

Die Funktion von Cyclin E und Skp2 in der Regulation der Proliferation und genetischen Instabilität in Hepatozyten der Maus

Endoreduplikation versus genomische Instabilität

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von Dipl. Humanbiologin
Uta Kossatz-Böhlert

geb. am 15. 4. 1976 in Potsdam

2007

Referent:
Prof. Dr. A. Gossler

Koreferent:
Prof. Dr. S. Kubicka

Tag der Promotion:
6. 3. 2007

I	Inhalt	
1.0.	EINLEITUNG	9
1.1.	Der Zellzyklus	9
1.1.1.	Methoden zur Analyse der Zellzyklusprogression	9
1.1. 2.	Die G0/ G1 Phase	10
1.2.	Die Funktion von Cyclin E in der S-Phase Transition	13
1.2.1.	Cyclin E und die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins	14
1.2.2.	Funktion von Cyclin E in der Initiation der Replikation	15
1.2.3.	Der Abbau von Cyclin E durch den SCF Komplex und den Cullin3 BTB-Protein Komplex	16
1.3.	Die S- und M-Phase	16
1.4.	Cycline und Cyclin- abhängige Kinasen	18
1.4.1.	Die Aktivierung von Cyclin Kinase Komplexen	20
1.4.1.1.	Kontrolle durch Bindung und Expression	20
1.4.1.2.	Aktivierung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung	21
1.5.	Die Funktion von p27	22
1.5.1.	Die Phosphorylierung von p27 reguliert die Lokalisation des Proteins	22
1.5.2.	Die Phosphorylierung von p27 reguliert den Abbau des Proteins	24
1.5.3.	Der Verlust von p27 führt zu gesteigerter Zellproliferation	25
1.6.	Die Degradation von Proteinen	26
1.6. 1.	Der Abbau von Proteinen durch Ubiquitinylierung	26
1.6.2.	Die Familie der E3 Ligasen	28
1.6.2.1.	Der Skp1-Cullin1-F-Box Protein Komplex	28
1.6.2.1.1.	Das F- Box Protein Skp2	30
1.7.	Ziel der Arbeit	32

2. 0.	MATERIALIEN UND METHODEN	33
2.1.	Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	33
2.1.1.	Allgemeine Materialien für die Zellkultur	33
2.1.2.	Allgemeine Reagenzien für die Immunhistochemie	33
2.2.	Puffer und Lösungen	34
2.2.1.	Puffer für Immunhistochemie	34
2.2.2.	Puffer und Lösungen für die DNA Extraktion und Genotypisierung der Mauslinien; PCR Puffer	35
2.2.3.	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Analysen	36
2.2. 4.	Lösungen für die RNA Extraktion	37
2.2.5.	Lösungen für die Virusamplifikation	38
2.3.	Antikörper	39
2.4.	Mausarbeiten	39
2.4.1.	Genotypisierung der Mäuse	39
2.4.2.	DNA Extraktion	39
2.4.3.	Genotypisierung der Skp2 knock out Mäuse	40
2.4.4.	Genotypisierung der p27 ko Mäuse	41
2.4.5.	Genotypisierung der p27T187A Mäuse	41
2.4.6.	Genotypisierung der CDK2 knock out Mäuse	42
2.4.7.	Genotypisierung der Cullin 3 konditionellen knock out Mäuse	42
2.5.	Partielle Hepatektomie	44
2.6.	Immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Färbungen	44
2.6.1.	Beschichtung von Objektträgern	44
2.6.2.	Immunhistochemische BrDU Färbung	45
2.6.3.	Phospho-Histon H3 Färbung	45
2.6.4.	Feulgen Färbung	46
2.6.5.	β-Catenin Färbung	47

