

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
und
Lehrstuhl für Biochemie

Regulation des F-Box Proteins NIPA

Christine R. von Klitzing

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Groll
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher, i.R.
2. Univ.-Prof. Dr. J. Duyster
3. Univ.-Prof. Dr. W. Domcke

Die Dissertation wurde am 15. April 2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 12. August 2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	v
1 Einleitung	1
1.1 Der Zellzyklus	1
1.2 Ubiquitin-abhängige Proteolyse	3
1.2.1 Mechanismus der Ubiquitinierung	3
1.2.2 E3 Ubiquitin Ligasen	3
1.2.3 Der SCF Komplex	4
1.2.4 Der Anaphase Promoting Complex	6
1.3 Das F-Box Protein NIPA	8
1.4 Die DNA Schadensantwort	10
1.4.1 Der G1/S Checkpoint und Intra-S-Checkpoint	11
1.4.2 Der G2/M Checkpoint	12
1.5 Zielsetzung der Arbeit	13
2 Materialien	15
2.1 Chemikalien und biogene Substanzen	15
2.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur	16
2.3 Proteasominhibitoren	16
2.4 Radiochemikalien	16
2.5 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine	16
2.6 Enzyme	17
2.6.1 Restriktionsenzyme	17
2.6.2 DNA Polymerasen	17
2.6.3 Enzyme für Ubiquitinierungs-Reaktionen und Degradationsversuche	17
2.6.4 weitere Enzyme	17
2.7 Antikörper	17
2.8 Bakterienstämme	18
2.9 Zelllinien	18
2.10 Molekularbiologische Kitsysteme	18
2.11 Vektoren und DNA-Konstrukte	19
2.12 Oligonukleotide	20
2.12.1 Primer für Klonierungen	20
2.12.2 Primer für Mutagenese mittels PCR	20
2.12.3 Primer für Sequenzierungen	21
2.12.4 siRNA Oligonukleotide	21
2.13 Standardgeräte	21
2.14 Software	22

2.15	Standard Lösungen und Puffer	22
3	Methoden	25
3.1	Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1	Restriktionsverdau	25
3.1.2	Dephosphorylierung von Plasmid DNA	25
3.1.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	25
3.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
3.1.5	Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten	26
3.1.6	Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	26
3.1.7	Polymerase-Kettenreaktion	26
3.1.8	Mutagenese mittels PCR	27
3.1.9	Herstellung von Deletionsmutanten	28
3.2	Arbeiten mit Bakterien	28
3.2.1	Kulturbedingungen	28
3.2.2	Lagerung von E.coli Stämmen	28
3.2.3	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	28
3.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep/Maxiprep)	28
3.2.5	Induktion und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	29
3.3	Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien	30
3.3.1	Kultivierung der Zelllinien	30
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl	30
3.3.3	Kryokonservierung von Zellen	31
3.3.4	Transfektionsmethoden	31
3.3.5	RNA-Interferenz	31
3.3.6	Induzierbare Expression mit Hilfe des GeneSwitch Systems	31
3.3.7	Synchronisierung	32
3.3.8	Behandlung von Zellen mit Proteasominhibitoren	33
3.3.9	Behandlung von Zellen mit Kinase-Inhibitoren	33
3.3.10	Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid	33
3.3.11	Bestrahlung von Zellen mit ultraviolettem Licht	33
3.3.12	Zellzyklusbestimmung	34
3.3.13	Apoptosemessung (TUNEL)	35
3.3.14	Indirekte Immunfluoreszenz	36
3.4	Proteinbiochemische Methoden	36
3.4.1	Herstellung von Zelllysaten	36
3.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	36
3.4.3	Immunpräzipitation	37
3.4.4	In vitro Translation von Proteinen	37
3.4.5	Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen (GST-pulldown)	37
3.4.6	In vivo Ubiquitinierung	38
3.4.7	In vitro Degradations-Assay	38
3.4.8	In vitro Ubiquitinierung	39
3.4.9	SDS-Gelelektrophorese	40
3.4.10	Färben der Polyacrylamidgele	40

3.4.11 Western Blotting	41
4 Ergebnisse I: Regulation von NIPA durch den APC	43
4.1 NIPA wird in der späten Mitose abgebaut	43
4.1.1 Die phosphorylierte Form von NIPA wird abgebaut, nicht dephosphoryliert	43
4.1.2 NIPA wird in vivo ubiquitiniert	45
4.2 Der APC/Cdh1 vermittelt den Abbau von NIPA	45
4.2.1 Der Abbau von phosphoryliertem NIPA erfolgt zeitgleich mit bekannten mitotischen APC-Substraten	45
4.2.2 Der APC Komplex degradiert NIPA in vitro	47
4.2.3 NIPA interagiert in vivo mit Cdh1, jedoch nicht mit Cdc20	48
4.2.4 Identifizierung der Bindungsdomäne an Cdh1 in NIPA	50
4.2.5 in vitro Ubiquitinierung von NIPA durch den APC ist abhängig von Cdh1	50
4.2.6 Überexpression von Cdh1 führt zu einem verstärkten Abbau von NIPA	54
4.2.7 Durch RNA-Interferenz vermittelte Herunterregulation von Cdh1 führt zu einer Stabilisierung der phosphorylierten Form von NIPA in später Mitose	55
4.3 Identifizierung des Degradations-Motivs in NIPA	56
4.3.1 Die NIPA-Sequenz enthält zwei potentielle Dbox-Motive	56
4.3.2 Mutation der Dbox Motive hat keinen Einfluss auf die Bindung von NIPA an Cdh1	56
4.3.3 Mutation der Dbox-Motive in NIPA vermindert die APC/Cdh1-vermittelte Ubiquitinierung in vitro	57
4.3.4 Mutation der Dbox-Motive hat keinen Einfluss auf die Stabilität der phosphorylierten Form von NIPA in der späten Mitose	58
4.3.5 Mutation der Dbox Motive beeinflusst die zelluläre Lokalisation von NIPA	59
4.4 Regulation der Ubiquitinierung von NIPA	61
4.4.1 Die Phosphomimick-Mutante von NIPA bindet an Skp1	61
4.4.2 Phosphorylierung von NIPA an den Serinen Ser354, Ser359 und Ser395 hat keinen Einfluss auf die Bindung von NIPA an Cdh1	62
4.4.3 Die F-Box Mutante ist instabiler als wildtyp NIPA	63
4.4.4 Die F-Box Mutante wird in vivo stärker ubiquitiniert als wildtyp NIPA	64
4.4.5 Skp1 schützt NIPA vor Degradation in vitro	66
4.4.6 Überexpression von Skp1 verhindert die Bindung von NIPA an Cdh1	67
5 Ergebnisse II: Regulation von NIPA nach Schädigung der DNA	69
5.1 NIPA wird nach UVC-Behandlung phosphoryliert	69
5.1.1 NIPA wird nach UVC-Behandlung dosis- und zeitabhängig phosphoryliert	69
5.1.2 NIPA wird nach UVC-Behandlung an Serin 354 phosphoryliert . . .	70
5.1.3 Die Akkumulierung von phosphoryliertem NIPA nach UVC-Bestrahlung ist zellzyklus-abhängig	71

5.1.4	UVC-induzierte Phosphorylierung von NIPA führt zu Dissoziation der Bindung an Skp1	73
5.1.5	Das Zinkfingermotiv in NIPA ist wichtig für die UV-induzierte Phosphorylierung	74
5.2	Die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA ist ATR-abhängig	75
5.2.1	Caffein inhibiert die Phosphorylierung von NIPA in der Mitose und nach UV-Bestrahlung	75
5.2.2	Durch RNA-Interferenz vermittelte Herunterregulation von ATR führt zu einer Inhibierung der UV-induzierten Phosphorylierung von NIPA	76
5.2.3	In Seckel-Zellen wird NIPA nicht nach UV-Strahlung phosphoryliert	77
5.2.4	Die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA, jedoch nicht Phosphorylierung in der Mitose wird durch einen Chk1 Inhibitor inhibiert	78
5.2.5	Die UV-induzierte Degradation von NIPA in der G1-Phase wird durch Caffein inhibiert	79
5.3	Einfluss der NIPA-Expression auf UVC-induzierte Apoptose	80
5.3.1	Überexpression von NIPA sensibilisiert Zellen gegenüber UVC-induzierter Apoptose	80
5.3.2	Überexpression der S354A-Mutante von NIPA hat keinen Einfluss auf die UVC-induzierte Apoptose	80
5.3.3	NIPA ^{-/-} MEFs sind resistenter gegenüber UV-induzierter Apoptose, als NIPA ^{+/+} MEFs	82
5.4	Einfluss der NIPA-Expression auf die Signaltransduktion nach UVC-Bestrahlung	84
5.4.1	Überexpression von NIPA führt zu einer verminderten Induktion von p53 nach UVC-Bestrahlung	84
5.4.2	NIPA-überexprimierende Zellen haben keinen G1-Checkpoint-Defekt	85
6	Diskussion	87
6.1	Regulation von NIPA durch den APC	87
6.1.1	Der APC ^{Cdh1} vermittelt den Abbau von NIPA	87
6.1.2	Regulation der Ubiquitinierung von NIPA	88
6.1.3	Identifizierung der Degradationsmotive in NIPA	90
6.2	Regulation von NIPA nach Schädigung der DNA	92
6.2.1	NIPA wird nach Induktion von DNA-Schädigungen phosphoryliert	92
6.2.2	Die UVC-induzierte Phosphorylierung von NIPA ist ATR-abhängig	93
6.2.3	Funktion der UV-induzierten Phosphorylierung von NIPA	93
6.2.4	Einfluss der NIPA-Expression auf die UVC-induzierte Apoptose	94
7	Zusammenfassung	97
	Literaturverzeichnis	99
	Danksagung	115
	Publikationen	117

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A.d.	destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata</i>)
ALK	anaplastische Lymphom-Kinase
APC/C	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutiert
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM-Rad3-related
BIR	Baculovirus IAP Repeat Domäne
bp	Basenpaar
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
β TrCP	β -transducin repeat-containing protein
C	Celsius
Cdc	Cell division cycle
Cdh1	Cdc20 Homolog 1
CDK	Cyclin -abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
Chk1	Checkpointkinase 1
Chk2	Checkpointkinase 2
CHX	Cycloheximid
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
Da	Dalton
DAPI	4',6 Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxy-ribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G ₁	“Gap” -Phase 1
G ₂	“Gap” -Phase 2
G ₂ /M	Übergang von der “Gap”-Phase 2 in die Mitose
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde, Stunden
HA	Hemagglutinin
HECT	Homologous to E6-AP Carboxy Terminus

IAP	Apoptose-Inhibitor (<i>inhibitor of apoptosis protein</i>)
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> Translation
J	Joule
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
m	milli (10^{-3})
M	Mol pro Liter, molar
mA	Milliampere
MEFs	murine embryonale Fibroblasten
MG132	N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal
min	Minute, Minuten
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
n	nano (10^{-9})
NIPA	Nuclear Interaction Partner of ALK
NLS	Kernlokalisierungs-Signal (<i>nuclear localisation signal</i>)
nm	Nanometer
NPM	Nucleophosmin
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered-saline</i>)
PBST	PBS mit Tween20
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Iodid oder Preimmunserum
PMSF	Phenylmetansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RING	Really Interestin New Gene
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde, Sekunden
SCF	Skp1/Cullin/F-box protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
Skp	S-phase kinase associated protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ub	Ubiquitin
Ub _n	Ubiquitinkonjugate
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen-Verhältnis (<i>volume/volume</i>)

wt Wildtyp
w/v Gewicht/Volumen-Verhältnis (*weight/volume*)

Aminosäuren

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

Abkürzungen

1 Einleitung

1.1 Der Zellzyklus

Die Vermehrung der Zellen wird durch Zellteilung erreicht, wobei sich eine einzelne Ursprungszelle in zwei Tochterzellen aufteilt. Dabei durchläuft die Zelle verschiedene, sich wiederholende zyklische Phasen, die zusammen den Zellzyklus bilden.

Die wichtigsten Phasen des Zellzyklus sind die Synthesephase (S-Phase), während der die DNA repliziert wird und die Mitose (M-Phase), in der die Teilung der Zelle stattfindet. Dazwischen liegen bei den meisten Zelltypen zwei Zwischenperioden ("gap"-Phasen G_1 und G_2), in denen Proteinsynthese stattfindet und die DNA auf Fehler hin überprüft wird. Zudem können Zellen den Zellzyklus verlassen und in eine Ruhephase, die G_0 -Phase eintreten. Dies geschieht während der G_1 -Phase und ist entweder transient, zum Beispiel bei geringem Nährstoffangebot, oder permanent, zum Beispiel wenn Zellen terminal differenzieren.

Die Mitose wird in weitere fünf Phasen unterteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase [1]. Diese Phasen werden auf Grund der Änderungen der Morphologie der mitotischen Spindel und der Chromosomen unterschieden (siehe Abb. 1.1): In der Prophase fängt das Chromatin an, zu Chromosomen zu kondensieren, im Zytoplasma beginnt die Bildung der mitotischen Spindel und die Zentriolen wandern an die entgegengesetzten Pole der Zelle. In der anschließenden Prometaphase zerfällt die Kernhülle in ihre Bestandteile, so dass die Spindelfasern an die Kinetochoren der kondensierten Chromosomen binden können. Die Anordnung der Chromosomen an der Äquatorialebene erfolgt dann in der Metaphase und während der Anaphase werden die Chromatiden durch Verkürzung von Kinetochor-Fasern zu den entsprechenden Zellpolen bewegt. Abschließend werden in der Telophase, sobald die Chromatiden die Zellpole erreicht haben, neue Kernhüllen gebildet, das Chromatin beginnt zu decondensieren und ein kontraktiler Ring wird gebildet, der während der Zytokinese tiefer wird und somit das Zytoplasma teilt, so dass zwei Tochterzellen entstehen.

Die bedeutendsten Kontrollproteine des Zellzyklus sind heterodimere Proteinkinasen, die Cyclin/CDK-Komplexe, die über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus koordinieren und regulieren [2, 3]. In diesen Komplexen ist die Cyclin-Komponente die regulative-, die CDK (*cyclin-dependent kinase*)-Komponente die enzymatisch aktive Untereinheit. CDKs sind ausschließlich in Verbindung mit Cyclinen aktiv, die selbst wiederum spezifisch zu bestimmten Phasen des Zellzyklus exprimiert werden [4] und über ihre subzelluläre Lokalisierung reguliert werden [5]. Somit sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Zellzyklus unterschiedliche Cyclin/CDK-Komplexe aktiv (siehe Abb. 1.2)

Zudem regulieren weitere Aktivatoren und Inhibitoren die Aktivität dieser Kinasen und ermöglichen hierdurch die Kontrolle des Fortschreitens der Zelle durch die Phasen des Zellzyklus. Dies erfolgt an bestimmten Zeitpunkten, die als "Checkpoints" bezeichnet werden

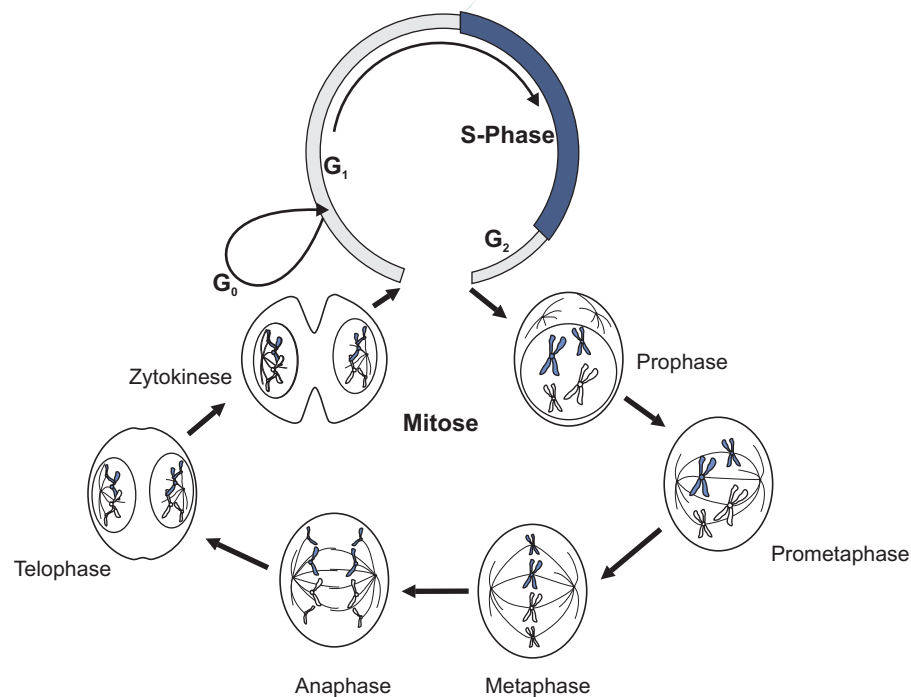


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen. G_0 : Ruhephase; G_1 : Zwischenperiode zwischen Mitose und Synthese-Phase ; G_2 : Zwischenperiode zwischen Synthese-Phase und Mitose; S-Phase: Synthesephase.

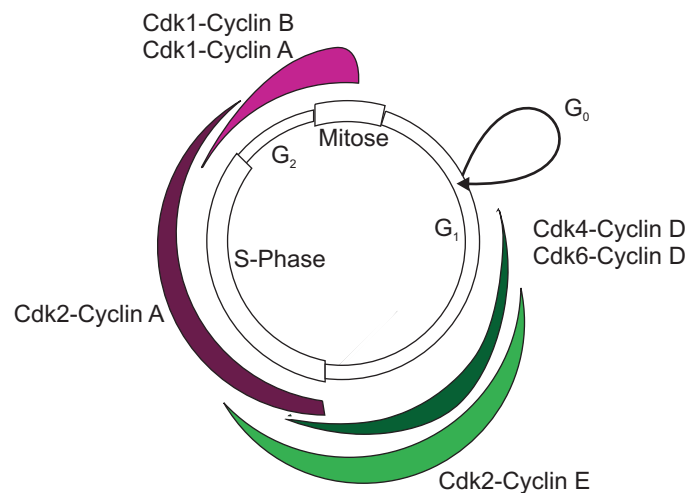


Abbildung 1.2: Regulation der verschiedenen Zellzyklus-Übergänge durch die Aktivität spezifischer Cyclin/CDK-Komplexe. CDK: Cyclin-abhängige Kinase; G_0 : Ruhephase; G_1 : Zwischenperiode zwischen Mitose und Synthese-Phase ; G_2 : Zwischenperiode zwischen Synthese-Phase und Mitose; S-Phase: Synthesephase. Abbildung nach Korf, 2006 [6].

[7, 8]. Solche Kontrollpunkte gewährleisten, dass erst dann der nächste Schritt des Zellzyklus erfolgt, wenn der vorhergehende fehlerlos abgeschlossen ist [9, 10]. Ist dies nicht der Fall, werden Signalwege aktiviert, die zu Zellzyklusarrest und Reparatur oder programmiertem Zelltod (Apoptose) führen [11–13].

1.2 Ubiquitin-abhängige Proteolyse

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch zeitlich kontrollierte Aktivität der CDKs, der Cycline und weiterer Zellzyklusproteine reguliert. Diese zeitliche Kontrolle wird durch verschiedene Mechanismen, wie Regulation der Expression, Phosphorylierung und Interaktion mit regulatorischen Proteinen gewährleistet. Einer der wichtigsten Regulationsmechanismen ist jedoch der zeitgerechte Abbau von Zellzyklusproteinen an den Zellzyklus-Übergängen, da durch diese irreversible Inaktivierung der Proteine eine Richtung im Zellzyklus festgelegt werden kann [14].

Neben der Regulation des Zellzyklus spielt der Ubiquitin-abhängige Abbau von Proteinen eine entscheidende regulative Rolle in weiteren biologischen Prozessen, wie Transkription, DNA Replikation, Differenzierung und der Regulation von Immunantworten [15].

1.2.1 Mechanismus der Ubiquitinierung

Für den Abbau eines Proteins über den Ubiquitin-Proteasom Signalweg wird das Substratprotein zunächst durch die kovalente Bindung mehrerer Ubiquitin-Moleküle markiert. Dieses polyubiquitinierte Protein wird dann spezifisch vom 26S Proteasom, einer makromolekularen Protease, erkannt und abgebaut.

Die Bindung des Ubiquitins, einem hoch konservierten 76 Aminosäure großen Molekül, an das Substratprotein erfolgt in drei Schritten [16]. Zunächst aktiviert ein E1 genanntes Enzym das Ubiquitin, indem es in einer ATP-abhängigen Reaktion eine energiereiche Thioester-Bindung zwischen einem Cystein in seinem aktiven Zentrum und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins bildet. Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf eine Sulfhydrylgruppe eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen, das entweder allein oder in Verbindung mit einer Ubiquitin-Ligase (E3) die Übertragung auf das Zielprotein katalysiert. Hierbei wird das carboxyterminale Glycin des Ubiquitins kovalent mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins verknüpft (Abbildung 1.3). Schließlich werden weitere Ubiquitinmoleküle entweder an die Lys 48 Seitenkette des bereits gebundenen Ubiquitins oder an weitere Lysin-Seitenketten des Substrates gebunden [17, 18]. Auf diese Weise wird das Substrat für den Abbau durch den 26S-Proteasomkomplex markiert [19].

Es gibt keine Anhaltspunkte für eine Beteiligung von E1-Ligasen in der Carcinogenese und nur wenige Veröffentlichungen zeigen einen Zusammenhang zwischen E2-Ligasen und Krebsentstehung [21]. Für verschiedene Komponenten von E3 Ligasen wurde jedoch gezeigt, dass eine Deregulierung zu Krebsentstehung führen kann [22].

1.2.2 E3 Ubiquitin Ligasen

E3 Ubiquitin Ligasen sind entscheidende Bestandteile des Ubiquitin-Proteasom Signalweges, da sie die Substratspezifität der Ubiquitinierungs-Reaktion verantwortlich sind.

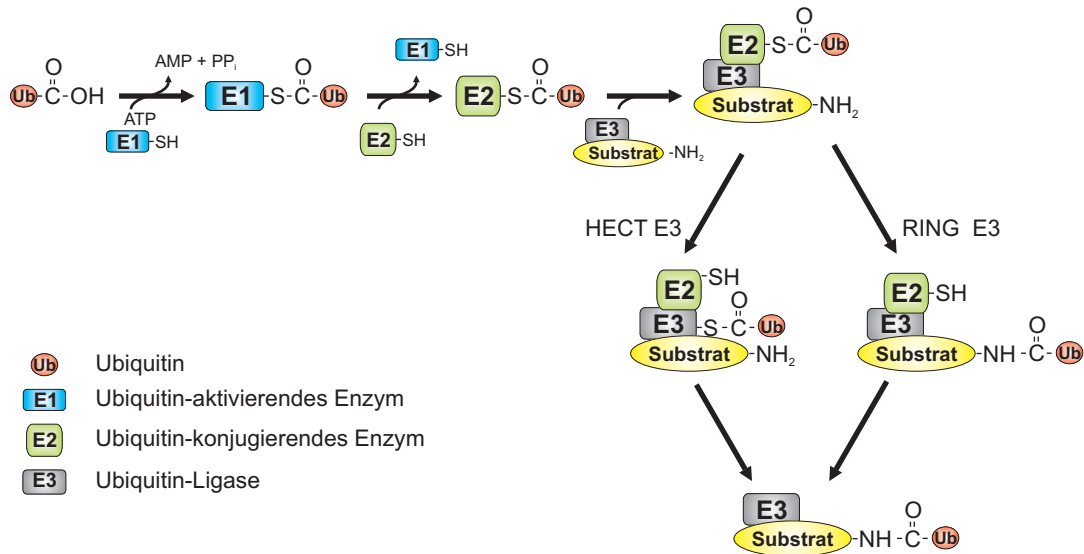


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung Ubiquitinierungs-Kaskade. Abbildung nach Weissman, 2001 [20].

Um diese Spezifität zu gewährleisten, besitzen eukaryotische Zellen eine Vielzahl (etwa 500–1000) verschiedener E3 Enzyme. Bislang konnte hingegen nur ein einziges Ubiquitin-aktivierendes Enzym, E1/Uba1 beschrieben werden und es sind nur wenige Ubiquitin-konjugierende Enzyme bekannt [23].

E3 Ligasen werden aufgrund spezifischer Motive in drei Klassen eingeteilt: HECT-Ligasen (*H*omologous to *E6-AP* *C*arboxy *T*erminus [24]), RING-Finger Ligasen (*R*eally *I*nteresting *N*ew *G*ene [25, 26]) und U-box Ligasen (*U*FD2 *h*omology [27]).

E3 Ligasen, die HECT Domänen enthalten, bilden eine Thioesterbindung zwischen dem Ubiquitin und einem konservierten Cystein innerhalb der HECT-Domäne und übertragen dann das Ubiquitin auf das Substrat (Abbildung 1.3, [28, 29]). RING-Finger E3 Ligasen fungieren hingegen als Adaptermoleküle und arrangieren das E2 Enzym und das Substrat räumlich so, dass das Ubiquitin direkt vom E2 Enzym auf das Substratprotein übertragen werden kann (Abbildung 1.3, [25]). Der RING-Finger ist eine durch die Koordination von zwei Zn^{2+} -Ionen stabilisierte Protein-Protein Wechselwirkungsdomäne, die in Ubiquitin Ligasen meist als E2-Rekrutierungsdomäne agiert [30]. RING-Finger E3 Ligasen bilden die größte Klasse an E3 Ubiquitin Ligasen und kommen sowohl als Monomer (z.B. c-Cbl, Mdm2 (*murine double minute 2*)), als auch als hetero-oligomere Komplexe vor.

Zwei Klassen von E3 Ligasen kommt bei der Zellzyklusregulation besondere Bedeutung zu: Zum einen der “*anaphase promoting complex, APC*” [31–34], sowie der Skp1-Cullin-F-box Protein Komplex, SCF [35].

1.2.3 Der SCF Komplex

SCF-Komplexe sind hetero-oligomere E3-Ubiquitin Ligasen mit einer hohen Substratdiversität [36]. Sie sind aus den Proteinen Skp1 (*S-phase-kinase-associated protein-1*, [37]),

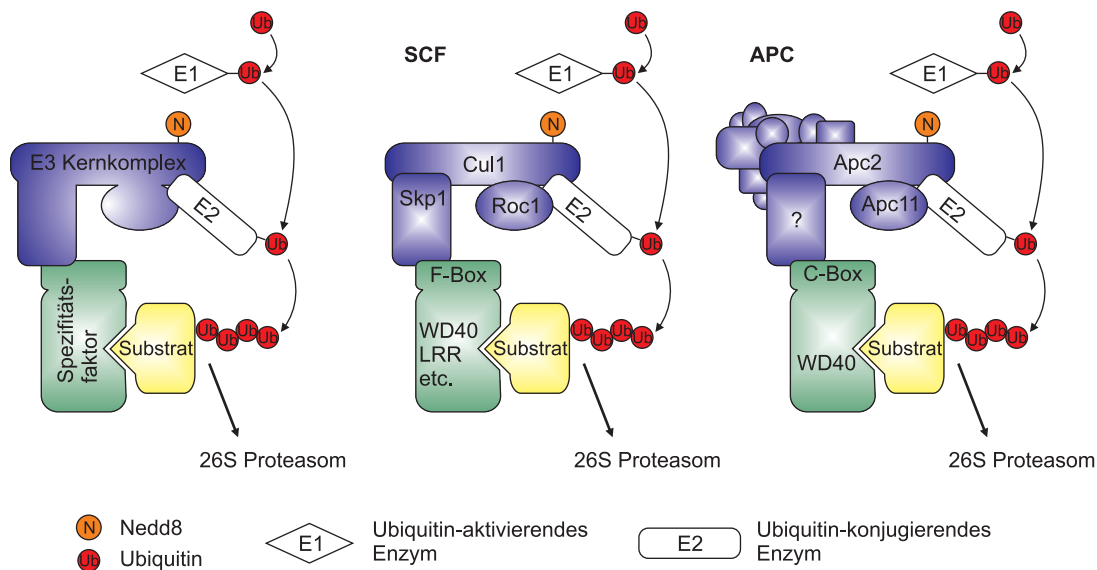


Abbildung 1.4: Struktur der RING-Finger Ubiquitin Ligasen. Links ist der allgemeine Aufbau der RING-Finger E3 Komplexe dargestellt. Der Kernkomplex (blau) besteht aus einem RING-Finger Protein, einem Protein der Cullin-Familie sowie einem Adapterprotein, das den jeweiligen Spezifitätsfaktor (grün) bindet. Die Culline werden durch Nedd8 (orange) modifiziert. Der Kernkomplex bindet das Ubiquitin-beladene E2-Enzym, während das Substrat (gelb) durch den Spezifitätsfaktor rekrutiert wird. Nachfolgend sind die beiden für den Zellzyklus wichtigen RING-Finger E3 Ligasen, der SCF-Komplex sowie der APC dargestellt. Abbildung nach Willems, 2004 [36].

Cul1 [38–40], Roc1 [26, 41, 42] und einem variablen F-Box Protein [37] zusammengesetzt (Abb. 1.4). Das variable F-Box Protein bestimmt hierbei die Substratspezifität des jeweiligen SCF-Komplexes indem es hochspezifisch die entsprechenden Substrate bindet [37].

Die Untereinheit Roc1 besitzt eine RING-Finger Domäne, über die es das E2-Enzym zum SCF-Komplex rekrutiert. Das Cullin Protein Cul1 bindet gleichzeitig im C-Terminus das RING-Finger Protein Roc1 und das E2-Enzym und im N-Terminus das Adapter-Protein Skp1, welches wiederum das F-Box Protein rekrutiert. Die Cullin-Untereinheit dient somit als Grundgerüst (Scaffold Protein) des Komplexes und arrangiert das Substrat und das mit Ubiquitin beladene E2-Enzym räumlich so, dass das Ubiquitin auf das Substrat übertragen werden kann [43]. Die Bindung des F-Box Proteins an Skp1 erfolgt über ein etwa 50 Aminosäuren großes, N-terminales Motiv, das zuerst in Cyclin F beschrieben wurde und daraufhin “F-Box” benannt wurde [37].

Der SCF-Kernkomplex (Skp1, Cul1 und Roc1) besteht während des gesamten Zellzyklus. Die Aktivität des Komplexes wird zum einen durch die Bindung eines substratspezifischen F-Box Proteins reguliert, zum anderen durch posttranslationale Modifikation der Substrate, wie z.B. Phosphorylierung oder Glykosylierung [44–48], die Voraussetzung für die Bindung des F-Box Proteins an das Substrat zu sein scheint. Desweiteren kann die Cullin Untereinheit des Komplexes, Cul1, an einem konservierten carboxyterminalen Lysinrest durch das Ubiquitin-verwandte Protein Nedd8 kovalent modifiziert werden. Diese “Neddylierung” er-

leichtert die E2 Rekrutierung und erhöht die Ubiquitinierungsaktivität des SCF-Komplexes [49, 50].

In humanen Zellen existiert eine große Anzahl an F-Box Proteinen (mindestens 70, [51, 52]). Diese werden aufgrund der Struktur ihrer Substratbindungs-Domäne in 3 verschiedene Klassen eingeteilt [53]: FBWs (F-Box mit WD-40 Domäne) binden ihre Substrate über eine WD-40 genannte β -Propeller Struktur [54], während FBLs eine Leuzin-reiche Substratbindungs-Domäne (LRR, *leucine-rich repeat* [55]) besitzen. In der dritten Klasse (FBXs) befinden sich F-Box Proteine, die weder eine WD-40 Domäne, noch ein LRR enthalten. Diese binden ihr Substrat über andere Protein-Protein Bindungsmotive, wie zum Beispiel Zink-Finger, Prolin-reiche Domänen, Calponin-Homologie (CH) Domänen oder Sec7 Motive.

Die wichtigsten F-Box Proteine in der Zellzyklusregulation sind Skp2 (*S-phase kinase associated protein 2*), Fbw7 (*F-box and WD-40 domain protein 7*), β Trep (*β -transducin repeat-containing protein*) und NIPA (*nuclear interaction partner of Alk*).

1.2.4 Der Anaphase Promoting Complex

Der auch als Cyclosom bezeichnete Anaphase-promoting Complex (APC) ist eine oligomere E3 Ubiquitin Ligase aus 11 Untereinheiten, die eine dem SCF Komplex ähnliche Struktur besitzt (siehe Abbildung 1.4). So besitzt die Untereinheit Apc11 ein RING-Finger Motiv, mit dem es das E2 Enzym rekrutiert [56], während die Cullin-Untereinheit Apc2 ähnlich wie sein Homolog Roc1 im SCF-Komplex als "Scaffold Protein" fungiert [57, 58].

Die wichtigsten Funktionen des APC sind zum einen die für den Austritt aus der Mitose notwendige Inaktivierung der mitotischen Cyclin-abhängigen Kinase Cdk1 durch den Abbau von Cyclin B1 [59, 60] und zum anderen die Ubiquitinierung des Anaphase-Inhibitors Securin. Securin ist die inhibitorische Untereinheit der Separase, einer den Caspasen verwandten Cystein-Protease. Der Abbau von Securin führt zu einer Aktivierung der Separase, die daraufhin das Protein Scc1 (eine Untereinheit des Cohesin-Komplexes) spaltet und somit die Kohäsion zwischen den Schwesterchromatiden aufhebt und die Anaphase einleitet [61, 62].

Weitere Substrate des APC sind zum Beispiel mitotische Kinasen (Plk1 [63], Aurora Kinasen [64–67] und Nek2A (*never in mitosis gene A-related kinase2*) [68, 69]), Spindel-assoziierte Proteine wie z.B. Kip1 [70], Cin8 (*chromosome instability protein 8*) [71] und Xkid [72, 73] oder Replikationsfaktoren wie z.B. Cdc6 (*cell division cycle 6*) [74], Dbf4 [75] oder Geminin [76].

Neben diesen zellzyklus-spezifischen Funktionen spielt der APC aber auch in anderen zellulären Prozessen eine Rolle. So ist er zum Beispiel in der TGF β (*transforming growth factor β*)-vermittelten Signaltransduktion [77, 78] und auch in der Regulation der Differenzierung postmitotischer Neuronen [79, 80] involviert.

Der APC ist zellzyklus-spezifisch ab der Metaphase bis zum Ende der G₁-Phase aktiv [81, 82]. Die APC Aktivität wird hauptsächlich durch die Phosphorylierung mehrerer Untereinheiten [83–86], sowie durch die Bindung von aktivierenden Untereinheiten reguliert.

Diese Aktivatoren binden über die sogenannte "C-box" [87], sowie ein konserviertes Isoleuzin-Arginin Dipeptid, den "IR-tail" [88, 89] an den APC Kernkomplex. Desweiteren besitzen sie in ihrem Carboxy-terminus eine WD-40 Domäne, über die sie die Substrate

des APC binden [90]. Somit fungieren diese Aktivatoren ähnlich wie das F-Box Protein in SCF-Komplexen als Adapterproteine und vermitteln somit die Substratspezifität der Ubiquitinierungsreaktion. In der Mitose wird der APC sequenziell durch die Adapterproteine Cdc20 (*cell division cycle 20*) und Cdh1 (*Cdc20 homolog 1*) aktiviert [91, 92], in der Hefe gibt es zudem zwei Meiose-spezifische Aktivatoren, Ama1 (*AMAnitin resistant*) in *Saccharomyces cerevisiae* [93] und Mfr1 (*meiotic fizzy-related 1*) in *Schizosaccharomyces pombe* [94]. Cdc20 kann nur mit dem APC Kernkomplex interagieren, wenn mehrere Untereinheiten des APC durch die mitotischen Kinasen Plk1 und Cdk1 phosphoryliert wurden [83–85, 95, 96]. Die Bindung von Cdh1 an den APC hingegen wird durch Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinasen in der S und G₂ Phase, sowie in der frühen Mitose inhibiert [96–100]. Somit ist der APC^{Cdc20} in der frühen Mitose, ab der Metaphase aktiv, während der APC^{Cdh1} erst ab der späten Anaphase bis zum G₁/S Zellzyklusübergang aktiv ist, wenn Cdk1 durch den APC^{Cdc20}-vermittelten Abbau von Cyclin A und B inaktiviert wurde und die inhibierende Phosphorylierung von Cdh1 aufgehoben ist.

Das F-Box Protein Emi1 (*early mitotic inhibitor 1*) inhibiert den APC vor dem Eintritt in die Mitose, indem es mit Cdc20 und Cdh1 interagiert und verhindert somit die verfrühte Aktivierung des APC [101–103]. In Prophase wird Emi1 durch die mitotische Kinase Plk1 (*Polo like kinase 1*) phosphoryliert und somit für den Abbau durch SCF^{βTrCP} markiert [104, 105]. Nach dem Abbau von Emi1 wird der APC^{Cdc20} weiter bis zum Ende der Prometaphase durch Bindung des Tumorsuppressorproteins Rassf1A (*Ras association domain family 1*) an Cdc20 inhibiert [106].

Einen weiteren Kontrollmechanismus des APC^{Cdc20} stellt der sogenannte “Spindel-Checkpoint” dar [107–110]. Dieser verzögert den Beginn der Anaphase bis alle Schwesterchromatide korrekt an den Microtubuli befestigt sind. Der APC^{Cdc20} wird durch Bindung der Checkpointproteine Mad2 (*mitotic arrest deficient 2*) und BubR1 an Cdc20 inhibiert [82, 111], so dass die für die Trennung der Schwesterchromatide und den Austritt aus der Mitose wichtigen Substrate Securin und Cyclin B1 nicht abgebaut werden können.

Die meisten Substrate des APC enthalten kurze Erkennungssequenzen, so genannte Degrons, die die spezifische Erkennung durch die APC-Untereinheiten Cdh1 und Cdc20 gewährleisten. Die am weitesten verbreiteten Erkennungssequenzen sind die destruction box (Dbox), RxxLxxxxN [112] und die KEN-box, KENxxxN [113], die sich meist im Aminoterminus der Substrate befinden. Substrate, die eine D-box enthalten, werden vom APC^{Cdc20} ubiquitiniert, während der APC^{Cdh1} sowohl Substrate mit einer D-box, als auch Substrate mit einer KEN-box erkennt. Es gibt jedoch auch einige Substrate, die anstatt funktioneller D-box oder KEN-Box Motive andere Erkennungssequenzen enthalten. So wurde zum Beispiel in der größten Untereinheit des origin recognition complex (Orc1) aus *D. melanogaster* eine neue Erkennungssequenz (O-box: LxxxN) identifiziert, die für den APC^{Cdh1}-spezifischen Abbau erforderlich ist. Diese O-box befindet sich auch im “abnormal spindle” Protein Asp aus *D. melanogaster*, sowie in Cut2, dem Securin-Homolog aus *S. pombe* [114]. Ein weiteres Degron, die A-box (QRLV), wurde in den Aurora Kinasen Aur-A und Aur-B identifiziert, die außerdem eine funktionelle KEN-box enthalten [115, 116].



Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des humanen NIPA Proteins. C: C-Terminus; C3HC: Zink Finger Domäne; F-Box: F-Box Domäne; N: N-Terminus; NLS: Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*); S: Serin-Rest

1.3 Das F-Box Protein NIPA

In einem Yeast-two-Hybrid Screen mit der onkogenen Tyrosinkinase NPM-ALK als Bait wurde NIPA (*Nuclear Interaction Partner of Alk*) als neues Molekül identifiziert. NIPA bindet an Kinase-aktives NPM-ALK und ist in NPM-ALK exprimierenden Lymphomzellen konstitutiv phosphoryliert [117].

Das NIPA-Gen ist im humanen Genom auf Chromosom 7q23.2 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit 10 Exons, das aus 502 Aminosäuren aufgebaut ist. Die NIPA-Sequenz enthält im C-terminalen Ende ein klassisches nukleäres Translokationssignal (NLS), was zu einer ausschließlich nukleären Lokalisierung des NIPA Proteins führt (Abbildung 1.5, [117]). Des Weiteren befindet sich im N-Terminus von NIPA ein potentielles C3HC Zink-Bindungs Motiv. Daher wird NIPA auch als “ZC3HC1” (*zinc finger C3HC-type protein1*) bezeichnet. In solchen Zinkfingerdomänen wird ein Zn^{2+} -Ion von den konservierten Cystein- und Histidinresten koordinativ gebunden, wodurch es zu einer schleifenförmigen Struktur der Polypeptidkette, dem sogenannten Zinkfinger kommt. Dieser Zinkfinger kann spezifisch mit DNA oder RNA interagieren und befindet sich hauptsächlich in Transkriptionsfaktoren [118, 119]. Aber auch Interaktionen mit Proteinen oder Lipiden wurden für Zinkfinger gezeigt [120, 121]. Für das C3HC Zink-Bindungs Motiv in NIPA wurde jedoch durch Strukturanalysen vorhergesagt, dass es sich um ein BIR (*Baculovirus Inhibitor of apoptosis Repeat*)-ähnliches Motiv handelt [122]. Dieses Motiv kommt vor allem in den antiapoptotischen IAP (Inhibitors of Apoptosis) Proteinen vor und vermittelt die Bindung dieser IAP Proteine an diverse proapoptotische Faktoren, insbesondere Caspasen. In manchen Proteinen dienen die BIR-Domänen jedoch nicht der Inhibierung von Caspasen, sondern regulieren diverse Mechanismen, wie zum Beispiel die Funktion der mitotischen Spindel oder die Modulierung einer Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion [123]. Die NIPA-Sequenz in der Region der BIR-Domäne, die in IAPs an der Bindung an Caspasen beteiligt ist, ist sehr divergent zu der entsprechenden Sequenz in IAP Proteinen. Aufgrund dessen besitzt die BIR-Domäne in NIPA vermutlich eine unterschiedliche Funktion, als in IAP Proteinen [122].

