, Pagano M (1999) Identification of a family of human F-box proteins. *Curr Biol* 9: 1177-1179

Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1299-1310

Chuang CF, Ng SY (1994) Functional divergence of the MAP kinase pathway. ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Lett* 346: 229-234

Chuderland D, Seger R (2005) Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol* 29: 57-74

Coffman FD, Studzinski GP (1999) Differentiation-related mechanisms which suppress DNA replication. *Exp Cell Res* 248: 58-73

Coffman RL (1982) Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol Rev* 69: 5-23

Corbalan-Garcia S, Yang SS, Degenhardt KR, Bar-Sagi D (1996) Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Mol Cell Biol* 16: 5674-5682

del Pozo JC, Estelle M (2000) F-box proteins and protein degradation: an emerging theme in cellular regulation. *Plant Mol Biol* 44: 123-128

Denli AM, Hannon GJ (2003) RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci* 28: 196-201

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: 1289-1295

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7686-7689

Dumesic PA, Scholl FA, Barragan DI, Khavari PA (2009) Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol* 185: 409-422

Duncia JV, Santella JB, 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Frieze 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: 2839-2844

Duyster J, Bai RY, Morris SW (2001) Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene* 20: 5623-5637

Dynlacht BD (1997) Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* 389: 149-152

Eddy SR (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2: 919-929

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

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26: 199-213

Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672

Enkhbayar P, Kamiya M, Osaki M, Matsumoto T, Matsushima N (2004) Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins* 54: 394-403

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-396

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: 18623-18632

Finnegan EJ, Matzke MA (2003) The small RNA world. *J Cell Sci* 116: 4689-4693

Fremin C, Ezan F, Boisselier P, Bessard A, Pages G, Pouyssegur J, Baffet G (2007) ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: an RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology* 45: 1035-1045

Gallant P, Nigg EA (1992) Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol* 117: 213-224

Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW (1991) cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* 67: 197-211

Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-138

Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ (1991) Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem* 266: 22159-22163

Guadagno TM, Ferrell JE, Jr. (1998) Requirement for MAPK activation for normal mitotic progression in *Xenopus* egg extracts. *Science* 282: 1312-1315

Hagting A, Jackman M, Simpson K, Pines J (1999) Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr Biol* 9: 680-689

Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J (1998) MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J* 17: 4127-4138

Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 6: 387-400

Hartwell L (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71: 543-546

Hartwell LH, Kastan MB (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* 266: 1821-1828

Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634

Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M (2003) Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8: 847-856

Hayne C, Tzivion G, Luo Z (2000) Raf-1/MEK/MAPK pathway is necessary for the G2/M transition induced by nocodazole. *J Biol Chem* 275: 31876-31882

Heald R, McLoughlin M, McKeon F (1993) Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74: 463-474

Hochstrasser M (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30: 405-439

Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, Kohno M (1999) Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18: 813-822

Jackson PK, Eldridge AG (2002) The SCF ubiquitin ligase: an extended look. *Mol Cell* 9: 923-925

Kim DS, Lee HK, Park SH, Lee S, Ryoo IJ, Kim WG, Yoo ID, Na JI, Kwon SB, Park KC (2008) Terrein inhibits keratinocyte proliferation via ERK inactivation and G2/M cell cycle arrest. *Exp Dermatol* 17: 312-317

King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274: 1652-1659

King RW, Jackson PK, Kirschner MW (1994) Mitosis in transition. *Cell* 79: 563-571

King RW, Peters JM, Tugendreich S, Rolfe M, Hieter P, Kirschner MW (1995) A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81: 279-288

Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11: 725-732

Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge SJ (2001) Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294: 173-177

Kosako H, Gotoh Y, Nishida E (1994) Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *EMBO J* 13: 2131-2138

Kossatz U, Dietrich N, Zender L, Buer J, Manns MP, Malek NP (2004) Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev* 18: 2602-2607

Krek W, Nigg EA (1991) Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J* 10: 3331-3341

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lagasse E, Weissman IL (1996) Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197: 139-150

Ledbetter JA, Rouse RV, Micklem HS, Herzenberg LA (1980) T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J Exp Med* 152: 280-295

Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam SW, Park WS, Kim SH, Yoo NJ, Lee JY (2004) Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 112: 233-238

Leenen PJ, de Bruijn MF, Voerman JS, Campbell PA, van Ewijk W (1994) Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 174: 5-19

Li J, Meyer AN, Donoghue DJ (1997) Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 502-507

Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnicka-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: 571-583

Liu X, Yan S, Zhou T, Terada Y, Erikson RL (2004) The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene* 23: 763-776

Lloyd AC (2006) Distinct functions for ERKs? *J Biol* 5: 13

Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108: 1-6

MacCorkle RA, Tan TH (2005) Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. *Cell Biochem Biophys* 43: 451-461

Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265: 966-970

Marchi M, D'Antoni A, Formentini I, Parra R, Brambilla R, Ratto GM, Costa M (2008) The N-terminal domain of ERK1 accounts for the functional differences with ERK2. *PLoS One* 3: e3873

Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, Raghunath PN, Wlodarski P, Wasik MA (2007) Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene* 26: 813-821

Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pages G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrenguber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron* 34: 807-820

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1263-1284

Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26: 3227-3239

Miething C, Grundler R, Fend F, Hoepfl J, Mugler C, von Schilling C, Morris SW, Peschel C, Duyster J (2003) The oncogenic fusion protein nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK) induces two distinct malignant phenotypes in a murine retroviral transplantation model. *Oncogene* 22: 4642-4647

Minshull J, Blow JJ, Hunt T (1989) Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. *Cell* 56: 947-956

Molinari M (2000) Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif* 33: 261-274

Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-134

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: 1281-1284

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: 263-273

Murray A (1994) Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol* 6: 872-876

Murray AW (1992) Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359: 599-604

Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI (2004) Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 6: 661-672

Nakayama KI, Nakayama K (2005) Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* 16: 323-333

Noguchi E (2004-2006) The cell cycle and checkpoint controls: Toward understanding of genome maintenance mechanisms. <http://homepage.mac.com/enognog/checkpoint.htm>. Stand: 27.05.2009

Norbury C, Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 61: 441-470

Nurse P (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79: 547-550

Ohi R, Gould KL (1999) Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11: 267-273

Oshima J, Campisi J (1991) Fundamentals of cell proliferation: control of the cell cycle. *J Dairy Sci* 74: 2778-2787

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 interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA). *J Biol Chem* 278: 30028-30036

Pagano M, Benmaamar R (2003) When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose. *Cancer Cell* 4: 251-256

Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 286: 1374-1377

Palmer A, Gavin AC, Nebreda AR (1998) A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J* 17: 5037-5047

Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH (1997) When checkpoints fail. *Cell* 88: 315-321

Pear WS, Miller JP, Xu L, Pui JC, Soffer B, Quackenbush RC, Pendergast AM, Bronson R, Aster JC, Scott ML, Baltimore D (1998) Efficient and rapid induction of a chronic myelogenous leukemia-like myeloproliferative disease in mice receiving P210 bcr/abl-transduced bone marrow. *Blood* 92: 3780-3792

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153-183

Peters JM (1998) SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 10: 759-768

Pines J (1991) Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ* 2: 305-310

Pines J (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* 308: 697-711

Pines J (1995) Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 6: 63-72

Pines J (1999) Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1: E73-79

Pines J, Hunter T (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115: 1-17

Pines J, Hunter T (1994) The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J* 13: 3772-3781

Platanias LC (2003) Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101: 4667-4679

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78: 59-66

Ramos JW (2008) The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2707-2719

Ranganathan A, Yazicioglu MN, Cobb MH (2006) The nuclear localization of ERK2 occurs by mechanisms both independent of and dependent on energy. *J Biol Chem* 281: 15645-15652

Roberts EC, Shapiro PS, Nahreini TS, Pages G, Pouyssegur J, Ahn NG (2002) Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol Cell Biol* 22: 7226-7241

Roovers K, Assoian RK (2000) Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 22: 818-826

Saba-EI-Leil MK, Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S (2003) An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep* 4: 964-968

Sebolt-Leopold JS, Herrera R (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 937-947

Seger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735

Shaul YD, Seger R (2007) The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1213-1226

Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677

Shinohara M, Mikhailov AV, Aguirre-Ghiso JA, Rieder CL (2006) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity is not required in mammalian cells during late G2 for timely entry into or exit from mitosis. *Mol Biol Cell* 17: 5227-5240

Sivaraman VS, Wang H, Nuovo GJ, Malbon CC (1997) Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. *J Clin Invest* 99: 1478-1483

Skehan P (1988) Control models of cell cycle transit, exit, and arrest. *Biochem Cell Biol* 66: 467-477

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24: 181-185

Smits VA, Medema RH (2001) Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta* 1519: 1-12

Stark GR, Taylor WR (2006) Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* 32: 227-248

Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, Ruderman JV, Hershko A (1995) The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 6: 185-197

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Ueki K, Izumi T, Chatani Y, Kohno M, Kasuga M, Yazaki Y, Akanuma Y (1992) Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *J Biol Chem* 267: 20293-20297

Towatari M, Iida H, Tanimoto M, Iwata H, Hamaguchi M, Saito H (1997) Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. *Leukemia* 11: 479-484

Tyson JJ, Novak B, Chen K, Val J (1995) Checkpoints in the cell cycle from a modeler's perspective. *Prog Cell Cycle Res* 1: 1-8

Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R (2006) ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol* 5: 14

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36: 131-149

Voinnet O (2002) RNA silencing: small RNAs as ubiquitous regulators of gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 5: 444-451

Walsh S, Margolis SS, Kornbluth S (2003) Phosphorylation of the cyclin b1 cytoplasmic retention sequence by mitogen-activated protein kinase and Plx. *Mol Cancer Res* 1: 280-289

Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M, Ashorn CL, Gallick GE, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kuang J (2007) Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* 128: 1119-1132

Watanabe N, Arai H, Nishihara Y, Taniguchi M, Hunter T, Osada H (2004) M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4419-4424

Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 169-178

Winston JT, Koepp DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW (1999) A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol* 9: 1180-1182

Wright JH, Munar E, Jameson DR, Andreassen PR, Margolis RL, Seger R, Krebs EG (1999) Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G(2)/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11335-11340

Yamamoto T, Ebisuya M, Ashida F, Okamoto K, Yonehara S, Nishida E (2006) Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol* 16: 1171-1182

Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24: 21-44

Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, Ito Y, Matsuoka K, Yoshida M, Tanaka K, Tai T (2002) E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* 418: 438-442

Yoshida Y, Tokunaga F, Chiba T, Iwai K, Tanaka K, Tai T (2003) Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J Biol Chem* 278: 43877-43884

Zachariae W, Nasmyth K (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13: 2039-2058

Zachariae W, Schwab M, Nasmyth K, Seufert W (1998) Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* 282: 1721-1724

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Organisation des Zellzyklus (nach Noguchi, 2004-2006).....	1
Abb. 2:	Schematische Darstellung der SCF-gesteuerten Ubiquitinierungsreaktion (mit freundlicher Überlassung durch F. Bassermann)	6
Abb. 3:	Model der SCF ^{NIPA} -Aktivität während des Zellzyklus (mit freundlicher Überlassung durch F. Bassermann).....	8
Abb. 4:	Aminosäuresequenzen von humanem, murinen und <i>Xenopus laevis</i> entstammenden NIPA (nach Bassermann et al, 2007)	9
Abb. 5:	Statische Zellzyklusanalyse.....	37
Abb. 6:	Dynamische Zellzyklusanalyse	38
Abb. 7:	ERK1 und ERK2 phosphorylieren NIPA <i>in vitro</i>	49
Abb. 8:	Strukturformeln von PD98059 (2'-Amino-3'-methoxy-flavon) und von U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien.....	51
Abb. 9:	Inhibition der ERK-Aktivität führt zu verminderter Phosphorylierung von NIPA am G ₂ /M-Übergang	52
Abb. 10:	Prinzip der RNA-Interferenz zwischen ERK-miRNAs und den mRNA- Strängen von ERK (hier als entsprechende cDNA dargestellt).....	54
Abb. 11:	Stabile Transfektion von D1-Zellen mit ERK1-miRNA, ERK2-miRNA und Kontrollsequenz.....	55
Abb. 12:	Spezifischer Knockdown von ERK1 und ERK2 durch das microRNA- System.....	56
Abb. 13:	Knockdown von ERK2, nicht aber von ERK1 führt zu verminderter Phosphorylierung von NIPA am G ₂ /M-Übergang.....	57
Abb. 14:	Phosphorylierung von NIPA korreliert mit dem Aktivitätsgrad von ERK.....	58
Abb. 15:	Inhibition der ERK-Aktivität führt zu verzögertem Zellzyklus-Progress	60
Abb. 16:	Knockdown von ERK2 führt zu verzögertem Zellzyklus-Progress.....	62

Abb. 17: ERK-Inhibition und ERK2-Knockdown beeinflussen die Struktur von SCF ^{NIPA} am G ₂ /M-Übergang	65
Abb. 18: Inhibition der ERK-Aktivität führt zu verminderter Phosphorylierung von NIPA in NPM-ALK-positiven Zellen	67
Abb. 19: Schematische Darstellung einer murinen Knochenmarktransplantation	69
Abb. 20: Retroviraler Transfer von NPM-ALK in murine Knochenmarkzellen.....	70
Abb. 21: NPM-ALK-induzierte Splenomegalie.....	71
Abb. 22: Durchflusszytometrische Analyse von Knochenmark- und Milzzellen.....	72
Abb. 23: Leukozyten im peripheren Blut.....	73
Abb. 24: Hämoglobin-Gehalt des peripheren Blutes	74
Abb. 25: Kaplan-Meier Überlebenskurve von NIPA-Wildtyp- und NIPA-Knockout-Mäusen	75
Abb. 26: Überleben bei Expression von NIPA S353A.....	76

8 Danksagung

Mein herausragender Dank gilt Frau Dr. Anna Lena Illert für die exzellente Betreuung und kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Christian Peschel möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München bedanken.

Frau Petra Schenk danke ich für die ausgezeichnete Anleitung beim Erlernen der Arbeitstechniken. Auch für die Unterstützung durch Frau Melanie Sickinger möchte ich mich bedanken.

Bei Frau Corinna Albers bedanke ich mich für freundliche Hilfe mit dem microRNA-System.

Herzlichen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Duyster für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

9 Posterpräsentationen

M. Zech, A. L. Illert, C. Albers, F. Bassermann, C. Peschel und J. Duyster.

„NIPA phosphorylation and inactivation at G₂/M is mediated by ERK2”.

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2009 in Heidelberg/ Mannheim.

M. Zech, A. L. Illert, C. Albers, F. Bassermann, C. Peschel und J. Duyster.

„NIPA phosphorylation and inactivation at G₂/M is mediated by ERK2”.

51ST ASH (American Society of Hematology) Meeting and Exposition 2009 in New Orleans, USA.