2.7.	Proteinchemische Analysen in Leberlysaten	47
2.7.1.	Herstellung der Proteinlysate aus Leber	47
2.7.1.1.	Analyse der Proteinlysate im Western Blot	48
2.7.1.2.	Immunpräzipitation und Kinase Assays	48
2.8.	Analyse der Expression auf RNA Ebene	49
2.8.1.	RNA Extraktion	49
2.8.1.1.	Reverse Transkription der RNA in cDNA	50
2.8.1.2.	Semiquantitative RT-PCR zur Expressionsanalyse	50
2.9.	Zellkultur	52
2.9. 1.	Kryokonservierung von Zellen	52
2.10.	Virusamplifikation	52
2.10.1.	Virusanzucht und Präparation	53
2.10.1.1.	Transfektion des Adenoviralen Plasmids in 293 Zellen	53
2.10.1.2.	Calcium-Phosphat Transfektion	53
2.10.1.3.	Gewinnung der Virussuspension aus infizierten Zellen zur Amplifikation des Virus	54
2.10.1.4.	Aufreinigung und Titer des Virus	54
2.10.1.5.	Injektion des Virus in Mäuse	55
3.0	RESULTATE	56
3.1.	Die Funktion von Skp2 in der Regulation der Zellzyklusprogression	56
3.1.2.	Genotypisierung der Mäuse	56
3.1.2.1.	Generation und Identifizierung der Skp2/p27 doppel knock out Mäuse	56
3.1.2.2.	Genotypisierung der T187A knock in Mäuse	57
3.1.3.	Die Analyse der Phänotypen der Skp2/p27 doppel knock out Mäuse	57
3.1.3.1.	Histologische Analyse von Lebergewebe der Skp2, p27/Skp2 doppel knock out Maus und der T187A knock in Mäuse	60
3.1.3.2.	Induktion von Proliferation in Hepatozyten durch partielle Hepatektomie	66
3.1.3.3.	Molekulare Analysen zur Zellzyklusprogression	70

3.1.3.4.	Molekulare Analysen der G1 Phase Proteine	71
3.1.3.5.	Molekulare Analyse der S-Phase	74
3.1.3.6.	Die molekulare Analyse der mitotischen Komplexe	76
3.2.	Endoreduplikation versus genomische Instabilität	78
3.2.1.	Genotypisierung der Mäuse	78
3.2.1. 1.	Genotypisierung der Cullin 3 loxp Mäuse	78
3.2.1.2.	Genotypisierung der Cdk2 knock out Mäuse	79
3.2.2.	Endoreduplikation und genetische Instabilität durch Cyclin E	79
3.2.3.	Genetische Instabilität und Tumor	88
4.0.	DISKUSSION	91
4.1.	Die Funktion von Cyclin E in der Zellproliferation und Endoreduplikation	91
4.2.	Die Funktion von Cyclin E/CDK2 in der Ausbildung genomisch instabiler Zellen	94
4.3.	Die Funktion von Cyclin E/CDK2 in der Tumorprogression	97
4.3.1.	Die Ausbildung genetisch instabiler Zellen wird durch die Aktivierung eines Kontrollpunktes verhindert	97
5.0	ZUSAMMENFASSUNG	101
5.1.	Summary	102
6.0.	LITERATURVERZEICHNIS	103
7.0.	ANHANG	115
7.1.	Statistische Analyse der Zellgröße von Hepatozyten	119
7.2.	Statistische Analyse der Zellgröße der Epithelzellen der Bronchioli	123

II

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphorsäure
BrDU	5-Bromo-1-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)-uracil, 2'-Deoxy-5-bromuridin (5-Brom-2'-deoxyuridin)
BSA	Bovines Serumalbumin
CsCl ₂	Cäsiumchlorid
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKO	doppel knock out
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleotid 5'triphosphat
DOC	Deoxycholat
DTT	1,4-Dithio-DL-threit
EDTA	Ethylendiamionotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid

KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
ko	knock out
MGB	Modified Gitschier Buffer
MgCl_2	Magnesiumchlorid
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	diNatriumhydrogenphosphat Heptahydrat
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	Natriumpyrophosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumflourid
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat Monohydrat
NP_{40}	Nonylphenylpolyethylenglycol
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
β -ME	β -Mercaptoethanol
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA
TNT	Tris-HCl-Natriumchlorid- Tween Puffer
WT	Wildtyp

1.0. EINLEITUNG

1.1. Der Zellzyklus

Wachstum und Proliferation von Zellen, die Entwicklung von Organismen durch Differenzierung, aber auch zelluläre Antworten auf endogene und exogene Schädigungen sind komplexe Prozesse, in denen die exakte Regulation der Zellproliferation essentiell für das Überleben von Organismen ist. Der Begriff Zellzyklus wird verwendet, um den Weg einer Zelle von der Teilung der Mutterzelle bis zur Teilung der Tochterzelle zu beschreiben. Der Hauptteil des Zellzykluses wird durch die Interphase eingenommen, die in die G₁-, S- und G₂-Phase unterschieden wird. Die G₁- und G₂-Phase representieren Lücken "Gaps", die zwischen der DNA Synthese und der Zellteilung liegen. In der G₁-Phase trifft die Zelle, in Abhängigkeit von exogenen und endogenen Einflüssen, die Entscheidung in die S-Phase einzutreten. Diese Entscheidung ist bis zum Überschreiten des G₁-Phase Kontrollpunktes (Restriktionspunkt, siehe Kapitel 1.3.1.) reversibel. Erst die Überschreitung des Restriktionspunktes erlaubt es der Zelle ohne weitere mitogene Stimuli in die S-Phase einzutreten. In dieser Phase erfolgt die Neusynthese der DNA anhand des maternalen Stranges. Der S-Phase folgt die G₂-Phase in der die Zelle die duplizierten Chromosomen auf Replikationsfehler untersucht und sich somit auf die Zellteilung vorbereitet.