NIPA besitzt desweiteren ein N-terminales F-box-ähnliches Motif, über das es an die SCF-Untereinheit Skp1 bindet. Zusammen mit den weiteren Komponenten Skp1, Roc1 und Cul1 bildet NIPA einen aktiven SCF-Komplex (SCF^{NIPA}), der nukleäres Cyclin B1 ubiquitiniert [124]. Cyclin B1 bildet zusammen mit der zugehörigen Cyclin abhängigen Kinase Cdk1 den “*Maturation promoting factor*” (MPF), dessen Aktivierung den entscheidenden Schritt für den Mitose-Eintritt darstellt [125, 126]. Voraussetzung für die Aktivierung des Cdk1/Cyclin B1 Komplexes ist die Translokation von Cyclin B1 in den Zellkern. Bis zur

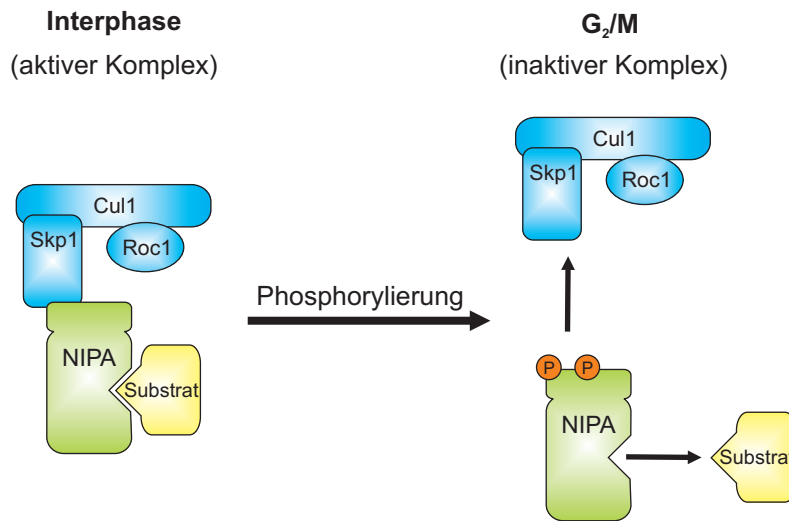


Abbildung 1.6: Regulation des SCF^{NIPA}-Komplexes während des Zellzyklus. Phosphorylierung von NIPA am G₂/M Übergang führt zu einer Dissoziation des SCF^{NIPA}-Komplexes

Einleitung der Mitose wird Cyclin B1 im Zytoplasma der Zelle retiniert, um einen vorzeitigen Mitoseeintritt zu verhindern.

Phosphorylierung von NIPA am G₂/M Übergang führt zu einer Dissoziation der NIPA-Skp1 Bindung und somit zu einer Inaktivierung des SCF^{NIPA} Komplexes. Die Aktivität des SCF^{NIPA} Komplexes ist somit auf das Zellzyklus-Segment von G₁-G₂ beschränkt (Abb. 1.6 [124]). Dieser Mechanismus beschreibt zum ersten Mal die Regulation eines SCF Komplexes durch Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung der F-Box Komponente. Durch diese Zellzyklus-regulierte Aktivität des SCF^{NIPA} Komplexes wird die Degradation von nukleärem Cyclin B1 in Interphase sichergestellt und die zeitgerechte Akkumulation von nukleärem Cyclin B1 in der G₂ Phase gewährleistet. NIPA ist somit direkt an der Kontrolle eines ordnungsgemäßen Ablaufs der Mitose beteiligt und verhindert den verfrühten Mitose-Eintritt.

Durch RNA Interferenz vermittelte Herunterregulation der NIPA Expression in HeLa Zellen führt zu einer verfrühten Aktivierung von nukleärem Cyclin B1-Cdk1 und somit zu einem vorzeitigen Eintritt in die Mitose. Nach dem verfrühten Mitose-Eintritt kommt es in NIPA knock-down Zellen zu einem Zellzyklus-Block in Prometaphase [124]. Dieser Phänotyp ist durch eine verfrühte Akkumulation von Cyclin B1 nicht zu erklären und weist darauf hin, dass die SCF^{NIPA} Ligase vermutlich noch weitere wichtige Substrate ubiquitiniert. Alternativ könnte dieser Phänotyp auch Folge einer genetischen Instabilität dieser Zellen aufgrund der verfrühten Mitose sein in deren Folge Zellzyklus-Kontrollpunkte aktiviert werden.

Als Phosphorylierungsstellen in NIPA wurden die Serine Ser354, Ser359 und Ser395 identifiziert. Der Cdk1/Cyclin B1 Komplex ist in der Lage, NIPA am Serinrest 395 *in vivo* und *in vitro* zu phosphorylieren. Vermutlich führt eine initiale Phosphorylierung an den Serinen Ser 354 und 359 durch eine bis jetzt unbekannte Kinase zur Dissoziation des SCF^{NIPA} Komplexes und somit zu einer Akkumulation von Cyclin B1. Anschließend phosphoryliert

der nun aktive Cdk1/Cyclin B1 Komplex NIPA an Serin 395 und gewährleistet hierdurch in einem positiven Feedback-loop seine eigene Aktivität [127].

Eine phosphorylierungs-defiziente Mutante von NIPA (NIPA S354A) bildet einen konstitutiv aktiven SCF^{NIPAS354A} Komplex, der nicht am G₂/M-Übergang dissoziiert und folglich auch während dieser Zellzyklusphase in der Lage ist, nukleäres Cyclin B1 zu ubiquitinieren. Überexpression von NIPA S354A führt somit zu einem stark verzögerten Anstieg von nukleärem Cyclin B1 am G₂/M-Übergang und in Folge dessen zu einem mitotischen Block in Prophase [124].

Die Substratbindungsdomäne in NIPA, über die die Bindung an sein Substrat Cyclin B1 vermittelt wird, umfasst die Aminosäuren 352–402 [127]. Interessanterweise befindet sich in dieser Region das Signal für die nukleäre Lokalisierung von NIPA (NLS). Auf diese Weise wird sichergestellt, dass ausschließlich nukleäres Cyclin B1 durch den SCF^{NIPA} Komplex ubiquitiniert und anschließend abgebaut wird. Da die Substratbindung nicht über eine WD-40 Domäne oder ein LRR stattfindet, kann NIPA der Gruppe der FBX F-Box Proteine zugeordnet werden.

NIPA Knockout-Mäuse sind viabel und zeigen eine normale Entwicklung, haben jedoch eine verminderte Körpergröße im Vergleich zu wildtyp Mäusen. NIPA^{-/-} Männchen sind infertil, während weibliche knockout Mäuse eine verminderte Fertilität aufweisen. Da das Fehlen von NIPA auch in Keimzellen zu einer verfrühten Akkumulierung von nukleärem Cyclin B führt, sind NIPA^{-/-} Spermatozyten nicht in der Lage, die meiotische Prophase zu vollenden. Sie arretieren im Zygoten/frühes Pachyten-Stadium der Prophase I und gehen anschließend in Apoptose. Die Testes der knockout Tiere sind atrophisch und enthalten keine Spermatozoen, ebenso sind die Ovarien der NIPA^{-/-} Weibchen atrophisch und es werden weniger Primordialfollikel gebildet. Diese Daten zeigen, dass NIPA auch in der Meiose eine wichtige Rolle spielt (Illert et al., unveröffentlichte Daten).

1.4 Die DNA Schadensantwort

Das Genom unterliegt dem ständigen Angriff DNA-schädigender Substanzen, die zum einen endogen als (Neben-)Produkte des normalen zellulären Metabolismus entstehen (wie zum Beispiel verschiedene Sauerstoff-Radikale) oder exogene Umwelteinflüsse (wie zum Beispiel die UV-Komponente im Sonnenlicht, ionisierende Strahlung oder genotoxische Chemikalien) darstellen. Liegen Schädigungen an der DNA vor, werden Zellzykluskontrollpunkte, sogenannte “DNA damage-Checkpoints” aktiviert. Dies sind Signalkaskaden, die den Zellzyklus nach einer Schädigung der DNA verlangsamen oder arretieren, bis der Schaden repariert ist [128]. Desweiteren regulieren sie die Reparatur der geschädigten DNA, sind an der Reorganisation des Chromatins beteiligt und modulieren nach der DNA-Schädigung die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren. Im Fall einer irreparablen Schädigung der DNA kann auch ein permanenter Zellzyklusarrest (Seneszenz) oder Apoptose induziert werden [129, 130].

Die wichtigsten Zellzykluskontrollpunkte nach DNA-Schädigung sind der G₁/S-Checkpoint, der Intra-S-Checkpoint und der G₂/M-Checkpoint [129]. Der G₁/S-Checkpoint verhindert, dass die Zelle mit einer DNA-Schädigung in die S-Phase fortschreitet und sich die Schädigung durch die Duplikation des Genoms auf beiden Chromatiden manifestieren kann.

Findet eine Schädigung der DNA während der Replikation statt, führt die Aktivierung des Intra-S-Checkpoints zu einer transienten Verlangsamung der DNA-Replikation. Wird während dieser Verzögerung der S-Phase der DNA-Schaden nicht repariert, arretieren die Zellen in der darauffolgenden G₂-Phase. Der G₂/M-Checkpoint verhindert das Eintreten der Zelle mit einer DNA-Schädigung in die Mitose und somit die Segregation gebrochener oder unreparierter Chromosomen. Defekte in diesen Checkpointmechanismen führen zu genetischer Instabilität und prädisponieren für Krebserkrankungen.

Die an dieser DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine werden in Sensoren, Signalumwandler (Transduktoren) und Effektoren eingeteilt [129]. Sensorproteine sind direkt oder indirekt an der Erkennung der DNA-Schädigung beteiligt und initiieren die folgende Signalkaskade. Die Transduktoren sind typischerweise Kinasen, die das von den Sensoren gesendete Signal durch Phosphorylierung von Schlüsselproteinen der verschiedenen Signalwege weiterleiten und amplifizieren. Eine zentrale Funktion bei dieser frühen Signaltransmission spielen die beiden Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKKs) ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and rad-3 related*), sowie deren nachgeschaltete Checkpointkinasen Chk1 und Chk2. Hierbei aktiviert gewöhnlich ATM die Checkpointkinase Chk2 in Folge von DNA Doppelstrangbrüchen, während ATR durch DNA Einzelstrangbrüche und blockierte Replikationsgabeln aktiviert wird und die Checkpointkinase Chk1 phosphoryliert und aktiviert [130]. Es gibt jedoch einige Überschneidungen dieser beiden Signalwege [129, 131]. Diese Elemente der Signaltransduktion sind Bestandteil der DNA-Schadensantwort in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen und auch in unterschiedlichen Zelltypen. Die Effektorproteine hingegen, die die Funktionen der DNA-Schadensantwort durchführen, können in der G₁-Phase, der S-Phase oder der G₂/M-Phase unterschiedlich sein (siehe Kap. 1.4.1 und 1.4.2). Diese Effektorproteine greifen direkt in die Zellzykluskontrolle oder andere Prozesse der Zellregulation ein und vermitteln hierdurch die diversen Reaktionen der Zelle auf die Schädigung der DNA.

Im Folgenden soll nun eine kurze Übersicht über die molekularen Grundlagen des Checkpoint-induzierten Zellzyklusarrests in den verschiedenen Zellzyklusphasen gegeben werden.

1.4.1 Der G₁/S Checkpoint und Intra-S-Checkpoint

Ein essentielles Ereignis am G₁/S-Übergang ist die Beseitigung der inhibierenden Phosphorylierung am Tyrosinrest Tyr15 in Cdk2 durch die Phosphatase CDC25A [132]. Nach Schädigung der DNA wird CDC25A durch die Kinasen Chk1 und Chk2 phosphoryliert und hierdurch für den Abbau über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg markiert [133, 134]. Somit wird die Phosphorylierung an Tyr15 in Cdk2 aufrechterhalten und die daraus resultierende Inhibierung der Cyclin E/Cdk2-Aktivität führt zu einem Zellzyklusarrest am G₁/S-Übergang (siehe Abb. 1.7 a).

An der Aufrechterhaltung des G₁/S Checkpoints ist ein zweiter, p53-abhängiger Signalweg beteiligt. Phosphorylierung von p53 am Serinrest Ser20 durch die Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 führt zu einer Dissoziation von der Mdm2 Ubiquitin Ligase und somit zu einer Stabilisierung des p53 Proteins [136, 137]. Desweiteren aktivieren ATM und ATR p53 über eine Phosphorylierung des Serinrests Ser15 [138]. Zusätzlich wird Mdm2 von ATM und ATR phosphoryliert und ist hierdurch nicht mehr in der Lage, p53 aus dem Zellkern in das Zytoplasma zu exportieren, so dass p53 im Zellkern akkumulieren kann [139]. Die

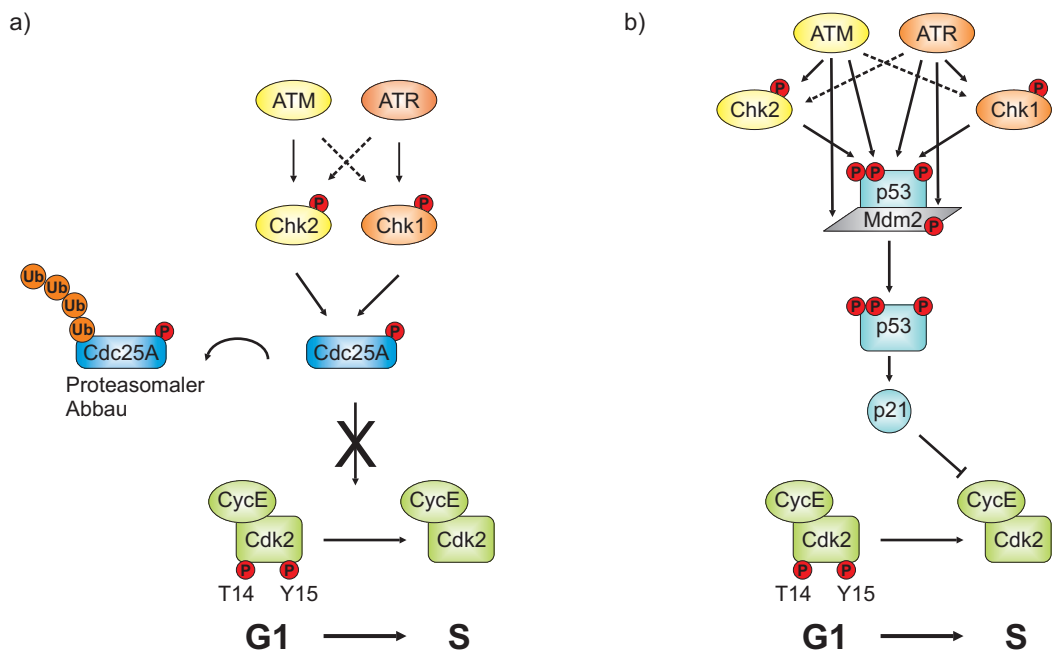


Abbildung 1.7: Molekulare Mechanismen des G₁/S-Checkpoints Abbildung nach Donzelli, 2003 [135]

Akkumulierung des Transkriptionsfaktors p53 führt unter anderem zu einer Expression des CDK-Inhibitors p21. p21 bindet und inhibiert den Cyclin E/Cdk2-Komplex und trägt somit zu einer Aufrechterhaltung des G₁/S-Checkpoints bei [140, 141] (Abbildung 1.7 b).

Der Intra-S-Checkpoint wirkt ebenso, wie der G₁/S-Checkpoint über die Inhibition der Cdk2-Aktivität durch Degradation der CDC25A Phosphatase. p53-abhängige Mechanismen sind an diesem Checkpoint allerdings nicht beteiligt.

1.4.2 Der G₂/M Checkpoint

Ähnlich wie der G₁/S Checkpoint funktioniert auch der G₂/M Checkpoint hauptsächlich über die Inhibition der Cdk Kinaseaktivität durch die Aufrechterhaltung der inhibierenden Phosphorylierung am Tyrosinrest Tyr15. Chk1 und Chk2 phosphorylieren die CDC25C Phosphatase [142, 143]. Durch diese Phosphorylierung wird eine Bindungsstelle an CDC25C für 14-3-3 Proteine gebildet. Die Bindung der 14-3-3 Proteine führt zu einer Relokalisierung von CDC25C ins Zytoplasma und somit zu einer Aufrechterhaltung der inhibierenden Phosphorylierung an Cdk1 [144, 145] (Abbildung 1.8 a). Desweiteren führt ebenso wie am G₁/S Checkpoint eine Checkpointkinasen-vermittelte Phosphorylierung zum Abbau von CDC25A [146, 147].

Darüber hinaus scheint p53 auch eine, wenn auch nicht essentielle, Rolle am G₂/M-Checkpoint zu spielen [148]. Die durch Schädigung der DNA induzierte Akkumulierung und Aktivierung von p53 bewirkt die Expression von GADD45 (*growth arrest- and DNA damage-inducible 45*) [149]. Dieses Protein kann Cdk1/Cyclin B Komplexe destabilisieren und bewirkt möglicherweise hierdurch eine Inaktivierung von Cdk1 nach Schädigung der

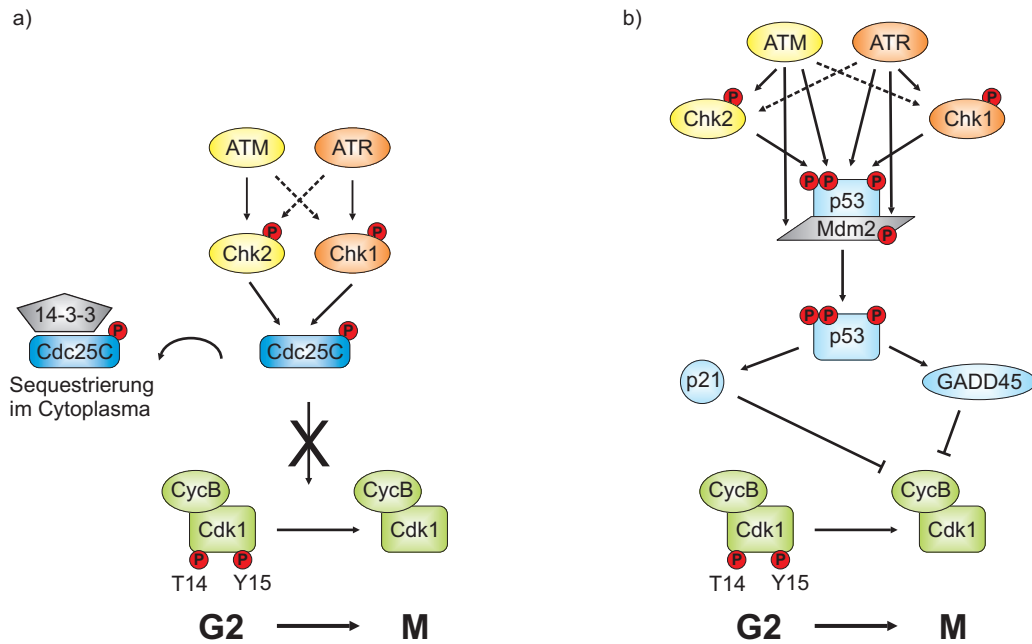


Abbildung 1.8: Molekulare Mechanismen des G₂/M-Checkpoints Abbildung nach Donzelli, 2003 [135]

DNA [150]. Der G₂-Kontrollpunkt hängt desweiteren teilweise auch von der transkriptionellen Aktivierung von p21 durch p53 und der anschließenden Inhibierung der Cyclin A- und Cyclin B/Cdk Komplexe durch p21 ab [8] (Abbildung 1.8 b).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1.) Das F-Box Protein NIPA ist durch den zeitgerechten Abbau von nukleärem Cyclin B1 direkt an der Kontrolle eines ordnungsgemäßen Ablaufs der Mitose beteiligt. Dies ist von großer Bedeutung, da ein verfrühter Mitose Eintritt mit der möglichen Konsequenz fehlerhafter Genom-Verdoppelung und damit genetischer Instabilität assoziiert ist. Frühere Experimente zeigen, dass eine Inaktivierung von NIPA diesen Kontrollpunkt signifikant stört, da NIPA knock-down Zellen einen verfrühten Mitose-Eintritt haben können und nachfolgend einen Block in der Prometaphase zeigen. Die Inaktivierung der SCF^{NIPA} E3-Ligase kann prinzipiell durch zwei Mechanismen erfolgen: durch Phosphorylierung oder durch Degradation des F-Box Proteins NIPA. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob NIPA im Zellzyklus neben der inaktivierenden Phosphorylierung auch durch proteasomalen Abbau reguliert wird.

2.) Treten in einer nicht transformierten Zelle Schädigungen der DNA oder andere massive Stress-Situationen auf, so wird der Zellzyklus arretiert, bis der Schaden behoben ist. Der Zellzyklusarrest wird großteils durch negative Regulation der Cyclin-CDK-Komplexe an

den verschiedenen Zellzyklus-Übergängen gewährleistet. Die einzelnen Komponenten der Signalkaskaden, die zu dieser Inhibierung der Cyclin-CDK-Komplexe führen, sind weitgehend Proteine, die auch im ungestörten Zellzyklus an der Regulation der Cyclin-CDK-Komplexe beteiligt sind. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob der SCF^{NIP^A}-Komplex im Rahmen der Signalantwort einer Zelle nach Schädigung der DNA moduliert wird.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und biogene Substanzen

Acrylamid/Bisacrylamid Gel 30	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Aqua ad injectabilia, steril	Braun, Melsungen
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Caffein	Calbiochem, Darmstadt
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Boehringer, Mannheim
Cycloheximid (CHX)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Heidelberg
dNTP-Mix, 10 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka Chemie, Taufkirchen
Glycerol	Fluka Chemie, Taufkirchen
Glycerol-2-phosphat	Aldrich Chemical Company, Steinheim
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kreatinphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Fluka Chemie, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Fluka Chemie, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Nocodazol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Phosphat buffered saline (PBS), 10-fach, fest	Biochrom AG, Berlin
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Protein A Sepharose-Lösung	Pharmacia Biotech, Freiburg

Protein G Sepharose-Lösung	Pharmacia Biotech, Freiburg
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
SlowFade [®] Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SuperSignal [®] Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka Chemie, Taufkirchen
Thymidin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Trockenmilchpulver	Fluka Chemie, Taufkirchen
Trypanblau	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Fluka Chemie, Taufkirchen
Ubiquitin	Fluka Chemie, Taufkirchen
Ubiquitininaldehyd	Biomol, Hamburg
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.2 Medien und Supplemente für die Zellkultur

DMEM, Zellkulturmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DOTAP, Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
Gene Porter, Transfektionsreagenz	Gene Therapy Systems, San Diego (USA)
Hygromycin B	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine [™] 2000, Transfektionsreagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
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
Trypsin-EDTA-Lösung, 10-fach	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zeocin, 100 mg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.3 Proteasominhibitoren

MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.4 Radiochemikalien

³⁵S-Methionin Hartmann Analytic, Braunschweig

2.5 Molekulargewichtsmarker für DNA und Proteine

1 kb Plus DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rainbow Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Biosciences, Braunschweig

2.6 Enzyme

2.6.1 Restriktionsenzyme

Die für die Klonierungen verwendeten Restriktionsenzyme (AscI, BamHI, DpnI, NotI, SpeI und XhoI) wurden von der Fermentas GmbH in St. Leon-Rot bezogen.

2.6.2 DNA Polymerasen

Pfu-DNA Polymerase Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
 Taq-DNA Polymerase Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.6.3 Enzyme für Ubiquitinierungs-Reaktionen und Degradationsversuche

Kreatin Phosphokinase Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
 E1 (human, rekombinant, His6-tagged) Biomol, Hamburg
 UbcH10 (human, rekombinant, His6-tagged) Biomol, Hamburg

2.6.4 weitere Enzyme

RNasin, Ribonuclease Inhibitor Promega, Heidelberg
 Shrimp Alkalische Phosphatase Amersham, Braunschweig

2.7 Antikörper

Anti- β -Aktin (AC-15), monoklonal, Maus IgG1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Cdh1 (Ab-2), monoklonal, Maus IgG1	Calbiochem, Darmstadt
Anti-Cdc20 (H175), polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Cdc27 (AF3.1), monoklonal, Maus IgG2b	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-c-myc (9E10), monoklonal, Maus IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Cyclin A1 (H-230), polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Cyclin B1 (H-433), polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Flag (M2), monoklonal, Maus IgG1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Flag (M2), Agarose gekoppelt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-HA (Y-11), polyklonal, Kaninchen IgG	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert, Esel IgG	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus, Alexa Fluor [®] 594-konjugiert, Ziege IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-Mdm2 (SMP14), monoklonal, Maus IgG1	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-NIPA, polyklonal, Maus	Dauids Biotechnologie, Regensburg [124]
Anti-NIPA phospho S354, polyklonal, Kaninchen IgG	Abcam, Cambridge, UK
Anti-p53, polyklonal, Kaninchen IgG	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
Anti-Skp1, polyklonal, Kaninchen IgG	Zymed, San Francisco

2.8 Bakterienstämme

Escherichia Coli DH5 α TM F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Epicurian Coli TM XL-1 Blue Supercompetent Cells <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg
OneShot [®] BL21 Star TM (DE3) Chemically Competent E.coli F- <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (<i>r_B⁻</i> <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>rne131</i> (DE3)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.9 Zelllinien

293T	humane embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie
Cos-1	Nierenepithel-Zelllinie der grünen Meerkatze, SV-40 transformiert
GM18366	Fibroblasten eines Patienten mit Seckel-Syndrom
GM09607	pSVori-transformierte Fibroblasten eines Patienten mit Ataxia Telangiectasia
GeneSwitch TM -3T3	murine embryonale Fibroblasten Zelllinie, die stabil mit pSwitch transfiziert wurden
HCT 116	humane Kolonkarzinom-Zelllinie
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
MEFs NIPA ^{+/+}	immortalisierte murine embryone Fibroblasten, wildtyp
MEFs NIPA ^{-/-}	immortalisierte murine embryone Fibroblasten, NIPA ^{-/-}
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie
U2OS	humane Osteosarkom Zelllinie

Die Seckel- und Ataxia Telangiectasia Fibroblasten wurden beim Coriell Institute for Medical Research in Camden (USA) erworben, die restlichen Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig bezogen. Die immortalisierten MEF-Zelllinien wurden in dieser Abteilung von A.L. Illert generiert.

2.10 Molekularbiologische Kitsysteme

APO-DIRECT TM Kit	BD Biosciences, Heidelberg
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Spin Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange TM Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Penzberg
Rediprime [®] II DNA Labeling System	Amersham Biosciences, Braunschweig

2.11 Vektoren und DNA-Konstrukte

pcDNA3.1 Zeo (+)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pCMV-Vektoren	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGene/V5-His	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGex-4T2	Pharmacia, Freiburg
HA-Cdh1 in pCMV	M. Pagano, New York
Myc-Cdh1 in pCMV	diese Arbeit
HA-Cdc20 in pCMV	M. Pagano, New York
Flag-NIPA wt in pCDNA 3.1/Zeo	T. Ouyang, diese Abt. [117]
Flag-NIPA Dbox1 in pCDNA 3.1/Zeo	diese Arbeit
Flag-NIPA Dbox2 in pCDNA 3.1/Zeo	diese Arbeit
Flag-NIPA Dbox1+2 in pCDNA 3.1/Zeo	diese Arbeit
Flag-NIPA F-Box Mutante in pCDNA 3.1/Zeo	F. Bassermann, diese Abt. [124]
Flag-NIPA Ser354Ala in pCDNA3.1/Zeo	T. Ouyang, diese Abt. [117]
Flag-NIPA AAA (Ser354,359,395Ala) in pCDNA3.1/Zeo	F. Bassermann, diese Abt. [127]
Flag-NIPA DDD (Ser354,359,395Asp) in pCDNA3.1/Zeo	diese Arbeit
Flag-NIPA RKK (NLS-Mutante) in pCDNA3.1/Zeo	T. Ouyang, diese Abt. [117]
Flag-NIPA ZF (Zinkfinger-Mutante) in pCDNA3.1/Zeo	diese Arbeit
Myc- NIPA wt in pCMV	T. Ouyang, diese Abt. [117]
Flag-NIPA wt in pGene/V5-His	diese Arbeit
Flag-NIPA S354A in pGene/V5-His	diese Arbeit
GST-NIPA wt in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 1-402 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 1-302 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 1-202 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 1-102 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 302-402 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 327-377 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 302-352 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 352-402 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 352-394 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [127]
GST-NIPA 352-397 in pGEX	diese Arbeit
GST-NIPA 352-399 in pGEX	diese Arbeit
GST-NIPA 352-502 in pGEX	diese Arbeit
GST-NIPA 352-502 Δ 375–402 in pGEX	diese Arbeit
GST-NIPA 352-502 Δ 395–402 in pGEX	diese Arbeit
Skp1 in pcDNA3.1	Z.-Q. Pan, New York
GST-Skp1 in pGEX	F. Bassermann, diese Abt. [124]
HA-Ubiquitin in pCMV	W. Krek, Zürich
pGene/V5-His/lacZ	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.12 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

2.12.1 Primer für Klonierungen

Flag-F-SpeI	5'-TCCACTAGTCATGGATTACAAGGATGAC-3'
NIPA-352-F-BamHI	5'-GTCCGGATCCCGGAGCTGGGACTCTTCCAG-3'
NIPA-390-F-BamHI	5'-CTGGGATCCCTGGAGGTACCATCTAGC-3'
NIPA-395-F-BamHI	5'-CTGGGATCCAGCCCTCTGCGGAAAGCC-3'
NIPA-397-R-XhoI	5'-GTACTCGAGCAGAGGGCTAGATGGTACC-3'
NIPA-399-R-XhoI	5'-GTACTCGAGTTTCCGCAGAGGGCTAGATGG-3'
NIPA-R-NotI	5'-GACCTCGAGCGGCCGCTCAGCATGAGCACAGAGA-3'
NIPA-R-XhoI	5'-CTGCTCGAGTCAGCATGAGCACAGAGATTC-3'

2.12.2 Primer für Mutagenese mittels PCR

AscI-375-F	5'-CCCACCACCAGGGCGCGCCCAGTGACC-3'
AscI-375-R	5'-GGTCACTGGGCGCGCCCTGGTGGTGGG-3'
AscI-395-F	5'-CCTGGAGGTACCGGCGCGCCCTCTGCGGA-3'
AscI-395-R	5'-TCCGCAGAGGGCGCGCCGGTACCTCCAGG-3'
AscI-402-F	5'-AAAGCCAAGCGGGCGCGCCTCTGCTCC-3'
AscI-402-R	5'-GGAGCAGAGGCGCGCCCGCTTGGCTTT-3'
Dbox1-F	5'-GCGACCAGAGGCCTTACCTGCGGTGCTGAAT-3'
Dbox1-R	5'-ATTCAGGCACCGCAGGTAAGGCCTCTGGTCGC-3'
delDbox1-F	5'-GAGGGGCGACCAGAGGTGCCTGAATCTCCT-3'
delDbox1-R	5'-AGGAGATTTCAGGCACCTCTGGTCGCCCTC-3'
Dbox2-F	5'-GAAAGCCAAGGCAGCTCGCGCCTGCTCCTCCA-3'
Dbox2-R	5'-TGGAGGAGCAGGCGCGAGCTGCCTTGGCTTTC-3'
delDbox2-F	5'-CTGCGGAAAGCCAAGTGCTCCTCCAGCAGT-3'
delDbox2-R	5'-ACTGCTGGAGGAGCACTTGGCTTTCGCGAG-3'
C117A,C120A-F	5'-TATGCTCAAGGCCTCTAGCGCTCAAGCTTTTC-3'
C117A,C120A-R	5'-GAAAAGCTTGAGCGCTAGAGGCCTTGAGCATA-3'
H152A,C156A-F	5'-GTGTACTGCCGCTGAGAAGTTTCGCTTTCTGGCC-3'
H152A,C156A-R	5'-CTGGCCAGAAAGCGAACTTCTCAGCGGCAGTACAC-3'
S354D-F	5'-TCTCGAACTCGGGACTGGGACTCTTCC-3'
S354D-R	5'-GGAAGAGTCCCAGTCCCAGTTCGAGA-3'
S359D-F	5'-TGGGACTCTTCCGATCCTGTTGACCGTCC-3'
S359D-R	5'-GGACGGTCAACAGGATCGGAAGAGTCCCA-3'
S395D-F	5'-GAGGTACCATCTGACCCCTCTGCGGAAAGCC-3'
S395D-R	5'-GGCTTTCGCGAGAGGGTCAGATGGTACCTC-3'

2.12.3 Primer für Sequenzierungen

T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
BGH rev	5'-GGCAACTAGAAGGCACAGTC-3'
pGene for	5'-CTGCTATTCTGCTCAACCT-3'
pGex for	5'-ATAGCATGGCCTTTGCAGG-3'
pGex rev	5'-GAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'
NIPA-495-F	5'-CATCCCCAGACCGATTTGGGATGTTGCC-3'

2.12.4 siRNA Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Moleküle wurden bei der Firma Prologo (Paris) in Auftrag gegeben. Es handelt sich hierbei um synthetisch hergestellte, 21 Nukleotide lange dsRNA Moleküle mit einzelsträngigen dTdT-Überhängen an den 3'-Enden. Die Zielsequenzen der verwendeten siRNAs sind untenstehend aufgeführt:

ATM	AACAUACUACUCAAGACAUU [151]
ATR	AACCUCGUGAUGUUGCUUGA [152]
Cdh1	AAUGAGAAGUCUCCCAGUCAG [153]
Luziferase	CGUACGCGAAUACUUCGA [154]

2.13 Standardgeräte

Agarosegel Elektrophoresekammer	Kodak, 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
Mini-Gel Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Multi-Gel Long Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Reichert, New York, USA
PCR-Thermocycler	MWG-Biotech, Ebersberg

pH-Meter Φ 32	Beckman, Fullerton, USA
Schüttler WT 12	Biometra, Göttingen
Sterile Werkbank, Laminar-Flow 1.8	Holten, Gydevang, Dänemark
Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
Stromgenerator, Powerpack P25	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Transphor Electrophoresis Unit	Hofer, San Fransisco, USA
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortex REAX-Top	Heidolph, Nürnberg
Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifuge GS-6K	Beckman, Fullerton, USA

2.14 Software

FlowJo Flow Cytometry Analysis Software, Version 4.6.2 Tree Star, Ashland, USA

2.15 Standard Lösungen und Puffer

Amidoschwarz-Färbelösung:	0,2% Naphtol Blau Schwarz 25% Isopropanol 10% Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung:	25% Isopropanol 10% Essigsäure
Blockierlösung für Westernblot:	5% (w/v) Trockenmilchpulver 0,1% Tween 20 in PBS
Coomassie-Färbelösung:	0,25% Brilliant Blau 45% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung:	45% Methanol 10% Essigsäure
Degradationspuffer (5-fach):	7,5 mg/ml Ubiquitin 5 mM ATP 5 mM MgCl ₂ 0,5 mg/ml CHX 37,5 mM Phosphokreatin 1 mg Kreatin Phosphokinase 0,1 M DTT

Denaturierungspuffer (2-fach):	2 mM DTT 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 2% SDS
DNA Probenpuffer (10-fach):	60% Glycerol 0,2% Bromphenol Blau 0,2 M EDTA in A.d.
Elutionspuffer (für GST-Fusionsproteine):	20 mM reduziertes Glutathion 100 mM Tris/HCl (pH 8,0) 120 mM NaCl
GST-Pulldown Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM NaCl 5 mM EDTA 0,1% Triton X-100 20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,5) 10 mM Natriumpyrophosphat (pH 7,0) 1 mM Natriumorthovanadate 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
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 7,0) 1 mM Natriumorthovanadate 20 mM Natriumfluorid 1 mM Glycerol-2-Phosphat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
Lysis-Puffer für APC-Aufreinigung:	50 mM Tris/HCl (pH 7,5) 250 mM NaCl 0,1% Triton 100 1 mM EDTA 50 mM NaF 1 mM Natriumorthovanadat 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.

NETN-Puffer:	0,5% (v/v) NP40 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF 1 mM Benzamidin 1 Protease-Inhibitor Cocktail Tablette ad 10 ml A.d.
QA-Puffer:	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 100 mM KCl 1 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM DTT
Sammelgelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	0,5 M Tris (pH 6,8<9) 0,4% SDS in A.d.
SDS-Elektrophoresepuffer:	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.
TAE-Puffer (10-fach):	0,4 M Tris 1,1% Essigsäure 10 mM EDTA (pH 8,0) in A.d.
Transferpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol 0,1% SDS in A.d.
Trenngelpuffer für SDS-Gele (4-fach):	1,5 M Tris (pH 8,8) 0,4% SDS in A.d.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Restriktionsverdau

Um für Klonierungsansätze geeignete DNA-Fragmente zu erhalten oder zur Charakterisierung von Plasmiden wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese Enzyme erkennen kurze Palindrome in doppelsträngiger DNA und führen Brüche im Zucker-Phosphat Rückgrat an diesen Sequenzabschnitten ein [155]. Dabei entstehen je nach Enzym komplementäre, überhängende Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Die Aktivität der Enzyme wird in units (U) angegeben. Ein unit entspricht der Menge an Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 μg Lambda-DNA in einer Stunde an allen vorhandenen Schnittstellen zu schneiden. Eine vollständige Spaltung der DNA wird sichergestellt, indem die Restriktionsendonuklease im Überschuss zugegeben wird.

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer inkubiert. In der Regel erfolgt die Inkubation bei 37°C für 2 h. Nach erfolgter Reaktion wird das Enzym durch Erhitzen auf 65°C denaturiert oder durch Aufreinigung im Agarosegel aus dem Reaktionsansatz entfernt.

3.1.2 Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Vektoren, die zu Klonierungszwecken nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten werden, müssen zur Verhinderung der Rezirkularisierung vor der Ligationsreaktion mit alkalischer Phosphatase behandelt werden. Dieses Enzym entfernt an den von der Restriktionsendonuklease erzeugten Enden die 5'-Phosphatgruppe. Somit ist die Ligase nicht mehr in der Lage, die Vektorstränge wieder kovalent zu schließen. Eine kovalente Verknüpfung ist daher nur mit dem Insert möglich, da es intakte 5'-Phosphatgruppen besitzt.

Nach dem Restriktionsverdau wurde die alkalische Phosphatase CIP (*calf intestinal phosphatase*) direkt in den Restriktionsansatz gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 65°C für 10 min inaktiviert.

3.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung von zirkulärer Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten werden native Agarosegele eingesetzt. Agarose ist ein aus Meeresalgen aufgereinigtes Polysaccharid und bildet nach Aufkochen in Pufferlösung beim anschließenden Abkühlen eine Matrix aus. Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Wird die angelegte Spannung gering gehalten, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA dem Logarithmus ihres Molekulargewichts umgekehrt proportional [156]. Die Zugabe DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid, ermöglicht die Visualisierung der DNA-Fragmente nach

Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm. Zur Größenbestimmung werden DNA-Molekulargewichtsmarker mit aufgetrennt.

Für die Herstellung eines Agarosegels wird die Agarose in TAE-Puffer (Kap. 2.15) vorsichtig aufgeköcht, bis die Lösung klar und schlierenfrei ist. Nach Abkühlen auf 50°C wird die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einem Gelträger mit Taschenschablone ausgegossen. Die Auftrennung der mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA erfolgt in einer mit TAE-Puffer gefüllten DNA-Elektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 20–210 V. Nach erfolgter Elektrophorese werden die Nukleinsäuremoleküle visualisiert und fotografisch dokumentiert oder zur präparativen Isolierung ausgeschnitten.

3.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten nach ihrer elektrophoretischen Trennung in Agarose-Gelen wurden diese unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des “QIAquick® Gel Extraction Kit” nach Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert.

3.1.5 Ligation von DNA-Doppelstrang-Fragmenten

Linearisierte DNA-Moleküle können durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden miteinander verbunden werden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert diese Reaktion unter Hydrolyse von ATP. Zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle wird die linearisierte Vektor-DNA mit dem Restriktionsfragment der Fremd-DNA kovalent verknüpft [155]. Der Ligationsansatz enthält 50–100 ng linearisierte Vektor-DNA und einen 3–10-fachen molaren Überschuß des zu integrierenden DNA-Fragments und wird nach dem Protokoll des “Rapid DNA Ligation Kit” durchgeführt.

3.1.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml für Doppelstrang-DNA oder 40 mg/ml für Einzelstrang-DNA und RNA [155]. Aromatische Aminosäuren und Phenol haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm kann daher als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung verwendet werden. Relativ saubere DNA- bzw. RNA-Lösungen besitzen einen Quotient OD_{260}/OD_{280} von 1,8–2,0.

3.1.7 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist es möglich, *in vitro* Nukleotidsequenzen enzymatisch zu vervielfältigen [157]. Die PCR ist ein zyklischer Prozess, bei dem sich die Zahl der synthetisierten DNA-Moleküle mit jedem durchlaufenden Zyklus verdoppelt. Im ersten Schritt eines Zyklus wird die doppelsträngige DNA, welche als Matrize dient, durch Erhitzen denaturiert. Daraufhin wird der Reaktionsansatz soweit abgekühlt, dass sich die eingesetzten Oligonukleotid-Primer jeweils an die komplementären

DNA-Abschnitte anlagern können. Die Oligonukleotide sind so gewählt, dass sie flankierend zu dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt jeweils mit dem kodierenden bzw. dem nicht-kodierenden DNA-Strang hybridisieren können. Die DNA-Polymerase verlängert im letzten Schritt eines Zyklus diese Startermoleküle durch den Einbau von Deoxynukleotiden. Erneute Denaturierung leitet den nächsten Zyklus ein. Durchgeführt wird die PCR in einem Thermozykler, dessen automatische Steuerung ein individuell programmierbares zyklisches Temperaturprogramm regelt.

3.1.8 Mutagenese mittels PCR

Um spezifisch Punktmutationen oder kleine Deletionen in DNA-Moleküle einzuführen, wurde der “QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit” verwendet. Dieses Kit basiert auf der Technik der PCR-Mutagenese. Hierbei werden zwei zueinander komplementäre Primer verwendet, welche die neue (mutierte) Sequenz flankiert von 10–20 Basen auf jeder Seite enthalten. Somit wird das komplette doppelsträngige zirkuläre Plasmid amplifiziert.

Der PCR-Reaktionsansatz ist wie folgt zusammengestellt:

5 μ l	10x Reaktionspuffer
50 ng	dsDNA-Matrize
125 ng	3'-Primer
125 ng	5'-Primer
2,5 mM	dNTP Mix
2,5 U	Pfu DNA Polymerase

Ablauf der PCR-Reaktion:

1x	95°C,	30 s	
16-18x	{	95°C,	30 s
		55–62°C,	1 min
		68°C,	2 min/kb Matrizen-DNA
1x	68°C,	10 min	

Im Anschluß an die PCR-Reaktion wird der Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Hierfür werden 10 units des Enzyms zu dem PCR-Produkt gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

DpnI schneidet ausschließlich methylierte Erkennungssequenzen. DNA-Moleküle, die mittels PCR vervielfältigt wurden, sind im Gegensatz zu *in vivo* amplifizierten DNA-Plasmiden nicht methyliert. Somit wird durch den DpnI-Verdau spezifisch die methylierte, nicht mutierte Matrizen-DNA aus dem Gemisch entfernt.

Das DpnI-verdaute PCR-Produkt wird mit Hilfe des “QIAquick® Spin Purification Kits” aufgereinigt, bevor es in in Epicurian Coli™ XL-1 Blue-Bakterien transformiert wird. Die erfolgreiche Einführung der Mutation wird durch Sequenzierung überprüft.

3.1.9 Herstellung von Deletionsmutanten

Um größere Deletionen in DNA-Moleküle einzuführen, wurden durch PCR-Mutagenese flankierend an das zu deletierende Fragment Schnittstellen für ein Restriktionsenzym eingefügt, welches nicht in dem entsprechenden Gen oder dem verwendeten Vektor vorhanden ist. Nach erfolgreicher Mutagenese wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym geschnitten, durch Gelelektrophorese von dem deletierten Fragment getrennt, aufgereinigt und religiert. Die erfolgreiche Einführung der Deletion wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft.