Die Aufteilung der replizierten Chromosomen auf die Tochterzellen erfolgt schließlich während der Mitose (M-Phase). Sie wird in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterschieden. Danach tritt die Zelle wieder in die G₁-Phase ein oder geht in einen Ruhezustand über, der als G₀-Phase bezeichnet wird.

1.1.1. Methoden zur Analyse der Zellzyklusprogression

In den frühen 1950 Jahren wurden mikrophotospektrometrische Analysen und Autoradiographie genutzt, um zu zeigen, dass die DNA Synthese während einer bestimmten Zeit in der Interphase erfolgt (Swift 1950, 1953; Walker und Yates 1952). Diese Methoden nutzen die radioaktive Markierung von Zellen oder die mikroskopische Analyse in Zusammenhang mit der Bestimmung des relativen DNA Gehaltes durch Feulgen Färbungen. Die Mikrospektrometrie und Autoradiographie sind Methoden, mit denen sich auch die Länge der unterschiedlichen Zellzyklusphasen, G₁-, S- und G₂-Phase, bestimmen lässt. Diese Analysen wurden unter anderem von Howard und Plec durchgeführt, die 1953 auch die Nomenklatur der G₁-, S-, G₂- und M-Phase einführten. Dabei zeigte sich, dass die Länge jeder einzelnen Phase in Säugerzellen relativ konstant ist. Änderungen in den Kulturbedingungen führten jedoch zu einer Verlängerung der Gesamtzellzykluslänge, die auf eine Verlängerung der G₁-Phase zurückzuführen war (Sisken 1961, Mendelsohn). Weitere

Methoden zur Analyse der Zellzyklusregulation beinhalten den Arrest von Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase durch verschiedene Chemikalien oder den Entzug von Wachstumsfaktoren. Diese Methoden erlauben jedoch vorzugsweise die Analyse von Fibroblasten oder von Tumorzelllinien, die durch Immortalisierung die Fähigkeit erhalten haben, sich endlos zu teilen. Die Sensitivität, mit der eine Zelle z.B. auf die Änderungen in den Kulturbedingungen, wie oben beschrieben, reagiert, zeigen, dass es für einige Fragestellungen in der Regulation der Zellzyklusprogression vorteilhaft ist in vivo Systeme, insbesondere Mausmodelle, zu nutzen. Zu solchen in vivo Systemen zur Untersuchung der Zellproliferation zählen u.a. die Knochenmarkstransplantation, die Wundheilung und die Leberregeneration. Da die Leberregeneration in dieser Arbeit eine wichtige Methode zur Untersuchung der Zellproliferation darstellt, soll sie im folgenden genauer beschrieben werden.

Die Regeneration der Leber der Maus erfolgt nach Entnahme des linken lateralen, linken medianen und rechten medianen Leberlappens, was $2/3$ der Leber entspricht. Nach der Entnahme vergrößern sich die verbleibenden Leberlappen, durch Zellteilung der Hepatozyten, um die ursprüngliche Masse der Leber und auch ihre Funktion zu regenerieren. Dieser Prozess dauert in der Maus ca. 5 bis 7 Tage. Der Eintritt der Hepatozyten in die S-Phase erfolgt in den ersten 48 Stunden nach der Operation. Nach ca. 4 Tagen ist die Regeneration der Leber in der Maus weitestgehend abgeschlossen. Die verbliebenen Leberlappen haben an Größe zugenommen und die Hepatozyten arrangieren sich in Zellschichten. Desweiteren erfolgt in dieser Zeit auch die Regeneration von nichthepatozytären Zellen. Hierzu zählen epitheliale und endotheliale Zellen, Kupffer Zellen und Ito Zellen, die u.a. Wachstumsfaktoren sezernieren (Michalopoulos and DeFrances 1997).

Die Entnahme von $2/3$ der Leber führt zu einem mitogenem Stimulus, der die verbleibenden Zellen zur Proliferation anregt. Dies konnte durch Versuche bewiesen werden, in denen die Blutkreisläufe zweier Mäuse miteinander verbunden wurden (Parabiose) und eine dieser Mäuse operiert wurde. Sowohl die Hepatozyten dieser Maus, als auch die der nicht operierten Maus traten in die S-Phase ein (Moolten and Bucher 1967).

Bevor jedoch eine Zelle in die S-Phase eintritt, muss sie in die G1-Phase eintreten und einen hier lokalisierten Kontrollpunkt passieren.

1.1. 2. Die G0/ G1-Phase

In der G1-Phase interpretiert die Zelle verschiedene metabolische, Stress- und Umweltsignale und entscheidet über den Eintritt in den Zellzyklus oder in den Ruhezustand (Massague 2004). Dieser Zustand wird auch als G0-Phase bezeichnet.

Zetterberg und Larsson zeigten 1985, dass der Eintritt in die G0-Phase aus der frühen G1-Phase erfolgt. In ihren Experimenten konnten sie beweisen, dass Zellen der frühen G1-Phase in der Lage sind, in den Ruhezustand einzutreten, während Zellen der späten G1-Phase dazu nicht mehr in der Lage sind (Zetterberg and Larsson 1985).

Neueste Untersuchungen zeigen, dass die G₀-Phase ein eher aktiver als passiver Prozess ist, zu dem die aktive Repression von Genen, aber auch die Expression bestimmter "Ruhephase-Gene" gehört. Zu solchen "Ruhephase-Genen" zählen Gene, die in die Regulation von Zellwachstum und Zellteilung involviert sind, aber auch Gene die die Expression apoptotischer Faktoren und Differenzierungsfaktoren inhibieren. Demzufolge sind Zellen der G₀-Phase nicht in der Lage sich zu differenzieren, sie können aber aus der G₀-Phase in die G₁-Phase eintreten, um dann den Zellzyklus zu durchlaufen (Coller, Sang et al. 2006). Der Austritt aus der Ruhephase in die G₁-Phase erfolgt nur nach Stimulation mit mitogenen Faktoren. Diese werden durch Wachstumsfaktorrezeptoren, z.B. Tyrosin-Kinasen oder Adhensionsrezeptoren, z.B. Integrine in die Zelle weitergeleitet. Sie sind somit essentiell für die Zellproliferation. Die Transduktion des extrazellulären Signals in die Zelle erfolgt u.a. durch Ras GTPasen, die in der Zelle zu einer Aktivierung verschiedener Effektoren führen. Unter anderem erfolgt die Aktivierung von MAP Kinasen (Mitogen aktivierte Proteinkinase). Am Ende dieser Kaskade steht die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase ERK (Extrazellulär regulierte Kinase), die die Expression von Akuten-Phase Genen reguliert (Coleman and Marshall 2001; Pruitt and Der 2001; Zhang and Liu 2002). Eines der früh exprimierten Gene in der Zellzyklusregulation ist das Protoonkogen c-Myc. In Kooperation mit der extrazellulär regulierten Kinase ERK reguliert c-Myc die Expression von Cyclin D (Welsh, Roovers et al. 2001) (Pines 1995; Steiner, Philipp et al. 1995; Mateyak, Obaya et al. 1999). Die Expression und Aktivierung dieser Gene steuert die Expression der Gene der späten G₁-Phase, deren Aktivierung wiederum die S-Phase Transition reguliert. Bevor die Zelle jedoch in die S-Phase eintritt, muss sie einen Kontrollpunkt durchlaufen. Bereits 1974 beschrieb Pardee einen Punkt in der G₁-Phase, nach dessen Überschreitung Zellen die S- und M-Phase durchlaufen, obwohl sie keinen mitogenen Stimulus mehr erhalten. Er nannte diesen Punkt Restriktionspunkt (Pardee 1974), der durch 3 Kriterien definiert ist: 1. nach der Überschreitung des Restriktionspunktes benötigen die Zellen keine Serumstimulation mehr, um in die S-Phase einzutreten (Pardee 1974), 2. Zellen die den Restriktionspunkt überschritten haben, sind nicht mehr sensitiv gegenüber Wachstumsinhibitoren, z.B. gegenüber TNF- β (Transforming growth factor β), 3. Zellen die den Restriktionspunkt überschritten haben, reagieren nicht mehr auf geringe Mengen des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (Campisi, Medrano et al. 1982).