Um Deletionen in NIPA einzuführen, wurden in pCDNA3.1-Flag-NIPA mit Hilfe der entsprechenden Primer (Kap. 2.12.2) Schnittstellen für das Restriktionsenzym *AscI* eingefügt und anschließend wie oben beschrieben weiter verfahren.

3.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1 Kulturbedingungen

Die Anzucht einer Bakterienkultur sollte in Gegenwart eines Antibiotikums stattfinden, um sicherzustellen, dass nur Zellen wachsen können, die ein Resistenz-vermittelndes Plasmid enthalten. Dem LB-Medium und den Kulturplatten wird deshalb je nach Resistenz des verwendeten Plasmids 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin zugefügt. Flüssigkulturen werden bei 37°C mit 250 Upm geschüttelt.

3.2.2 Lagerung von *E.coli* Stämmen

Zur dauerhaften Lagerung einzelner Zellklone wurden Zellen einer frischen Kultur mit 30% sterilem Glycerol versetzt und bei -80°C eingefroren und aufbewahrt.

3.2.3 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Durch kurzzeitige Hitzebehandlung kann Vektor-DNA in chemisch kompetente Bakterien eingeschleust werden. Hierfür werden 50 μl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 5 μl eines Ligationsansatzes oder 0,1–1 μg Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt der Hitzeschock für 45 s bei 37°C, wonach die Bakterien erneut für 2 min auf Eis inkubiert werden. Danach wird der komplette Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep/Maxiprep)

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Kulturen erfolgt je nach erwünschter DNA-Menge mit dem "QIAprep[®] Spin Miniprep Kit" oder dem "QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit" nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung der Plasmide mit Qiagen-Säulen basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, gefolgt von einer Bindung der Plasmid-DNA an eine Anionenaustausch-Säule. Kontaminationen wie RNA, Proteine und weitere niedermolekulare Verunreinigungen werden durch eine Erhöhung der Salzkonzentration entfernt.

Anschließend wird die Plasmid-DNA durch einen Puffer hoher Salzkonzentration eluiert und dann durch Präzipitation mit Isopropanol sowie Waschen mit 70% Ethanol entsalzt.

3.2.5 Induktion und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine wurde das Glutathion S-Transferase (GST) Genfusionssystem verwendet. Hierfür wird das entsprechende Gen oder Genfragment so in den GST-Expressionsvektor pGEX kloniert, dass es im gleichen Leseraster wie die GST aus *Schistosoma japonicum* liegt. Dieses 26 kDa große Enzym katalysiert die Reduktion der Disulfidbrücke im oxidierten Glutathion zu jeweils freien SH-Gruppen und besitzt eine sehr hohe Affinität zu seinem Substrat. Die Expression des GST-Fusionsgens erfolgt unter der Kontrolle des künstlichen *tac* Promotors, der durch das Lactose Analog Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) induziert wird. Das fertige Fusionsprotein akkumuliert im *E.coli* Cytoplasma, wobei sich am N-Terminus das GST und am C-Terminus das gewünschte Protein befindet. GST Fusionsproteine können aus Bakterienlysaten leicht durch Affinitätschromatographie mithilfe von Glutathion gereinigt werden. Dabei ist das Glutathion an eine Matrix (z.B. Sepharose) immobilisiert. Die Fusionsproteine binden an den Liganden (Glutathion) während die unspezifischen Proteine aus *E.coli* durch Waschen mit einem Bindungspuffer beseitigt werden können.

Die Klonierung der NIPA-Fragmente in den GST-Expressionsvektor pGex erfolgte durch eine PCR mit entsprechenden Klonierungs-Primern (Kap. 2.12.1). Hierdurch wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und XhoI an die entsprechenden NIPA Sequenzen angehängt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnitten und in den ebenso geschnittenen pGex-4T2 Vektor ligiert.

Für die Expression der Fusionsproteine wird der pGEX Vektor mit dem entsprechenden Fusionsgen in den *E.coli*-Stamm BL21 transformiert. Nach der Transformation wird mit einem Klon eine 5 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wird zur Proteinexpression in 50–200 ml LB-Medium (Kap. 2.15) mit Ampicillin überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4–0,6 kultiviert. In dieser logarithmischen Wachstumsphase wird die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach zweistündiger Induktion wird die Bakterienkultur abzentrifugiert und das Zellpellet für mindestens 15 Minuten bei -80°C weggefroren.

Für die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine werden die Zellpellets in NETN-Puffer (Kap. 2.15) resuspendiert und anschließend für 30 Minuten mit 100 μ g/ml Lysozym auf Eis inkubiert. Lysozym spaltet die glycosidischen Bindungen in den Zuckerketten des Peptidoglycangerüsts der Bakterienzellwand und bewirkt somit einen Abbau der bakteriellen Zellwand. Nach weiterem Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung (10 Impulse bei 50% Leistung), werden die Zell-Lysate zentrifugiert, um die unlösliche Proteinfraction (Pellet) von der löslichen Proteinfraction (Überstand) zu trennen. Durch Zugabe von 30 μ l Glutathion-Sepharose zum Überstand und anschließender halbstündiger Inkubation auf dem Rollrad bei 4°C werden die GST-Fusionsproteine an das Sepharose-gekoppelte Glutathion gebunden. Nach dieser Inkubation kann das an Sepharose gebundene Protein durch Zentrifugation pelletiert werden. Das Pellet wird dreimal mit NETN-Puffer gewaschen, um unspezifische an die Sepharose gebundene Proteine zu entfernen und wird anschließend in 100 μ l NETN-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert. Zur Überprüfung der erfolgrei-

chen Induktion und Aufreinigung des Fusionsproteins wird ein Aliquot der Probe in einem Test-SDS-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung (Kap. 3.4.10) detektiert.

Die Elution der GST-Fusionsproteine von der Sepharose erfolgt mit einem Elutionspuffer (Kap. 2.15), der eine hohe Konzentration reduziertes Glutathion enthält. Durch den Überschuss an freiem Glutathion wird GST kompetitiv von der Glutathion-Sepharose verdrängt. 25 μ l des Elutionspuffers werden auf die fast trockene Sepharose gegeben und etwa 10 min auf dem Rollrad bei 4°C inkubiert. Dieser Vorgang wird 3–4 mal wiederholt und die Eluate können bei -80°C gelagert werden.

3.3 Arbeiten mit eukaryoten Zelllinien

3.3.1 Kultivierung der Zelllinien

Alle Zelllinien werden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Sie werden in DMEM-Kulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 2% Penicillin/Streptomycin-Lösung in liegenden Zellkulturflaschen gehalten. Seckel-Zellen werden in DMEM-Kulturmedium mit 20% FCS und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Bei 90%-iger Konfluenz werden die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung durch enzymatischen Abbau vom Boden abgelöst. Hierzu wäscht man die Zellen vorsichtig mit PBS, versetzt sie anschließend mit einigen Tropfen der Trypsin/EDTA-Lösung und inkubiert die Zellen 1–5 min bei 37°C. Nach sichtbarem Ablösen der Zellen werden diese mit Medium abgespült und 5 min bei 1200 Upm zentrifugiert. Durch das im Medium enthaltene FCS und die Verdünnung wird das Trypsin inaktiviert. Anschließend werden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl lebender und toter Zellen zu bestimmen, werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer Zählkammer mikroskopiert. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Der Farbstoff diffundiert ausschließlich durch die Membran toter Zellen, die dadurch blau angefärbt werden. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell.

Die Neubauer-Zählkammer ist eine Glasplatte mit einer um 0,1 mm vertieften Mittelfläche, auf der 9 Großquadrate mit einer Fläche von 1 mm² eingätzt sind. Ein Großquadrat besitzt somit im gefüllten und mit einem Deckglas versehenen Zustand ein Gesamtvolumen von 1×10^{-4} ml. Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0,5%-igen Trypanblaulösung werden gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop werden 4 Großquadrate ausgezählt, wobei man nur vitale, nicht angefärbte Zellen berücksichtigt. Die Zellkonzentration (Zellzahl pro ml Zellsuspension) wird ermittelt, indem man die durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Faktor 10^4 multipliziert.

3.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Zellkulturen können in flüssigem Stickstoff dauerhaft vital gelagert werden. Als Schutzsubstanz dient Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Kristallbildung innerhalb der Zellen und die partielle Dehydratation des Cytoplasma verhindert.

Von einer dichten Zellsuspension wird etwa 1 ml entnommen, mit gleichem Volumen Einfriermedium (20% DMSO, 80% FCS) vermischt und in einem Kryoröhrchen sofort bei -80°C eingefroren. Nach 12 h können die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen wird das Kryoröhrchen dem Stickstoffbehälter entnommen und unmittelbar in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Sobald die Suspension aufgetaut ist, wird die Kultur in vorgewärmtem Medium aufgenommen und zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Daraufhin wird der Überstand abgesaugt, die Zellen in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

3.3.4 Transfektionsmethoden

3.3.4.1 Lipofektion adhärenter Zellen

Bei der Lipofektion verwendet man kationische Lipide, um DNA in die Zellen einzuschleusen. Die kationischen Kopfgruppen der Lipide greifen an der polyanionischen DNA an und bilden einen Liposom-DNA-Komplex mit positiver Gesamtladung. Diese Komplexe binden an die negativ geladene Zellmembran und die DNA gelangt durch Fusion der Vesikel mit der Cytoplasmamembran in die Zelle.

Für die verschiedenen Zelllinien wurden unterschiedliche Transfektions-Reagenzien eingesetzt. So wurden Cos-1 und 293-Zellen mit Dotap transfiziert, während für Hela-Zellen Geneporter[®] und für NIH/3T3 Lipofectamine[™] 2000 Transfektionsreagenzien verwendet wurden. Die Transfektionen wurden jeweils nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.5 RNA-Interferenz

Mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) kann spezifisch die Expression bestimmter Proteine herunterreguliert werden [158]. Hierfür werden so genannte “*small interfering RNAs*” (siRNAs), synthetisch hergestellte 21nt lange RNA-Moleküle, in die Zelle eingebracht. Diese siRNAs sind in ihrer Sequenz komplementär zum Ziel-Gen und können somit an die entsprechende mRNA binden. Dies führt zur Spaltung der Ziel-mRNA oder zum Methylieren und Abschalten des entsprechenden Gens und infolge dessen zu einer spezifischen Herabregulation des gewünschten Proteins. Die siRNA wurde durch Lipofektion mit Lipofectamine[™] 2000 nach Angaben des Herstellers in die Zellen eingebracht (etwa 1 nmol pro 10 cm-Platte). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet oder für weitere Versuche eingesetzt.

3.3.6 Induzierbare Expression mit Hilfe des GeneSwitch Systems

Das GeneSwitch[™] System von Invitrogen erlaubt die induzierbare Expression eines bestimmten Proteins in Säugetierzellen [159]. Die Zellen werden mit zwei unterschiedlichen Plasmiden stabil transfiziert. Von einem Plasmid wird ein regulatorisches Fusionsprotein

bestehend aus einer GAL4 DNA-Bindungsdomäne aus der Hefe, einer trunkeierten Liganden-Bindungsdomäne des humanen Progesteron-Rezeptors und der Aktivierungsdomäne des humanen NF- κ B Proteins exprimiert. Das zweite, induzierbare Plasmid kodiert für das zu untersuchende Gen unter der Kontrolle eines hybriden Promoters, der aus der TATA-Box des Adenovirus E1B-Gens [160] und GAL4 5' liegenden aktivierenden Sequenzen (*upstream activating sequences*, UAS) aus *S. cerevisiae* [159, 161] besteht.

Werden die transfizierten Zellen mit Mifepriston inkubiert, bindet dieses synthetische Steroid an die Liganden-Bindungsdomäne des humanen Progesteron-Rezeptors im regulatorischen Fusionsprotein und induziert hierdurch eine Konformationsänderung und Dimerisierung dieses Fusionsproteins. Das so aktivierte regulatorische Protein interagiert nun über seine GAL4 DNA-Bindungsdomäne mit den GAL4-Bindungsstellen im Promoter des induzierbaren Plasmids und aktiviert die Transkription des zu untersuchenden Gens.

Durch eine PCR mit den Primern Flag-F-SpeI und NIPA-R-NotI wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SpeI und NotI an die Flag-NIPA Sequenz angehängt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnitten und in den ebenso geschnittenen induzierbaren Vektor pGene/V5-His ligiert. Hierbei wurde das Stop-Codon der NIPA-Sequenz beibehalten, so dass keine C-terminale Fusion des V5 Epitops und Polyhistidin-Signals an das NIPA-Protein zustande kommt. Das so generierte pGene-Flag-NIPA Konstrukt wurde mit Dotap in GeneSwitch™ -3T3 Fibroblasten transfiziert und die Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 180 μ g/ml Zeocin und 50 μ g/ml Hygromycin B selektioniert.

Die Expression des Flag-NIPA Proteins wurde durch Zugabe von Mifepriston (1×10^{-8} M) in das Zellkulturmedium induziert.

3.3.7 Synchronisierung

3.3.7.1 Synchronisierung in der S-Phase

Um Zellen in der S-Phase zu synchronisieren, wird dem Kulturmedium exponentiell wachsender Zellen eine hohe Konzentration Thymidin (2 mM) beigegeben. Dies führt zu einer Anreicherung von Thymidin Trisphosphat in der Zelle, welches die Reduktion von Cytidin Diphosphat durch die Ribonukleotid-Reduktase allosterisch hemmt. Somit kommt es zu einem Mangel an Deoxycytidin Triphosphat an der Replikationsgabel und die DNA-Synthese kann nicht fortgeführt werden. Checkpoint-Mechanismen der Zelle, die gewährleisten sollen, dass Zellen mit unvollständig replizierter DNA nicht in die Mitose gehen, arretieren den Zellzyklus in der S-Phase. Nach etwa 24 h Inkubation mit Thymidin sind die Zellen in S-Phase synchronisiert und können entweder durch Auswaschen des Thymidins aus dem Block entlassen werden oder direkt für Versuche geerntet werden.

3.3.7.2 Synchronisierung in Mitose

Für eine Synchronisierung der Zellen in der Mitose wird Methyl-(5-[2-thienylcarbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate (Nocodazol) verwendet, ein Spindelgift, welches Zellen durch Destabilisierung der Mikrotubule in Prometaphase arretiert. Da längere Inkubation der Zellen mit Nocodazol zu einem irreversiblen Mitose-Block führt, werden die Zellen zunächst mit Hilfe von Thymidin in der S-Phase synchronisiert. Anschließend wird das

Thymidin durch Waschen der Zellen mit PBS entfernt und die Zellen werden weitere 10–12 h in Kulturmedium mit 500 ng/ml Nocodazol inkubiert.

Da sich adhärenente Zellen bei Eintritt in die Mitose abrunden und von der Zellkulturplatte ablösen, können die mitotischen Zellen einfach von den nicht synchronisierten Zellen getrennt werden.

3.3.7.3 Synchronisierung in G₀

Kultivierte Zellen können durch Serumentzug in der G₀-Phase des Zellzyklus synchronisiert werden. Hierfür werden die Zellen bei etwa 75% Konfluenz für 72 h in Medium mit 0,5% FCS inkubiert. Um die Zellen aus dem G₀-Block zu entlassen, werden sie trypsiniert und in einer geringeren Dichte in Medium mit 20% FCS neu ausplattiert.

3.3.8 Behandlung von Zellen mit Proteasominhibitoren

MG132 (N-carbobenzoxyl-Leu-Leu-leucinal) ist ein Peptid-Aldehyd Inhibitor, der die proteolytische Aktivität des Proteasoms durch Bindung an die Untereinheit $\beta 5$ (MB1) hemmt [162].

Um den proteasomalen Abbau ubiquitinerter Proteine zu inhibieren, wurde MG132 in einer Endkonzentration von 10 μ M dem Kulturmedium zugegeben.

3.3.9 Behandlung von Zellen mit Kinase-Inhibitoren

Caffein ist ein Methylxanthin, das die katalytische Aktivität der Kinasen ATM und ATR inhibiert [163]. Das Caffein wurde in einer Endkonzentration von 2 mM direkt in vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und 2 h vor UV-Bestrahlung auf die Zellen gegeben.

Das Staurosporin-Analog SB218078 ist ein Inhibitor der Checkpointkinase Chk1 [164, 165]. SB218078 wurde in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 5 μ M zwei Stunden vor UV-Bestrahlung in das Kulturmedium der Zellen gegeben.

3.3.10 Hemmung der Proteinsynthese mit Cycloheximid

Cycloheximid gehört zur Gruppe der Glutarimid-Antibiotika und wurde aus *Streptomyces griseus* isoliert. Es konkurriert mit ATP um die Bindung an die 60S Untereinheit der Ribosomen und wirkt somit als Elongations Inhibitor während der Proteinsynthese in Eukaryoten.

Um die Proteinsynthese zu hemmen, wurde Cycloheximid in einer Endkonzentration von 50 μ g/ml in das Kulturmedium der Zellen gegeben.

3.3.11 Bestrahlung von Zellen mit ultraviolettem Licht

Um adhärenente Zellen mit UV zu bestrahlen, wurde das Medium abgenommen und die Zellkulturschale ohne Deckel in einem UV Stratalinker 2400 (Stratagene) mit der angegebenen Intensität an UVC (254 nm) bestrahlt. Anschließend wurde neues, vorgewärmtes Medium auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden für die angegebene Zeit weiterkultiviert.

3.3.12 Zellzyklusbestimmung

3.3.12.1 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse, fluoreszenzaktivierte Zellanalyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen.

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photonendetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich eingesetzte Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Die in der Durchflusszytometrie erhaltenen Daten wurden mit der "FlowJo Flow Cytometry Analysis Software" analysiert.

3.3.12.2 Propidiumiodid Färbung

Mit Hilfe der Propidiumiodid (PI) Färbung kann der DNA-Gehalt einer Zelle und somit deren Zellzyklusstadium bestimmt werden. Das Propidiumiodid interkaliert in die große Furche doppelsträngiger DNA und bildet ein stark fluoreszierendes Addukt, wobei die Fluoreszenzintensität der PI-Färbung direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist (siehe Abb. 3.1 a). Da PI auch in doppelsträngige RNA interkaliert, ist es wichtig, die Zellen vor der Messung mit RNase zu behandeln um ein optimales DNA-Profil zu erhalten.

Für die Zellzyklus-Messung wurden die Zellen durch Abschaben geerntet, einmal mit PBS gewaschen, in 70% Ethanol resuspendiert und für mindestens 12 h bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden 30 min mit 200 µg/ml RNaseA inkubiert, mit 10 µg/ml Propidiumiodid versetzt und im Durchflusszytometer analysiert.

Während der Apoptose werden Calcium- und Magnesium-abhängige Nucleasen aktiviert und degradieren die DNA der apoptotischen Zelle. Die durch diese Degradation entstandenen DNA-Fragmente werden beim Waschen der Zellen mit PBS aus den Zellen eluiert, so dass apoptotische Zellen einen kleineren DNA-Gehalt haben als nicht-apoptotische Zellen. Somit können nach PI-Färbung apoptotische Zellen als sogenannte sub-G₁ Fraktion detektiert werden (siehe Abb. 3.1 b).

3.3.12.3 BrdU Färbung

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Uridinderivat und kann somit anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut werden. Die zu analysierenden Zellen werden für eine sehr kurze Zeit mit BrdU im Kulturmedium inkubiert. Ausschließlich diejenigen Zellen, welche gerade DNA synthetisieren, sich also in der S-Phase des Zellzyklus befinden, bauen BrdU in die DNA ein.

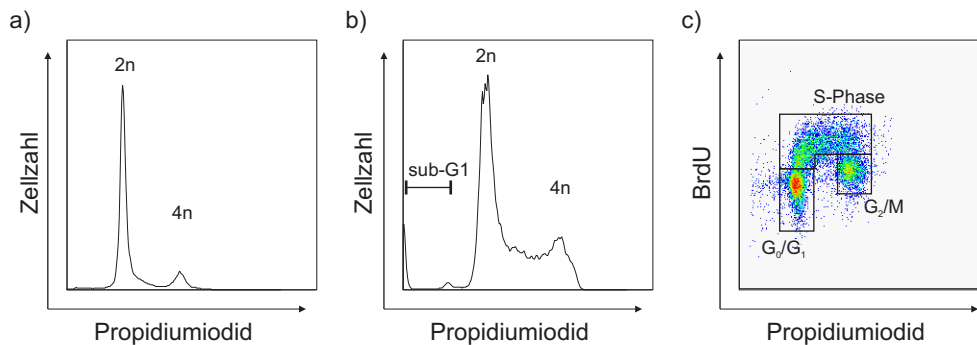


Abbildung 3.1: Durchflusszytometrische Zellzyklusbestimmung. Darstellung der Zellzyklusmessung durch Propidiumiodid Färbung in a) und b), sowie durch BrdU Färbung in c).

Das eingebaute BrdU kann anschließend mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper gebunden und durchflusszytometrisch detektiert werden. Zusätzlich werden die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt, wodurch sich der Gesamt-DNA Gehalt einer Zelle bestimmen lässt. Somit kann man bei BrdU-negativen Zellen zwischen G_1 und G_2/M -Phase unterscheiden, sowie bei BrdU-positiven Zellen zwischen früher und später S-Phase differenzieren (siehe Abb. 3.1 c).

Das BrdU wurde den Zellen in einer Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ zugegeben und die Zellen wurden für weitere 60 min inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen durch Abschaben geerntet, einmal in PBS mit 1% BSA gewaschen, in 70% Ethanol resuspendiert und für mindestens 12 h bei 4°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden 30 min in 2 N Salzsäure mit 0,5% Triton X-100 inkubiert, um die DNA zu denaturieren, dann abzentrifugiert und in 1 M Natriumtetraborat resuspendiert, um die Säure zu neutralisieren. Anschließend wurden die Zellen in PBS mit 1% BSA und 0,5% Tween[®] 20 aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur mit FITC-markiertem Anti-BrdU Antikörper gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden einmal in PBS gewaschen, 30 min mit $200 \mu\text{g/ml}$ RNaseA inkubiert, mit $10 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid versetzt und im Durchflusszytometer analysiert.

3.3.13 Apoptosemessung (TUNEL)

Die Abkürzung TUNEL steht für “*Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling*”. Bei dieser Technik werden Einzel- und Doppelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen, die durch die Aktivität von Endonukleasen während der Apoptose entstehen. Hierfür wird das Enzym TdT (*Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase*) verwendet, das dUTP-Nukleotide an die entstehenden 3'-Hydroxyl-Enden anhängt. Durch die Konjugation der dUTP-Nukleotide mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC ist die Detektion im Durchflusszytometer möglich.

Um den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen durch Abschaben geerntet, pelletiert und zunächst mit 1% PFA für 15 min bei 4°C inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und dann in 70% Ethanol resuspendiert und für mindestens 12 h bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des “APO-DIRECT™ Kit” gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

3.3.14 Indirekte Immunfluoreszenz

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die Lokalisation von Proteinen in der intakten Zelle definieren. Hierfür wird das entsprechende Protein mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern spezifisch markiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop detektiert.

Die Zellen wurden auf Objektträgern ausplattiert, zum gewünschten Zeitpunkt zum Ernten gründlich mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen erneut mit PBS gewaschen und durch 2 min Inkubation in Methanol permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung folgte ein weiterer Wasch-Schritt mit PBS bevor die Zellen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde in 1:10 mit PBS verdünntem Ziegenserum schüttelnd inkubiert wurden. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wurde 1:1000 in verdünntem Ziegenserum angesetzt und für 2 h bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach gründlichem Waschen in PBS zur Entfernung ungebundener Primärantikörper wurden die Zellen 1 h abgedunkelt mit dem in Ziegenserum verdünntem, Fluoreszenz-gekoppeltem Sekundär-Antikörper schüttelnd inkubiert. Vor dem Eindeckeln der Objektträger wurden die Zellen kurz mit einem Anti-Fading-Mittel (Slow Fade[®] Gold antifade reagent) inkubiert, um das Ausbleichen der Fluorophore zu verzögern. Dieses Anti-Fading-Mittel enthält den Fluoreszenzstoff DAPI (4',6 Diamidino-2-phenylindol), welcher in die AT-reichen Regionen der DNA interkaliert und somit die kondensierten Chromosomen, beziehungsweise während der Interphase den Zellkern sichtbar macht.

Die an die Antikörper gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffe, sowie der in die DNA interkalierte Farbstoff DAPI lassen sich bei bestimmten Wellenlängen anregen. Die hierdurch von den Farbstoffen emittierte Fluoreszenz kann dann im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach Zentrifugation der zu lysierenden Zellen wird das Kulturmedium vollständig abgenommen und das Zellpellet wird in frisch hergestelltem, eiskaltem Lysis-Puffer (Kap. 2.15) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (14.000 Upm, 20 min, 4°C) wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder für weitere Versuche verwendet oder mit SDS-Probenpuffer (Kap. 2.15) versetzt und durch Inkubation für 10 min bei 95°C denaturiert.

3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde nach der Methode von Bradford [166] bestimmt. Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische und aromatische Aminosäuren von Proteinen in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm.

Die Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung des "Bio-Rad Proteinassays" nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.4.3 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation können einzelne Proteine aus einem Zellysate isoliert werden. Hierbei bindet ein spezifischer Antikörper ein Antigen des zu präzipitierenden Proteins. Die Präzipitation erfolgt durch Adsorption des Antikörper-Protein-Konjugats an Sepharose-gekoppeltes Protein A bzw. Agarose-gekoppeltes Protein G. Aufgrund der Masse der Sepharose/Agarose lassen sich die Komplexe durch Zentrifugation aus dem Lysat separieren.

Das Zellysate wird mit 20 μ l Protein A- oder Protein G-Beads versetzt und 30 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert, um unspezifisch an Protein A oder Protein G bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Die Beads werden abzentrifugiert und verworfen. Der verbleibende Überstand wird mit 2 μ g des spezifischen Antikörpers versetzt und bei 4°C für 2–4 h rotierend inkubiert. Anschließend werden die Lysate mit 30 μ l Protein A/G-Lösung bei 4°C 30 min auf dem Rollrad inkubiert. Die gebundenen Immunkomplexe werden abzentrifugiert und 3x mit jeweils 500 μ l Lysis-Puffer gewaschen. Das verbleibende Sediment wird mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min erhitzt, um die präzipitierten Proteine zu denaturieren und sie von den Beads abzulösen. Nach kurzer Zentrifugation können die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese weiterverarbeitet werden.

3.4.4 In vitro Translation von Proteinen

Proteine können im zellfreien System in Gegenwart von RNA-Polymerase, Aminosäuren und zirkulärer Plasmid-DNA translatiert und bei Bedarf durch Zugabe von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert werden. Die verwendete RNA-Polymerase erkennt den viralen T7- bzw. T3-Promotor. Somit können Gene aus Vektoren, die diese Promotoren vor ihrer Multiklonierungsstelle besitzen translatiert werden.

Die *in vitro* Translation (IVT) erfolgte unter Verwendung des “TNT Reticulocyte Lysate Systems” nach Angaben des Herstellers. Als Matrize für die IVT-Reaktionen wurden pCMV-Myc-Cdh1 bzw. verschiedene pCDNA3.1-Flag-NIPA Konstrukte verwendet.

3.4.5 Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen (GST-pulldown)

3.4.5.1 Interaktion von GST-Fusionsproteinen mit Proteinen aus Zellysaten

Mit Hilfe von GST-pulldowns können Protein-Interaktionen *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei kann die Bindung an endogene oder an ektop exprimierte Proteine untersucht werden. Die Zellysate werden hierfür zunächst mit 30 μ l Glutathion-Sepharose versetzt und 30 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert, um unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Die Sepharose wird abzentrifugiert und verworfen. Anschließend werden die Zellysate mit zuvor aufgereinigtem Sepharose-gekoppeltem GST-Fusionsprotein für 3 h bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert. Das Pellet wird dreimal mit Lysis-Puffer gewaschen, um unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Danach wird es mit SDS-Probenpuffer (Kap. 2.15) versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt, um die gebundenen Proteine zu denaturieren und sie von den Beads abzulösen. Die gebundenen Proteine werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Western Blot nachgewiesen (Kap. 3.4.11). Anschließend werden die Proteine auf der Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran mit Amidoschwarz angefärbt (Kap. 3.4.11.2), um die eingesetzten Mengen an GST-Fusionsprotein und GST-Protein zu dokumentieren.

3.4.5.2 Interaktion von GST-Fusionsproteinen mit *in vitro* translatierten Proteinen

Alternativ zu Bindungsexperimenten mit Proteinen aus Zelllysaten kann auch die Interaktion von GST-Fusionsproteinen mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Proteinen untersucht werden. Hierfür werden 10–20 μl des mit ^{35}S -Methionen radioaktiv markierten IVT-Produkts mit etwa 500 μl GST-pulldown Puffer (Kap. 2.15) aufgefüllt, mit 30 μl Glutathion-Sepharose versetzt und 30 min bei 4°C auf dem Rollrad inkubiert, um unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen. Anschließend werden die Bindungsexperimente wie in Kapitel 3.4.5.1 beschrieben durchgeführt. Die gebundenen Proteine werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung autoradiographisch dargestellt. Die eingesetzten Mengen an GST-Fusionsprotein und GST-Protein werden durch Coomassie-Färbung (Kap. 3.4.10) des Gels dokumentiert.

3.4.6 *In vivo* Ubiquitinierung

Um zu untersuchen, ob ein bestimmtes Protein in der Zelle unter bestimmten Bedingungen oder in bestimmten Zellzyklusphasen ubiquitiniert wird, werden sogenannte *in vivo* Ubiquitinierungs-Experimente durchgeführt. Hierfür wird Hemagglutinin Epitop (HA)-markiertes Ubiquitin in großer Menge in die Zellen transfiziert, damit es anstelle des endogenen Ubiquitins in die Polyubiquitin-Ketten eingebaut wird und die Zellen werden vor dem Ernten mit Proteasominhibitoren behandelt, damit die ubiquitinierten Proteine nicht abgebaut werden und anreichern können. Nach Herstellung der Zelllysate werden diese durch Zugabe eines SDS-haltigen Denaturierungspuffers und Aufkochen denaturiert, um die Bindung an eventuelle ubiquitinierte Bindungspartner aufzulösen und somit die Detektion unspezifischer Ubiquitinierungen zu minimieren. Anschließend wird das zu untersuchende Protein immunpräzipitiert und die eventuelle Ubiquitinierung mittels Westernblot mit einem HA-Antikörper nachgewiesen.

293-Zellen wurden mit 5 μg pCMV-HA-Ubiquitin und als Kontrolle mit 5 μg pCDNA3.1 Leervektor oder mit 5 μg pCDNA-Flag-NIPA wildtyp oder einer angepassten Menge einer NIPA Mutante transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit MG132 behandelt, anschließend geerntet, und in mit MG132 versetztem Lysispuffer lysiert. Die Lysate wurden daraufhin mit Denaturierungs-Puffer (Kap. 2.15) versetzt und für 10 min bei 90°C denaturiert. Anschließend wurde NIPA mit einem an Agarose gekoppelten anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert. Die Ubiquitinierung der Immunpräzipitate wurde im Westernblot mit einem HA-Antikörper nachgewiesen.

3.4.7 *In vitro* Degradations-Assay

Mit Hilfe von *in vitro* Degradationsversuchen wird die Stabilität eines radioaktiv markierten, *in vitro* translatierten Proteins in Zelllysaten untersucht.

HeLa Zellen wurden durch Entlassen aus einem Prometaphase-Block in der frühen G₁-Phase des Zellzyklus synchronisiert und in Lysispuffer lysiert. Falls angegeben, wurde der APC vor dem Degradations-Versuch mit einem Antikörper gegen die APC-Untereinheit Cdc27 aus dem Lysat depletiert. Das Substrat für die Degradationsreaktion (Flag-NIPA) wurde durch *in vitro*-Translation synthetisiert (Kap. 3.4.4) und durch Zugabe von ^{35}S -Methionin in die Reaktion radioaktiv markiert.

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 4 μ l radioaktiv markierte NIPA IVT
- 20 μ l Zellysat
- 8 μ l 5x Degradationspuffer (Kap. 2.15)
- 8 μ l Cdh1 IVT

Der Ansatz wurde bei 30°C schüttelnd inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10 μ l-Aliquots aus dem Reaktionsansatz entfernt, mit SDS-Ladepuffer versetzt und denaturiert um die Degradation zu beenden.

3.4.8 In vitro Ubiquitinierung

Für *in vitro* Ubiquitinierungsversuche wurde zunächst der APC-Komplex aufgereinigt. Hierfür wurden exponentiell wachsende HeLa Zellen geerntet und in APC-Lysispuffer (Kap. 2.15) lysiert. Aus etwa 10 mg Zellextrakt wurde der APC mit 15 μ g anti-Cdc27 Antikörper 4 h bei 4°C immunpräzipitiert. Anschließend wurde der an die Sepharose-Beads gebundene Komplex 3 mal mit QA-Puffer (Kap. 2.15) gewaschen. Der somit aufgereinigte APC-Komplex wurde auf 3–4 Reaktionsansätze aufgeteilt. Das Substrat für die Ubiquitinierungsreaktion (Flag-NIPA) wurde durch *in vitro*-Translation synthetisiert und durch Zugabe von ³⁵S-Methionin in die Reaktion radioaktiv markiert. Alternativ wurde Flag-NIPA in 293-Zellen überexprimiert und anschließend mit einem Agarose-gekoppelten anti-Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Dieses Immunpräzipitat wurde dann in die *in vitro* Ubiquitinierungs-Reaktionen eingesetzt.

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- APC-Beads
- Flag-NIPA Beads oder 0.5 μ l NIPA IVT
- 40 mM Tris-Hcl (pH7,6)
- 0,7 mM DTT
- 5 mM MgCl₂
- 2 mM ATP
- 10 mM Kreatinphosphat
- 24 U/ml Kreatin Phosphokinase
- 1 mg/ml Ubiquitin
- 10 μ g/ml Ubiquitin-Aldehyd
- 0,84 μ g/ml E1
- 10 μ g/ml E2 (UbcH10)
- 0,1 μ g/ μ l Cycloheximid
- 8 μ l Cdh1-IVT
- ad 40 μ l A.d.

Der Ansatz wurde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 10 μ l-Aliquots aus dem Reaktionsansatz entfernt, mit SDS-Ladepuffer versetzt und denaturiert um die Ubiquitinierungs-Reaktion zu beenden.

3.4.9 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wird standardmäßig zur Trennung von Proteingemischen eingesetzt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird von Proteinen in großer Menge gebunden und überdeckt ihre Eigenladung so effektiv, dass Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (1,4 g SDS pro 1 g Protein) [167]. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrückenbindungen zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung, z.B. β -Mercaptoethanol oder Dithiotreitol (DTT), aufgespalten. Hierdurch wird gewährleistet, dass nur die molare Masse des Proteins als Trennkriterium wirkt. Im diskontinuierlichen System passieren die Proteine zunächst das Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite. Die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und des Sammelgels bewirkt eine Fokussierung des Proteingemisches im Sammelgel. Beim Einwandern der Proteine in das Trenngel, das eine geringere Porengröße und einen höheren pH-Wert als das Sammelgel besitzt, werden die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt.

Für die Herstellung eines Polyacrylamidgels wird das Trenngel je nach gewünschter Auftrennung der Proteine mit 5–15% Polyacrylamid-Lösung angesetzt, in die Gelvorrichtung gegossen und mit Methanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wird das Methanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Probestaschen eingesetzt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Kamm entfernt und das Gel in eine SDS-Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wird die Kammer mit Elektrophoresepuffer (Kap. 2.15) gefüllt. Die vorbereiteten hitzedenaturierten Proteine und ein Molekulargewichtsmarker werden in die Probestaschen gefüllt und durch Anlegen einer Spannung (25–120 Volt) aufgetrennt.

3.4.10 Färben der Polyacrylamidgele

Proteinbanden in PAGE-Gelen werden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Das Färben geschieht in saurer Lösung (Essigsäure/Methanol), wobei eine erhöhte Temperatur den Färbungsprozess beschleunigt. Durch die Essigsäure werden die Proteine im Gel fixiert und positiv geladen. Die positive Ladung bewirkt eine verstärkte Farbstoffbindung, allerdings machen hydrophobe Wechselwirkungen den Hauptteil der Proteinbindungskapazität an den Farbstoff aus. An den Färbungsvorgang schließt sich ein Entfärbungsprozeß des Gelhintergrunds an. Dabei wird aus dem Gelbereich, der kein Protein enthält, der Farbstoff ausgewaschen, der proteingebundene Farbstoff bleibt im Gel, wodurch letztlich die Proteine als blaue Banden sichtbar werden. Die Sensitivität der Coomassie-Färbung liegt bei etwa 0,05 μg /Bande.

Das Gel wird 30–60 min in der Coomassie-Färbelösung (Kap. 2.15) bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wird das Gel so lange in Coomassie-Entfärbelösung (Kap. 2.15) entfärbt, bis der Gelhintergrund so weit entfärbt ist, dass die Proteinbanden gut sichtbar sind.

3.4.11 Western Blotting

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Proteingemischen werden die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und anschließend immunchemisch nachgewiesen.

3.4.11.1 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Der Transfer der Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran erfolgt nach dem "Wet-Blot"-Verfahren in einer mit Transferpuffer (Kap. 2.15) gefüllten Elektrophoresekammer. Hierfür wird die zugeschnittene PVDF-Membran zunächst mit Methanol benetzt, dann luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und zwischen zwei Schichten Cellulosefilterkarton (Whatman-Paper) eingespannt. Anschließend werden die Schichten entsprechend der Polung der Apparatur (Membran zur Anode, Gel zur Kathode weisend) in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgt unter ständiger Kühlung bei konstanter Stromstärke (1 Ampere). Die Dauer des Transfers ist abhängig von der molaren Masse der zu transferierenden Proteine (etwa 1 min pro kDa).

3.4.11.2 Amidoschwarz-Färbung der PVDF-Membran

Die Effizienz des Blotvorgangs kann mit Hilfe von Färbereagenzien, die generell Proteine anfärben, überprüft werden. Hierfür wird die PVDF-Membran für 15 min in Amidoschwarz-Färbelösung (Kap. 2.15) gefärbt und anschließend in der Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden erkennbar sind. Nach der Färbung kann die Membran weiter für den immunchemischen Nachweis von Proteinen verwendet werden.

3.4.11.3 Immunchemische Färbung von transferierten Proteinen

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Membran, werden diese mit einem spezifischen Antikörper markiert und anschließend durch Chemolumineszenz detektiert. Zur Absättigung der freien Bindungsbereiche der Membran, die nicht durch die aus dem Gel transferierten Proteine belegt sind, wird die Membran nach dem Transfer 30 min bei 37°C in Blockierlösung (Kap. 2.15) schüttelnd inkubiert. Hierdurch wird eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran verhindert. Da einige Milchproteine in phosphorylierter Form vorliegen und somit eine Reaktion mit phosphospezifischen Antikörpern eingehen können, wird bei der Detektion phosphorylierter Proteine eine Blockierlösung mit Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist, wird nach Angaben des Herstellers in Blockierlösung verdünnt und für 1–3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Nach dreimal 10-minütigem Waschen in PBS mit 0,1% Tween 20 (PBST) zur Entfernung der ungebundenen Primärantikörper wird die Membran 30–60 min in Blockierlösung mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Dieser Antikörper, der spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet, wird in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt. Daraufhin wird die Membran zweimal mit PBST und einmal mit PBS je 10 min gewaschen und anschließend in einer Chemolumineszenz-Substratlösung inkubiert. Das Substrat wird durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase in

einer Chemolumineszenz-Reaktion umgesetzt. Ein Chemilumineszenz-Film wird durch das bei der Reaktion emittierte Licht belichtet, entwickelt und anschließend analysiert.

3.4.11.4 Entfernung des gebundenen Erstantikörpers von der Membran

Die Blot-Membran wird zur Entfernung der Antikörper etwa 15 min mit Amidoschwarz-Entfärbelösung (Kap. 2.15) schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit A.d. gewaschen. Danach kann die Western Blot-Membran erneut geblockt und mit Antikörper inkubiert werden, um weitere Zielproteine zu detektieren.

4 Ergebnisse I: Regulation von NIPA durch den APC

4.1 NIPA wird in der späten Mitose abgebaut

4.1.1 Die phosphorylierte Form von NIPA wird abgebaut, nicht dephosphoryliert

NIPA wird in der späten S-Phase/G₂-Phase des Zellzyklus an den Serinresten Ser354, Ser359 und Ser395 phosphoryliert [127]. Diese Phosphorylierung führt zu einer Dissoziation vom SCF Kernkomplex und somit zu einer Inaktivierung der SCF^{NIPA} Ubiquitin Ligase [124]. Die Phosphorylierung ist als scheinbare Erhöhung der molekularen Masse, also als höher laufende Bande im Westernblot zu erkennen.

In Zellen, die durch einen Thymidin-Nocodazol Block in Prometaphase synchronisiert wurden, liegt NIPA ausschließlich in phosphorylierter Form vor (Abb. 4.1 a, Spur 1). Werden die Zellen durch Auswaschen des Nocodazols synchron aus dem Prometaphase-Block entlassen, nimmt in der späten Mitose, etwa zeitgleich mit dem Abbau von Cyclin B1, die Intensität der phosphorylierten Form von NIPA stark ab, bis schließlich kein phosphoryliertes Protein mehr vorhanden ist (Abb. 4.1 a, Spur 1–5). Etwa zum gleichen Zeitpunkt im Zellzyklus erscheint eine Bande auf der Höhe von unphosphoryliertem NIPA, die im weiteren Verlauf des Zellzyklus an Intensität zunimmt (Abb. 4.1 a, Spur 4 und 5).

Um zu untersuchen, ob die phosphorylierte Form von NIPA abgebaut wird und es sich bei der unphosphorylierten Bande um neu synthetisiertes Protein handelt, oder ob NIPA in der späten Mitose dephosphoryliert wird, wurde der Translations-Inhibitor Cycloheximid verwendet. Hierfür wurden NIH/3T3 Fibroblasten, die wildtyp Flag-NIPA stabil exprimieren, durch einen Thymidin-Nocodazol-Block in Prometaphase synchronisiert und anschließend durch Waschen aus dem Zellzyklus-Block entlassen. Die Zellen wurden in Medium mit oder ohne Cycloheximid neu ausplattiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. In Abbildung 4.1 a ist zu sehen, dass in unbehandelten Zellen etwa 2 h nach dem Entlassen aus dem Prometaphase-Block eine Bande auf Höhe von unphosphoryliertem NIPA erscheint. In Cycloheximid-behandelten Zellen hingegen nimmt zwar wie in den unbehandelten Zellen die Intensität der phosphorylierten Form von NIPA ab, es ist jedoch kein Erscheinen einer unphosphorylierten Form von NIPA im weiteren Verlauf der Mitose zu sehen (vergleiche Spur 3–5 mit Spur 8–10). Somit findet am Übergang von der Mitose in die G₁-Phase Protein-Neusynthese von NIPA statt, die durch Cycloheximid inhibiert werden kann. Die vergleichbare Kinetik des Abbaus von Cyclin B1 (Abb. 4.1 Mitte) sowie die FACS-Analyse der Propidiumiodid-gefärbten Zellen in Abbildung 4.1 b zeigen, dass die Behandlung mit Cycloheximid keinen Einfluss auf das Fortschreiten der Zellen durch die Mitose ausübt.