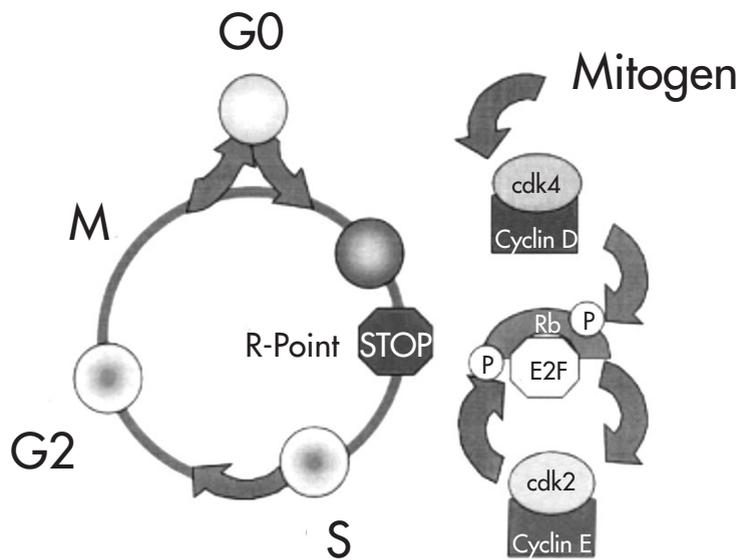
Ein wichtiges Kriterium für die Passage des Kontrollpunktes stellt die Zellgröße dar. Zellwachstum kann z.B. in Nervenzellen durch eine Größenzunahme ohne Vervielfachung der DNA erfolgen. Andere Zellen jedoch zeigen gleichzeitig eine Zunahme des DNA Gehaltes, um weiterhin eine effektive Funktion zu gewährleisten, z.B. Hepatozyten (Conlon and Raff 1999).

In *Schizosaccharomyces pombe* wurde ein "size and timer" Model vorgeschlagen, nachdem die Zelle nur dann in die S-Phase eintritt, wenn eine bestimmte Zellgröße erreicht ist (Nurse & Thuriaux, 1977; Fantes & Nurse, 1978)(Mitchison and Nurse 1985; Conlon and Raff 1999). Auch in Vorläuferzellen von Oligodendrozyten scheint es ähnliche Mechanismen zu geben. Gao und Raff zeigten 1997, dass Nervenvorläuferzellen sich in unter-

schiedlich große Tochterzellen teilen. Im nächsten Zellzyklus teilte sich die größere der beiden Tochterzellen schneller. Gao und Raff schlussfolgerten durch ihre Arbeiten, dass ähnlich zu einzelligen Eukaryoten, auch in diesen Zellen eine gewisse Zellgröße zur Zellproliferation erreicht werden muss (Gao and Raff 1997). Wie die Verknüpfung von Zellwachstum und Proliferation auf molekularer Ebene verläuft, ist bisher noch nicht bekannt. Arbeiten in *Xenopus laevis* zeigen, dass die Länge der G1-Phase wichtig für das Zellwachstum ist und dass die Länge der G1-Phase durch die Expression des CDH1-Proteins kontrolliert wird. CDH1 ist ein Aktivator des Anaphase Promoting Complexes (APC), dessen Bindung an den Komplex zum Abbau der für die Zellzyklusprogression wichtigen Cycline führt. Die Überexpression von CDH1 in *Xenopus*, nach der Generation der ersten G1-Phase führte zu einem Arrest und einer Größenzunahme der Zellen (Zhou, Ching et al. 2002; Zhou, Ching et al. 2003). Andere Arbeiten deuten auf eine Funktion des Transkriptionsfaktors und Protoonkogens *c-Myc*. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *c-Myc* zu einer Verminderung des Zellwachstums führt, während die Überexpression zu einer Vergrößerung der Zellen führt (Johnston, Prober et al. 1999). Ein Modell, das durch Untersuchungen in *Drosophila* aufgestellt wurde, verknüpft die GTPase RAS, die extrazelluläre Signale in die Zelle weiterleitet, mit einer Aktivierung von *c-Myc*. Die Inaktivierung von RAS im Flügel von *Drosophila* durch Expression eines Null Allels oder durch Expression einer dominant negativen Form zeigte ein verlangsamtes Wachstum, eine Verminderung der Zellgröße und Apoptose, während die Aktivierung von RAS zu einer Größenzunahme sowie einer Zunahme der Wachstumsraten der Zellen führt. Das aus diesen Experimenten entstandene Modell verdeutlicht, dass die Aktivierung von RAS zu der Expression des Transkriptionsfaktors *c-Myc* führt. *c-Myc* induziert einerseits Zellwachstum und induziert die Expression von Cyclin E, welches die G1-S-Phase Transition reguliert, wodurch Zellwachstum und die Regulation des Zellzyklus miteinander verknüpft werden. Aber auch andere Zielproteine in der RAS Signaltransduktionskaskade können das Zellwachstum regulieren. (Johnston, Prober et al. 1999; Prober and Edgar 2000). In Vertebraten führt die Akkumulation bzw. die Überexpression von *c-Myc* auch zu einer Zunahme der Zellmasse. Die Überexpression von *c-Myc* in B-Zellen von Mäusen führte auch hier zu einer Zunahme der Zellmasse, d.h. einem verstärkten Zellwachstum. Die Induktion des Zellwachstums durch *c-Myc* ist in B-Zellen jedoch unabhängig von der Zellzyklusphase (Iritani and Eisenman 1999; Welcker, Orian et al. 2004). Wie die Verknüpfung von Zellwachstum und Zellproliferation auf molekularer Ebene reguliert wird, ist jedoch nicht geklärt.