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass in später Mitose die phosphorylierte Form von NIPA abgebaut wird.

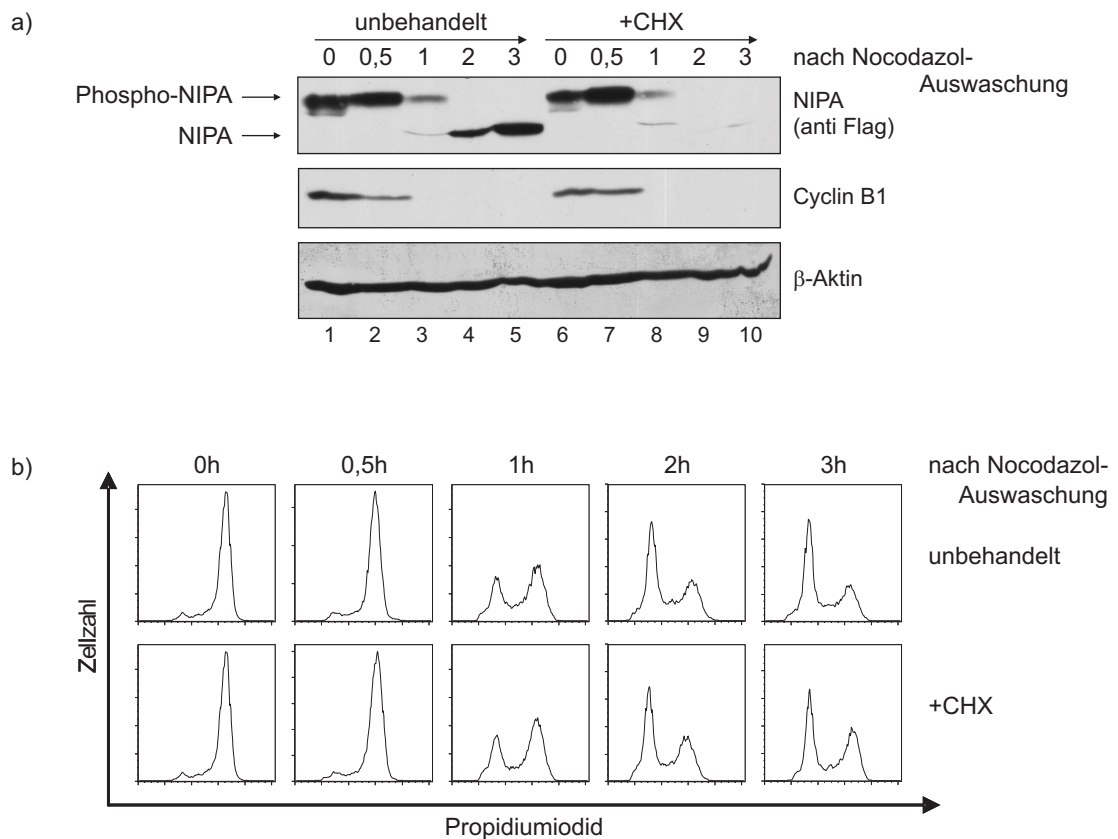


Abbildung 4.1: Die phosphorylierte Form von NIPA wird in später Mitose abgebaut. NIH/3T3 Zellen, die stabil Flag-NIPA wt exprimieren, wurden in Prometaphase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen aus dem Zellzyklusblock entlassen, in Medium mit oder ohne Cycloheximid neu ausplattiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. a) Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Westernblot mit einem anti Flag-Antikörper, einem anti Cyclin B1-Antikörper und als Ladungskontrolle einem anti β -Aktin-Antikörper auf der gleichen Membran. b) Ein Teil der Zellen aus a) wurde in 70% Ethanol fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

4.1.2 NIPA wird *in vivo* ubiquitiniert

Der Abbau intrazellulärer Proteine erfolgt in den meisten Fällen durch das 26S Proteasom. Hierfür müssen die zum Abbau bestimmten Proteine zunächst mit Polyubiquitin-Ketten markiert werden, damit sie durch das Proteasom als Substrate erkannt werden (siehe Einleitung, Kap. 1.2.1).

Um zu untersuchen, ob NIPA in der Zelle ubiquitiniert wird, wurden so genannte *in vivo* Ubiquitinierungs-Versuche durchgeführt. Hierfür wurden 293-Zellen entweder mit Flag-NIPA, mit HA-Ubiquitin oder mit beiden Konstrukten zusammen transfiziert. Das HA-markierte Ubiquitin wird in großer Menge in die Zellen transfiziert, damit es anstelle des endogenen Ubiquitins in die Polyubiquitin-Ketten eingebaut wird. Auf diese Weise lassen sich *in vivo* gebildete Polyubiquitin-Ketten spezifisch mit einem anti HA-Antikörper nachweisen. Die Zellen wurden vor dem Ernten mit Proteasominhibitoren behandelt, um den Abbau von NIPA zu verhindern und somit die ubiquitinierte Form von NIPA anzureichern. Nach Herstellung der Zelllysate wurden diese zunächst durch Zugabe eines SDS-haltigen Denaturierungspuffers und Aufkochen denaturiert, um die Bindung von NIPA an seine Bindungspartner aufzulösen und somit auszuschließen, dass weitere ubiquitinierte Proteine, wie zum Beispiel Substrate des SCF^{NIPA} Komplexes zusammen mit NIPA immunpräzipitiert werden. Anschließend wurde Flag-NIPA mit einem agarosegekoppelten monoklonalen anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden denaturiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

In dem Ansatz, in dem die mit Flag-NIPA und HA-Ubiquitin transfizierten Zellen mit Proteasominhibitoren behandelt wurden (Abb. 4.2, Spur 8), ist im Flag-Blot eine Akkumulation verschieden großer hochmolekularer NIPA-Konjugate in der Immunpräzipitation zu sehen. Da dieser "smear" auch im HA-Blot zu sehen ist (Spur 4), handelt es sich hierbei tatsächlich um polyubiquitinierte NIPA-Konjugate. In den Kontrollen (Spur 1–3 und 5–7) ist hingegen keine oder eine sehr schwache Polyubiquitinierung von NIPA zu sehen.

Diese Daten zeigen, dass NIPA *in vivo* ubiquitiniert wird und geben somit einen weiteren Hinweis darauf, dass NIPA über den Ubiquitin-Proteasom Signalweg abgebaut wird.

4.2 Der APC^{Cdh1} vermittelt den Abbau von NIPA

Die in der Mitose und frühen G₁-Phase wichtigste E3-Ubiquitin Ligase ist der sogenannte "Anaphase-promoting Complex" (APC). Da der Abbau von NIPA während dieser Zellzyklusphase stattfindet, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob es sich hierbei um einen APC-abhängigen Prozess handelt. Desweiteren wurde untersucht, welcher der beiden in der Mitose relevanten APC-Aktivatoren (Cdc20 oder Cdh1) den Abbau von NIPA vermittelt.

4.2.1 Der Abbau von phosphoryliertem NIPA erfolgt zeitgleich mit bekannten mitotischen APC-Substraten

Um den genauen Zeitpunkt des Abbaus von NIPA zu ermitteln, wurden HeLa-Zellen durch einen Thymidin-Nocodazol-Block in Prometaphase synchronisiert und anschließend durch

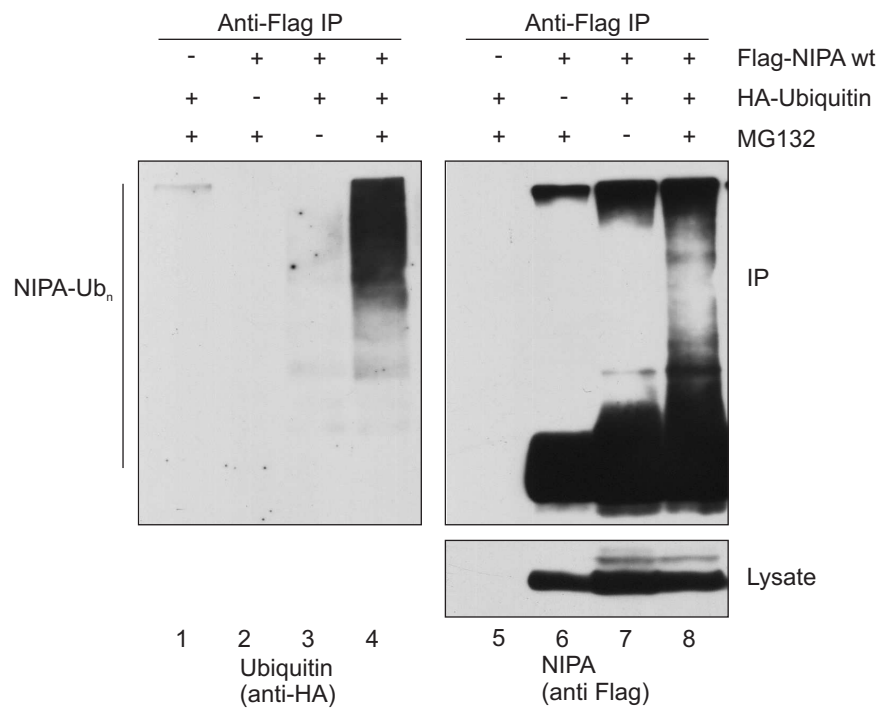


Abbildung 4.2: NIPA wird in vivo ubiquitiniert. Flag-NIPA wurde zusammen mit HA-Ubiquitin in 293-Zellen koexprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Proteasominhibitoren inkubiert. Die Lysate wurden denaturiert und Flag-NIPA wurde mit einem an Agarose-beads gekoppelten Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Lysate im Western Blot mit einem anti Flag-Antikörper sowie der Immunpräzipitationen mit einem anti Flag-Antikörper und einem anti HA-Antikörper auf der gleichen Membran. IP: Immunpräzipitation; Ub_n: Ubiquitin-Konjugate.

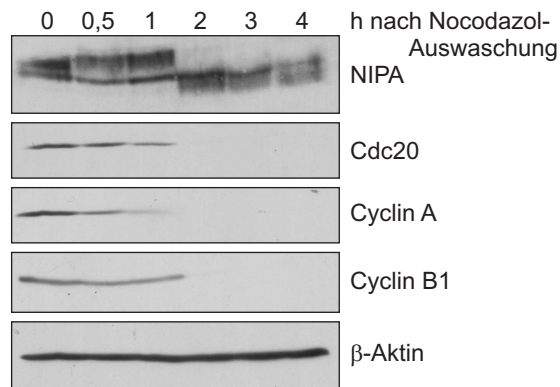


Abbildung 4.3: Der Abbau von phosphoryliertem NIPA erfolgt zeitgleich mit bekannten mitotischen APC-Substraten. HeLa-Zellen wurden in Prometaphase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen aus dem Zellzyklusblock entlassen und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Lysate im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran.

Waschen aus dem Zellzyklus-Block entlassen. Die Zellen wurden neu ausplattiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet.

In Abbildung 4.3 ist zu sehen, dass in HeLa Zellen 2h nach dem Entlassen aus dem Prometaphase-Block keine phosphorylierte Form des endogenen NIPA mehr vorhanden ist. Etwa zur gleichen Zeit werden die beiden APC-Substrate Cdc20 und Cyclin B1 abgebaut, wohingegen Cyclin A schon 1h nach dem Entlassen aus dem Prometaphase-Block fast vollständig degradiert ist.

Cyclin A ist ein Substrat des APC^{Cdc20} und wird in der späten Prometaphase ubiquitiniert und abgebaut [168], während Cyclin B1 zunächst auch ein Substrat des APC^{Cdc20} ist, jedoch erst in der späten Metaphase durch den APC^{Cdh1} vollständig degradiert wird [169]. Cdc20 wiederum wird in der späten Anaphase ausschließlich durch den APC^{Cdh1} ubiquitiniert [170] und anschließend abgebaut.

Somit wird die phosphorylierte Form von NIPA etwa zeitgleich mit den beiden APC^{Cdh1} -Substraten Cyclin B1 und Cdc20 abgebaut.

4.2.2 Der APC Komplex degradiert NIPA *in vitro*

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob NIPA in einem Lysat aus G_1 -synchronisierten Zellen *in vitro* degradiert werden kann. Hierfür wurde radioaktiv markiertes NIPA IVT Produkt in einem Lysat aus G_1 -synchronisierten HeLa-Zellen inkubiert, welches zuvor mit Degradationspuffer und Cdh1-IVT versetzt wurde. Wie im linken Teil der Abbildung 4.4 zu sehen ist, nimmt die Intensität der radioaktiven Bande, also die Konzentration von NIPA im Reaktionsansatz im Verlauf des Versuchs stark ab (Spur 4–6).

Dieser Versuch zeigt, dass NIPA *in vitro* mit Hilfe einer E3-Ligase, die in G_1 -synchronisierten Zellen aktiv ist, abgebaut werden kann.

Um zu untersuchen, ob dieser Abbau abhängig vom APC-Komplex ist, wurde in einem weiteren Ansatz Cdc27, eine Untereinheit des APC-Kernkomplexes, aus dem eingesetzten Lysat depletiert. Die Depletion von Cdc27 führt zu einer Depletion des gesamten APC

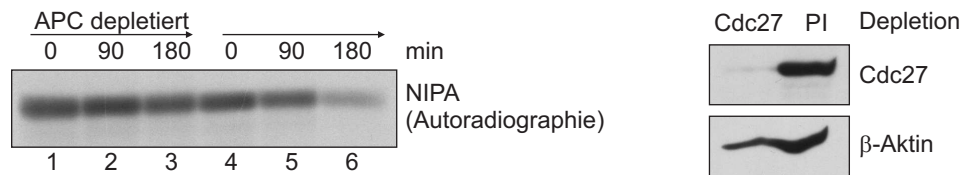


Abbildung 4.4: In vitro Degradation von NIPA ist APC-abhängig. HeLa-Zellen wurden durch Entlassen aus einem Nocodazol-Block in früher G₁-Phase synchronisiert. Die Lysate wurden mit einem anti Cdc27 Antikörper oder als Kontrolle mit Preimmunserum (PI) depletiert. Anschließend wurde radioaktiv markiertes NIPAwT IVT-Produkt in den depletierten, mit Degradationspuffer versetzten Lysaten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im linken Teil der Abbildung ist die Autoradiographie der NIPA IVT dargestellt, rechts ist die immunchemische Darstellung der depletierten Lysate im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran zu sehen. PI: Preimmunserum.

Kernkomplexes und somit zu einer Verminderung der APC-Aktivität [59]. Im rechten Teil der Abbildung 4.4 ist gezeigt, dass Cdc27 erfolgreich aus dem eingesetzten Lysat depletiert wurde. In diesem depletierten Lysat konnte NIPA nicht mehr erfolgreich degradiert werden (Abb. 4.4 links, Spur 1–3).

Somit ist die *in vitro* Degradation von NIPA in Lysaten aus G₁-synchronisierten Zellen abhängig von der Aktivität des APC-Komplexes.

4.2.3 NIPA interagiert *in vivo* mit Cdh1, jedoch nicht mit Cdc20

Für mehrere APC-Substrate wurde bereits gezeigt, dass sie direkt an die APC Adapter-Proteine Cdc20 oder Cdh1 binden (zum Beispiel [87, 171, 172]). Um zu untersuchen, ob NIPA mit einem der APC-Aktivatoren interagiert, wurden Koimmunpräzipitationsstudien durchgeführt. Hierfür wurde Flag-NIPA zusammen mit HA-Cdh1 oder HA-Cdc20 in der humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinie 293 transient koexprimiert. Die Zellen wurden vor dem Ernten mit Proteasominhibitoren behandelt, um einen verstärkten Abbau von NIPA durch die Überexpression von Cdh1 zu verhindern. Nach Herstellung der Zelllysate wurde Flag-NIPA mit einem agarosegekoppelten monoklonalen Anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert. Als Negativkontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit einem unspezifischen Kaninchen-Antiserum durchgeführt. Die Immunkomplexe wurden denaturiert, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Wie der Western Blot mit einem HA-Antikörper zeigt, wurden HA-Cdh1 und HA-Cdc20 etwa gleich stark exprimiert, jedoch koimmunpräzipitierte nur HA-Cdh1, nicht aber HA-Cdc20 mit Flag-NIPA (Abb. 4.5 a). Der Flag-Blot zeigt, dass vergleichbare Mengen NIPA immunpräzipitiert wurden. Die Immunpräzipitation ist spezifisch, da die Kaninchenserumkontrolle keinerlei unspezifische Reaktionen zeigte.

Als Kontrolle wurde in einem weiteren Experiment Myc-NIPA zusammen mit HA-Cdh1 oder HA-Cdc20 in 293 Zellen koexprimiert, welche anschließend mit Proteasominhibitoren behandelt wurden. Anschließend wurde diesmal HA-Cdh1 bzw. HA-Cdc20 mit einem HA-Antikörper immunpräzipitiert. Wie Abbildung 4.5 b zeigt, wurden HA-Cdh1 und HA-Cdc20

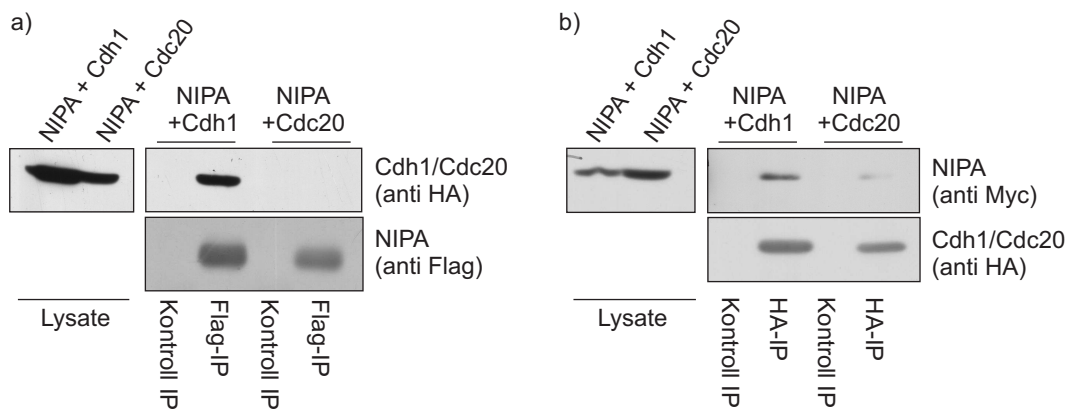


Abbildung 4.5: NIPA interagiert in vivo mit Cdh1. a) Flag-NIPA wurde zusammen mit HA-Cdh1 oder HA-Cdc20 in 293-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Proteasominhibitoren inkubiert. Die Ko-Immünpräzipitation wurde mit einem an Agarose-beads gekoppelten Flag-Antikörper durchgeführt. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem anti HA-Antikörper und einem anti Flag-Antikörper. b) Myc-NIPA wurde zusammen mit HA-Cdh1 oder HA-Cdc20 in 293-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Proteasominhibitoren inkubiert. Die Ko-Immünpräzipitation wurde mit einem anti Myc-Antikörper durchgeführt. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem anti HA-Antikörper und einem anti Myc-Antikörper. IP: Immunpräzipitation

in vergleichbaren Mengen immunpräzipitiert. Jedoch ist nur in der Cdh1-Immunpräzipitation eine gute Ko-Immunpräzipitation von Myc-NIPA zu erkennen, während Myc-NIPA nur sehr schwach mit HA-Cdc20 ko-immunpräzipitiert.

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass NIPA *in vivo* selektiv mit dem APC-Aktivator Cdh1, jedoch nicht mit Cdc20 interagiert.

4.2.4 Identifizierung der Bindungsdomäne an Cdh1 in NIPA

Um die Region in NIPA zu identifizieren, die die Bindung an Cdh1 vermittelt, wurden GST-Pulldown Studien mit verschiedenen GST-NIPA-Deletionsmutanten durchgeführt. Hierfür wurde Cdh1 durch *in vitro* Translation synthetisiert, radioaktiv markiert und in die GST-Bindungsexperimente eingesetzt. Ein erstes Experiment wurde mit GST-NIPA-Fragmenten mit den Aminosäuren 1–102, 1–202, 1–302, 1–402 und dem wildtyp GST-NIPA-Protein (1–502) durchgeführt (Abb. 4.6 a rechts). Ein Pulldown mit GST diente als negativ Kontrolle, um die Spezifität der Bindung von NIPA an Cdh1 zu überprüfen. Die Coomassie-Färbung des Gels zeigt, dass in die Pulldowns etwa gleiche Mengen GST-NIPA Protein eingesetzt wurde (Abb. 4.6 a links unten). Während die Cdh1 IVT an wildtyp NIPA und das Fragment mit den Aminosäuren 1–402 bindet (Spuren 1 und 5), ist keine Bindung an die kürzeren NIPA-Fragmente 1–102, 1–202 und 1–302 zu sehen (Spuren 2–4, Abb. 4.6 a links oben). Aus diesem Experiment lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung von Cdh1 in der Region 302–402 in NIPA stattfindet. Da dieses Experiment im zellfreien System durchgeführt wird, kann davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesene Interaktion zwischen NIPA und Cdh1 nicht über dritte Proteine vermittelt wird.

Um die Region, an die Cdh1 bindet, genauer zu bestimmen, wurden in weiteren Experimenten GST-Pulldowns mit kleineren GST-NIPA-Fragmenten in der Region 302–402 durchgeführt (Abb. 4.6 b und c). Auch hier zeigt die Coomassie-Färbung der Gele, dass in etwa gleiche Mengen GST-NIPA Protein in die Pulldowns eingesetzt wurde. Wie nach dem vorherigen Experiment zu erwarten war, bindet Cdh1 an das NIPA-Fragment mit den Aminosäuren 302–402 (Abb. 4.6 b, Spur 2). Eine weitere Unterteilung dieses Fragments zeigt, dass die Bindungsstelle von Cdh1 an NIPA in der Region 352–402 von NIPA liegt (Abb. 4.6 b, Spur 4). Da des Weiteren die Fragmente 352–402 und 395–502 in der Lage sind, an Cdh1 zu binden (Abb. 4.6 c), kann man aus diesen Experimenten folgern, dass die Bindung von Cdh1 in der Region 395–402 von NIPA stattfindet.

Eine Deletionsmutante von NIPA, in der diese Aminosäuren 395–402 deletiert wurden, ist dementsprechend in Pulldown-Experimenten nicht mehr in der Lage, an Cdh1 zu binden (Abb. 4.7, vergleiche Spur 2 und 3)

4.2.5 *in vitro* Ubiquitinierung von NIPA durch den APC ist abhängig von Cdh1

Da NIPA *in vitro* APC-abhängig degradiert wird und an das APC-Adapterprotein Protein Cdh1 bindet, sollte im Folgenden untersucht werden, ob der APC^{Cdh1} in der Lage ist, NIPA zu ubiquitinieren.

Für die *in vitro* Ubiquitinierungs-Experimente wurde an Agarose gebundenes Flag-NIPA eingesetzt, welches zuvor aus transfizierten 293-Zellen immunpräzipitiert wurde. Der APC-Kernkomplex wurde mit einem Antikörper gegen die Untereinheit Cdc27 aus dem Ly-

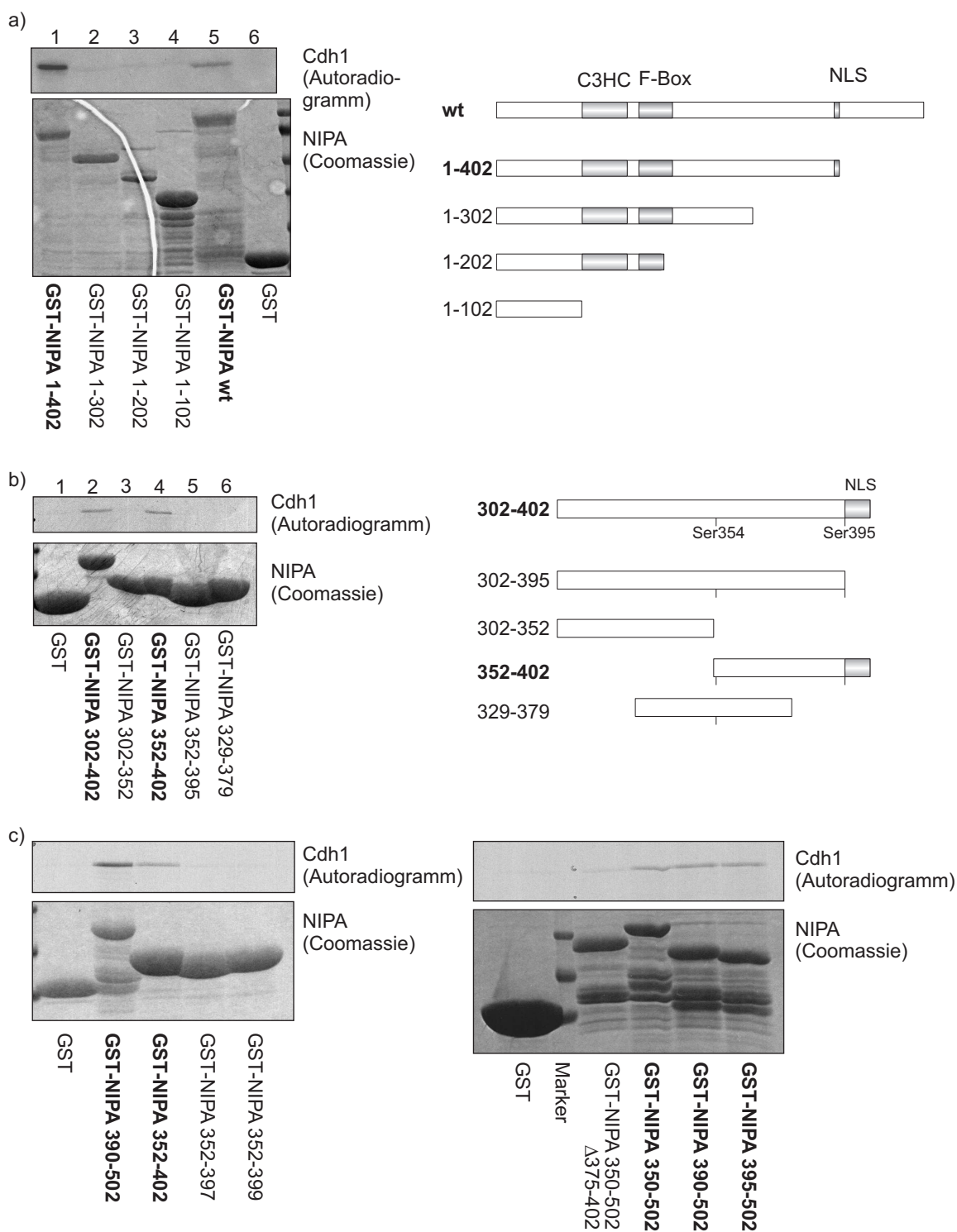


Abbildung 4.6: Identifizierung der Cdh1-Bindungsdomäne in NIPA. GST-Pulldown Experimente mit *in vitro* translatiertem, mit ^{35}S -Methionin markiertem Cdh1 und verschiedenen GST-fusionierten NIPA Fragmenten. Die Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch dargestellt. In der Coomassie-Färbung der Gele sind die in die Pulldowns eingesetzten GST und GST-NIPA Fragmente dargestellt. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die schematische Darstellung der in die Pulldowns eingesetzten GST-NIPA Fragmente zu sehen. Bindende Fragmente sind durch dickere Schrift hervorgehoben.

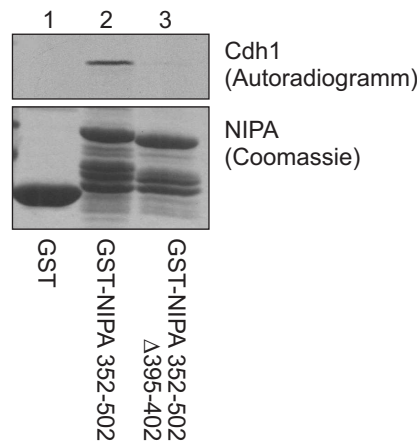


Abbildung 4.7: Deletion der Aminosäuren 395–402 in NIPA beeinträchtigt die Interaktion mit Cdh1. GST-Pulldown Experimente mit *in vitro* translatiertem, mit ^{35}S -Methionin markiertem Cdh1 und verschiedenen GST-fusionierten NIPA Fragmenten. Die Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch dargestellt. In der Coomassie-Färbung der Gele sind die in die Pulldowns eingesetzten GST und GST-NIPA Fragmente dargestellt.

sat exponentiell wachsender HeLa-Zellen immunpräzipitiert. Diese beiden Immunpräzipitate wurden zusammen mit aufgereinigtem Ubiquitin-aktivierendem Enzym (E1), Ubiquitin-konjugierendem Enzym (E2), Ubiquitin und einem ATP-regenerierenden System in Ubiquitinierungs-Puffer inkubiert (siehe Kap. 3.4.8). Hierbei wurde einem Ansatz *in vitro* translatiertes Cdh1-Protein zugegeben, während dem Kontroll-Ansatz kein APC-Aktivator beigefügt wurde. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt und denaturiert. Anschließend wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt.

In Abbildung 4.8 a wurde das in die Ubiquitinierungs-Reaktionen eingesetzte NIPA mit einem anti Flag-Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. In dem Ansatz, in dem der APC-Aktivator Cdh1 zugegeben wurde, werden nach 30 Minuten höhermolekulare Banden von NIPA sichtbar, deren Intensität zu späteren Zeitpunkten zunimmt (Spur 1–3). In der Kontrollreaktion ohne Cdh1 ist hingegen keine Akkumulation solcher höhermolekularen Konjugate zu erkennen (Spur 4–6).

In einem weiteren Versuch wurde anstatt des an Agarose gebundenen, immunpräzipitierten Flag-NIPA radioaktiv markiertes, *in vitro* translatiertes (IVT) NIPA-Protein als Substrat eingesetzt. Die *in vitro* Ubiquitinierungs-Reaktionen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Auch in diesem Versuch werden in dem Ansatz, in dem Cdh1 zugegeben wurde, nach 30 Minuten höhermolekulare Banden von NIPA sichtbar, deren Intensität nach 90 Minuten stark zunimmt (Abb. 4.8 b, Spur 1-3). In diesem Versuch sind die unterschiedlich langen höhermolekularen Ubiquitin-Konjugate sehr schön als “smear” zu erkennen. In der Kontrollreaktion ohne Cdh1 ist die Ubiquitinierung von NIPA wesentlich schwächer ausgeprägt, aber nicht vollständig aufgehoben. Dies liegt vermutlich daran, dass in dem Retikulozyten-Lysat, das für die *in vitro* Translation des Substrates verwendet wird, eine hohe APC-Aktivität und auch Cdh1 Protein vorliegt.

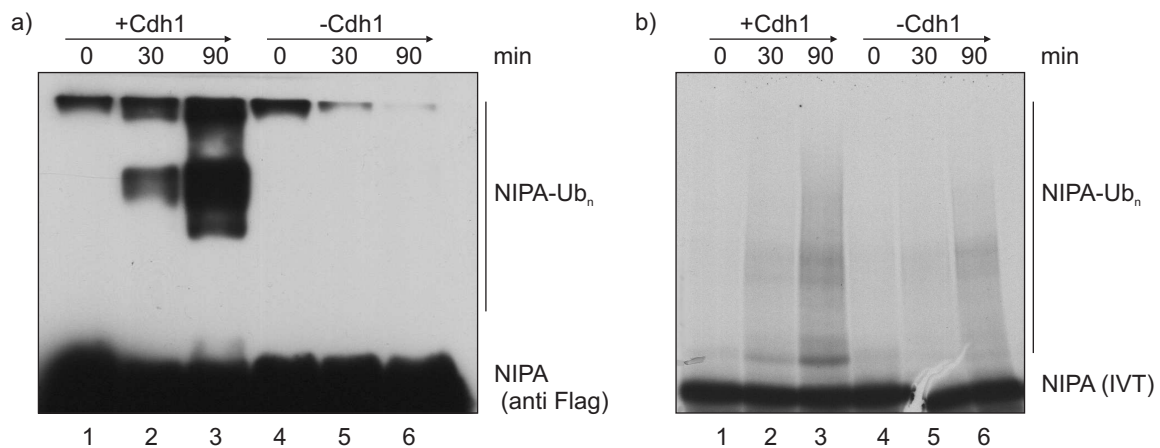


Abbildung 4.8: in vitro Ubiquitinierung von NIPA durch den APC ist abhängig von Cdh1. a) Flag-NIPA wurde transient in 293-Zellen überexprimiert und anschließend mit einem Agarose-gekoppelten anti Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Dieses Immunpräzipitat wurde in APC *in vitro* Ubiquitinierungs-Reaktionen eingesetzt, denen Cdh1 IVT zugesetzt wurde oder nicht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der aus den Ubiquitinierungsansätzen entnommenen Flag-NIPA Immunpräzipitate mit einem anti Flag-Antikörper. b) Radioaktiv markiertes IVT-Produkt des wildtyp NIPA Proteins wurde in die APC *in vitro* Ubiquitinierungs-Reaktionen eingesetzt, die wie in a) durchgeführt wurden. Dargestellt ist die Autoradiographie der Ubiquitinierungs-Versuche. Ub_n: Ubiquitin-Konjugate.

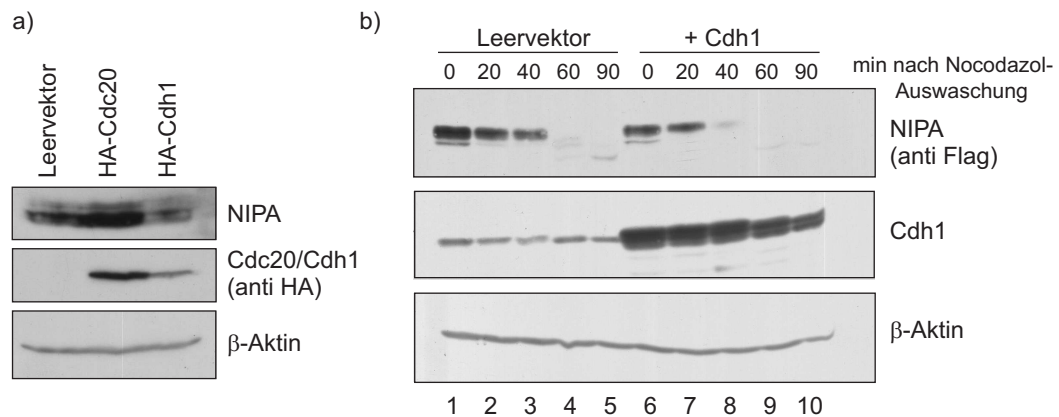


Abbildung 4.9: Überexpression von Cdh1 führt zu einem verstärkten Abbau von NIPA.

a) 293-Zellen wurden mit HA-Cdc20, HA-Cdh1 oder als Kontrolle mit Leervektor transfiziert und 48 h nach der Transfektion geerntet. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran. b) NIH/3T3 Zellen, die stabil Flag-NIPA wt exprimieren, wurden mit HA-Cdh1 oder Leervektor transfiziert und 24 h nach Transfektion in Prometaphase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen aus dem Zellzyklusblock entlassen und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Zell-Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem anti Flag-Antikörper, einem anti Cdh1-Antikörper und als Ladungskontrolle einem anti β -Aktin-Antikörper.

Diese Daten zeigen, dass der APC-Komplex in der Lage ist, NIPA *in vitro* zu ubiquitinieren und dass dieser Prozess durch das APC Adapterprotein Cdh1 reguliert wird.

Somit vermittelt der APC^{Cdh1}-Komplex *in vitro* sowohl die Ubiquitinierung als auch den Abbau von NIPA. Ob der APC^{Cdh1}-Komplex jedoch auch die E3-Ligase ist, die *in vivo* für den Abbau der phosphorylierten Form von NIPA in der späten Mitose verantwortlich ist, soll in den folgenden Experimenten untersucht werden.

4.2.6 Überexpression von Cdh1 führt zu einem verstärkten Abbau von NIPA

Cdh1 liegt in limitierenden Mengen in der Zelle vor, so dass Überexpression von Cdh1 zu einer Steigerung der APC-Aktivität führen kann [173]. Um zu untersuchen, ob Cdh1 ein limitierender Faktor für den Abbau von NIPA ist, wurden 293-Zellen transient mit HA-Cdh1 oder als Kontrolle mit HA-Cdc20 oder Leervektor transfiziert und 48 h nach Transfektion geerntet. Im HA-Blot ist zu sehen, dass sowohl Cdh1 als auch Cdc20 erfolgreich überexprimiert wurden (Abb. 4.9 a, mittleres Bild). Die Überexpression von Cdh1, jedoch nicht von Cdc20 führt zu einer verminderten Expression des endogenen NIPA-Proteins (Abb. 4.9 a, oben).

In einem weiteren Experiment wurden NIH/3T3 Zellen, die stabil humanes Flag-NIPA überexprimieren, transient mit HA-Cdh1 oder als Kontrolle mit Leervektor transfiziert. Anschließend wurden die Zellen durch einen Thymidin-Nocodazol Block in Prometaphase synchronisiert, die mitotischen Zellen wurden durch Auswaschen des Nocodazols aus dem Block entlassen und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Wie in Abbildung 4.9 b zu

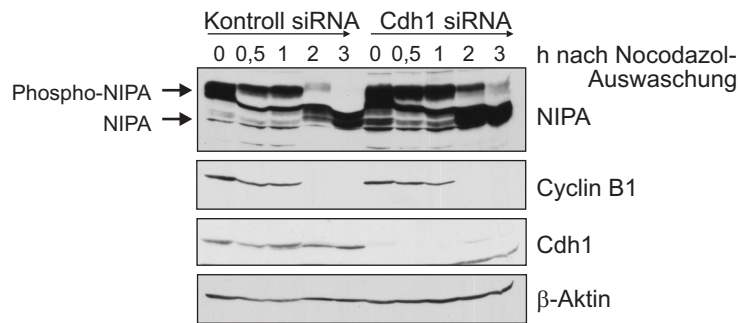


Abbildung 4.10: Herunterregulierung von Cdh1 führt zu einer Stabilisierung der phosphorylierten Form von NIPA. HeLa Zellen wurden mit Cdh1-spezifischer siRNA oder mit Luziferase siRNA transfiziert, 12 h nach Transfektion wurden die Zellen in Prometaphase synchronisiert, aus dem Zellzyklusblock entlassen und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran.

sehen, wird phosphoryliertes NIPA in Cdh1-überexprimierenden Zellen zu einem früheren Zeitpunkt in der Mitose abgebaut, als in den parentalen Kontrollzellen. Auch hier ist zu sehen, dass die Überexpression des Cdh1-Proteins generell zu einer verminderten Expression NIPAs führt (vergleiche Spur 1 und Spur 6).

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass Cdh1 einen limitierenden Faktor für den Abbau von phosphoryliertem NIPA in der späten Mitose darstellt.

4.2.7 Durch RNA-Interferenz vermittelte Herunterregulation von Cdh1 führt zu einer Stabilisierung der phosphorylierten Form von NIPA in später Mitose

Um die Bedeutung von Cdh1 für den Abbau von NIPA in der Mitose weiter zu untersuchen, wurden RNA-Interferenz Experimente durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode kann spezifisch die Expression eines bestimmten Proteins herunterreguliert werden [158]. Um zu untersuchen, ob die reduzierte Expression von Cdh1 einen Einfluß auf den Abbau von phosphoryliertem NIPA in später Mitose hat, wurden HeLa-Zellen entweder mit Cdh1-siRNA oder als Kontrolle mit Luziferase-siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch einen Thymidin-Nocodazol-Block in Prometaphase synchronisiert, die mitotischen Zellen wurden durch Auswaschen des Nocodazols aus dem Block entlassen und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet.

Im Cdh1-Blot ist zu sehen, dass die Cdh1-Expression durch Transfektion der siRNA erfolgreich herunterreguliert werden konnte (Abb. 4.10). Diese Herunterregulierung von Cdh1 führt zu einer Verzögerung des Abbaus der phosphorylierten Form von NIPA im Vergleich zu den mit Luciferase-siRNA transfizierten Kontrollzellen.

Diese Daten geben einen weiteren Hinweis darauf, dass Cdh1 den Abbau von phosphoryliertem NIPA in der späten Mitose vermittelt.

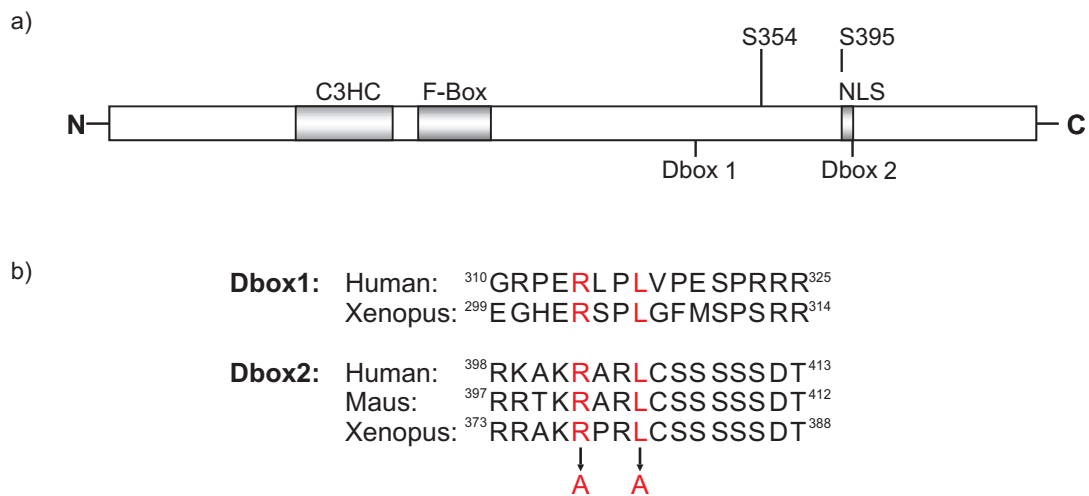


Abbildung 4.11: Die NIPA-Sequenz enthält zwei Dbox-Motive. a) Schematische Darstellung des humanen NIPA Proteins mit Kennzeichnung der potentiellen Dbox-Motive. C: C-Terminus; C3HC: Zink Finger Domäne; Dbox: destruction box; F-Box: F-Box Domäne; N: N-Terminus; NLS: Kernlokalisierungs-Signal (nuclear localisation signal); S: Serin-Rest b) Alignment der potentiellen D-Box-Motive in verschiedenen Spezies.