Die Transition durch die G0/G1-Phase ist zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt. Der mitogene Stimulus führt über die Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase zu einer Expression von Cyclin D (Welsh, Roovers et al. 2001). Aktive Cyclin D/CDK4 Komplexe phosphorylieren das Retinoblastomprotein am Serin 780. Dies führt zu einer partiellen Aktivierung des E2F Transkriptionsfaktors und zu der Expression der Akuten Phase Gene, zu denen Cyclin E gehört (Kitagawa, Higashi et al. 1996; Grana, Garriga et al. 1998; Trimarchi and Lees 2002) (Ohtani, DeGregori et al. 1995). Durch die Bildung von Cyclin

E/CDK2 Komplexen wird eine positive Rückkopplungsschleife aktiviert, die zu einer Hyperphosphorylierung des Rb Proteins führt. Cyclin E/CDK2 Komplexe das Rb Protein phosphorylieren. Diese Phosphorylierungsstelle unterscheidet sich von der für Cyclin D/CDK4 (Resnitzky and Reed 1995; Kitagawa, Higashi et al. 1996; Morgan 1997). Durch die Aktivierung von Cyclin E/CDK2 Komplexen und die Hyperphosphorylierung des Retinoblastomproteins wird der E2F Transkriptionsfaktor vollständig freigesetzt und kann die Expression von S-Phase Genen regulieren (Hwang and Clurman 2005).



Der mitogene Stimulus führt zu einer Aktivierung von Cyclin D/CDK4 Komplexen, die die Expression von Cyclin E über die Monophosphorylierung des Retinoblastomproteins kontrollieren. Die Aktivierung von Cyclin E/CDK2 Komplexen führt zu der Aktivierung einer positiven Rückkopplungsschleife, wodurch E2F freigesetzt wird und die Expression von S-Phase Genen reguliert. Durch die Aktivierung dieser Kaskaden wird eine schrittweise Progression durch den Zellzyklus ermöglicht.

Abbildung 1

1.2. Die Funktion von Cyclin E in der S-Phase Transition

Lew et al. beschrieb 1991 die Isolation von drei cDNAs, die für humane Cycline kodieren. Diese cDNAs konnten den Verlust von G1 Cyclinen in *S. cerevisiae* kompensieren. Zu der gleichen Zeit zeigten Koff et al., dass Cyclin E mit dem humanen Homolog von *Xenopus* CDK2 interagiert und Kinaseaktivität besitzt (Koff, Cross et al. 1991; Lew, Dulic et al. 1991).

Die Proteinspiegel von Cyclin E und seine Kinaseaktivität variieren im Zellzyklus. Dies ist auf die verschiedensten Regulationsmechanismen des Cyclin E Proteins zurückzuführen, auf

die im Kapitel "Die Aktivierung von Cyclin Kinase Komplexen" genauer eingegangen wird. Cyclin E übernimmt in der Zellzyklusregulation verschiedene essentielle Funktionen. Es reguliert die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins und somit die G1/S-Phase Transition, es ist notwendig für die Initiation der DNA Synthese und die Induktion von Endoreduplikationszyklen.