4.3 Identifizierung des Degradations-Motivs in NIPA

4.3.1 Die NIPA-Sequenz enthält zwei potentielle Dbox-Motive

Die meisten Substrate des APC enthalten kurze Erkennungssequenzen, wie zum Beispiel die destruction box (Dbox), RxxLxxxxN [112] oder die KEN-box, KENxxxN [113]. Substrate, die eine Dbox enthalten, werden von APC^{Cdc20} ubiquitiniert, während der APC^{Cdh1} sowohl Substrate mit einer Dbox, als auch Substrate mit einer KEN-box erkennt (siehe Einleitung, Kap. 1.2.4).

Die humane NIPA Sequenz enthält im C-terminus zwei RxxL Motive, jedoch keine anderen bisher beschriebenen Erkennungssequenzen (Abb. 4.11 a). Eines dieser beiden Motive (Dbox1) ist auch in der Sequenz von *Xenopus laevis* zu finden, während das zweite Motiv (Dbox2) sowohl in der murinen Sequenz, als auch in *Xenopus laevis* konserviert ist (Abb. 4.11 b). Die Arginin- und Leuzinreste dieser beiden potentiellen Dbox Motive wurden mit Hilfe der PCR Mutagenese zu Alaninresten mutiert um in weiteren Versuchen die Abhängigkeit des Abbaus von NIPA von diesen Motiven zu untersuchen.

4.3.2 Mutation der Dbox Motive hat keinen Einfluss auf die Bindung von NIPA an Cdh1

Die APC-Koaktivatoren Cdc20 und Cdh1 binden in vielen Fällen direkt an die Erkennungsmotive (Dboxen und KEN-Boxen) ihrer Substrate [90, 174]. Um zu untersuchen, ob die Mutation der Dbox Motive in NIPA die Bindung an Cdh1 beeinflusst, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierfür wurde HA-Cdh1 zusammen mit Flag-NIPA wt oder den Dbox-Mutanten in 293-Zellen transient koexprimiert. Als Kontrolle wurde

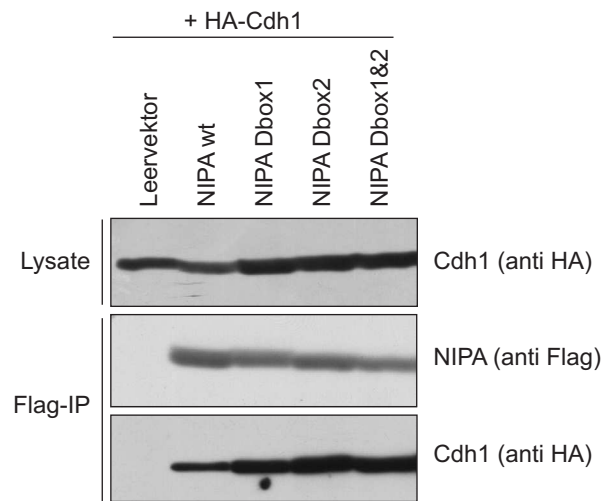


Abbildung 4.12: Mutation der Dbox-Motive in NIPA hat keinen Einfluß auf die Bindung an Cdh1. HA-Cdh1 wurde zusammen mit Flag-NIPAwT oder einer der Dbox-Mutanten in 293-Zellen koexprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Proteasominhibitoren inkubiert. Die Ko-Immünpräzipitation wurde mit einem an Agarose-beads gekoppelten Flag-Antikörper durchgeführt. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem anti HA-Antikörper und einem anti Flag-Antikörper.

HA-Cdh1 zusammen mit Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden vor dem Ernten für 6 h mit Proteasominhibitoren behandelt, um den Abbau von NIPA zu verhindern. Nach Herstellung der Zellysate wurde Flag-NIPA mit einem agarosegekoppelten monoklonalen Anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden denaturiert, mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

Wie der Western Blot mit einem HA-Antikörper zeigt, wurde HA-Cdh1 sowohl mit Flag-NIPA wt, als auch mit den NIPA-Dbox-Mutanten koimmunpräzipitiert (Abb. 4.12). Die Mutation der D-box Motive in NIPA hat somit keinen Einfluss auf die Bindung von NIPA an Cdh1. Die Bindung von Cdh1 an NIPA ist spezifisch, da in der Kontrolle ohne NIPA kein Cdh1 in der Ko-Immünpräzipitation vorhanden ist.

4.3.3 Mutation der Dbox-Motive in NIPA vermindert die APC^{Cdh1}-vermittelte Ubiquitinierung *in vitro*

Wie bereits erwähnt, findet bei vielen Substraten des APC die Bindung an Cdh1 oder Cdc20 über das Degradationsmotiv im Substrat statt. Für einige Substrate wurde hingegen gezeigt, dass der Abbau, jedoch nicht die Bindung an Cdh1 von der Integrität des Dbox Motives abhängig ist (zum Beispiel [87, 175]). Somit wäre es möglich, dass trotz der Dbox-unabhängigen Bindung von NIPA an Cdh1 die Ubiquitinierung durch den APC^{Cdh1} und der anschließende Abbau der phosphorylierten Form von NIPA abhängig von einem der beiden Dbox-Motive ist. Deshalb soll nun im Folgenden untersucht werden, ob die Mutation der Dbox-Motive einen Einfluss auf die *in vitro* Ubiquitinierung durch den APC^{Cdh1} hat.

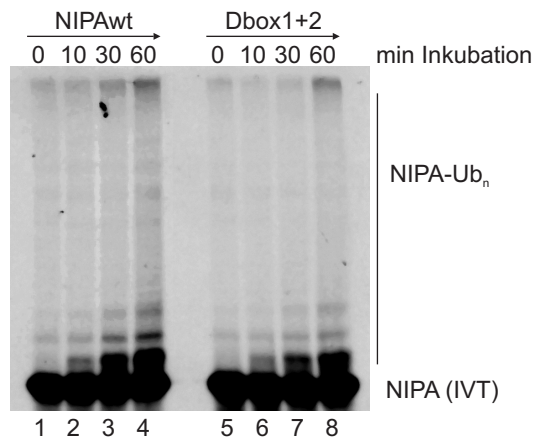


Abbildung 4.13: Mutation der Dbox-Motive vermindert die APC^{Cdh1}-vermittelte Ubiquitinierung *in vitro*. Radioaktiv markiertes IVT-Produkt des wildtyp NIPA Proteins oder der Dbox1+2-Mutante wurde in APC *in vitro* Ubiquitinierungs-Reaktionen eingesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist die Autoradiographie der Ubiquitinierungs-Versuche. Ub_n: Ubiquitin-Konjugate.

Die *in vitro* Ubiquitinierungsreaktion wurde wie bereits in Kapitel 4.2.5 beschrieben durchgeführt. Jedoch wurde diesmal nicht nur wildtyp NIPA in die Reaktion eingesetzt, es wurde auch eine Ubiquitinierungsreaktion mit einer Mutante von NIPA, in der beide potentiellen D-Box Motive mutiert sind (Dbox1+2), durchgeführt.

Wie bereits in Kapitel 4.2.5 gezeigt wurde, wird wildtyp NIPA *in vitro* durch den APC^{Cdh1} ubiquitiniert (Abb. 4.13, Spur 1-4). Bei der Mutante, in der beide potentiellen Dbox-Motive mutiert sind, ist auch eine schwache Ubiquitinierung zu erkennen (Spur 5-8). Diese Ubiquitinierung ist allerdings wesentlich weniger stark ausgeprägt, als bei dem wildtyp NIPA Protein.

Diese Daten zeigen, dass eines der Dbox-Motive - oder beide - essentiell für die APC^{Cdh1}-vermittelte *in vitro* Ubiquitinierung ist und somit als Degradationsmotiv in NIPA dient. Da die Mutation dieser Motive jedoch die Ubiquitinierung zwar abschwächt, aber nicht vollständig aufhebt, ist es wahrscheinlich, dass noch weitere Degradationsmotive in NIPA vorhanden sind.

4.3.4 Mutation der Dbox-Motive hat keinen Einfluss auf die Stabilität der phosphorylierten Form von NIPA in der späten Mitose

Da die Mutation der Dbox-Motive in NIPA zu einer verminderten *in vitro* Ubiquitinierung durch den APC^{Cdh1} führt, sollte nun im Folgenden untersucht werden, ob eines der beiden Dbox-Motive als Degradationsmotiv für den Abbau der phosphorylierten Form von NIPA in der späten Mitose eine Rolle spielt. Hierfür wurden NIH/3T3-Zellen mit Flag-NIPA wildtyp oder mit einer Mutante, in der beide Dbox-Motive mutiert wurden, transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden durch einen Thymidin-Nocodazol-Block in Prometaphase synchronisiert und anschließend durch Waschen synchron aus dem Zellzyklusblock entlassen.

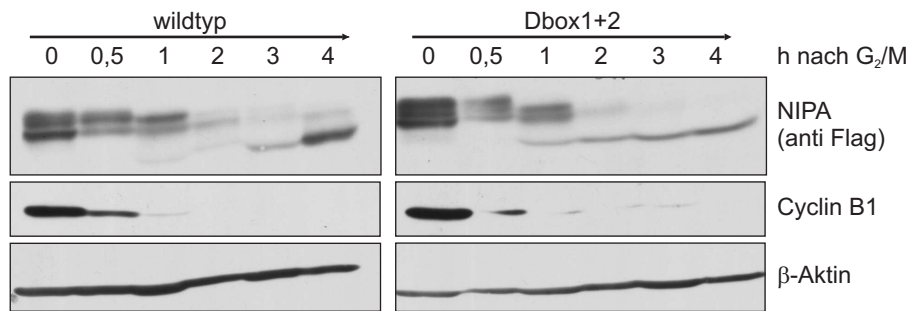


Abbildung 4.14: Mutation der Dbox-Motive hat keinen Einfluss auf die Stabilität der phosphorylierten Form von NIPA in der späten Mitose. NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPA wildtyp oder die Dbox1+2 Mutante überexprimieren, wurden in Prometaphase synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen aus dem Zellzyklusblock entlassen, neu ausplattiert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern.



Abbildung 4.15: Überlappung des Dbox2 Motives in NIPA mit dem Kernlokalisierungs-Signal. Dargestellt ist die Region der Aminosäuren 390–409 des humanen NIPA-Proteins. Farblich hervorgehoben sind die für die nukleäre Lokalisation wichtigen Aminosäuren (in grau), sowie die beiden essentiellen Aminosäuren des Dbox2-Motives (in rot). NLS: Kernlokalisierungs-Signal (*nuclear localisation signal*).

In Abbildung 4.14 ist zu sehen, dass etwa zwei Stunden nach Entlassen aus dem Zellzyklusblock die phosphorylierte Form des NIPA wildtyp Proteins fast vollständig degradiert ist. Auch bei der Mutante, in der beide Dbox-Motive mutiert wurden, ist zum gleichen Zeitpunkt so gut wie kein phosphoryliertes Protein mehr vorhanden. Die vergleichbare Kinetik des Abbaus von Cyclin B1 zeigt, dass die Überexpression der Dbox-Mutante keinen Einfluss auf das Fortschreiten der Zelle durch die Mitose ausübt. Somit hat die Mutation der Dbox-Motive keinen Einfluss auf die Stabilität der phosphorylierten Form von NIPA in der späten Mitose.

4.3.5 Mutation der Dbox Motive beeinflusst die zelluläre Lokalisation von NIPA

Das zweite D-box Motiv in NIPA überschneidet sich teilweise mit dem Motiv, das für die nukleäre Lokalisation von NIPA notwendig ist (*nuclear localisation signal*, NLS, siehe Abb. 4.15). Die Mutation eines einzigen Aminosäure-Restes im NLS (K399P) führt zu einer teilweise cytoplasmatischen Expression von NIPA, während bei einem Austausch von drei Aminosäure-Resten (R395A, K399A, K401A) NIPA nur noch im Cytoplasma lokalisiert ist [117].

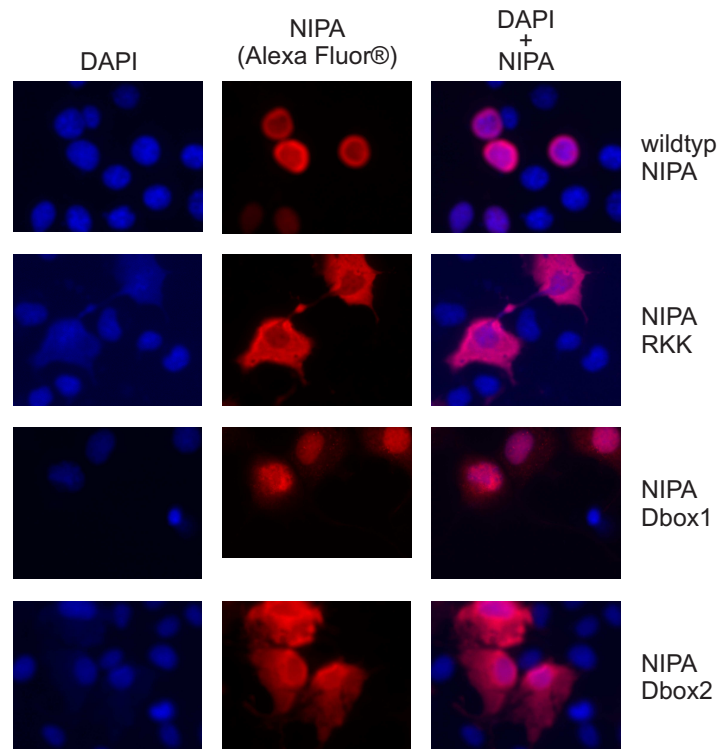


Abbildung 4.16: Mutation der Dbox-Motive beeinflusst die nukleäre Lokalisation von NIPA Gezeigt ist die Immunfluoreszenz-Aufnahme von Cos-1 Zellen, die transient Flag-NIPA wt, Flag-NIPA Dbox1, Flag-NIPA Dbox2 oder die NLS-Mutante Flag-NIPA RKK überexprimieren. Die Zellen wurden mit einem anti-Flag-Antikörper und anschließend mit einem Alexa Fluor® 594-markierten Sekundärantikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Es wäre möglich, dass eine falsche Lokalisation der Dbox-Mutante zu einem APC-unabhängigen Abbau aufgrund dieser Fehl-Lokalisation führt. Um auszuschließen, dass die Mutation des Dbox-Motives auch das NLS abschwächt oder inaktiviert, wurde die zelluläre Lokalisation der NIPA-Mutante mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz überprüft. Hierfür wurden Cos-1 Zellen auf Objektträgern ausplattiert, mit Flag-NIPA wt, der Dbox1-Mutante oder der Dbox2-Mutante transfiziert und 24 h nach der Transfektion geerntet. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer Mutante von NIPA transfiziert, die sich aufgrund einer Mutation im NLS (R395A, K399A, K401A) ausschließlich im Cytoplasma befindet. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit einem anti-Flag Antikörper und anschließend mit einem Alexa Fluor® 594-markierten Zweitantikörper inkubiert.

Wie bereits beschrieben wurde, ist das wildtyp NIPA Protein ausschließlich im Zellkern lokalisiert, wohingegen sich die NLS-Mutante (RKK) ausschließlich im Cytoplasma befindet (Abb. 4.16, oben). Die Mutation des ersten Dbox-Motives hat keinen Einfluss auf die Lokalisation des NIPA-Proteins. Bei der Dbox2-Mutante befindet sich hingegen ein Großteil des Proteins im Cytoplasma. Diese cytoplasmatische Lokalisation ist jedoch nicht so ausgeprägt, wie bei der NLS-Mutante (Abb. 4.16, unten).

Da die Proteine mit Hilfe eines anti Flag-Antikörper detektiert wurden, ist in diesem Versuch ausschließlich die überexprimierte Dbox-Mutante, jedoch nicht das endogene wildtyp Protein zu sehen. Aufgrund einer relativ niedrigen Transfektionseffizienz ist die Expression von Flag-NIPA nur in einem Teil der Zellen zu sehen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutation des Dbox2-Motives aufgrund seiner Nähe zum NLS die Lokalisation von NIPA stark beeinflusst. Somit wäre es möglich, dass die phosphorylierte Form der Dbox-Mutante in der späten Mitose aufgrund der falschen Lokalisation durch APC-unabhängige Mechanismen degradiert wird, so dass keine Stabilisierung dieser Mutante zu beobachten ist.

4.4 Regulation der Ubiquitinierung von NIPA

Der APC^{Cdh1} ist in der Mitose ab der späten Anaphase und während der gesamten anschließenden G₁-Phase aktiv (siehe Einleitung, Kap. 1.2.4). Da während dieser Zellzyklusphase die unphosphorylierte Form von NIPA akkumulieren kann, muss es einen Regulationsmechanismus geben, der gewährleistet, dass die phosphorylierte Form von NIPA abgebaut werden kann, während unphosphoryliertes NIPA vor der Ubiquitinierung durch den APC^{Cdh1} geschützt ist.

In den folgenden Experimenten soll deshalb untersucht werden, wie der Abbau von NIPA durch den APC-Komplex reguliert wird.

4.4.1 Die Phosphomimick-Mutante von NIPA bindet an Skp1

Zunächst wurde untersucht, ob der Phosphorylierungsstatus von NIPA direkt einen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hat. Als Phosphorylierungsstellen in NIPA wurden die Serinreste 354, 359 und 395 identifiziert [127]. Diese Serinreste wurden mit Hilfe der PCR-vermittelten Mutagenese (Kap. 3.1.8) zu Aspartatresten mutiert. Die Seitenkette der Aminosäure Aspartat ist bei physiologischem pH-Wert negativ geladen und imitiert somit die negative Ladung des Phosphat-Rests einer phosphorylierten Aminosäure. Die somit erzeugte Phosphomimick-Mutante von NIPA (S354D, S359D, S395D oder "DDD") wurde zunächst auf seine Funktionalität untersucht. Phosphorylierung von NIPA in der G₂-Phase führt zur Dissoziation der NIPA-Skp1 Bindung und somit zu einer Inaktivierung des SCF^{NIPA}-Komplexes [124]. Um zu untersuchen, ob die Phosphomimick-Mutante noch in der Lage ist, an Skp1 zu binden, wurden GST-Bindungsstudien durchgeführt. Hierfür wurde Flag-NIPA wt oder die Phosphomimick-Mutante (DDD) transient in 293-Zellen überexprimiert und die Lysate wurden in GST-Pulldown Experimente mit GST-Skp1 oder als Negativkontrolle GST eingesetzt.

Im linken Teil der Abbildung 4.17 sind die in den GST-Bindungsexperimenten eingesetzten Lysate dargestellt. Wie der Western Blot mit einem anti Flag-Antikörper zeigt, sind NIPA wt und die DDD-Mutante etwa gleich stark exprimiert. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Bindung von Flag-NIPA an die GST-Skp1 Sepharose. Hier ist zu sehen, dass sowohl wildtyp NIPA, als auch die Phosphomimick-Mutante an Skp1 binden.

Die Bindung von NIPA an Skp1 ist spezifisch, da in der Kontrolle mit GST-Sepharose kein NIPA im Pulldown vorhanden ist. Die Amidoschwarzfärbung der Membran im rechten

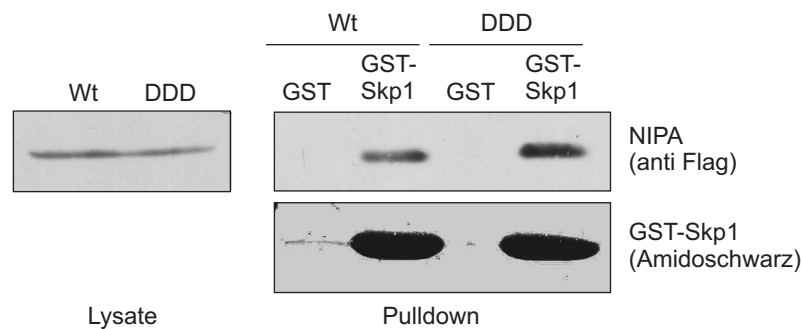


Abbildung 4.17: Die Phosphomimick-Mutante von NIPA bindet an Skp1. 293-Zellen wurden transient mit Flag-NIPA wt oder der Phosphomimick-Mutante, in der die Serine Ser354, Ser359 und Ser395 zu Aspartat mutiert wurden (DDD), transfiziert. Die Lysate wurden mit GST- oder GST-Skp1-Sepharose inkubiert und die gebundenen Proteinkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine in den Lysaten (links) und in den gebundenen Proteinkomplexen (rechts oben), sowie eine Amidoschwarzfärbung der Membran (rechts unten).

unteren Teil der Abbildung belegt, dass in beiden Ansätzen gleiche Mengen an GST-Skp1 eingesetzt wurden.

Dieses Experiment zeigt, dass die Phosphomimick-Mutante von NIPA, in der die drei Serinreste Ser354, Ser 359 und Ser395 zu Aspartat mutiert wurden, noch in der Lage ist, an Skp1 zu binden. Dies lässt darauf schließen, dass entweder weitere Aminosäurereste in NIPA phosphoryliert werden müssen, um die Bindung von NIPA an Skp1 zu lösen, oder die Mutation der Serinreste zu Aspartat imitiert die Phosphorylierung von NIPA nicht gut genug, um eine Dissoziation von Skp1 zu induzieren.

4.4.2 Phosphorylierung von NIPA an den Serinen Ser354, Ser359 und Ser395 hat keinen Einfluss auf die Bindung von NIPA an Cdh1

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von NIPA an den Serinresten Ser354, Ser359 und Ser395 einen direkten Einfluss auf die Bindung von NIPA an Cdh1 hat, wurden Ko-Immunpräzipitationen mit einer Mutante durchgeführt, in der die Serinreste Ser354, Ser359 und Ser395 gegen nicht phosphorylierbare Alanine ausgetauscht wurden (Ser354,359,395Ala, AAA). Neben dieser phosphorylierungs-defizienten Mutante wurde des weiteren die Phosphomimick-Mutante (DDD, Kap. 4.4.1) auf Bindung an Cdh1 untersucht. HA-Cdh1 wurde zusammen mit Flag-NIPA wt, der phosphorylierungs-defizienten NIPA-Mutante AAA oder der Phosphomimick-Mutante DDD transient in 293-Zellen koexprimiert. Als Kontrolle wurde HA-Cdh1 zusammen mit Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden vor dem Ernten mit Proteasom-inhibitoren behandelt, um einen verstärkten Abbau von NIPA durch die Überexpression von Cdh1 zu verhindern. Nach Herstellung der Zellysate wurde Flag-NIPA mit einem agarosegekoppelten monoklonalen anti Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Wie der Westernblot mit einem Flag-Antikörper zeigt, wurden vergleichbare Mengen NIPA immunpräzipitiert. Die Expression von HA-Cdh1 ist in den Zellen mit wildtyp NIPA etwas geringer, als in den Zellen, die die Mutanten exprimieren. Entsprechend ko-immunpräzipitiert wildtyp NIPA im Vergleich zu NIPA-AAA und NIPA-DDD etwas weniger HA-Cdh1. Die

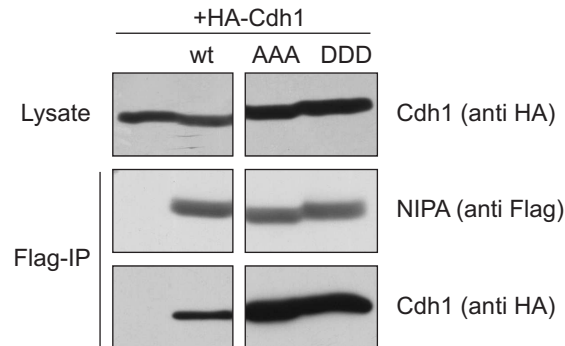


Abbildung 4.18: Phosphorylierung von NIPA an den Serinresten Ser354, Ser359 und Ser395 hat keinen Einfluss auf die Bindung von NIPA an Cdh1. HA-Cdh1 wurde zusammen mit Flag-NIPA, der phosphorylierungs-defizienten Ser354,359,395Ala (AAA) Mutante oder der Phosphomimik-Mutante Ser354,359,495Asp (DDD) in 293-Zellen koexprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Proteasominhibitoren inkubiert. Die Ko-Immünpräzipitation wurde mit einem an Agarose-beads gekoppelten Flag-Antikörper durchgeführt. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem anti HA-Antikörper und einem anti Flag-Antikörper.

Immünpräzipitation ist spezifisch, da in der Kontrolle, in der kein Flag-NIPA exprimiert wurde, kein HA-Cdh1 ko-immünpräzipitiert wurde.

Diese Daten zeigen, dass die phosphorylierungsdefiziente Mutante von NIPA, sowie die Phosphomimik-Mutante etwa gleich gut an Cdh1 binden wie wildtyp NIPA. Dies weist darauf hin, dass vermutlich die Phosphorylierung von NIPA nicht direkt zu einer verstärkten Bindung von NIPA an Cdh1 und somit zur Degradation von phosphoryliertem NIPA führt. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass weitere Aminosäurereste neben den drei bekannten Serinen in der Mitose phosphoryliert werden und auch diese mutiert werden müssten, um einen Unterschied in der Bindung an Cdh1 herbeizuführen.

4.4.3 Die F-Box Mutante ist instabiler als wildtyp NIPA

Neben der direkten Erkennung von ausschließlich phosphoryliertem NIPA durch den APC, wäre eine weitere Möglichkeit, dass die Ubiquitinierung von NIPA über die Bindung an Skp1 reguliert wird. Dies würde heißen, dass die unphosphorylierte Form von NIPA durch seine Bindung an Skp1 vor dem Abbau durch den APC^{Cdh1} Komplex geschützt ist, während die Phosphorylierung in der Mitose zu einer Dissoziation von Skp1 führt und NIPA somit durch den APC^{Cdh1} ubiquitiniert werden kann.

F-Box Proteine binden über ihr F-Box Motiv an Skp1 [37]. Für diese Bindung ist ein konserviertes Leucin-Prolin Dipeptid im F-Box Motiv essentiell [35]. Eine Mutante von NIPA, in der diese beiden konservierten Aminosäuren Leu170 und Pro171 zu Alanin mutiert wurden (F-Box Mutante), ist nicht mehr in der Lage, an Skp1 zu binden [124].

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob der Abbau von NIPA über die Bindung an Skp1 reguliert wird. Hierfür wurde zunächst die Stabilität der F-Box Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, an Skp1 zu binden, untersucht. Zu diesem Zweck wurden 293-Zellen

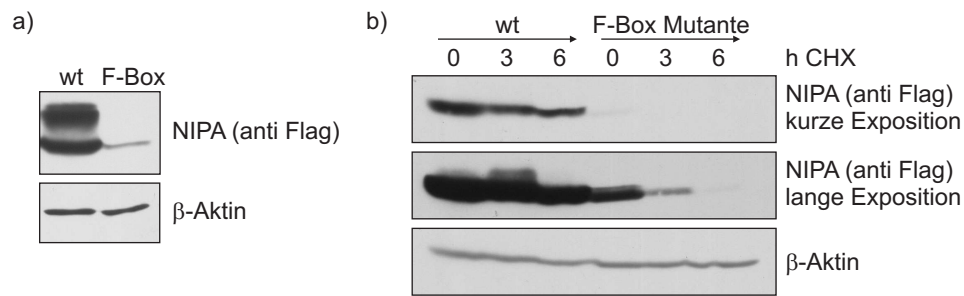


Abbildung 4.19: Die F-Box Mutante ist instabiler als wildtyp NIPA. a) Je $10 \mu\text{g}$ Flag-NIPA wt oder die F-Box Mutante wurden in 293-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran. b) 293-Zellen wurden mit $1 \mu\text{g}$ Flag-NIPA wt oder $10 \mu\text{g}$ der F-Box Mutante transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und auf 3 Zellkulturschalen aufgeteilt. Weitere 24 h später wurden die Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit einem anti Flag-Antikörper und einem anti β -Aktin Antikörper auf der gleichen Membran. Aufgrund der unterschiedlich starken Expression der beiden NIPA Konstrukte sind für die Entwicklung mit dem anti Flag-Antikörper zwei verschiedene Expositionszeiten abgebildet.

transient mit Flag-NIPA wt oder der F-Box Mutante transfiziert. In Abbildung 4.19 a ist zu sehen, dass trotz gleicher Mengen transfizierter DNA die F-Box Mutante in einem wesentlich geringeren Maß exprimiert wird, als wildtyp NIPA.

Um nun zu untersuchen, ob diese geringere Expression auf eine verminderte Stabilität der Mutante zurückzuführen ist, wurde die Halbwertszeit der beiden Proteine mit Hilfe des Translationsinhibitors Cycloheximid bestimmt. Hierfür wurden Flag-NIPA wt oder die F-Box Mutante in 293-Zellen transfiziert, anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und auf 3 Zellkulturschalen aufgeteilt. Dem Medium wurde Cycloheximid zugegeben, um die Neusynthese der Proteine zu hemmen und die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Wie in Abbildung 4.19 b zu sehen ist, hat die F-Box Mutante eine Halbwertszeit von weniger als 3 Stunden, während bei wildtyp NIPA selbst nach 6 Stunden noch ein Großteil des Proteins vorhanden ist.

Diese Experimente zeigen, dass die F-Box Mutante von NIPA eine verminderte Stabilität aufweist. Dies weist darauf hin, dass die Bindung von NIPA an Skp1 die Stabilität von NIPA beeinflusst.

4.4.4 Die F-Box Mutante wird *in vivo* stärker ubiquitiniert als wildtyp NIPA

Da die F-Box Mutante eine kürzere Halbwertszeit aufweist, als wildtyp NIPA, sollte im Folgenden untersucht werden, ob dies auf eine verstärkte Ubiquitinierung dieser Mutante zurückzuführen ist.

Hierfür wurden ähnlich wie in Kap. 4.1.2 beschrieben *in vivo* Ubiquitinierungs-Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde HA-Ubiquitin zusammen mit Flag-NIPAwT oder der F-Box Mutante oder als Kontrolle alleine transient in 293 Zellen transfiziert. Hier-

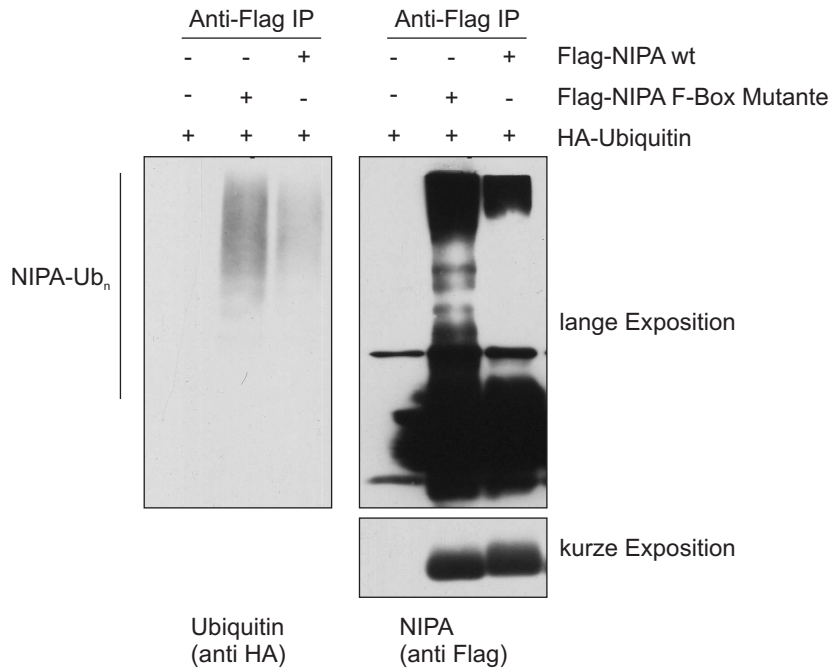


Abbildung 4.20: Die F-Box Mutante wird *in vivo* stärker ubiquitiniert als wildtyp NIPA. Flag-NIPA wt oder die F-Box Mutante wurden zusammen mit HA-Ubiquitin in 293-Zellen transient koexprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Proteasominhibitoren inkubiert. Die Lysate wurden denaturiert und Flag-NIPA wurde mit einem an Agarosebeads gekoppelten Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Immunpräzipitationen mit einem anti HA-Antikörper und einem anti Flag-Antikörper auf der gleichen Membran. IP: Immunpräzipitation; Ub_n: Ubiquitinkonjugate.

bei wurde im Vergleich zum NIPAw_t-Konstrukt die 10-fache Menge an DNA der F-Box Mutante transfiziert, um eine vergleichbare Expression der beiden Proteine zu gewährleisten. Die Zellen wurden vor dem Ernten mit Proteasominhibitoren behandelt, um die ubiquitinierte Form von NIPA anzureichern. Nach Herstellung der Zellysate wurden diese denaturiert und Flag-NIPA wurde mit einem agarosegekoppelten monoklonalen anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert.

Im linken Teil der Abbildung 4.20 sind die Ubiquitinkonjugate in den Immunpräzipitaten mit einem anti HA-Antikörper dargestellt. Hier ist deutlich zu sehen, dass in dem Ansatz mit der F-Box Mutante wesentlich mehr ubiquitiniertes Protein vorliegt, als im Immunpräzipitat des wildtyp NIPA. Auch in der immunchemischen Darstellung mit einem anti Flag-Antikörper wird deutlich, dass die F-Box Mutante mehr hochmolekulare Konjugate bildet, als wildtyp NIPA (Abb. 4.20 rechts oben). Bei kurzer Exposition ist zu sehen, dass in beiden Ansätzen vergleichbare Mengen Protein immunpräzipitiert wurden (Abb. 4.20 rechts unten).

Aus diesem Experiment lässt sich schlussfolgern, dass die verminderte Stabilität der NIPA F-Box Mutante im Vergleich zum wildtyp Protein auf eine stärkere Ubiquitinierung dieser Mutante zurückzuführen ist. Dies bedeutet, dass die Mutante, die nicht an Skp1 binden kann, ein besseres Substrat des APC^{Cdh1}-Komplexes zu sein scheint, als wildtyp NIPA.

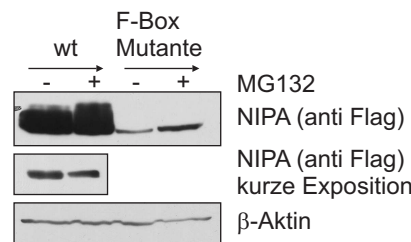


Abbildung 4.21: Die F-Box Mutante wird stärker abgebaut, als NIPA wt. Flag-NIPA wt oder die F-Box Mutante wurden transient in 293-Zellen überexprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Proteasominhibitoren inkubiert. Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Lysate mit einem anti Flag-Antikörper und einem anti β -Aktin Antikörper auf der gleichen Membran.

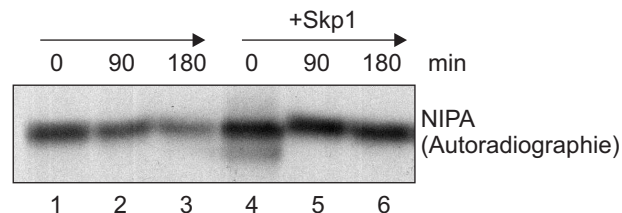


Abbildung 4.22: Skp1 schützt NIPA vor Degradation in vitro. Radioaktiv markiertes Flag-NIPAw_t IVT-Produkt wurde zunächst mit aufgereinigtem GST-Skp1 oder GST für 1 h in Lysispuffer schüttelnd inkubiert und anschließend mit einem agarosegekoppelten Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Diese Immunpräzipitate wurden in Degradations-Ansätze mit Lysaten aus G₁-Phase synchronisierten Hela-Zellen eingesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus den Reaktionsansätzen entnommen, mit SDS-Ladepuffer versetzt, denaturiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dargestellt ist die Autoradiographie der Degradations-Versuche.

Entsprechend führt auch die Behandlung der Zellen mit einem Proteasominhibitor zu einer Akkumulation der F-Box-Mutante von NIPA, während sie keinen Einfluss auf die Expression des wildtyp Proteins hat (Abb. 4.21). Auch dieses Experiment zeigt, dass die F-Box Mutante stärker durch das Proteasom abgebaut wird, als wildtyp NIPA.

4.4.5 Skp1 schützt NIPA vor Degradation in vitro

Um nun zu untersuchen, ob die Bindung an Skp1 tatsächlich die Stabilität von NIPA beeinflusst, wurden ähnlich wie in Kapitel 4.2.2 Degradationsversuche durchgeführt. Jedoch wurde das radioaktiv markierte Flag-NIPA IVT-Produkt zunächst mit aufgereinigtem GST-Skp1 Fusionsprotein in Lysispuffer schüttelnd inkubiert, damit das Skp1 an NIPA bindet. Anschließend wurde das an GST-Skp1 gebundene NIPA mit einem agarosegekoppelten Flag-Antikörper immunpräzipitiert und in Degradationsversuche eingesetzt. Als Kontrolle wurde NIPA vor der Immunpräzipitation mit GST inkubiert.

In Abbildung 4.22 ist die Autoradiographie der Degradationsversuche dargestellt. In dem Kontrollansatz, in dem NIPA zuvor mit GST inkubiert wurde, nimmt die Intensität der

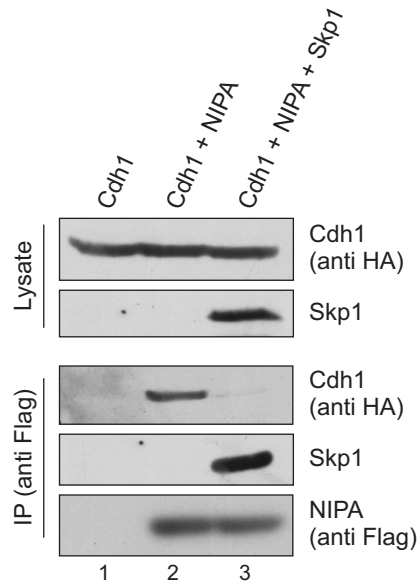


Abbildung 4.23: Überexpression von Skp1 verhindert die Bindung von NIPA an Cdh1. HA-Cdh1 wurde zusammen mit Flag-NIPA, mit Flag-NIPA und Skp1 oder als Kontrolle alleine in 293-Zellen transfiziert. Die Ko-Immunpräzipitation wurde mit einem an Agarose-beads gekoppelten Flag-Antikörper durchgeführt und die gebundenen Proteinkomplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine in den Lysaten, sowie in den Immunpräzipitationen mit den angegebenen Antikörpern.

radioaktiven Bande, also die Konzentration von NIPA im Reaktionsansatz im Verlauf des Versuchs stark ab (Spur 1–3). NIPA wird also in diesem Ansatz abgebaut. Wird jedoch Skp1-gebundenes NIPA in dem Versuch eingesetzt, wird NIPA kaum abgebaut (Spur 4–6). Die Bindung an Skp1 scheint also NIPA vor Degradation *in vitro* zu schützen.

4.4.6 Überexpression von Skp1 verhindert die Bindung von NIPA an Cdh1

Die vorherigen Experimente zeigen, dass die Bindung an Skp1 NIPA vor dem Abbau durch den APC^{Cdh1} schützt. Dies könnte bedeuten, dass Skp1-gebundenes NIPA nicht mehr durch den APC-Aktivator Cdh1 gebunden und somit zum APC-Kernkomplex rekrutiert werden kann. Alternativ wäre es möglich, dass Cdh1 zwar an Skp1-gebundenes NIPA bindet, dieses aber nicht durch den APC ubiquitiniert werden kann.

Um zu untersuchen, durch welchen dieser Mechanismen Skp1 NIPA vor dem Abbau schützt, wurden NIPA/Cdh1 Ko-Immunpräzipitationen mit und ohne gleichzeitiger Skp1-Überexpression durchgeführt. Hierfür wurden HA-Cdh1 und Flag-NIPA zusammen mit Skp1 oder mit einem Leervektor in 293-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde in einem Ansatz nur HA-Cdh1 transfiziert. Nach Herstellung der Zellysate wurde Flag-NIPA mit einem agarosegekoppelten monoklonalen Anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert.

Wie der Western Blot mit einem Flag-Antikörper zeigt, wurde Flag-NIPA in beiden Ansätzen gleich gut immunpräzipitiert (Abb. 4.23, Spur 2 und 3). In dem Ansatz, in dem Skp1 ko-exprimiert wurde, ist eine Bindung von Skp1 an NIPA zu sehen (Spur 3). HA-

Cdh1 wurde in allen Ansätzen gleich stark exprimiert. Jedoch ist eine Bindung von Cdh1 an NIPA nur in dem Ansatz zu sehen, in dem nicht gleichzeitig Skp1 überexprimiert wurde (vergleiche Spur 2 und 3). Die Ko-Immunpräzipitation von Cdh1 ist spezifisch, da in dem Kontroll-Ansatz ohne NIPA kein Cdh1 immunpräzipitiert wurde (Spur 1).

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass Skp1 und Cdh1 um die Bindung an NIPA konkurrieren und Cdh1 somit nur an freies, nicht Skp1-gebundenes NIPA binden kann.

5 Ergebnisse II: Regulation von NIPA nach Schädigung der DNA

Treten in einer Zelle Schädigungen an der DNA auf, so wird der Zellzyklus arretiert, bis die geschädigte DNA repariert ist. Dieser Zellzyklusarrest wird durch negative Regulation der Cyclin-CDK-Komplexe an den verschiedenen Zellzyklus-Übergängen gewährleistet (siehe Einleitung, Kap. 1.4). Die einzelnen Komponenten der Signalkaskaden, die zu dieser Inhibierung der Cyclin-CDK-Komplexe führen, sind weitgehend Proteine, die auch im ungestörten Zellzyklus an der Regulation der Cyclin-CDK-Komplexe beteiligt sind.

Im Folgenden soll deshalb untersucht werden, ob das F-Box Protein NIPA eine Rolle in der Signaltransduktion nach DNA-Schädigung spielt. Insbesondere wurde in dieser Arbeit die Regulation von NIPA nach Bestrahlung der Zellen mit ultravioletter Strahlung (UVC, 254 nm) analysiert. Die Bestrahlung von Zellen mit UVC führt zu DNA-Schädigungen in Form von Cyclobutan Pyrimidin-Dimeren (CPDs) und (6-4)-Photoproducten, die zu Querverbindungen benachbarter DNA Basen führen [176]. Diese "crosslinks" benachbarter Basen haben Verzerrungen der DNA Helix zur Folge, die zu einer Blockierung der Replikationsgabel und Einzelstrangbrüchen der DNA führen [177].

5.1 NIPA wird nach UVC-Behandlung phosphoryliert

Die Funktion von NIPA wird im normalen Zellzyklus durch Phosphorylierung am G₂/M-Übergang reguliert. Infolgedessen wurde hier zunächst untersucht, ob auch in Folge von DNA-Schädigungen eine Phosphorylierung von NIPA stattfindet.

5.1.1 NIPA wird nach UVC-Behandlung dosis- und zeitabhängig phosphoryliert

Um zu untersuchen, ob NIPA nach UV-Bestrahlung phosphoryliert oder andersweitig reguliert wird, wurden NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPA überexprimieren mit verschiedenen Intensitäten UV bestrahlt. In Abbildung 5.1 a sieht man, dass in den unbehandelten Zellen NIPA fast ausschließlich in unphosphorylierter Form vorliegt. Auch nach Bestrahlung der Zellen mit relativ niedrigen Intensitäten UV (10 und 20 J/m²) ist NIPA nicht phosphoryliert. Werden die Zellen hingegen mit 50 J/m² bestrahlt, liegt ein Großteil des NIPA-Proteins in phosphorylierter Form vor, während bei noch höheren Intensitäten ausschließlich phosphoryliertes NIPA vorhanden ist. Bestrahlung der Zellen mit 150 J/m² induziert eine schwache zusätzliche, etwas höher laufende Bande, die bei 300 J/m² noch ausgeprägter ist. Bei diesen hohen UV-Intensitäten wird NIPA somit vermutlich an einer oder mehreren zusätzlichen Aminosäuren phosphoryliert.

Um nun die Kinetik der Phosphorylierung von NIPA nach der UV-Bestrahlung zu untersuchen, wurden die Zellen mit 100 J/m² bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten

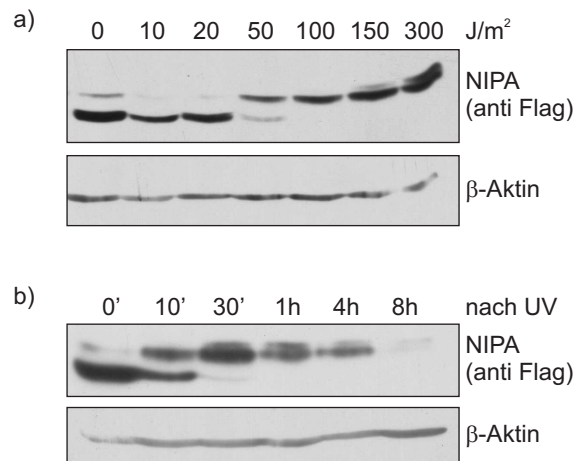


Abbildung 5.1: NIPA wird nach UVC-Behandlung dosis- und zeitabhängig phosphoryliert. a) NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPA überexprimieren wurden mit den angegebenen Intensitäten UV bestrahlt und 2 h nach der Bestrahlung geerntet. b) Flag-NIPA überexprimierende NIH/3T3-Zellen wurden mit 100 J/m² UVC bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet.

nach der Bestrahlung geerntet. Abbildung 5.1 b zeigt, dass bereits 10 min nach der Bestrahlung etwa die Hälfte des NIPA-Proteins in phosphorylierter Form vorliegt, während nach einer halben Stunde ausschließlich phosphoryliertes NIPA vorhanden ist. Auch im weiteren Zeitverlauf liegt NIPA nur in der phosphorylierten Form vor, jedoch nimmt die Expressionsstärke mit der Zeit ab, bis 8 h nach der Bestrahlung keine NIPA-Expression mehr vorhanden ist.

Diese Daten zeigen, dass NIPA nach Bestrahlung von Zellen mit UVC-Strahlung durch Phosphorylierung reguliert wird. Diese Phosphorylierung findet relativ schnell nach der UV-Bestrahlung statt und bleibt über mehrere Stunden erhalten. Die Stärke und auch die Art der Phosphorylierung ist hierbei abhängig von der Intensität der Bestrahlung.

5.1.2 NIPA wird nach UVC-Behandlung an Serin 354 phosphoryliert

NIPA wird am G₂/M Zellzyklus-Übergang an den Serinen 354, 359 und 395 phosphoryliert [127]. Um zu untersuchen, an welchen Aminosäure-Resten die Phosphorylierung NIPAs nach Behandlung der Zellen mit UVC stattfindet, wurden Flag-markierte NIPA-Mutanten, in denen die Serine 354, 359 oder 395 zu Alanin mutiert wurden, transient in Cos-1 Zellen transfiziert. Diese Zellen wurden, falls angegeben mit 100 J/m² UV-bestrahlt und 2 h nach der Bestrahlung geerntet.

Wie die immunchemische Darstellung mit einem Flag Antikörper in Abbildung 5.2 a zeigt, wurden NIPAw^t und die S359A und S395A-Mutanten durch Bestrahlung der Zellen mit UV phosphoryliert. Substitution des Ser354 durch Alanin hingegen inhibiert die UV-induzierte Phosphorylierung NIPAs. Dies weist darauf hin, dass NIPA nach Behandlung mit dieser Intensität UVC an Serin 354, jedoch nicht an den Serinen 359 oder 395 phosphoryliert wird. Auch in einem weiteren Experiment mit NIH/3T3 Fibroblasten, die stabil Flag-NIPA

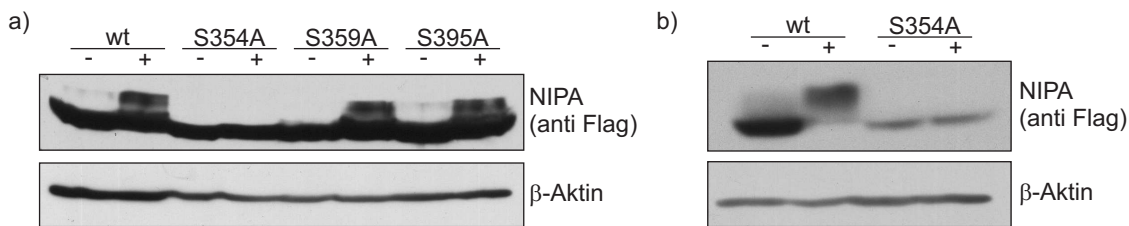


Abbildung 5.2: NIPA wird nach UVC-Behandlung an Serin 354 phosphoryliert. a) Cos-1 Zellen wurden transient mit Flag-NIPA wt oder einer der phosphorylierungsdefizienten Mutanten Ser354Ala, Ser359Ala oder Ser395Ala transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und auf zwei Zellkulturschalen aufgeteilt. Weitere 24 h später wurden die Zellen, falls angegeben, mit 100 J/m^2 bestrahlt und nach einer Stunde geerntet. Die Abbildung zeigt die immunochemische Darstellung der Proteine im Westernblot mit einem anti Flag-Antikörper und einem β -Aktin-Antikörper auf der gleichen Membran. b) NIH/3T3-Zellen, die stabil Flag-NIPAw_t oder die Ser354Ala Mutante exprimieren, wurden mit 100 J/m^2 bestrahlt oder unbehandelt gelassen und nach einer Stunde geerntet. Die Abbildung zeigt die immunochemische Darstellung der Proteine mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran.

wt oder die S354A Mutante exprimieren, ist deutlich zu sehen, dass in der Mutante die UV-induzierte Phosphorylierung vollständig inhibiert ist (Abb. 5.2 b). Diese vollständige Inhibierung der Phosphorylierung durch Substitution des Ser354 durch Alanin weist darauf hin, dass dieser Serinrest entweder die einzige Phosphorylierungsstelle nach UV-Bestrahlung ist, oder als erste Phosphorylierungsstelle essentiell für die anschließende Phosphorylierung weiterer Aminosäurereste.

Des Weiteren zeigen Versuche mit einem phosphorylierungs-spezifischen Antikörper, dass NIPA nach UV-Bestrahlung an Serin 354 phosphoryliert wird. U2OS-Zellen wurden mit verschiedenen Intensitäten UV bestrahlt und zwei Stunden nach der Bestrahlung geerntet. Abbildung 5.3 a zeigt, dass bei höheren Intensitäten eine Phosphorylierung von NIPA an Serin 354 stattfindet. Diese Phosphorylierung tritt etwa 30 Minuten nach der Bestrahlung auf und bleibt über mehrere Stunden erhalten (Abb. 5.3 b).

5.1.3 Die Akkumulierung von phosphoryliertem NIPA nach UVC-Bestrahlung ist zellzyklus-abhängig

Um zu untersuchen, ob in allen Zellzyklusphasen eine Phosphorylierung von NIPA stattfindet, wurden synchronisierte Zellen UV-bestrahlt und der Phosphorylierungsstatus von NIPA im Western-Blot analysiert.

NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPA exprimieren wurden in der G₀-Phase des Zellzyklus synchronisiert und anschließend aus dem Zellzyklusblock entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Entlassen aus dem Zellzyklusblock wurden die Zellen mit 100 J/m^2 UVC bestrahlt und 45 min später geerntet. Der Anteil der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der UV-Bestrahlung in S-Phase befanden, wurde durch BrdU-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

Während den ersten 12 h nach der Synchronisierung sind so gut wie alle Zellen BrdU-negativ (Abb. 5.4 b). Dies bedeutet, dass diese Zellen noch nicht in die S-Phase eingetreten

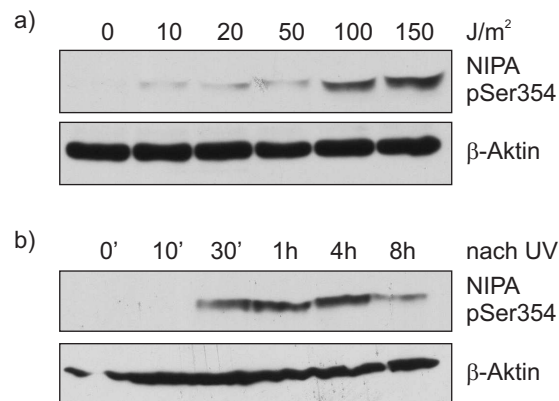


Abbildung 5.3: NIPA wird nach UV-Bestrahlung an Ser354 zeit- und dosisabhängig phosphoryliert. a) U2OS-Zellen wurden mit den angegebenen Intensitäten UV bestrahlt und 2 h nach der Bestrahlung geerntet. b) U2OS-Zellen wurden mit 100 J/m² UVC bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet.

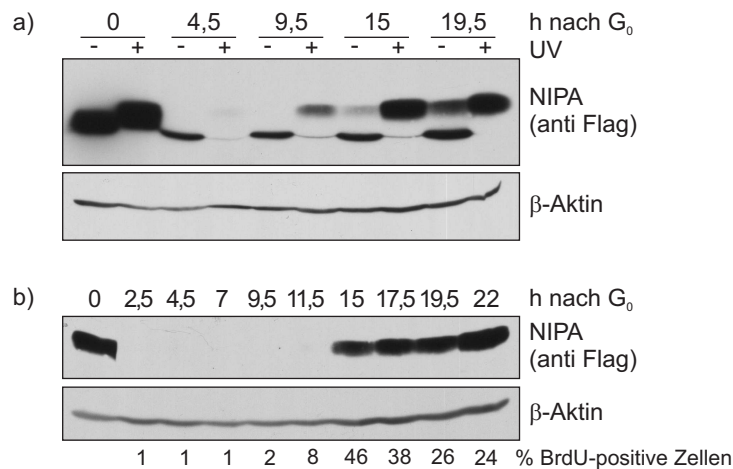


Abbildung 5.4: Die Akkumulierung von phosphoryliertem NIPA nach UVC-Bestrahlung ist zellzyklus-abhängig. a) NIH/3T3-Zellen, die stabil Flag-NIPA exprimieren, wurden durch Serumentzug in der G₀-Phase des Zellzyklus synchronisiert und anschließend aus dem Zellzyklus-Block entlassen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit 100 J/m² bestrahlt oder unbehandelt gelassen und 45 min später geerntet. Die Abbildung zeigt die immunochemische Darstellung der Proteine im Western Blot. In Abbildung b) sind die Zellen aus dem gleichen Experiment gezeigt, jedoch nur UV-behandelte Zellen zu mehreren Zeitpunkten. Der Anteil der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der UV-Bestrahlung in S-Phase befanden, wurde durch BrdU-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

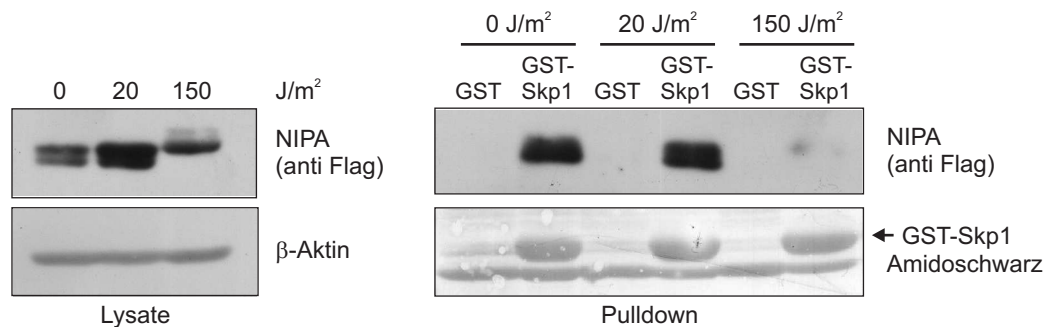


Abbildung 5.5: UVC-induzierte Phosphorylierung von NIPA führt zu Dissoziation der Bindung an Skp1. NIH/3T3-Zellen, die stabil Flag-NIPA wt exprimieren, wurden mit den angegebenen Intensitäten UVC bestrahlt und 2 h nach Bestrahlung geerntet. Die Lysate wurden mit GST- oder GST-Skp1-Sepharose inkubiert und die gebundenen Proteinkomplexe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine in den Lysaten (links), sowie in den gebundenen Proteinkomplexen (rechts oben), sowie eine Amidoschwarzfärbung der Membran (rechts unten).

sind, sich also in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus befinden. In diesen Zellen liegt NIPA in unphosphorylierter Form vor. Nach UV-Bestrahlung ist in diesen Zellen jedoch keine Expression von NIPA mehr zu erkennen. Erst gegen Ende der G_1 -Phase (9,5 h) kommt es zu einer leichten Akkumulation von phosphoryliertem NIPA (Abb. 5.4 a+b). Zu späteren Zeitpunkten hingegen, wenn sich ein signifikanter Anteil der Zellen zum Zeitpunkt der UV-Bestrahlung in S-Phase befindet (15 h nach der Synchronisierung) kommt es infolge der Bestrahlung zu einer ausgeprägten Akkumulation der phosphorylierten Form von NIPA (Abb. 5.4 b).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass NIPA durch UV-Bestrahlung in der G_0 - und S-Phase des Zellzyklus fast vollständig phosphoryliert wird und die phosphorylierte Form von NIPA in diesen Zellzyklusphasen nach der Bestrahlung akkumuliert. Werden hingegen Zellen in der G_1 -Phase bestrahlt, kommt es zu einer Degradation des NIPA Proteins.

5.1.4 UVC-induzierte Phosphorylierung von NIPA führt zu Dissoziation der Bindung an Skp1

Phosphorylierung von NIPA in der G_2 -Phase führt zur Dissoziation der NIPA-Skp1 Bindung und somit zu einer Inaktivierung des SCF^{NIPA} Komplexes [124]. Um zu untersuchen, ob auch die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA zu einer Inaktivierung des SCF^{NIPA} Komplexes führt, wurden GST-Bindungsstudien durchgeführt. Hierfür wurden subkonfluente stabile Flag-NIPA wt exprimierende NIH/3T3-Zellen mit 20 J/m² oder 150 J/m² UVC bestrahlt und 2 h nach Bestrahlung geerntet oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die entsprechenden Lysate in GST-Bindungsexperimenten mit GST-Skp1 oder als Negativkontrolle GST eingesetzt.

Im linken Teil der Abbildung 5.5 sind die in den GST-Bindungsexperimenten eingesetzten Lysate dargestellt. Wie der Western Blot mit einem Flag-Antikörper zeigt, liegt NIPA in

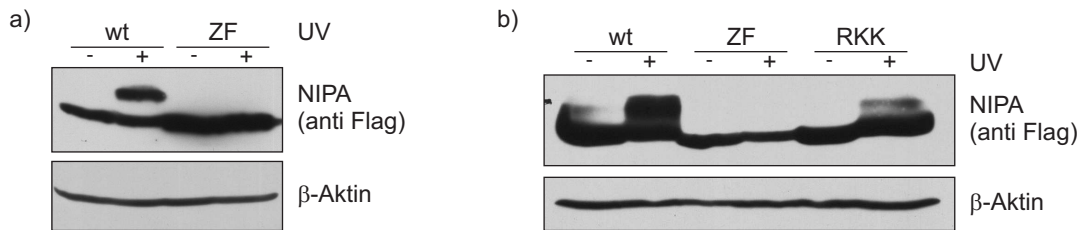


Abbildung 5.6: Das Zinkfingermotiv in NIPA, jedoch nicht die nukleäre Lokalisierung von NIPA, ist wichtig für die UV-induzierte Phosphorylierung. a)+b) Cos-1 Zellen wurden transient mit Flag-NIPA wt (wt), der Zinkfingermutante (ZF) oder einer Mutante, in der das NLS mutiert wurde (RKK) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und auf 2 Zellkulturschalen aufgeteilt. Weitere 24 h später wurden die Zellen, falls angegeben, mit 100 J/m^2 bestrahlt und nach einer Stunde geerntet. Die Abbildung zeigt die immunochemische Darstellung der Proteine im Westernblot mit einem anti Flag-Antikörper und einem β -Aktin-Antikörper auf der gleichen Membran

den mit 150 J/m^2 bestrahlten Zellen ausschließlich in phosphorylierter Form vor. In den unbestrahlten Zellen, sowie in den mit 20 J/m^2 bestrahlten Zellen hingegen ist sowohl die unphosphorylierte, als auch die phosphorylierte Form von NIPA vorhanden. In allen Lysaten ist Flag-NIPA in vergleichbaren Mengen exprimiert. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die Bindung von Flag-NIPA an die GST-Skp1-Sepharose. In den unbestrahlten Zellen, sowie in den mit 20 J/m^2 Zellen, bindet NIPA an Skp1. Hingegen ist nach Bestrahlung mit 150 J/m^2 , wenn NIPA ausschließlich in phosphorylierter Form vorliegt, keine Bindung an Skp1 zu sehen. Die Bindung von NIPA an Skp1 ist spezifisch, da in der Kontrolle mit GST-Sepharose kein NIPA im Pulldown vorhanden ist. Die Amidoschwarzfärbung der Membran im rechten unteren Teil der Abbildung zeigt, dass in allen Ansätzen gleiche Mengen an GST-Skp1 eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA ebenso wie die zellzyklus-abhängige Phosphorylierung in der G_2 -Phase zu einer Dissoziation der Bindung an Skp1 und somit zu einer Inaktivierung des SCF^{NIPA} Komplexes führt.

5.1.5 Das Zinkfingermotiv in NIPA ist wichtig für die UV-induzierte Phosphorylierung

Im C-Terminus von NIPA befindet sich eine potentielle Zinkfingerdomäne. Derartige Zink bindenden Motive vermitteln in vielen Proteinen die spezifische Bindung an DNA, RNA oder andere Proteine. Um zu untersuchen, ob das Zinkfingermotiv in NIPA wichtig für dessen Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung ist, wurden die konservierten Aminosäuren (Cys117, Cys120, His152 und Cys156), die vermutlich durch die koordinative Bindung eines Zn^{2+} -Ions an der Ausbildung eines Zinkfingers beteiligt sind, zu Alaninen mutiert. Diese Zinkfingermutante (ZF) oder wildtyp NIPA wurden transient in Cos-1 Zellen überexprimiert. Die Zellen wurden mit 100 J/m^2 UVC bestrahlt oder als Kontrolle unbehandelt belassen und eine Stunde später geerntet. Wie in Abbildung 5.6 a) zu sehen ist, liegen in den unbehandelten Zellen sowohl wildtyp NIPA als auch die Zinkfingermutante ausschließ-

lich in nicht phosphorylierter Form vor. Die UVC-Bestrahlung der Zellen induziert eine Phosphorylierung des wildtyp Proteins, jedoch nicht der Zinkfingermutante. Somit scheint die Integrität des Zinkfingermotivs in NIPA wichtig für die Phosphorylierung des Proteins nach UVC-Bestrahlung zu sein.

Viele Proteine, die an der Signaltransduktion nach Schädigung der DNA beteiligt sind, werden an die Stelle der DNA-Schädigung rekrutiert, um dort phosphoryliert und aktiviert zu werden [178]. Falls NIPA mit seinem potentiellen Zinkfinger an DNA binden sollte und diese DNA-Bindung Voraussetzung für die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA wäre, sollte eine Mutante von NIPA, die nicht im Zellkern lokalisiert ist, nicht phosphoryliert werden können.

Der Austausch von drei Aminosäure-Resten im NLS-Motiv (R398A, K399A, K401A) führt zu einer ausschließlich cytoplasmatischen Lokalisierung von NIPA [117]. Ein weiteres Experiment zeigt, dass diese Mutante (RKK) in der Lage ist, nach UV-Bestrahlung phosphoryliert zu werden (Abb. 5.6 b). Demzufolge ist die nukleäre Lokalisierung und somit eine etwaige Zinkfinger-vermittelte Bindung an die DNA keine Voraussetzung für die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA.

5.2 Die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA ist ATR-abhängig

Unter den wichtigsten Kinasen in der Regulierung der Signalantwort nach DNA-Schädigungen sind die beiden Phosphatidylinositolkinase-ähnlichen Kinasen ATM und ATR (siehe Einleitung, Kap. 1.4). Deshalb sollte nun untersucht werden, ob die Phosphorylierung von NIPA abhängig von der Aktivität einer dieser beiden Checkpointkinasen ist.

5.2.1 Caffein inhibiert die Phosphorylierung von NIPA in der Mitose und nach UV-Bestrahlung

Zunächst wurde untersucht, ob ein Inhibitor der beiden Kinasen ATM und ATR die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA beeinflusst. Hierfür wurde das Methylxanthin Caffein verwendet, welches sowohl die katalytische Aktivität von ATM als auch von ATR inhibiert [163].

NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw_t exprimieren, wurden 3 h vor UV-Bestrahlung mit 2 mM Caffein behandelt oder unbehandelt belassen. In den unbehandelten Zellen induziert die UV-Bestrahlung eine Phosphorylierung von NIPA (Abb. 5.7, Spur 1). Inkubation mit dem ATM/ATR-Inhibitor Caffein hingegen verhindert die Phosphorylierung von NIPA durch UV-Bestrahlung (Spur 2).

Desgleichen liegt NIPA in mitotischen Zellen ausschließlich in phosphorylierter Form vor, während eine Behandlung der Zellen mit Caffein diese Zellzyklus-induzierte Phosphorylierung von NIPA inhibiert (vergleiche Spur 3 und 4)

Die Inhibierung der Phosphorylierung von NIPA durch Caffein weist darauf hin, dass ATM und/oder ATR die Phosphorylierung von NIPA sowohl nach Schädigung der DNA, als auch im ungestörten Zellzyklus am G₂/M-Übergang regulieren könnte.

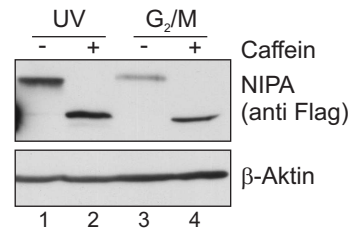


Abbildung 5.7: Caffein inhibiert die Phosphorylierung von NIPA in der Mitose und nach UV-Bestrahlung. NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw_t exprimieren, wurden mit 2 mM Caffein versetzt oder unbehandelt belassen, 3 h später mit 100 J/m² UVC bestrahlt und 1 h nach der Bestrahlung geerntet. Alternativ wurden die Zellen durch einen Thymidin-Nocodazol Block in Mitose synchronisiert. Falls angegeben, wurde das Caffein 5 h nach dem Nocodazol den Zellen zugegeben. Die Synchronisierung der Zellen wurde mit Hilfe einer Propidiumiodidfärbung kontrolliert (nicht gezeigt).

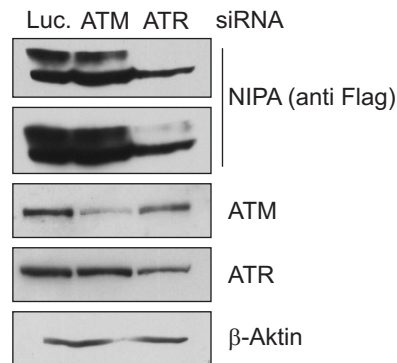


Abbildung 5.8: Inhibierung der UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA durch siRNA-vermittelte Herunterregulation von ATR. Hct116 Zellen wurden transient mit Flag-NIPA wt und entweder mit Luziferase Kontroll siRNA (Luc.), ATM siRNA oder ATR siRNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 100 J/m² bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung geerntet. Die Abbildung zeigt die immunochemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran.

5.2.2 Durch RNA-Interferenz vermittelte Herunterregulation von ATR führt zu einer Inhibierung der UV-induzierten Phosphorylierung von NIPA

Da Caffein sowohl die Kinaseaktivität von ATM als auch von ATR inhibiert, sollte nun genauer untersucht werden, welche dieser beiden Kinasen die Phosphorylierung von NIPA nach UV-Bestrahlung vermittelt. Hierfür wurden Hct116-Zellen mit Flag-NIPAw_t und entweder mit ATM-siRNA, ATR-siRNA oder als Kontrolle mit Luziferase siRNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 100 J/m² bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung geerntet.

Im Westernblot mit einem ATM-Antikörper ist zu sehen, dass in den mit ATM-siRNA behandelten Zellen die Expression von ATM stark reduziert ist (Abb. 5.8, mittlere Spur). In diesen Zellen wird NIPA genau wie in den mit Luziferase siRNA behandelten Kontrollzellen durch die UV-Bestrahlung phosphoryliert. Die Expression von ATR wird durch Behandlung

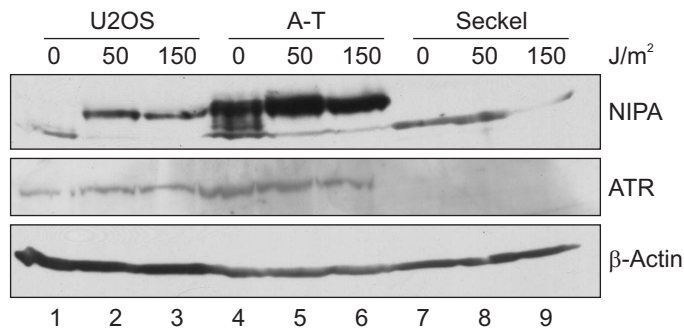


Abbildung 5.9: In Seckel-Zellen wird NIPA nicht nach UVC-Strahlung phosphoryliert. Seckel-Zellen, A-T Zellen oder U2OS-Zellen wurden mit 0 J/m², 50 J/m² oder 150 J/m² UVC bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung geerntet. Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunchemische Darstellung der Proteine im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran.

der Zellen mit ATR-siRNA um nur etwa 50% reduziert (letzte Spur). Diese Reduktion der ATR-Expression reicht jedoch aus, um die Phosphorylierung von NIPA fast vollständig zu inhibieren.

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die UVC-induzierte Phosphorylierung von NIPA ATR-abhängig und nicht ATM-abhängig ist.

5.2.3 In Seckel-Zellen wird NIPA nicht nach UV-Strahlung phosphoryliert

Das Seckel Syndrom ist eine seltene Erbkrankheit, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Symptome des Seckel Syndroms sind unter anderem extreme prä- und postnatale Kleinwüchsigkeit, Mikrozephalie und geistige Retardierung der Betroffenen [179]. Eine Form des Seckel-Syndroms ist mit Mutationen im ATR-Gen assoziiert [180, 181]. Um die Rolle des ATR Proteins in der Phosphorylierung von NIPA weiter zu untersuchen, wurden immortalisierte Fibroblasten eines Patienten mit Seckel Syndrom verwendet. In diesen Seckel-Zellen führt eine Mutation im ATR-Gen zur Aktivierung zweier kryptischer Splicestellen in Exon 9 und infolgedessen zur Generierung eines Stop-Codons im nächsten Exon. Dies resultiert in einer stark reduzierten Expression des ATR-Proteins in diesen Zellen [181].

Als Kontrolle wurden Fibroblasten eines Patienten mit Ataxia Telangiectasia (A-T) verwendet. In diesen Zellen tragen beide Allele des ATM-Gens Mutationen, die zu einem trunkeierten und somit nicht funktionellen ATM-Protein führen [182]. Ataxia Telangiectasia ist ebenso wie das Seckel Syndrom eine seltene, autosomal-rezessive Erbkrankheit und ist durch ähnliche Symptome, wie physischer und geistiger Retardierung, Mikrozephalie und einer Prädisposition für Leukämien und Hodgkin-Lymphome gekennzeichnet. Kennzeichnend und namensgebend sind des weiteren eine zerebelläre Ataxie und Erweiterungen der kleinen Arterien (Teleangiektasien) vor allem im Gesicht und auf der Bindehaut des Auges.

Subkonfluente Seckel-Zellen, A-T Zellen oder als Kontrolle U2OS Zellen, wurden mit 0 J/m², 50 J/m² oder 150 J/m² UVC bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung geerntet. In den Kontrollzellen führt die UV-Bestrahlung zu einer Phosphorylierung von NIPA (Abb. 5.9 Spur 2 und 3). Erstaunlicher Weise liegt in den ATM-defekten A-T Zellen


```

Cdc25A: 116 P A L K R S H S D S L D 127
Cdc25C: 209 S G L Y R S P S M P E N 220
E2F-1:  337 P L L S R M G S L R A P 369
p53:    13 P L S Q E T F S D L W K 24
NIPA:   347 P I V S R T R S W D S S 358
    
```

Abbildung 5.10: Ser354 in NIPA liegt in einer Konsensus-Phosphorylierungsstelle der Checkpointkinasen Chk1/Chk2. Alignment der Chk1/Chk2 Phosphorylierungsstellen in verschiedenen Substraten. Die für die Phosphorylierungsreaktion wichtigen Aminosäurereste sind rot hervorgehoben.

bereits ohne Bestrahlung ein Großteil von NIPA in phosphorylierter Form vor (Spur 4). Dennoch ist deutlich zu sehen, dass UV-Bestrahlung dieser Zellen zu einer vollständigen Phosphorylierung von NIPA führt, diese UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA also nicht inhibiert ist. Wie die immunchemische Darstellung mit einem ATR-Antikörper zeigt, ist in den Seckel-Zellen die Expression von ATR stark reduziert. In diesen Zellen wird keine Phosphorylierung durch UV-Bestrahlung induziert (Spur 8 und 9).

Diese Daten geben einen weiteren Hinweis darauf, dass die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA ATR-abhängig ist.

5.2.4 Die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA, jedoch nicht Phosphorylierung in der Mitose wird durch einen Chk1 Inhibitor inhibiert

NIPA wird nach UV-Bestrahlung an Serin 354 phosphoryliert (Kap. 5.1.2). Da in der Konsensus-Phosphorylierungssequenz von ATR und ATM das phosphorylierte Serin oder Threonin von einem Glutamin gefolgt wird (S/TQ Motiv, [183, 184]), dem Serin 354 in NIPA aber ein Tryptophan folgt, ist es unwahrscheinlich, dass NIPA direkt von ATR an Ser354 phosphoryliert wird. Dieser Serinrest liegt jedoch in einer Konsensus-Phosphorylierungsstelle der Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 (Abb. 5.10). In dieser Konsensus-Sequenz liegt an Position -3 vor dem phosphorylierten Serin ein Arginin und an Position -5 eine Aminosäure mit einer hydrophoben Seitenkette (Valin 349 in NIPA) [185, 186].

Im folgenden Experiment wurde deshalb untersucht, ob NIPA durch die von ATR aktivierte Checkpointkinase Chk1 phosphoryliert wird. Hierfür wurden die Zellen vor der UV-Bestrahlung mit einem Chk1 Kinase-Inhibitor (SB218078) behandelt. Die Inhibierung der Checkpointkinase Chk1 mit diesem Inhibitor führt ebenso, wie die Behandlung der Zellen mit Caffein zu einer vollständigen Inhibierung der UV-induzierten Phosphorylierung von NIPA (Abb. 5.11, Spur 1–3). Die Phosphorylierung von NIPA in der Mitose hingegen wird zwar wie bereits gezeigt durch Caffein inhibiert, der Chk1 Inhibitor SB218078 hat jedoch keinen Einfluss auf diese zellzyklusabhängige Phosphorylierung von NIPA (Abb. 5.11, Spur 4–6).

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass zwar sowohl die UV-induzierte, als auch die zellzyklus-regulierte Phosphorylierung von NIPA abhängig von der Aktivität der Kinasen ATR und/oder ATM sind. Die direkt für die jeweilige Phosphorylierung verantwortlichen Kinasen scheinen jedoch in der DNA-Schadensantwort und im normalen Zellzyklus unterschiedlich zu sein. Da die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA durch SB218078

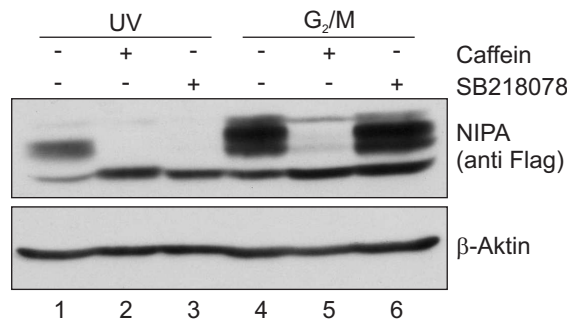


Abbildung 5.11: Der Checkpointkinase-Inhibitor SB218078 inhibiert Phosphorylierung von NIPA nach UV-Bestrahlung, jedoch nicht in der Mitose. NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw_t überexprimieren, wurden mit 100 J/m² UVC bestrahlt oder durch einen Thymidin-Nocodazol-Block in Mitose synchronisiert. Falls angegeben wurde den Zellen 2 h vor der UV-Bestrahlung bzw. 2 h vor Ernte der mitotischen Zellen 2 mM Caffein oder 5 μM SB218078 in das Zellkulturmedium zugegeben.

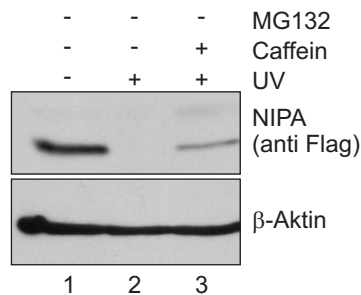


Abbildung 5.12: Die UV-induzierte Degradation von NIPA in der G₁-Phase wird durch Caffein inhibiert. NIH/3T3-Zellen, die stabil Flag-NIPA exprimieren, wurden durch Serumentzug in der G₀-Phase des Zellzyklus synchronisiert und anschließend aus dem Zellzyklus-Block entlassen. Die Zellen wurden 2,5 h später mit 100 J/m² bestrahlt oder unbehandelt gelassen und 45 min später geerntet. Falls angegeben, wurde den Zellen 2 h vor der Bestrahlung 2 mM Caffein in das Kulturmedium zugegeben. Die Abbildung zeigt die immunochemische Darstellung der Proteine im Western Blot.

inhibiert wird, wäre es möglich, dass die Checkpointkinase Chk1 NIPA nach der UV-Bestrahlung phosphoryliert.

5.2.5 Die UV-induzierte Degradation von NIPA in der G₁-Phase wird durch Caffein inhibiert

UV-Bestrahlung in der G₁-Phase des Zellzyklus führt zu einer Degradation des NIPA Proteins (Kap. 5.1.3). Um zu untersuchen, ob diese Degradation abhängig vom Phosphorylierungsstatus von NIPA ist, wurde die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA durch Zugabe von Caffein inhibiert und untersucht, ob dies einen Einfluss auf den Abbau von NIPA in dieser Zellzyklusphase hat.

NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw_t exprimieren, wurden in der G₀-Phase des Zellzyklus synchronisiert und anschließend aus dem Zellzyklus-Block entlassen. 2,5 Stun-

den später wurden die Zellen mit 100 J/m^2 UV bestrahlt oder unbehandelt belassen und 45 min später geerntet. Wie bereits gezeigt, liegt NIPA in den unbestrahlten Zellen ausschließlich in unphosphorylierter Form vor und die UV-Bestrahlung dieser Zellen führt zu einer vollständigen Degradation von NIPA (Abb. 5.12, Spur 1 und 2). Wurden die Zellen vor der UV-Bestrahlung jedoch mit Caffein behandelt, um die Phosphorylierung von NIPA zu inhibieren, wurde auch die Degradation von NIPA teilweise inhibiert. In diesen Zellen ist eine Expression der unphosphorylierten Form von NIPA zu erkennen (Abb. 5.12, Spur 3).

Diese Daten weisen darauf hin, dass NIPA in der G_1 Phase durch die UV-induzierte Phosphorylierung für den darauf folgenden Abbau markiert wird und nur die phosphorylierte Form von NIPA in dieser Zellzyklusphase abgebaut werden kann.

5.3 Einfluss der NIPA-Expression auf UVC-induzierte Apoptose

Zellen mit defekten DNA-Reparaturmechanismen oder auch funktionsunfähigen Checkpoints weisen häufig eine erhöhte Apoptose nach Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen auf [187]. Um zu untersuchen, ob NIPA eine funktionelle Rolle in der Signalantwort nach DNA-Schädigungen spielt, wurde deshalb zunächst untersucht, ob die NIPA-Expression einen Einfluss auf die Apoptoserate nach Schädigung der DNA hat.

5.3.1 Überexpression von NIPA sensibilisiert Zellen gegenüber UVC-induzierter Apoptose

Zunächst wurde im folgenden Experiment untersucht, ob eine erhöhte NIPA-Expression einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber UV-induzierter Apoptose ausübt.

Hierfür wurden NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw_t überexprimieren, oder als Kontrolle Zellen mit Leervektor, mit 100 J/m^2 UV bestrahlt und 6 h, 12 h und 26 h nach der Bestrahlung geerntet. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen wurde mit der TUNEL-Methode (Kap. 3.3.13) bestimmt.

Abbildung 5.13 zeigt, dass die Kontrollzellen (Leervektorzellen) relativ resistent gegenüber UV-induzierter Apoptose sind. Selbst 26 h nach der Bestrahlung ist nur ein geringer Anteil der Zellen TUNEL-positiv (schwarze Balken). Bei den NIPA-überexprimierenden Zellen hingegen ist bereits 12 h nach der Bestrahlung die Hälfte der Zellen apoptotisch (weiße Balken).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine erhöhte Expression von NIPA zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber UV-induzierter Apoptose führt.

5.3.2 Überexpression der S354A-Mutante von NIPA hat keinen Einfluss auf die UVC-induzierte Apoptose

NIPA wird nach UVC-Bestrahlung am Serinrest Ser354 phosphoryliert. Substitution dieses Serins durch Alanin (S354A) führt zu einer vollständigen Inhibierung der NIPA-Phosphorylierung nach UVC-Bestrahlung (Kap. 5.1.2). Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Überexpression dieser phosphorylierungs-defizienten Mutante ebenso wie Überexpression

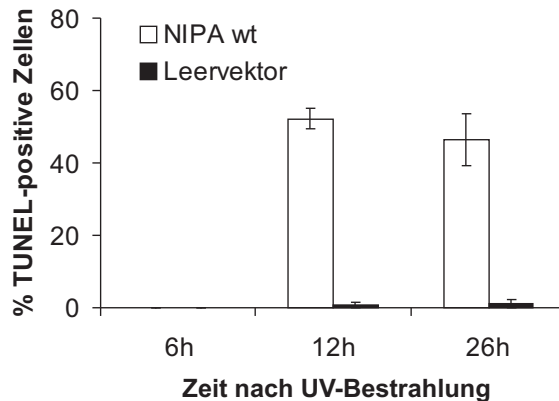


Abbildung 5.13: Überexpression von NIPA sensibilisiert Zellen gegenüber UVC-induzierter Apoptose. NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw_t überexprimieren, oder als Kontrolle Zellen mit Leervektor, wurden mit 100 J/m² UVC bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet. Der Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

von wildtyp NIPA zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UVC-induzierter Apoptose führt.

NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw_t oder Flag-NIPA S354A überexprimieren, oder als Kontrolle Zellen mit Leervektor, wurden mit 100 J/m² UVC bestrahlt oder unbehandelt belassen. 24 h nach der Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und der Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Wie bereits in Kapitel 5.3.1 gezeigt wurde, ist ein Großteil der wildtyp NIPA-überexprimierenden Zellen nach der UV-Bestrahlung TUNEL-positiv, wohingegen die Leervektorzellen auch nach der UV-Bestrahlung fast ausschließlich TUNEL-negativ sind (Abb. 5.14). Diejenigen Zellen, die die phosphorylierungs-defiziente Mutante von NIPA (S354A) überexprimieren, sind nach der UV-Bestrahlung ebenso wie die Leervektorzellen fast ausschließlich TUNEL-negativ.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nur Überexpression von wildtyp NIPA, nicht der phosphorylierungs-defizienten Mutante, die Zellen gegenüber UVC-induzierter Apoptose sensibilisiert.

Für ein weiteres Experiment wurden mit Hilfe des Geneswitch™ Systems 3T3-Fibroblasten mit induzierbarer Flag-NIPA-Expression generiert (siehe Kap. 3.3.6). Abbildung 5.15 a zeigt, dass in diesen Zellen die Expression von wildtyp NIPA und der S354A-Mutante durch die Zugabe von Mifepriston etwa gleich stark induziert wird. In den nicht induzierten Zellen ist hingegen keine Hintergrund-Expression von Flag-NIPA zu sehen.

In diesen Zellen wurde nun der Anteil apoptotischer Zellen mit und ohne induzierter Expression von NIPA nach UV-Bestrahlung bestimmt.

In Abbildung 5.15 b ist die NIPA Expression in den für die Apoptose-Messung verwendeten induzierten Zellen dargestellt. Das NIPA wildtyp-Protein und die Mutante werden etwa gleich stark exprimiert, in den Kontrollzellen mit β -Galactosidase Expression ist jedoch keine Flag-NIPA Expression zu sehen. Die UV-Bestrahlung führt zu einer Phosphorylierung

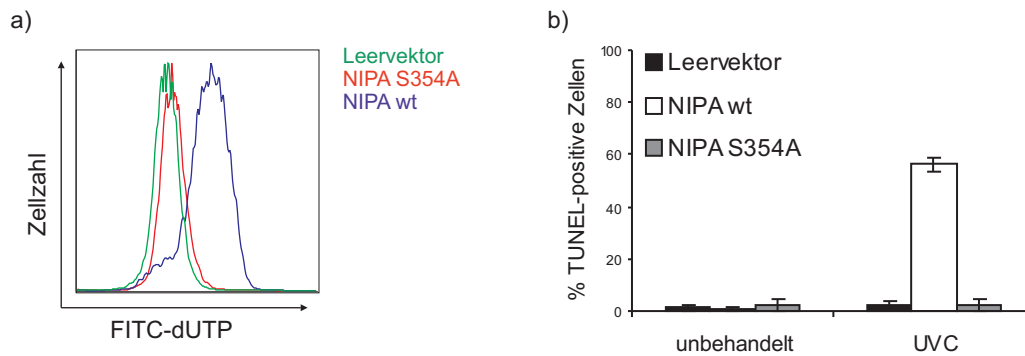


Abbildung 5.14: Überexpression der S354A-Mutante von NIPA hat keinen Einfluß auf die UVC-induzierte Apoptose. NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAwT oder Flag-NIPA S354A überexprimieren, oder als Kontrolle Zellen mit Leervektor, wurden mit 100 J/m² UVC bestrahlt oder unbehandelt belassen und 24 h nach der Bestrahlung geerntet. Der Prozentsatz TUNEL-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. a) Exemplarische Darstellung einer TUNEL-Messung UVC-bestrahlter Zellen b) Quantifizierung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

von NIPAwT, die S354A-Mutante wird hingegen wie erwartet nach der UV-Bestrahlung nicht phosphoryliert.