1.2.1. Cyclin E und die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins

Das Retinoblastomprotein (Rb) ist das erste Tumorsuppressorprotein, das kloniert wurde (Friend et al 1986). Es ist u.a. charakterisiert durch seine ubiquitäre Expression und nukleäre Lokalisation. (Lee 1989). Das Retinoblastomprotein gehört zu der Familie der pocket Proteine, die sich aus drei Mitgliedern, Rb, p130 und p107 zusammensetzt. Die Expression dieser Proteine ist zellzyklusspezifisch aber redundant. p130 wird hauptsächlich in G0-Phase Zellen exprimiert, während Rb in proliferierenden und ruhenden Zellen zu finden ist. Die Expression von p107 erfolgt zum größten Teil in proliferierenden Zellen (Cobrinik 2005).

1989 zeigte Lee durch Gentransfer des Retinoblastomproteins, dass die Expression von Rb in Rb defizienten Tumorzellen zu einer Verminderung des Tumorpotentials dieser Zellen führte, wenn diese wieder in Nacktmäuse injiziert wurden. Gleichzeitig beobachtete er, dass die Phosphorylierung von Rb im Zellzyklus oszilliert und die nicht phosphorylierte Form hauptsächlich in ruhenden Zellen zu finden ist. Dass diese Phosphorylierung abhängig ist von der Aktivierung von Cyclinen, wurde u.a. von Mittnacht et al 1994 gezeigt. Der Grund oder die physiologischen Effekte dieser Phosphorylierung waren zu diesem Zeitpunkt jedoch unbekannt (Mittnacht, Lees et al. 1994). Das heutige Model der E2F/Rb Interaktion hat seinen Ursprung in Untersuchungen von mit Adenoviren infizierten Zellen.

E2F Komplexe zeigten hier die Fähigkeit, an eine Sequenz im Adenoviruspromotor zu binden. Die Entdeckung, dass der Transkriptionsfaktor E2F mit dem Retinoblastomprotein interagiert (Bagchi, Weinmann et al. 1991; Nevins, Chellappan et al. 1991), führte zu dem heute gültigen Model, in dem E2F durch seine Assoziation an das Retinoblastomprotein reprimiert wird (Dyson 1998). E2F Transkriptionsfaktoren werden in der frühen G1-Phase partiell aktiviert und steuern die Expression von S-Phase Genen. Cyclin E ist ein Zielprotein der E2F Transkription (Ohtani, DeGregori et al. 1995) und seine Fähigkeit, die volle Freisetzung von E2F durch Rb Hyperphosphorylierung zu bewirken, führt u.a. zu einem S-Phase Eintritt (Hwang and Clurman 2005). Die Hyperphosphorylierung von Rb durch Cyclin E reguliert so die G1/S-Phase Transition und deutet auf eine Funktion von Rb in der Regulation des Restriktionspunktes hin. Proliferationsuntersuchungen in knock out Mäusen für Rb, Rb und p107 sowie der Verlust aller drei Pocketproteine (Triple knock out) zeigten, dass die Proliferation in embryonalen Mausfibroblasten, die keines der drei Pocket Proteine exprimierten, stark erhöht ist.

Fibroblasten, die mit geringen Mengen Serum (0,1%) kultiviert werden, gehen aufgrund fehlender mitogener Stimuli in den Ruhezustand über. Dannenberg et al. und Sage et al. zeigten, dass knock out Fibroblasten für Rb, p130 und p107 nicht in der Lage sind, in den Ruhezustand einzutreten, während knock out Zellen für Rb normal arretierten. (Dannenberg, van Rossum et al. 2000; Sage, Mulligan et al. 2000). Dieser Phänotyp deutet darauf hin, dass der Restriktionspunkt, wie er von Pardee bereits 1974 beschrieben wurde, nicht durch die Funktion eines einzelnen Proteins, sondern durch die Funktion der gesamten Pocket Protein Familie reguliert wird. Allerdings scheint die Hyperphosphorylierung von Rb durch Cyclin E nicht der einzige limitierende Faktor zu sein, der die G1/S-Phase Transition reguliert. In embryonalen Mausfibroblasten, die kein Cyclin E1 und E2 exprimieren, erfolgt nach Serumentzug keine G1/S-Phase Transition, obwohl das Retinoblastomprotein in diesen Zellen phosphoryliert ist. Der Defekt in der S-Phase Transition liegt in der Initiation der Replikation und deutet auf eine weitere wichtige Funktion von Cyclin E in der Regulation des Zellzyklus hin (Geng, Yu et al. 2003).