In den Kontrollzellen bewirkt die Induktion der β -Galactosidase-Expression durch Zugabe des Mifepristons keine erhöhte Anzahl TUNEL-positiver Zellen. Auch die UV-Bestrahlung der induzierten und der nicht-induzierten Zellen führt nicht zu einer erhöhten Apoptose in diesen Zellen. Wird jedoch die Expression des wildtyp NIPA Proteins induziert, weisen die Zellen nach UV-Bestrahlung eine wesentlich höhere Sensitivität auf (etwa 50% TUNEL-positiv Zellen). Bestrahlung der uninduzierten Zellen oder allein die Induktion der Expression des wildtyp NIPA Proteins führen jedoch nicht zu einer erhöhten Apoptoserate. Wird die Expression der phosphorylierungsdefizienten S354A Mutante induziert, so weisen diese Zellen nach UV-Bestrahlung entgegengesetzt zu den induzierten NIPA wildtyp Zellen keine erhöhte Sensitivität auf (Abb. 5.15 c).

Diese Daten zeigen, dass eine erhöhte Expression des wildtyp NIPA Proteins, jedoch nicht der S354A Mutante zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-induzierter Apoptose führt und untermauern somit die in den stabilen Zelllinien generierten Daten.

5.3.3 NIPA^{-/-} MEFs sind resistenter gegenüber UV-induzierter Apoptose, als NIPA^{+/+} MEFs

Da eine erhöhte Expression des NIPA-Proteins zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber UV-induzierter Apoptose führt, wurde im Folgenden untersucht, ob entsprechend eine verminderte NIPA-Expression zu einer erhöhten Resistenz der Zellen führt.

Hierfür wurde die Sensitivität immortalisierter NIPA^{-/-} und NIPA^{+/+} MEFs (murine embryonische Fibroblasten) gegenüber UV-induzierter Apoptose analysiert.

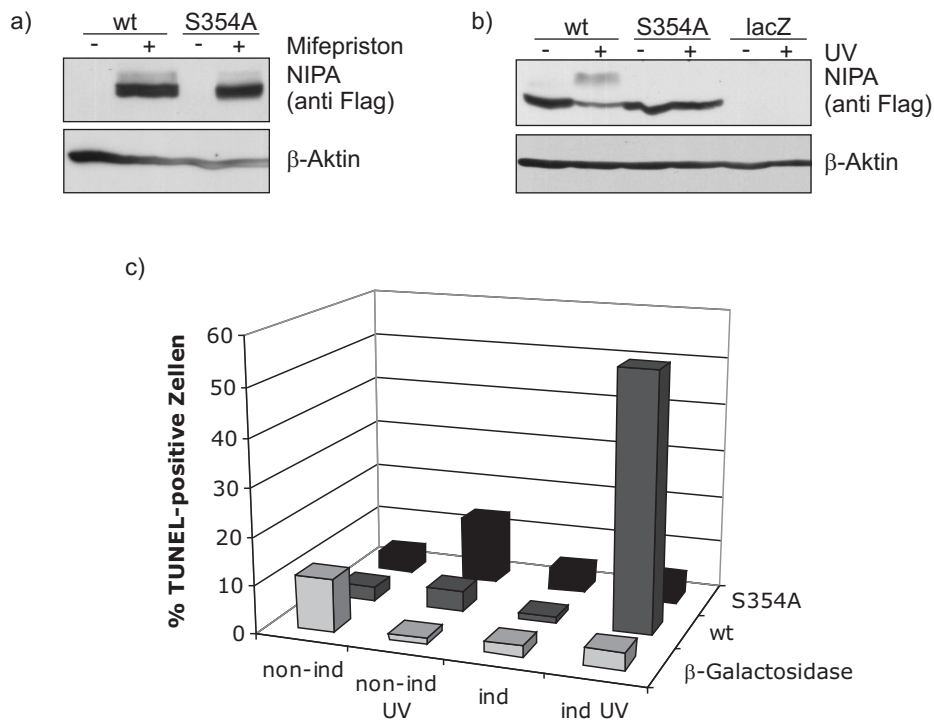


Abbildung 5.15: Induktion der Expression von wildtyp NIPA, jedoch nicht der S354A-Mutante sensibilisiert Zellen gegenüber UV-induzierter Apoptose. a) Nachweis der induzierbaren Expression von NIPA in den generierten GeneSwitch™ 3T3-Zellen 24 h nach Zugabe von Mifepriston. b) NIPA-Expression der in c) verwendeten induzierten Zellen. c) Falls angegeben wurde die Expression des NIPA wildtyp Proteins, der Mutante oder als Kontrolle der β -Galactosidase durch Zugabe von Mifepriston induziert. 24 h nach der Induktion wurden die Zellen mit 100 J/m² UVC bestrahlt oder unbehandelt belassen und weitere 24 h später geerntet. Der Anteil TUNEL-positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. ind.: induzierte Expression durch Mifepriston-Zugabe; non-ind.: keine Mifepriston-Zugabe. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, es ist exemplarisch die Auswertung eines Versuchs dargestellt.

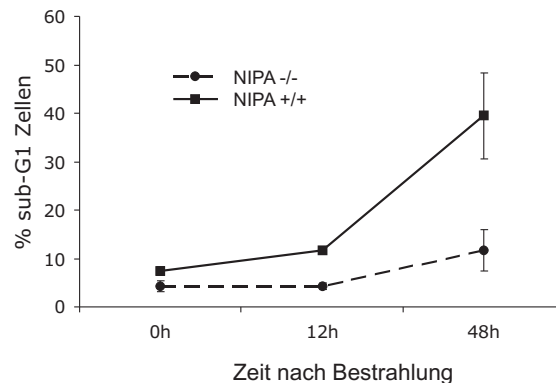


Abbildung 5.16: NIPA^{-/-} MEFs sind resistenter gegenüber UV-induzierter Apoptose, als NIPA^{+/+} MEFs. Immortalisierte murine embryonische Fibroblasten (MEFs) wurden mit 50 J/m² UVC bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Der Prozentsatz an sub-G₁ Zellen wurde nach Propidiumiodid-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

Die subkonfluenten Zellen wurden mit 50 J/m² bestrahlt und 0 h, 12 h und 48 h nach der UV-Bestrahlung geerntet. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und der Anteil apoptotischer sub-G₁ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Wie die Auswertung der Experimente in Abbildung 5.16 zeigt, sind bei den wildtyp MEFs 48 h nach Bestrahlung etwa 40% der Zellen apoptotisch. Bei den NIPA-defizienten MEFs hingegen ist nach dem gleichen Zeitintervall ein wesentlich geringerer Anteil der Zellen apoptotisch (im Schnitt etwa 10%).

Diese Daten zeigen somit, dass eine geringere NIPA-Expression mit einer erhöhten Resistenz der Zellen auf UV-induzierter Apoptose assoziiert ist.

5.4 Einfluss der NIPA-Expression auf die Signaltransduktion nach UVC-Bestrahlung

Da der Expressionslevel von NIPA einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber UVC-induzierte Apoptose ausübt, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, welche Auswirkung die Überexpression von NIPA auf die Signaltransduktion nach DNA-Schädigung hat.

5.4.1 Überexpression von NIPA führt zu einer verminderten Induktion von p53 nach UVC-Bestrahlung

Eines der wichtigsten Checkpointproteine in der Signalantwort nach UV-Bestrahlung ist das Tumorsuppressorprotein p53. Deshalb wurde zunächst der Einfluss der NIPA-Expression auf die Stabilisierung von p53 nach UV-Bestrahlung untersucht.

Hierfür wurden subkonfluente NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil mit Flag-NIPA oder als Kontrolle mit Leervektor transfiziert wurden, mit 50 J/m² bestrahlt oder unbehandelt gelassen. Die Zellen wurden 2 h nach Bestrahlung geerntet. Der Flag-Blot zeigt die Überexpres-

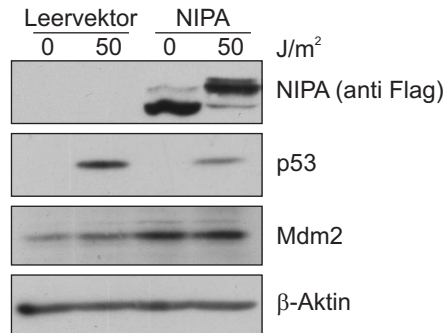


Abbildung 5.17: Überexpression von NIPA führt zu einer verminderten Induktion von p53 nach UVC-Bestrahlung. Subkonfluente NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil mit Flag-NIPA oder als Kontrolle mit Leervektor transfiziert wurden, wurden wie angegeben mit 0 J/m² oder 50 J/m² UVC bestrahlt und nach 2 h geerntet. Die aus den Zellen gewonnenen Lysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die immunochemische Darstellung der Proteine mit den angegebenen Antikörpern auf der gleichen Membran.

sion von Flag-NIPA ausschließlich in den mit Flag-NIPA transfizierten Zellen (Abb. 5.17). Nach UV-Bestrahlung liegt NIPA fast ausschließlich in phosphorylierter Form vor, während NIPA in unbehandelten Zellen kaum phosphoryliert ist. In den unbehandelten Zellen ist wie zu erwarten keine Expression von p53 detektierbar. Nach UV-Bestrahlung akkumuliert p53 sowohl in den Leervektorzellen, als auch in den Flag-NIPA überexprimierenden Zellen. In den NIPA-überexprimierenden Zellen ist die Stabilisierung von p53 nach der UV-Bestrahlung jedoch deutlich weniger ausgeprägt, als in den bestrahlten Kontrollzellen.

Die Stabilität von p53 wird durch die monomere E3-Ubiquitinligase Mdm2 reguliert [188, 189]. Der Western-Blot mit einem Mdm2-Antikörper zeigt, dass die NIPA-überexprimierenden Zellen eine höhere Mdm2-Expression aufweisen, als die Leervektor-Kontrollzellen.

Dieses Experiment zeigt, dass Überexpression von NIPA zu einer erhöhten Mdm2-Expression und infolgedessen zu einer geringeren UV-induzierten p53-Akkumulierung führt.

5.4.2 NIPA-überexprimierende Zellen haben keinen G₁-Checkpoint-Defekt

Nach Schädigung der DNA in einer Zelle bewirkt das p53 Tumorsuppressorprotein einen Zellzyklusarrest hauptsächlich am G₁/S-Übergang, aber auch am G₂/M-Übergang des Zellzyklus [190]. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob die verminderte Stabilisierung von p53 nach UV-Bestrahlung in NIPA-überexprimierenden Zellen zu einem Defekt im G₁/S-Checkpoint führt.

Exponentiell wachsende NIH/3T3-Fibroblasten, die stabil Flag-NIPAw^t überexprimieren, oder als Kontrolle Zellen mit einem Leervektor, wurden mit 50 J/m² UVC bestrahlt oder unbehandelt belassen und direkt anschließend mit dem Spindelgift Nocodazol behandelt. 16 h später wurden die Zellen geerntet und fixiert und anschließend die Zellzyklusverteilung der Zellen nach Propidiumiodidfärbung durchflusszytometrisch bestimmt.

In einer exponentiell wachsenden Zellpopulation befindet sich ein Großteil der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus (2n). Die Zugabe des Spindelgifts Nocodazol bewirkt eine Akkumulierung der Zellen in der Mitose (4n). Wurden die Zellen jedoch vor Nocodazol-Zugabe

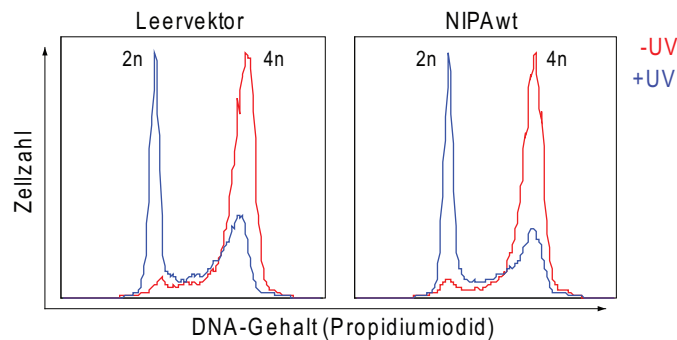


Abbildung 5.18: NIPA-überexprimierende Zellen haben keinen G_1 -Checkpoint-Defekt. Exponentiell wachsende NIH/3T3-Zellen, die stabil Flag-NIPAwT exprimieren oder Leervektorzellen wurden mit 0 J/m^2 (rot) oder 50 J/m^2 (blau) bestrahlt und direkt anschließend mit 50 ng/ml Nocodazol behandelt. 16 h später wurden die Zellen geerntet, fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

mit UVC bestrahlt, wird der G_1/S -Checkpoint aktiviert und die Zellen akkumulieren bereits am G_1/S -Übergang und sind nicht in der Lage, bis in die Mitose zu laufen und dort zu akkumulieren. Zellen mit einem defekten G_1/S -Checkpoint hingegen passieren ungehindert den G_1/S -Übergang und akkumulieren aufgrund der Nocodazol-Behandlung ebenso wie unbestrahlte Zellen in der Mitose.

Bei den Leervektorzellen (Abb. 5.18 links) erkennt man, dass die unbestrahlten Zellen (rot) wie erwartet in der Mitose akkumulieren. Die UV-bestrahlten Zellen (blau) hingegen arretieren bereits am G_1/S -Übergang. Gleichermäßen akkumulieren bei den NIPA-überexprimierenden Zellen (Abb. 5.18 rechts) die unbestrahlten Zellen in der Mitose, während die UV-bestrahlten Zellen am G_1/S -Übergang arretieren.

Diese Daten weisen darauf hin, dass NIPA-überexprimierende Zellen einen intakten G_1/S -Checkpoint nach UV-Bestrahlung haben. Somit ist die erhöhte Sensitivität dieser Zellen nicht auf einen Defekt in diesem Checkpoint zurückzuführen.

6 Diskussion

6.1 Regulation von NIPA durch den APC

NIPA wird in der späten S-Phase/G₂-Phase des Zellzyklus an mehreren Serinresten phosphoryliert [127]. Diese Phosphorylierung führt zu einer Dissoziation vom SCF Kernkomplex und somit zu einer Inaktivierung der SCF^{NIPA} Ubiquitin Ligase. Später im Zellzyklus, in der späten Mitose nimmt die phosphorylierte Form von NIPA ab, während etwa zeitgleich nicht phosphoryliertes Protein akkumuliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Abnehmen der phosphorylierten Form von NIPA in dieser Zellzyklusphase auf Ubiquitin-abhängige Proteolyse zurückzuführen ist (Kapitel 4.1).

Es wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben, dass verschiedene F-Box Proteine selbst Ubiquitin-abhängig proteasomal abgebaut werden. Dies wurde zunächst hauptsächlich auf eine Auto-Ubiquitinierung der F-Box Proteine zurückgeführt [191]. Jedoch wurde in den letzten Jahren für die zwei F-Box Proteine Skp2 und Tome-1 gezeigt, dass sie nicht SCF-abhängig, sondern durch den APC^{Cdh1}-Komplex abgebaut werden [175, 192, 193]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch das F-Box Protein NIPA ein Substrat des APC^{Cdh1}-Komplexes ist (Kapitel 4.2).

6.1.1 Der APC^{Cdh1} vermittelt den Abbau von NIPA

Die Aktivität des APC wird in der Mitose hauptsächlich durch die Bindung einer der beiden Substrat-bindenden Untereinheiten, Cdh1 oder Cdc20, reguliert. Hierbei ist der APC^{Cdc20} in der frühen Mitose, ab der Metaphase aktiv, während anschließend ab der späten Anaphase bis zum G₁/S-Übergang der APC^{Cdh1} aktiv ist (siehe Einleitung, Kap. 1.2.4).

Interessanter Weise bindet NIPA an das APC-Adapterprotein Cdh1, jedoch nicht an Cdc20 (Kap. 4.2.3). Dies weist darauf hin, dass der Abbau von NIPA durch den APC^{Cdh1}-Komplex, jedoch nicht durch APC^{Cdc20} vermittelt wird. Auch der Zeitpunkt des Abbaus der phosphorylierten Form von NIPA lässt vermuten, dass es sich hierbei um einen Cdh1-abhängigen Prozess handelt (Kap. 4.2.1). Der SCF^{NIPA}-Komplex wird bereits am G₂/M-Übergang durch Phosphorylierung von NIPA und eine hierdurch induzierte Dissoziation des Komplexes inaktiviert. Die Tatsache, dass die phosphorylierte Form von NIPA, die nach bisherigem Wissensstand als SCF-Untereinheit ohnehin inaktiv ist, anschließend abgebaut wird, wirft die Frage auf, ob diese phosphorylierte Form von NIPA eine von der SCF E3-Ligase unabhängige Funktion ausübt. Auch weist der Umstand, dass NIPA erst spät in der Mitose durch den APC^{Cdh1} und nicht bereits früher durch den APC^{Cdc20} degradiert wird, darauf hin, dass die Präsenz der phosphorylierten Form von NIPA in der frühen Mitose von Bedeutung sein könnte. Einen weiteren Hinweis darauf, dass die phosphorylierte Form von NIPA eine SCF-unabhängige Funktion besitzen könnte, geben Versuche, in denen die Überexpression des wildtyp NIPA Proteins, jedoch nicht einer phosphorylierungs-defizienten Mutante zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber UV-induzierter Apoptose führt

(siehe Diskussion, Kap. 6.2). Desweiteren wurde in einem Yeast-two-Hybrid Screen mit einer Phosphomimick-Mutante von NIPA (Ser354Asp) das nukleoläre Protein p78/MCRS1 (*microspherule protein 1*) als Interaktionspartner identifiziert (F. Bassermann, unveröffentlichte Daten). Weitere Experimente zeigen, dass p78/MCRS1 tatsächlich spezifisch an die phosphorylierte Form von NIPA bindet. Auch diese phosphorylierungs-abhängige Interaktion könnte darauf hinweisen, dass phosphoryliertes NIPA andere Funktionen besitzt, als die unphosphorylierte Form.

6.1.2 Regulation der Ubiquitinierung von NIPA

Der APC^{Cdh1}-Komplex ist im Zellzyklus ab der späten Anaphase bis mindestens zum Ende der G₁-Phase aktiv. Dennoch kann im Verlauf der G₁-Phase unphosphoryliertes NIPA akkumulieren, während die phosphorylierte Form von NIPA zu Beginn der G₁-Phase durch den APC^{Cdh1}-Komplex abgebaut wird. Diese Regulation des Abbaus eines Substrats des APC durch Phosphorylierung ist bemerkenswert, da man lange Zeit der Ansicht war, dass zwar SCF-vermittelte Ubiquitinierung abhängig von der Phosphorylierung des Substrates ist, wohingegen Phosphorylierung des Substrates keine Voraussetzung für die Ubiquitinierung durch den APC ist [194]. In der letzten Zeit wurden jedoch mehrere Arbeiten veröffentlicht, die auch für Substrate des APC-Komplexes eine Regulation des Abbaus durch Phosphorylierung zeigen. So werden zum Beispiel die mitotische Kinase Aurora A [65], der Replikationsfaktor Cdc6 [195], sowie das F-Box Protein Skp2 [196] durch Phosphorylierung vor APC-vermittelter Ubiquitinierung geschützt. Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors AML1/RUNX1 fördert hingegen dessen Ubiquitinierung durch den APC^{Cdc20} [197, 198].

Der Abbau von NIPA scheint jedoch nicht direkt vom Phosphorylierungsstatus von NIPA abzuhängen. Vielmehr scheint die Degradation von NIPA über die Bindung an die SCF-Komponente Skp1 reguliert zu werden (Kapitel 4.4). Nach diesem Modell ist NIPA in der G₁- und S-Phase durch seine Interaktion mit Skp1 vor der APC-abhängigen Ubiquitinierung geschützt. Die mitotische Phosphorylierung von NIPA führt zu einer Dissoziation dieser Interaktion [124] und erlaubt hierdurch die Ubiquitinierung von NIPA durch den APC-Komplex (siehe Schema in Abb. 6.1). Dies beschreibt einen neuen Regulationsmechanismus der Erkennung eines Substrates durch den APC-Komplex. Wei *et al.* beschreiben ebenso für das F-Box Protein Skp2, dass eine F-Box-Mutante, die nicht mehr an Skp1 binden kann, stärker *in vivo* durch den APC^{Cdh1}-Komplex ubiquitiniert wird, als das wildtyp Protein [192]. Dies lässt vermuten, dass auch die Ubiquitinierung von Skp2 ähnlich wie die Ubiquitinierung von NIPA über die Bindung an Skp1 reguliert werden kann. Jedoch wird zwar die APC^{Cdh1}-abhängige Ubiquitinierung von Skp2 ebenso wie diejenige von NIPA durch Phosphorylierung reguliert, der Phosphorylierungsstatus von Skp2 scheint allerdings keinen Einfluss auf die Bindung an den SCF Kernkomplex zu haben [196]. Somit wird die zellzyklus-abhängige Ubiquitinierung von Skp2 durch den APC-Komplex vermutlich über einen anderen Mechanismus und nicht über die Bindung an Skp1 reguliert. Es wäre nichtsdestotrotz möglich, dass auch bei Skp2 und bei anderen Substraten nicht die Phosphorylierung an sich, sondern eine phosphorylierungs-induzierte Modifikation von Interaktionen die APC-abhängige Ubiquitinierung reguliert.

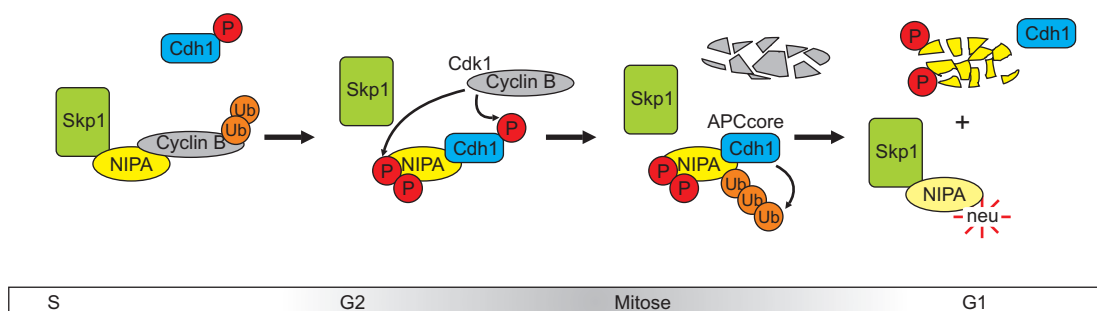


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Regulation des APC^{Cdh1}-vermittelten Abbaus von NIPA. Während der S-Phase des Zellzyklus ist NIPA an Skp1 gebunden. Am G₂/M-Übergang wird NIPA durch eine bisher unbekannte Kinase phosphoryliert. Dies führt zu Dissoziation der Bindung an Skp1 und Cyclin B1 und ermöglicht somit die Interaktion mit Cdh1. Jedoch verhindert Cdk-vermittelte Phosphorylierung von Cdh1 die Bindung an den APC-Kernkomplex und somit eine Ubiquitinierung von NIPA, so dass die phosphorylierte Form von NIPA zunächst stabil ist. Die Phosphorylierung von NIPA wird durch den nun aktiven Cyclin B1/Cdk1-Komplex aufrecht erhalten. Aktivierung des APC^{Cdc20} führt in der Mitose zu einer Degradation von Cyclin B1. Cdh1 wird dephosphoryliert und der jetzt aktive APC^{Cdh1}-Komplex kann nun das phosphorylierte NIPA-Protein ubiquitinieren. Das während der G₁-Phase neu synthetisierte NIPA bindet hingegen direkt an Skp1, ist somit vor dem APC^{Cdh1}-vermittelten Abbau geschützt und kann in der Zelle akkumulieren.

Während in der späten Mitose und G₁-Phase aufgrund der Protektion von NIPA durch Bindung an Skp1 ausschließlich die phosphorylierte Form von NIPA durch den APC^{Cdh1} abgebaut wird, konnte *in vitro* auch die APC^{Cdh1}-abhängige Ubiquitinierung und der Abbau der unphosphorylierten Form gezeigt werden (Kap. 4.2.5 und 4.2.2). Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass die Phosphorylierung von NIPA an sich keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung oder die Degradation hat. Vielmehr liegt in diesen *in vitro* Versuchen ungenügend Skp1-Protein vor, um das gesamte eingesetzte, *in vitro* translatierte NIPA zu binden und somit vor der Erkennung durch den APC^{Cdh1} zu schützen. Wird NIPA vor der *in vitro* Degradation hingegen mit aufgereinigtem Skp1 inkubiert, ist der Abbau von NIPA stark reduziert (Kap. 4.4.5). Dies unterstützt die auf weiteren Versuchen basierende Theorie, dass Bindung an Skp1 NIPA vor dem APC-vermittelten Abbau schützt.

Desweiteren konnte auch *in vivo* die Ubiquitinierung von NIPA und auch die Bindung von NIPA an Cdh1 in unsynchronisierten Zellen, also mit der unphosphorylierten Form gezeigt werden (Kap. 4.1.2 und 4.2.3). Dies ist allerdings nur möglich, wenn relativ große Mengen NIPA überexprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich auch hier nur eine Ubiquitinierung und Cdh1-Bindung der unphosphorylierten Form von NIPA zeigen, wenn mehr NIPA-Protein als Skp1 in der Zelle vorhanden ist und somit genügend NIPA Protein vorliegt, das zwar nicht phosphoryliert, aber nicht an Skp1 gebunden ist.

Wie die Bindung von Skp1 an NIPA die Interaktion zwischen NIPA und Cdh1 reguliert, ist ein Punkt, der noch weiter untersucht werden muss. Die beiden Proteine binden NIPA in relativ weit auseinanderliegenden Regionen: Skp1 bindet das F-Box Motiv in NIPA (Aminosäuren 170–210 [124]), während Cdh1 in der Region 395–402 von NIPA bindet

(Kap. 4.2.4). Dennoch führt die Bindung von Skp1 an NIPA möglicherweise zu einer sterischen Hinderung der Interaktion zwischen NIPA und Cdh1.

Interessanter Weise liegt in der Region, in der NIPA mit Cdh1 interagiert auch die Substratbindungsstelle für Cyclin B1 [127]. Da Cyclin B1 auch ein Substrat des APC^{Cdc20} und des APC^{Cdh1}-Komplexes ist und somit auch mit Cdh1 interagiert, wäre es theoretisch möglich, dass die gezeigte Bindung zwischen NIPA und Cdh1 nicht direkt, sondern indirekt über Cyclin B1 stattfindet und somit nicht physiologisch ist. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass NIPA spezifisch mit Cdh1, jedoch nicht mit Cdc20 interagiert (Kap. 4.2.3).

6.1.3 Identifizierung der Degradationsmotive in NIPA

Die spezifische Erkennung der Substrate des APC durch seine aktivierenden Untereinheiten Cdh1 und Cdc20 findet über bestimmte Sequenzen, sogenannte Degrons im Substrat statt. Die am weitesten verbreiteten Erkennungssequenzen sind die Dbox und die KEN-box (siehe Einleitung, Kap. 1.2.4). In der Sequenz von NIPA wurden zwei potentielle Dbox-Motive identifiziert, wobei das zweite Motiv konservierter als das erste ist (Kap. 4.3.1).

Die Mutation dieser Dbox-Motive in NIPA führt zwar zu einer verminderten Ubiquitinierung *in vitro*, jedoch ist die Ubiquitinierung durch diese Mutation nicht vollständig inhibiert. Dies lässt vermuten, dass noch weitere Degradationsmotive in NIPA vorhanden sind. Das wäre nicht ungewöhnlich, es sind einige Substrate des APC bekannt, in denen mehrere Degrons zusammen wichtig für eine effiziente Ubiquitinierung sind (zum Beispiel [68, 199, 200]). Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass neben den APC-Aktivatoren Cdh1 und Cdc20 auch Komponenten des APC Kernkomplexes an der Bindung der Substrate beteiligt sind [201–203].

Neben den beiden potentiellen Dbox-Motiven sind keine weiteren bekannten Erkennungssequenzen des APC in NIPA vorhanden, die als Degron dienen könnten. Es wird allerdings vermutet, dass Substrate des APC, die keine Dbox- oder KEN-box Motive besitzen, ein Motiv mit einer dreidimensionalen Interaktions-Oberfläche besitzen, die ähnlich zu der einer Dbox oder KEN-box ist, aber eine abweichende Aminosäure-Sequenz besitzt [203]. Somit wäre es möglich, dass sich in NIPA ein weiteres, bisher unbekanntes Degradationsmotiv befindet.

Die Mutation der Dbox-Motive führt trotz der verminderten *in vitro* Ubiquitinierung nicht zu einer Stabilisierung der phosphorylierten Form in der späten Mitose. Dies ist vermutlich teilweise darauf zurückzuführen, dass sich noch weitere Degradationsmotive in NIPA befinden, deren Mutation für eine effiziente Inhibierung der Ubiquitinierung und der Degradation wichtig sind. Aber möglicherweise führt auch eine falsche Lokalisation der Dbox-Mutante zu einer APC-unabhängigen Degradation des Proteins. Das zweite Dbox-Motiv in NIPA überschneidet sich teilweise mit dem NLS. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die Mutation dieses Dbox-Motives aufgrund seiner Nähe zum NLS zu einer cytoplasmatischen Lokalisierung dieser Mutante führt. Vermutlich führt diese falsche Lokalisierung der Dbox-Mutante zu einem APC-unabhängigen Abbau des Proteins, so dass keine Stabilisierung dieser Mutante in der späten Mitose zu beobachten ist. Um untersuchen zu können, ob die Mutation der Dbox-Motive bei richtiger Lokalisierung des Proteins zu einer Stabilisierung führen würde, wäre es möglich, das NLS an eine andere

Stelle in der NIPA Sequenz einzufügen, um so eine Beeinflussung der Lokalisation durch Mutation der Dbox-Motive zu unterbinden.

Die Identifizierung weiterer für die Degradation von NIPA wichtiger Motive, sowie der Transfer des NLS an eine andere Stelle in der NIPA Sequenz wird es erlauben, eine stabile Mutante von NIPA zu generieren und mit Hilfe dieser Mutante die Funktion des Abbaus der phosphorylierten Form von NIPA näher zu untersuchen.

6.2 Regulation von NIPA nach Schädigung der DNA

Treten in einer nicht transformierten Zelle Schädigungen an der DNA auf, so wird der Zellzyklus arretiert, bis die geschädigte DNA repariert ist. Dieser Zellzyklusarrest wird großteils durch negative Regulation der Cyclin-CDK-Komplexe an den verschiedenen Zellzyklus-Übergängen gewährleistet. Die einzelnen Komponenten der Signalkaskaden, die zu dieser Inhibierung der Cyclin-CDK-Komplexe führen, sind weitgehend Proteine, die auch im ungestörten Zellzyklus an der Regulation der Cyclin-CDK-Komplexe beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch das F-Box Protein NIPA, das im ungestörten Zellzyklus durch Ubiquitinierung von Cyclin B1 an der Regulation des Eintritts in die Mitose beteiligt ist, durch die DNA-Schadensantwort der Zelle reguliert wird.

6.2.1 NIPA wird nach Induktion von DNA-Schädigungen phosphoryliert

Bestrahlung von Zellen mit UVC (254 nm) führt zu einer scheinbaren Erhöhung der molekularen Masse des NIPA Proteins im Western Blot (Kapitel 5.1.1). Hierbei handelt es sich um eine Phosphorylierung von NIPA, da sich diese scheinbare Erhöhung der molekularen Masse durch Behandlung der Zellysate mit alkaliner Phosphatase inhibieren lässt (Doktorarbeit E. Grogro, bisher unveröffentlichte Daten).

Da die Phosphorylierung von NIPA relativ schnell (bereits 10 Minuten nach der Bestrahlung) zu sehen ist, kann ausgeschlossen werden, dass sie sekundär durch eine Akkumulierung der Zellen in der G₂-Phase oder Mitose auftritt. Somit wird NIPA als Antwort auf Schädigungen der DNA durch Phosphorylierung reguliert.

Diese durch Schädigung der DNA induzierte Phosphorylierung von NIPA ist nicht nur spezifisch nach Bestrahlung der Zellen mit UVC-Strahlung zu beobachten. Sie wird vielmehr auch durch weitere DNA-schädigende Substanzen, wie z.B. durch ionisierende Strahlung, durch die Topoisomerase-Inhibitoren Etoposid und Doxorubicin oder das DNA-methylierende Agens MMS (Methylmethansulfonat) induziert. Die Phosphorylierung von NIPA nach Behandlung der Zellen mit diesen Agenzien ist allerdings nicht so ausgeprägt, wie nach UV-Bestrahlung (Doktorarbeit E. Grogro, bisher unveröffentlichte Daten).

Desweiteren ist die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA nicht nur spezifisch in NIH/3T3-Fibroblasten, sondern auch in mehreren anderen Zelllinien zu beobachten. Versuche, in denen die Expression des p53 Tumorsuppressorproteins durch microRNA (miR) herunterreguliert wurden, zeigen außerdem, dass die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA unabhängig vom p53-Status der Zelle stattfinden kann (Doktorarbeit E. Grogro).

Das NIPA Protein besitzt eine potentielle Zinkfingerdomäne. Zwar wurde für dieses Motiv vorausgesagt, dass es sich hierbei um ein BIR-ähnliches Motiv handelt (siehe Einleitung, Kap. 1.3), dennoch gibt es Hinweise, dass NIPA direkt an DNA bindet (Doktorarbeit E. Grogro, bisher unveröffentlichte Daten). Somit wäre es möglich, dass NIPA in Reparaturmechanismen involviert ist oder als Sensorprotein in der Signaltransduktion nach DNA-Schädigungen funktioniert. Für mehrere Checkpoint-Proteine wurde beschrieben, dass sie erst dann phosphoryliert werden, wenn sie an die geschädigte DNA gebunden haben [178]. Eine Bindung von NIPA an die DNA scheint jedoch nicht Voraussetzung für eine Phosphorylierung von NIPA zu sein, da zwar die Zinkfingermutante nicht phosphoryliert wird, aber

die nukleäre Lokalisation von NIPA keine Voraussetzung für die UVC-induzierte Phosphorylierung ist (Kap. 5.1.5).

Interessanterweise wird NIPA auch durch die Expression verschiedener onkogener Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel NPM-ALK, BCR-ABL oder FLT3-ITD phosphoryliert ([117] und bisher unveröffentlichte Daten). Über die Signalwege, die in diesem Fall zur Phosphorylierung von NIPA führen, ist jedoch bisher wenig bekannt. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Expression von FLT3-ITD oder BCR-ABL zu einer Anreicherung reaktiver Sauerstoff-Verbindungen (ROS, *reactive oxygen species*) und hierdurch zu Doppelstrangbrüchen der DNA führt [204, 205]. Auch die Expression verschiedener Seneszenz-induzierender Onkogene wie Cdc6, Cyclin E oder H-RasV12 induziert eine ATM-abhängige Aktivierung der DNA-Schadensantwort [206, 207]. Somit wäre es denkbar, dass auch die durch Expression von Onkogenen induzierte Phosphorylierung von NIPA über die durch die Schädigungen der DNA aktivierten Signalkaskaden vermittelt wird.

6.2.2 Die UVC-induzierte Phosphorylierung von NIPA ist ATR-abhängig

Unter den wichtigsten Kinasen in der Regulierung der Signalantwort nach DNA-Schädigungen sind die beiden Phosphatidylinositolkinase-ähnlichen Kinasen ATM und ATR. Versuche mit einem Inhibitor dieser beiden Kinasen und Experimente, in denen ATM oder ATR mittels RNA-Interferenz herunterreguliert wurden, weisen darauf hin, dass die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA abhängig von der Kinaseaktivität von ATR, jedoch nicht von ATM ist (Kap. 5.2). Dies stimmt mit bisherigen Veröffentlichungen überein, die beschreiben, dass ATR durch eine Blockade der Replikationsgabel aktiviert wird, wie dies bei durch UV-induzierten DNA-Schädigungen der Fall ist, während ATM hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche aktiviert wird [130].

NIPA wird jedoch auch nach Behandlung mit Agenzien, die DNA-Doppelstrangbrüche induzieren, wie zum Beispiel ionisierender Strahlung oder Topoisomerase-Inhibitoren, phosphoryliert. Es wird interessant sein, herauszufinden, ob auch hier die Phosphorylierung abhängig von ATR oder von der durch Doppelstrangbrüche aktivierten Kinase ATM ist. Da die Phosphorylierung von NIPA nach Behandlung mit diesen Doppelstrangbruch-induzierenden Agenzien nicht so ausgeprägt ist, wie nach UV-Bestrahlung, wäre es allerdings möglich, dass die geringe Aktivierung von ATR durch diese Agenzien verantwortlich für die Phosphorylierung von NIPA ist.

6.2.3 Funktion der UV-induzierten Phosphorylierung von NIPA

In der Mitose wird NIPA an mindestens drei Serinresten (Ser354, Ser359 und Ser395) phosphoryliert [127]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung hingegen nur an einem dieser Serinreste (Ser354) erfolgt (Kap. 5.1.2). Auch die Versuche mit einem Inhibitor der Checkpointkinase Chk1 zeigen, dass es sich um zwei unterschiedliche Phosphorylierungen handelt. Während dieser Inhibitor die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA hemmt, hat er keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von

NIPA am G₂/M-Übergang (Kap. 5.2.4). Dennoch führt die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA ebenso, wie die zellzyklus-abhängige Phosphorylierung zu einer Dissoziation vom SCF-Kernkomplex (Kap. 5.1.4). Bis jetzt ist jedoch noch unklar, ob eine durch diese Inaktivierung der SCF^{NIPA}-Ligase hervorgerufene Akkumulierung von entsprechenden Substraten eine Rolle in der DNA-Schadensantwort spielt. Es wurde bereits beschrieben, dass in verschiedenen hematopoietischen Zellen durch γ -Strahlung induzierte Apoptose mit einer Akkumulierung von nukleärem Cyclin B1 assoziiert und abhängig von dieser Akkumulierung ist [208, 209]. Ob jedoch die Inaktivierung der SCF^{NIPA}-Ligase hierbei eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden. Alternativ oder zusätzlich wäre es auch möglich, dass die phosphorylierte Form von NIPA über eine Funktion in der Signaltransduktion nach DNA-Schädigung verfügt.

Erstaunlicherweise führt die UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA in der G₁-Phase des Zellzyklus zu einer vollständigen Degradation des NIPA Proteins (Kapitel 5.1.3). Hierbei ist die Phosphorylierung von NIPA Voraussetzung für diese Degradation, da die Inhibierung der Phosphorylierung durch Caffein den Abbau von NIPA zumindest teilweise inhibiert (Kapitel 5.2.5). Es wäre interessant herauszufinden, ob diese Degradation ebenso wie die Degradation der phosphorylierten Form von NIPA im ungestörten Zellzyklus abhängig von einer Ubiquitinierung durch den APC-Komplex ist. Der APC^{Cdh1} ist ab der späten Mitose bis zum Ende der G₁-Phase aktiv und wird zu Beginn der S-Phase durch Cdk2-abhängige Phosphorylierung inaktiviert [96, 210]. Dies würde erklären, warum UV-induzierte Phosphorylierung von NIPA in der G₁-Phase zu einer Degradation führt, während in der S-Phase und G₂-Phase die phosphorylierte Form von NIPA akkumulieren kann. In diesem Zusammenhang wird es auch sehr interessant sein, zu untersuchen ob die Expression einer Mutante, die nicht abgebaut werden kann, deren phosphorylierte Form also auch in der G₁-Phase nach UV-Bestrahlung akkumulieren kann, einen Einfluss auf die Integrität der DNA-Schadensantwort hat.

Die Expressionsstärke von NIPA bleibt unmittelbar nach UV-Bestrahlung der Zellen in etwa konstant, nimmt aber 4 h nach der Bestrahlung ab, bis 8 h nach Bestrahlung so gut wie kein NIPA mehr in den Zellen vorhanden ist (Kap. 5.1.1). Nach Schädigung der DNA durch UV-Strahlung werden die Zellen hauptsächlich am G₁/S-Checkpoint arretiert. Somit lässt sich die starke Abnahme der NIPA-Expression durch eine Akkumulierung der Zellen in der G₁-Phase und dem hier gezeigten Abbau der phosphorylierten Form von NIPA in dieser Zellzyklusphase erklären.

6.2.4 Einfluss der NIPA-Expression auf die UVC-induzierte Apoptose

Interessanterweise hat die Stärke der NIPA-Expression einen großen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber durch DNA-Schädigungen induzierter Apoptose. So führt die Überexpression von NIPA in murinen NIH/3T3 Fibroblasten zu einem ausgeprägten Anstieg der TUNEL-Positivität nach UV-Bestrahlung, während entsprechend NIPA^{-/-}MEFs eine höhere Resistenz gegenüber UV-induzierter Apoptose aufweisen, als NIPA-exprimierende MEFs (Kap. 5.3). Findet die Schädigung der DNA in einer bestimmten Zellzyklusphase, zum Beispiel während der DNA-Synthese statt, ist dieser Schaden für die Zelle gravierender, als wenn die DNA-Schädigung zum Beispiel während der G₁-Phase im Zell-

zyklus stattfindet [211, 212]. Da die Überexpression von NIPA jedoch keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der Zellen hat (Daten nicht gezeigt), kann ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Sensitivität der NIPA-überexprimierenden Zellen auf einen sekundären Effekt durch eine Akkumulierung der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase während der DNA-Schädigung zurückzuführen ist.

Durch RNA-Interferenz vermittelte Herunterregulation der NIPA Expression führt zu einem verfrühten Mitoseeintritt, Akkumulierung der Zellen in Prometaphase und anschließender Apoptose [124]. Aufgrund des durch den verfrühten Mitose-Eintritt induzierten Zellzyklus-Arrests und der darauffolgenden Apoptose in den mit NIPA siRNA behandelten Zellen, kann diese Methode leider nicht verwendet werden, um den Einfluss einer verminderten NIPA-Expression auf die UV-induzierte Apoptose zu untersuchen. Embryone Fibroblasten aus NIPA^{-/-}-Mäusen weisen hingegen keine Zellzyklus-Defekte auf (Illert *et al.*, *submitiert*) und können somit für diese Versuche verwendet werden.

Die Überexpression der phosphorylierungsdefizienten Mutante (Ser354Ala) von NIPA hat im Gegensatz zur Überexpression des wildtyp Proteins keinen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber UV-induzierter Apoptose (Kap. 5.3.2). Dies weist darauf hin, dass vermutlich die phosphorylierte Form von NIPA eine Funktion besitzt, die für diese Sensibilisierung der Zellen verantwortlich ist. Alternativ wäre es allerdings auch möglich, dass das in großer Menge überexprimierte wildtyp NIPA Protein mit anderen wichtigen Substraten um die Bindung an die Kinase und nachfolgende Phosphorylierung konkurriert und hierdurch die Signaltransduktion in einer unphysiologischen Weise beeinflusst. Da eine Reduktion der NIPA-Expression jedoch entsprechend einen konträren Effekt auf die Sensitivität der Zellen hat, erscheint es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen unphysiologischen Einfluss handelt.

Der Einfluss der NIPA-Expression auf die Sensitivität der Zellen scheint abhängig vom Apoptose-induzierenden Stimulus zu sein. So zeigen frühere Versuche, dass in der IL-3 abhängigen pro-B Lymphozyten Zelllinie Ba/F3 eine Überexpression von wildtyp NIPA, jedoch nicht der phosphorylierungs-defizienten Ser354Ala Mutante, zu einer verzögerten Apoptose nach Serumentzug führt [117]. Somit scheint die durch Überexpression von NIPA induzierte höhere Sensitivität der Zellen spezifisch für die durch Schädigungen der DNA induzierte Apoptose zu sein. Dies könnte darauf hinweisen, dass NIPA nicht direkt in einen der Apoptose-Signalwege involviert ist, sondern vielmehr an verschiedenen anderen Prozessen beteiligt ist, deren Fehlfunktion zu Apoptose führen kann.

In Zellen mit NIPA-Überexpression findet eine geringere Induktion der p53-Expression statt (Kap. 5.4.1). Es wäre demzufolge möglich, dass diese Zellen defizient in p53-abhängigen DNA-Reparaturmechanismen oder p53-abhängigen Zellzyklus-Checkpoints sind. Der wichtigste p53-abhängige Checkpoint nach UV-Bestrahlung ist der G₁/S-Checkpoint. Überexpression von NIPA hat jedoch keinen Einfluss auf die Integrität dieses Checkpoints (Kapitel 5.4.2). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Funktion des G₂/M-Checkpoints oder p53-abhängige Reparaturmechanismen in diesen Zellen beeinträchtigt sind. Die erhöhte Sensitivität der NIPA-überexprimierenden Zellen auf UV-Bestrahlung ist aber möglicher-

weise auch auf p53-unabhängige Mechanismen zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NIPA neben seiner Funktion als Zellzyklus Kontrollpunkt in der Regulation der S- und G₂-Phase im ungestörten Zellzyklus eine funktionelle Rolle in der DNA-Schadensantwort spielt. NIPA wird nach UVC-Bestrahlung ATR-abhängig, vermutlich durch die Checkpointkinase Chk1 phosphoryliert. Dies führt zu einer Dissoziation von Skp1 und somit zu einer Inaktivierung der SCF^{NIPA}-E3 Ligase. Hierdurch kommt es vermutlich zu einer Akkumulierung von für die zelluläre Stressantwort relevanten Substraten. Zudem legen die gezeigten Daten nahe, dass die phosphorylierte Form von NIPA eigenständige und wahrscheinlich SCF-unabhängige Funktionen in der DNA-Schadensantwort einnimmt. Die Funktion als Checkpoint-Molekül könnte NIPA und seine Substrate als attraktive Zielstrukturen bei molekularen Therapieansätzen etablieren.

7 Zusammenfassung

Das F-Box Protein NIPA (*Nuclear Interaction Partner of Alk*) bindet spezifisch an Skp1 und bildet mit weiteren Komponenten eine aktive SCF E3-Ubiquitinligase. Der SCF^{NIPA}-Komplex ubiquitiniert nukleäres Cyclin B1 während der Interphase des Zellzyklus und verhindert hierdurch einen verfrühten Mitoseeintritt der Zelle. Phosphorylierung von NIPA am G₂/M-Übergang des Zellzyklus führt zu einer Dissoziation der Bindung an Skp1 und somit zu einer Inaktivierung der SCF^{NIPA}-Ligase. Dies gewährleistet, dass Cyclin B1 zeitgerecht im Zellkern akkumulieren kann. Somit ist NIPA direkt an der Kontrolle eines ordnungsgemäßen Ablaufs der Mitose beteiligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass die phosphorylierte Form von NIPA in der späten Mitose selbst durch den Proteasom-Ubiquitin Signalweg abgebaut wird. Hierbei wird die Ubiquitinierung des phosphorylierten NIPA Proteins durch den APC^{Cdh1} (*Anaphase promoting complex*) vermittelt.

Die Degradation von NIPA wird über die Bindung an die SCF-Komponente Skp1 reguliert. Somit ist NIPA in der G₁- und S-Phase durch seine Interaktion mit Skp1 vor der APC-abhängigen Ubiquitinierung geschützt. Die mitotische Phosphorylierung von NIPA führt zu einer Dissoziation dieser Interaktion und erlaubt hierdurch die Ubiquitinierung von NIPA durch den APC-Komplex. Dies beschreibt einen neuen Regulationsmechanismus der Erkennung eines Substrates durch den APC. Hierdurch wird gewährleistet, dass die phosphorylierte Form von NIPA in der späten Mitose und G₁-Phase abgebaut wird, während neu synthetisiertes, nicht phosphoryliertes NIPA in der G₁-Phase akkumulieren kann.

Es wurden zwei potentielle Dbox-Motive in NIPA identifiziert, deren Mutation zu einer verminderten *in vitro* Ubiquitinierung durch den APC^{Cdh1} führt. Somit dienen diese Motive als Degradationsmotive für den APC-vermittelten Abbau von NIPA.

Als wichtiger Zellzyklus Kontrollpunkt scheint NIPA auch bei Prozessen nach DNA-Schädigungen eine funktionell wichtige Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass UVC-Bestrahlung von Zellen zu einer zellzyklusunabhängigen Phosphorylierung von NIPA und somit zu einer Inaktivierung der SCF^{NIPA} E3-Ligase führt. Diese Phosphorylierung ist abhängig von der Phosphatidylinositolkinase-ähnlichen Kinase ATR und findet anders als im ungestörten Zellzyklus an nur einem der Serinreste in NIPA statt. Während der G₁-Phase des Zellzyklus führt diese UV-induzierte Phosphorylierung zu einer vollständigen Degradation des NIPA Proteins, so dass nur während der S- und G₂/M-Phase die phosphorylierte Form von NIPA akkumulieren kann.

Überexpression des NIPA Proteins führt zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber UVC-induzierter Apoptose. NIPA knockout MEFs zeigen im Vergleich zu wildtyp MEFs eine erhöhte Resistenz gegenüber UVC. Somit scheint der SCF^{NIPA} die UVC-induzierten Antworten der Zelle zu modulieren.

Literaturverzeichnis

- [1] J. McIntosh und M. Koonce. Mitosis. *Science* **246**, 622–628 (1989).
- [2] C. Sherr. Cancer cell cycles. *Science* **247**, 1672–1677 (1996).
- [3] J. Ubersax, E. Woodbury, P. Quang, M. Paraz, J. Blethrow, K. Shah, K. Shokat und D. Morgan. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **425**, 859–864 (2003).
- [4] T. Hunt. Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin. Cell. Biol.* **2**, 213–222 (1991).
- [5] C. Takizawa und D. Morgan. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 658–665 (2000).
- [6] B. Korf. *Human Genetics and Genomics*. Blackwell Publishing, 3. Auflage (1989).
- [7] D. G. Johnson und C. L. Walker. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 295–312 (1999).
- [8] A. Li und J. Blow. The origin of CDK regulation. *Nat. Cell. Biol.* **3**, E182–184 (2001).
- [9] P. Nurse. Checkpoint pathways come of age. *Cell* **91**, 865–867 (1997).
- [10] A. Paulovich, D. Toczyski und L. Hartwell. When checkpoints fail. *Cell* **88**, 315–321 (1997).
- [11] K. L. King und J. A. Cidlowski. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 601–617 (1998).
- [12] M. V. Blagosklonny. A node between proliferation, apoptosis, and growth arrest. *Bioessays* **21**, 704–709 (1999).
- [13] M. Guo und B. Hay. Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 745–752 (1999).
- [14] R. King, R. Deshaies, J. Peters und M. Kirschner. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652–1659 (1996).
- [15] A. Hershko und A. Ciechanover. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 429–479 (1998).
- [16] A. Hershko, H. Heller, S. Elias und A. Ciechanover. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* **258**, 8206–8214 (1983).

- [17] V. Chau, J. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. Ecker, D. Gonda und A. Varshavsky. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576–1583 (1989).
- [18] D. Finley, S. Sadis, B. Monia, P. Boucher, D. Ecker, S. Crooke und V. Chau. Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5501–5509 (1994).
- [19] S. Jentsch. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *Trends Cell. Biol.* **2**, 98–103 (1992).
- [20] A. Weissman. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169–178 (2001).
- [21] Y. Okamoto, T. Ozaki, K. Miyazaki, M. Aoyama, M. Miyazaki und A. Nakagawara. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Res.* **63**, 4167–4173 (2003).
- [22] K. Nakayama und K. Nakayama. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 369–381 (2006).
- [23] C. Pickart. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 503–533 (2001).
- [24] R. Ingham, G. Gish und T. Pawson. The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* **23**, 1972–1984 (2004).
- [25] C. Joazeiro und A. Weissman. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **102**, 549–552 (2000).
- [26] J. Seol, R. Feldman, W. Zachariae, A. Shevchenko, C. Correll, S. Lyapina, Y. Chi, M. Galova, J. Claypool, S. Sandmeyer, K. Nasmyth, R. Deshaies, A. Shevchenko und R. Deshaies. Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes and Dev.* **13**, 1614–1626 (1999).
- [27] S. Hatakeyama, M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida und K. Nakayama. U box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* **276**, 33 111–33 120 (2001).
- [28] J. Huibregtse, M. Scheffner und P. Howley. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4918–4927 (1993).
- [29] M. Scheffner, U. Nuber und J. Huibregtse. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**, 81–83 (1995).
- [30] P. Freemont. Ring for destruction? *Curr. Biol.* **10**, R84–R87 (2000).

- [31] D. Morgan. Regulation of the APC and exit from mitosis. *Nat. Cell Biol.* **1**, E47–E53 (1999).
- [32] W. Zachariae und K. Nasmyth. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes and Dev.* **15**, 2039–2058 (1999).
- [33] J. Peters. The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9**, 931–943 (2002).
- [34] J. Harper, J. Burton und M. Solomon. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes and Dev.* **16**, 2179–2206 (2002).
- [35] R. Deshaies. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 435–467 (1999).
- [36] A. Willems, M. Schwab und M. Tyers. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 133–170 (2004).
- [37] C. Bai, P. Sen, K. Hofmann, L. Ma, M. Goebel, J. Harper und S. Elledge. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**, 263–274 (1996).
- [38] E. Kipreos, L. Lander, J. Wing, W. He und E. Hedgecock. Cul-1 is required for cell cycle exit in *C.elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* **85**, 829–839 (1996).
- [39] N. Mathias, S. Johnson, M. Winey, A. Adams, L. Goetsch, J. Pringle, B. Byers und M. Goebel. Cdc53p acts in concert with Cdc4p and Cdc34p to control the G1-to-S-phase transition and identifies a conserved family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6634–6643 (1996).
- [40] A. Willems, S. Lanker, E. Patton, K. Craig, T. Nason, N. Mathias, R. Kobayashi, C. Wittenberg und M. Tyers. Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* **86**, 453–463 (1996).
- [41] T. Kamura, D. Koepp, M. Conrad, D. Skowyra, R. Moreland, O. Iliopoulos, W. Lane, W. J. Kaelin, S. Elledge, R. Conaway, J. Harper und J. Conaway. Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* **284**, 657–661 (1999).
- [42] T. Ohta, J. Michel, A. Schottelius und Y. Xiong. ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell* **3**, 535–541 (1999).
- [43] N. Zheng, B. Schulman, L. Song, J. Miller, P. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D. Koepp, S. Elledge, M. Pagano, R. Conaway, J. Conaway, J. Harper und N. Pavletich. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box^{Skp2} SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703–709 (2002).

- [44] R. Feldman, C. Correll, K. Kaplan und R. Deshaies. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221–230 (1997).
- [45] D. Skowyra, K. Craig, M. Tyers, S. Elledge und J. Harper. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209–219 (1997).
- [46] P. Nash, X. Tang, S. Orlicky, Q. Chen, F. Gertler, M. Mendenhall, F. Sicheri, T. Pawson und M. Tyers. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**, 514–521 (2001).
- [47] Y. Yoshida, T. Chiba, F. Tokunaga, H. Kawasaki, K. Iwai, T. Suzuki, Y. Ho, K. Matsuoka, M. Yoshida, K. Tanaka und T. Tai. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature* **418**, 438–442 (2002).
- [48] G. Wu, G. Xu, B. Schulman, P. Jeffrey, J. Harper und N. Pavletich. Structure of a β -TrCP1-Skp1- β -Catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF β -TrCP1 ubiquitin ligase. *Mol. Cell* **11**, 1445–1456 (2003).
- [49] T. Kawakami, T. Chiba, T. Suzuki, K. Iwai, K. Yamanaka, N. Minato, H. Suzuki, N. Shimbara, Y. Hidaka, F. Osaka, M. Omata und K. Tanaka. NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *EMBO* **20** (2001).
- [50] K. Wu, A. Chen, P. Tan und Z. Pan. The Nedd8-conjugated ROC1-CUL1 core ubiquitin ligase utilizes Nedd8 charged surface residues for efficient polyubiquitin chain assembly catalyzed by Cdc34. *J. Biol. Chem.* **277**, 516–527 (2002).
- [51] C. Cenciarelli, C. D.S., D. Guardavaccaro, W. Parks, M. Vidal und M. Pagano. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr. Biol.* **9**, 1177–1179 (1999).
- [52] J. Winston, D. Koepf, C. Zhu, S. Elledge und J. Harper. A family of mammalian F-box proteins. *Curr. Biol.* **9**, 1180–1182 (1999).
- [53] J. Jin, T. Cardozo, R. Lovering, S. Elledge, M. Pagano und J. Harper. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes and Dev.* **18**, 2573–2580 (2004).
- [54] E. Neer, C. Schmidt, R. Nambudripad und T. Smith. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297–300 (1994).
- [55] B. Kobe und J. Deisenhofer. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 415–421 (1994).
- [56] Z. Tang, B. Li, R. Bharadwaj, H. Zhu, E. Ozkan, K. Hakala, J. Deisenhofer und H. Yu. APC2 cullin protein and APC11 RING protein comprise the minimal ubiquitin ligase module of the anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3839–3851 (2001).

-
- [57] W. Zachariae, A. Shevchenko, P. Andrews, R. Ciosk, M. Galova, M. Stark, M. Mann und K. Nasmyth. Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* **279**, 1216–1219 (1998).
- [58] H. Yu, J. Peters, R. King, A. Page, P. Hieter und M. Kirschner. Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* **279**, 1219–1222 (1998).
- [59] R. King, J. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter und M. Kirschner. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyses the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**, 279–288 (1995).
- [60] R. Wäsch und F. Cross. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* **418**, 556–562 (2002).
- [61] F. Uhlmann, F. Lottspeich und K. Nasmyth. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**, 37–42 (1999).
- [62] F. Uhlmann, D. Wernic, M. Poupart, E. Koonin und K. Nasmyth. Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**, 375–386 (2000).
- [63] C. Lindon und J. Pines. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J. Cell Biol.* **164**, 233–241 (2004).
- [64] S. Stewart und G. Fang. Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer Res.* **65**, 8730–8735 (2005).
- [65] L. Littlepage und J. Ruderman. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes and Dev.* **16**, 2274–2285 (2002).
- [66] A. Castro, S. Vigneron, C. Bernis, J. Labbe, C. Prigent und T. Lorca. The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep.* **3**, 1209–1214 (2002).
- [67] A. Castro, Y. Arlot-Bonnemains, S. Vigneron, J. Labbe, C. Prigent und T. Lorca. APC/Fizzy-related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep.* **3**, 457–462 (2002).
- [68] R. Hames, S. Wattam, H. Yamano, R. Bacchieri und A. Fry. APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *EMBO J.* **20**, 7117–7127 (2001).
- [69] M. Hayes, Y. Kimata, S. Wattam, C. Lindon, G. Mao, H. Yamano und A. Fry. Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nat. Cell Biol.* **153**, 707–614 (2006).

- [70] D. Gordon und D. Roof. Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphase-promoting complex and Cdc20p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12 515–12 520 (2001).
- [71] E. Hildebrandt und M. Hoyt. Cell cycle-dependent degradation of *saccharomyces cerevisiae* spindle motor Cin8p requires APC(Cdh1) and a bipartite destruction sequence. *Cell* **12**, 3402–3416 (2001).
- [72] H. Funabiki und A. Murray. The *xenopus* chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell* **102**, 411–424 (2000).
- [73] A. Castro, S. Vigneron, C. Bernis, J. Labbe, und T. Lorca. Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box-independent pathway. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4126–4138 (2003).
- [74] B. Petersen, C. Wagener, F. Marinoni, E. Kramer, M. Melixetian, E. Lazzerini Denchi, C. Gieffers, C. Matteucci, J. Peters und K. Helin. Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes and Dev.* **14**, 2330–2343 (2000).
- [75] M. Ferreira, C. Santocanale, L. Drury und J. Diffley. Dbf4p, and essential S phase-promoting factor, is targeted for degradation by the anaphase-promoting complex. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 242–248 (2000).
- [76] T. McGarry und M. Kirschner. Geminin, and inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* **93**, 1043–1053 (1998).
- [77] S. Stroschein, S. Bonni, J. Wrana und K. Luo. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes and Dev.* **15**, 2822–2836 (2001).
- [78] Y. Wan, X. Liu und M. Kirschner. The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targetin SnoN for destruction. *Mol. Cell* **8**, 1027–1039 (2001).
- [79] Y. Konishi, J. Stegmüller, T. Matsuda, S. Bonni und A. Bonni. Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science* **303**, 1026–1030 (2004).
- [80] J. Stegmüller und A. Bonni. Moving past proliferation: new roles for Cdh1-APC in postmitotic neurons. *Trends Neurosci.* **28**, 596–601 (2005).
- [81] E. Kramer, C. Gieffers, G. Hölzl, M. Hengstschläger und J. Peters. Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family. *Curr. Biol.* **8**, 1207–1210 (1998).
- [82] G. Fang, H. Yu und M. Kirschner. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes and Dev.* **12**, 1871–1883 (1998).

- [83] C. Kraft, F. Herzog, C. Gieffers, K. Mechtler, A. Hagting, J. Pines und J. Peters. Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* **22**, 6598–6609 (2003).
- [84] A. Golan, Y. Yudkovsky und A. Hershko. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclinb and Plk. *J. Biol. Chem.* **277**, 15 552–15 557 (2002).
- [85] A. Rudner und A. Murray. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J. Cell. Biol.* **149**, 1377–1390 (2000).
- [86] S. Kotani, S. Tugendreich, M. Fujii, P. Jorgensen, N. Watanabe, C. Hoog, P. Hieter und K. Todokoro. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol. Cell* **1**, 371–380 (1998).
- [87] M. Schwab, M. Neutzner, D. Mocker und W. Seufert. Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *EMBO J.* **20**, 5165–5175 (2001).
- [88] H. Vodermaier, C. Gieffers, S. Maurer-Stroh, F. Eisenhaber und J. Peters. TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr. Biol.* **13**, 1459–1468 (2003).
- [89] L. Passmore, E. McCormack, S. Au, A. Paul, K. Willison, J. Harper und D. Barford. Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *EMBO J.* **22**, 786–796 (2003).
- [90] C. Kraft, H. C. Vodermaier, S. Maurer-Stroh, F. Eisenhaber und J.-M. Peters. The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol. Cell* **18**, 543–553 (2005).
- [91] R. Visintin, S. Prinz und A. Amon. CDC20 and CDH1: A family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* **278**, 460–463 (1997).
- [92] M. Schwab, A. Lutum und W. Seufert. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* **90**, 683–693 (1997).
- [93] K. Cooper, M. Mallory, D. Egeland, M. Jarnik und R. Strich. Ama1p is a meiosis-specific regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14 548–14 553 (2000).
- [94] M. Blanco, L. Pelloquin und S. Moreno. Fission yeast *mfr1* activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *J. Cell. Sci.* **114**, 2135–2143 (2001).
- [95] M. Shteinberg, Y. Protopopov, D. Ganoth, T. Listovsky, M. Brandeis und A. Hershko. Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/Cdc20. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 193–198 (1999).

- [96] E. Kramer, N. Scheuringer, A. Podtelejnikov, M. Mann und J. Peters. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol. Biol. Cell* **5** (2000).
- [97] W. Zachariae, M. Schwab, K. Nasmyth und W. Seufert. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**, 1721–1724 (1998).
- [98] S. Jaspersen, J. Charles und D. Morgan. Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr. Biol.* **9**, 227–236 (1999).
- [99] M. Blanco, A. Sánchez-Díaz, J. de Prada und S. Moreno. APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *EMBO J.* **19**, 3945–3955 (2000).
- [100] S. Yamaguchi, H. Okayama und P. Nurse. Fission yeast Fizzy-related protein srw1p is a G(1)-specific promoter of mitotic cyclin B degradation. *EMBO J.* **19**, 3968–3977 (2000).
- [101] J. Reimann, B. Gardner, F. Margottin-Goguet und P. Jackson. Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than mad2 proteins. *Genes and Dev.* **15**, 3278–3285 (2001).
- [102] J. Reimann, E. Freed, J. Hsu, E. Kramer, J. Peters und P. Jackson. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**, 645–655 (2001).
- [103] J. Miller, M. Summers, D. Hansen, M. Nachury, N. Lehman, A. Loktev und P. Jackson. Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes and Dev.* **20**, 2410–2420 (2006).
- [104] D. Hansen, A. Loktev, K. Ban und P. Jackson. Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC inhibitor Emi1. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5623–5634 (2004).
- [105] Y. Moshe, J. Boulaire, M. Pagano und A. Hershko. Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7937–7942 (2004).
- [106] M. Song, S. Song, N. Ayad, J. Chang, J. Lee, H. Hong, N. Lee, H. Nd Choi, J. Kim, H. Kim, J. Kim, E. Choi, M. Kirschner und D. Lim. The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat. Cell Biol.* **6**, 129–137 (2004).
- [107] R. Bharadwaj und H. Yu. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**, 2016–2027 (2004).
- [108] D. Lew und D. Burke. The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 251–282 (2003).

- [109] K. Nasmyth. How do so few control so many? *Cell* **120**, 739–746 (2005).
- [110] H. Yu. Regulation of apc-cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**, 706–714 (2002).
- [111] Z. Tang, R. Bharadwaj, B. Li und H. Yu. Mad2-independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev. Cell* **1**, 227–237 (2001).
- [112] M. Glotzer, A. Murray und M. Kirschner. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–138 (1991).
- [113] C. Pfleger und M. Kirschner. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the Dbox targeted by Cdh1. *Genes and Dev.* **14**, 655–665 (2000).
- [114] M. Araki, H. Yu und M. Asano. A novel motif governs APC-dependent degradation of drosophila ORC1 in vivo. *Genes Dev.* **19**, 2458–2465 (2005).
- [115] R. Crane, A. Kloepper und J. Ruderman. Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J. Cell. Sci* **117**, 5975–5983 (2004).
- [116] H. Nguyen, D. Chinnappan, T. Urano und K. Ravid. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4977–4992 (2005).
- [117] T. Ouyang, R. Bai, F. Bassermann, C. von Klitzing, S. Klümper, C. Miething, S. Morris, C. Peschel und J. Duyster. Identification and characterization of a nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA). *J. Biol. Chem.* **278**, 30 028–30 036 (2003).
- [118] A. Klug. Zinc finger peptides for the regulation of gene expression. *J. Mol. Biol.* **293**, 215–218 (1999).
- [119] R. Brown. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 94–98 (2005).
- [120] R. Gamsjaeger, C. Liew, F. Loughlin, M. Crossley und J. Mackay. Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 63–70 (2007).
- [121] J. Matthews und M. Sunde. Zinc fingers - folds for many occasions. *IUBMB Life* **54**, 351–355 (2002).
- [122] K. Kokoszynska, L. Rychlewski und L. Wyrwicz. The mitotic entry regulator NIPA is a prototypic BIR domain protein. *Cell Cycle* **7**, 2073–2075 (2008).
- [123] L. Miller. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* **9**, 323–328 (1999).
- [124] F. Bassermann, C. von Klitzing, S. Münch, R. Bai, H. Kawaguchi, S. Morris, C. Peschel und J. Duyster. NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell* **122**, 45–57 (2005).

- [125] M. Lohka, M. Hayes und J. Maller. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3009–3013 (1988).
- [126] J. Minshull, J. Blow und T. Hunt. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis. *Cell* **56**, 947–956 (1989).
- [127] F. Bassermann, C. von Klitzing, A. Illert, S. Munch, S. Morris, M. Pagano, C. Peschel und J. Duyster. Multisite phosphorylation of nuclear interaction partner of ALK (NIPA) at G2/M involves cyclin B1/Cdk1. *J. Biol. Chem.* **282**, 15 965–15 972 (2007).
- [128] L. Hartwell und T. Weinert. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629–634 (1989).
- [129] B. Zhou und S. Elledge. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433–439 (2000).
- [130] Y. Shiloh. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 155–168 (2003).
- [131] M. Kastan und D. Lim. The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell.* **1**, 179–186 (2000).
- [132] J. Bartek und J. Lukas. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett.* **490**, 117–122 (2001).
- [133] N. Mailand, J. Falck, C. Lukas, R. Syljuåsen, M. Welcker, J. Bartek und J. Lukas. Rapid destruction of CDC25A in response to DNA damage. *Science* **288**, 1425–1429 (2000).
- [134] J. Falck, N. Mailand, R. Syljuåsen, J. Bartek und J. Lukas. The ATM-Chk2 Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**, 842–847 (2001).
- [135] M. Donzelli und G. Draetta. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**, 671–677 (2003).
- [136] N. Chehab, A. Malikzay, M. Appel und T. Halazonetis. Chk2/hCds1 functions as a dna damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* **14**, 278–288 (2000).
- [137] A. Hirao, Y. Kong, S. Matsuoka, A. Wakeham, J. Ruland, H. Yoshida, D. Liu, S. Elledge und T. Mak. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824–1827 (2000).
- [138] N. Dumaz und D. Meek. Serine 15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J.* **18**, 7002–7010 (1999).

- [139] R. Maya, M. Balass, S. Kim, D. Shkedy, J. Leal, O. Shifman, M. Moas, T. Buschmann, Z. Ronai, Y. Shiloh, M. Kastan, E. Katzir und M. Oren. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* **15**, 1067–1077 (2001).
- [140] V. Dulić, W. Kaufmann, S. Wilson, T. Tlsty, E. Lees, J. Harper, S. Elledge und S. Reed. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013–1023 (1994).
- [141] S. Kuerbitz, B. Plunkett, W. Walsh und M. Kastan. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7491–7495 (1992).
- [142] S. Matsuoka, M. Huang und S. Elledge. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**, 1893–1897 (1998).
- [143] Y. Sanchez, C. Wong, R. Thoma, R. Richman, Z. Wu, H. Piwnica-Worms und S. Elledge. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497–1501 (1997).
- [144] C. Peng, P. Graves, R. Thoma, Z. Wu, A. Shaw und H. Piwnica-Worms. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**, 1501–1505 (1997).
- [145] A. Lopez-Girona, B. Furnari, O. Mondesert und P. Russell. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* **397**, 172–175 (1999).
- [146] N. Mailand, A. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek und J. Lukas. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J.* **21**, 5911–5920 (2002).
- [147] L. Busino, M. Donzelli, M. Chiesa, D. Guardavaccaro, D. Ganoth, N. Dorrello, A. Herskho, M. Pagano und G. Draetta. Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during s phase and in response to DNA damage. *Nature* **426**, 87–91 (2003).
- [148] T. Passalaris, J. Benanti, L. Gewin, T. Kiyono und D. Galloway. The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5872–5881 (1999).
- [149] Q. Zhan, S. Fan, M. Smith, I. Bae, K. Yu, I. J. Alamo, P. O'Connor und A. J. Fornace. Abrogation of p53 function affects gadd gene responses to DNA base-damaging agents and starvation. *DNA Cell Biol.* **15**, 805–815 (1996).
- [150] Q. Zhan, M. Antinore, X. Wang, F. Carrier, M. Smith, C. Harris und A. J. Fornace. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein gadd45. *Oncogene* **18**, 2892–2900 (1999).
- [151] P. Andreassen, A. D'Andrea und T. Taniguchi. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes and Dev.* **18**, 1958–1963 (2004).

- [152] A. Casper, P. Nghiem, M. Arlt und T. Glover. ATR regulates fragile site stability. *Cell* **111**, 779–789 (2002).
- [153] M. Donzelli, M. Squatrito, D. Ganoth, A. Hershko, M. Pagano und G. Draetta. Dual mode of degradation of Cdc25 A phosphatase. *EMBO J.* **21**, 4875–4884 (2002).
- [154] A. Muratovska und M. Eccles. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Letters* **558**, 63–68 (2004).
- [155] J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Auflage (1989).
- [156] R. Helling, H. Goodman und H. Boyer. Analysis of endonuclease EcoRI fragments of DNA from λ bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. *J. Virol.* **14**, 1235–1244 (1974).
- [157] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn und H. Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, Band 52 Pt 1, 263–273 (1986).
- [158] S. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber und T. Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494–498 (2001).
- [159] Y. Wang, J. O'Malley, J. Tsai und B. O'Malley. a regulatory system for use in gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8180–8184 (1994).
- [160] J. Lillie und M. Green. Transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Nature* **338**, 39–44 (1989).
- [161] E. Giniger, S. Varnum und M. Ptashne. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**, 767–774 (1985).
- [162] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. Bartunik und R. Huber. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**, 463–471 (1997).
- [163] J. Sarkaria, E. Busby, R. Tibbetts, P. Roos, Y. Taya, L. Karnitz und R. Abraham. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res.* **59**, 4375–4382 (1999).
- [164] J. Jackson, A. Gilmartin, C. Imburgia, J. Winkler, L. Marshall und A. Roshak. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res.* **60**, 566–572 (2000).
- [165] P. Graves, L. Yu, J. Schwarz, J. Gales, E. Sausville, P. O'Connor und H. Piwnicka-Worms. The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J. Biol. Chem.* **275**, 5600–5605 (2000).

- [166] M. Bradford. 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 (1976).
- [167] U. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- [168] S. Geley, E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J. Peters und T. Hunt. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J. Cell. Biol.* **153**, 137–148 (2001).
- [169] P. Clute und J. Pines. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.* **1**, 82–87 (1999).
- [170] S. Prinz, E. Hwang, R. Visintin und A. Amon. The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr. Biol.* **8**, 750–760 (1998).
- [171] C. Sorensen, C. Lukas, E. Kramer, J. Peters, J. Bartek und J. Lukas. A conserved cyclin-binding domain determines functional interplay between anaphase-promoting complex-cdh1 and cyclin a-cdk2 during cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3692–3703 (2001).
- [172] Z. Hilioti, Y. Chung, Y. Mochizuki, C. Hardy und O. Cohen-Fix. The anaphase inhibitor Pds1 binds to the APC/C-associated protein Cdc20 in a destruction box-dependent manner. *Curr. Biol.* **11**, 1347–1352 (2001).
- [173] G. Fang, H. Yu und M. Kirschner. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell* **2**, 163–171 (1998).
- [174] J. Burton, V. Tsakraklides und M. Solomon. Assembly of an APC-Cdh1-substrate complex is stimulated by engagement of a destruction box. *Mol. Cell* **18**, 533–542 (2005).
- [175] T. Bashir, N. Dorello, V. Amador, D. Guardavaccaro und M. Pagano. Control of the SCF^{Skp2-Cks2} ubiquitin ligase by the APC/C^{Cdh1} ubiquitin ligase. *Nature* **428**, 190–193 (2004).
- [176] J. Ravanat, T. Douki und J. Cadet. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol.* **B 63**, 88–102 (2001).
- [177] S. Tornaletti und P. Hanawalt. Effect of dna lesions on transcription elongation. *Biochimie* **81**, 139–146 (1999).
- [178] C. Lukas, J. Falck, J. Bartkova, J. Bartek und J. Lukas. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**, 255–260 (2003).

- [179] L. Faivre, M. Merrer, S. Lyonnet, H. Plauchu, N. Dagoneau, A. Campos-Xavier, J. Attia-Sobol, A. Verloes, A. Munnich und V. Cormier-Daire. Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **112**, 379–383 (2002).
- [180] J. Goodship, H. Gill, J. Carter, A. Jackson, M. Splitt und M. Wright. Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22.1-q24. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 498–503 (2000).
- [181] M. O’Driscoll, V. Ruiz-Perez, C. Woods, P. Jeggo und J. Goodship. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 497–501 (2003).
- [182] J. Murnane, L. Fuller und R. Painter. Establishment and characterization of a permanent psv ori–transformed ataxia-telangiectasia cell line. *Exp. Cell. Res.* **158**, 119–126 (1985).
- [183] S. Kim, D. Lim, C. Canman und M. Kastan. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* **274**, 37 538–37 543 (1999).
- [184] T. O’Neill, A. Dwyer, Y. Ziv, D. Chan, S. Lees-Miller, R. Abraham, J. Lai, D. Hill, Y. Shiloh, L. Cantley und G. Rathbun. Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J. Biol. Chem.* **275**, 22 719–22 727 (2000).
- [185] P. Chen, C. Luo, Y. Deng, K. Ryan, J. Register, S. Margosiak, A. Tempczyk-Russell, B. Nguyen, P. Myers, K. Lundgren, C.-C. Kan und P. O’Connor. Implications for Chk1 regulation: the 1.7 Å crystal structure of human cell cycle checkpoint kinase Chk1. *Cell* **100**, 681–692 (2000).
- [186] T. O’Neill, L. Giarratani, P. Chen, L. Iyer, C.-H. Lee, M. Bobiak, F. Kanai, B.-B. Zhou, J. Chung und G. Rathbun. Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J. Biol. Chem.* **277**, 16 102–16 115 (2002).
- [187] W. Roos und B. Kaina. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* **12**, 440–450 (2006).
- [188] D. Vargas, S. Takahashi und Z. Ronai. Mdm2: a regulator of cell growth and death. *Adv. Cancer Res.* **89**, 1–34 (2003).
- [189] Y. Yang, C. Li und A. Weissman. Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* **23**, 2096–2106 (2004).
- [190] G. Wahl und A. Carr. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell Biol.* **3**, 277–286 (2001).
- [191] P. Zhou und P. Howley. Ubiquitination and degradation of the substrate recognition subunits of SCF ubiquitin-protein ligases. *Mol. Cell* **2**, 571–580 (1998).

- [192] W. Wei, N. Ayad, Y. Wan, G. Zhang, M. Kirschner und W. J. Kaelin. Degradation of the SCF component Skp1 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* **428**, 194–198 (2004).
- [193] N. G. Ayad, S. Rankin, M. Murakami, J. Jebanathirajah, S. Gygi und M. W. Kirschner. Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* **113**, 101–113 (2003).
- [194] H. Vodermaier. APC/C and SCF: Controlling each other and the cell cycle. *Curr. Bio.* **14**, R787–R796 (2004).
- [195] N. Mailand und J. Diffley. CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* **122**, 915–926 (2005).
- [196] G. Rodier, P. Coulombe, P. Tanguay, C. Boutonnet und S. Meloche. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC^{mathrmCdh1} in G1 phase. *EMBO* **27**, 679–691 (2008).
- [197] J. Biggs, L. Peterson, Y. Zhang, A. Kraft und D. Zhang. AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase promoting complex. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 7420–7429 (2006).
- [198] S. Wang, Y. Zhang, J. Soosairajah und A. Kraft. Regulation of RUNX1/AML1 during the G2/M transition. *Leuk. Res.* **31**, 839–851 (2007).
- [199] P.-Y. Ke, Y.-Y. Kuo, C.-M. Hu und Z.-F. Chang. Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev.* **19**, 1920–1933 (2005).
- [200] K. Christensen, J. Brennan, C. Aldridge und H. Ford. Cell cycle regulation of the human Six1 homeoprotein is mediated by APC^{Cdh1}. *Oncogene* **26**, 3406–3414 (2006).
- [201] H. Yamano, J. Gannon, H. Mahbubani und T. Hunt. Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin b by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* **13**, 137–147 (2004).
- [202] L. Passmore und D. Barford. Coactivator functions in a stoichiometric complex with anaphase-promoting complex/cyclosome to mediate substrate recognition. *EMBO Rep.* **6**, 873–878 (2005).
- [203] E. Eytan, Y. Moshe, I. Braunstein und A. Hershko. Roles of the anaphase-promoting complex/cyclosome and of its activator Cdc20 in functional substrate binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2081–2086 (2006).
- [204] A. Sallmyr, J. Fan, K. Datta, K. Kim, D. Grosu, P. Shapiro, S. D. und F. Rassool. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, dna damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* **111**, 3173–3182 (2008).

- [205] M. Sattler, S. Verma, G. Shrikhande, C. Byrne, Y. Pride, T. Winkler, E. Greenfield, R. Salgia und J. Griffin. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 24 273–24 278 (2000).
- [206] J. Bartkova, N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L.-V. F. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. Halazonetis, J. Bartek und V. Gorgoulis. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).
- [207] R. Di Micco, M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre', P. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P. Pelicci und F. d'Adda di Fagana. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).
- [208] L. Porter, G. Singh und J. Lee. Abundance of cyclin B1 regulates γ -radiation-induced apoptosis. *Blood* **95**, 2645–2650 (2000).
- [209] L. Porter, I. Cukier und J. Lee. Nuclear localization of cyclin B1 regulates DNA damage-induced apoptosis. *Blood* **101**, 1928–1933 (2003).
- [210] C. Lukas, C. Sorensen, E. Kramer, E. Santoni-Rugiu, C. Lindeneg, J. Peters, J. Bartek und J. Lukas. Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex. *Nature* **401**, 815–818 (1999).
- [211] A. Osborn, S. Elledge und L. Zou. Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell. Biol.* **12**, 509–516 (2002).
- [212] V. Gottifredi und C. Prives. The S phase checkpoint: When the crowd meets at the fork. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 355–368 (2005).

Danksagung

Viele Menschen haben direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihnen möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher danke ich für die freundliche Bereitschaft, diese Dissertation in den Fachbereich Chemie und Biochemie der Technischen Universität München zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Justus Duyster für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Gelegenheit, an diesem äußerst interessanten Projekt zu arbeiten. Er hat mir viel Vertrauen entgegengebracht und Freiraum für selbständige Arbeit gegeben. Für die fachlichen Diskussionen und wertvollen Vorschläge sowie die großzügige Unterstützung des Projekts möchte ich ihm ausdrücklich danken.

Herrn Prof. Dr. Christian Peschel danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation am hämatologischen Forschungslabor am Klinikum rechts der Isar anzufertigen.

Dr. Florian Bassermann danke ich dafür, dass er mich in die Welt des Zellzyklus und der Ubiquitinierung eingeführt hat. Auch aus den USA diente er noch als Ansprechpartner und hat durch rege Diskussionen, wertvolle Tipps und seinen unschlagbaren Optimismus wesentlich zu diesem Projekt beigetragen.

Astrid Fröschl danke ich herzlich für die äußerst wertvolle technische Unterstützung und vor allem ihren unermüdlichen Einsatz bei endlosen Ubiquitinierungsversuchen. Auch bei Sabine Wötzel möchte ich mich herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön geht auch an diejenigen, die das ganze Labor durch ihren organisatorischen Einsatz am Laufen halten: unseren TAs Astrid Fröschl, Claudia Mugler, Silvia Münch, Petra Schenk, Jana Sängler, Melanie Sickinger, Sabine Wötzel und Frau Budak und nicht zuletzt Petra Glänzer und Benita Parachoudis.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster danke ich für die nette und teilweise äußerst lustige Arbeitsatmosphäre, für die sehr gute Zusammenarbeit, für viele hilfreiche und fruchtbare Diskussionen und diverse nette gemeinsame Unternehmungen.

Danksagung

Danken möchte ich auch von ganzem Herzen meinen Eltern, die das Interesse an den Naturwissenschaften in mir geweckt haben, mich immer unterstützt und es mir ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen.

Matthias, ohne den diese Arbeit nie in dieser Form zustande gekommen wäre (und das nicht nur wegen seiner LaTeX- und Coreldraw- Kenntnisse) danke ich für die schönen Dinge im Leben.

Publikationen

von Klitzing, C., Bassermann, F., Illert, A.L., Fröschl, A., Peschel, C. and Duyster, J. Binding to Skp1 regulates APC^{Cdh1}-mediated degradation of the F-box protein NIPA. (Manuskript in Vorbereitung)

Illert, A.L., Kawaguchi, H., Quintanilla-Martinez, L., Bassermann, F., **von Klitzing, C.**, Schenk, P., Barchi, M., Hiwatari, M., Peschel, C., Morris, S.W. and Duyster, J. (2008) Targeted inactivation of nuclear interaction partner of ALK (NIPA) disrupts meiotic prophase. (submittiert)

Bassermann, F., **von Klitzing, C.**, Illert, A.L., Münch, S., Morris, S.W., Peschel, C. and Duyster, J. (2007) Multisite Phosphorylation of NIPA at G2/M Involves Cyclin B1/CDK1. *J. Biol. Chem.* 282(22):15965–15972

Bassermann, F., **von Klitzing, C.**, Münch, S., Bai, R.Y., Kawaguchi, H., Morris, S.W., Peschel, C., and Duyster, J. (2005) NIPA Defines an SCF-Type Mammalian E3 Ligase that Regulates Mitotic Entry. *Cell* 122(1):45–57

Ouyang, T., Bai, R.Y., Bassermann, F., **von Klitzing, C.**, Klümpen, S., Miething, C., Morris, S.W., Peschel, C., and Duyster, J. (2003) Identification and characterization of a nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (NIPA). *J. Biol. Chem.* 278: 30028–30036

Hamaguchi, M., Meth, J.L., **von Klitzing, C.**, Wei, W., Esposito, D., Rodgers, L., Walsh, T., Welch, P., King, M.C. and Wigler, M.H. (2002) DBC2, a Candidate for a Tumor Suppressor Gene Involved in Breast Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(21):13647–13652