1.2.2. Funktion von Cyclin E in der Initiation der Replikation

Durch den Aufbau von Pre-Replikationskomplexen auf der DNA wird die Initiation der Replikation der DNA in der S-Phase ermöglicht. Diese Pre-Replikationskomplexe (Pre-RC) bauen sich in der frühen G1-Phase an Replikationsursprüngen auf, indem ein Multiproteinkomplex (origin recognition complex, ORC), bestehend aus 6 Untereinheiten, an der DNA bindet. Weitere Proteine Cdt1 und CDC6 müssen mit diesem Multiproteinkomplex interagieren, um den Aufbau des vollständigen Pre-RC zu gewährleisten. Dies geschieht durch die Assoziation der MCM 2-7 (mini-maintenance-chromosome) Proteine, die die Funktion haben, sicher zu stellen, dass das Genom während der S-Phase nur einmal repliziert wird. Eine solche Lizenzierung wird z.B. dadurch ermöglicht, dass die Bindung von MCM2 an den Pre-Replikationskomplex abhängig von der Aktivierung von Cyclin E in der G1-Phase ist. In Kooperation mit CDC6, das eine ATPase Aktivität besitzt, ermöglicht Cyclin E die Auflockerung der Chromosomenstruktur und das Entwinden der DNA Helix. Dadurch kann die Bindung der DNA Polymerase erfolgen (Coverley, Laman et al. 2002; Pelizon 2003). Die Initiation der DNA Replikation ist abhängig von Cyclin Kinaseaktivität, gleichzeitig verhindert diese Kinaseaktivität aber auch die Bildung neuer Pre-Replikationskomplexe, wodurch eine Re-Replikation verhindert wird. So konnte gezeigt werden, dass eine permanent hohe Cyclin E Kinaseaktivität die erneute Bindung von Pre-Replikationskomplexen an die DNA inhibiert (Ekholm-Reed, Mendez et al. 2004).

Desweiteren ist die Initiation der DNA Replikation abhängig von der Lokalisation von Cyclin E an Centrosomen. Cyclin E besitzt eine 20 Aminosäuren lange Sequenz, durch die das Protein während der G1-Phase an Centrosomen bindet. Ein Verlust dieser Sequenz führt zu einer verminderten Fähigkeit der Zellen, in die S-Phase einzutreten. Die Funktion dieser Lokalisation ist bisher jedoch nicht bekannt (Matsumoto and Maller 2004).

1.2.3. Der Abbau von Cyclin E durch den SCF Komplex und Cullin 3- BTB Protein Komplex

Um eine Akkumulation von Cyclin E in der Zelle zu verhindern, erfolgt die Regulation von Cyclin E auf verschiedenen Ebenen. Neben der Induktion der Expression, sowie der Inhibition der Kinaseaktivität durch Bindung von p27, wird Cyclin E durch zwei verschiedene Mechanismen abgebaut. Der Abbau von Cyclin E kann einerseits durch den SCF-FBW7 Komplex oder durch den Cullin 3-BTB Protein Komplex erfolgen.

Die Degradation durch das F-Box Protein FBW7 erfolgt nach Phosphorylierung von Cyclin E (Koepp, Schaefer et al. 2001) am Threonin 62, Serin 372, Threonin 380 und Serin 384, von denen die letzten 3 Aminosäuren im C-terminalen Phosphorylierungsabschnitt liegen und der Bindung an CDK2. Die Phosphorylierungen an diesen Aminosäuren können durch CyclinE/CDK2 Komplexe selbst oder durch die Glycogen-Synthase Kinase 3 (GSK3) erfolgen (Welcker, Singer et al. 2003).

Der Abbau von monomerem Cyclin E erfolgt über die Cullin 3-Ring Ligase. Cullin 3 gehört, wie Cullin 1 des SCF Komplexes, zu den Ring Finger Ligasen. Im Unterschied zu dem SCF-Komplex bindet er das substratspezifische Protein jedoch direkt über die BTB (Bric a Brac, Tramtrack) Domäne. Viele dieser BTB Proteine besitzen eine zweite Protein-Protein Interaktionsdomäne, z.B. Zink Finger oder Kelch Motive, über die sie mit dem Substrat interagieren (Petroski and Deshaies 2005). Die Bindung von monomeren Cyclin E an Cullin 3 wurde mit Hilfe eines genetischen Screens in Hefe identifiziert. Der direkte knock out von Cullin 3 in der Maus führt zum pränatalen Tod von Cullin 3 homozygoten Tieren am 7,5 Tag nach der Gestation. Histologische Analysen zeigten, dass das extraembryonale Gewebe dieser Tiere disorganisiert ist und sich Amnion und Trophoblasten nicht entwickeln. Diese Zellen zeigten hohe Cyclin E Spiegel (Singer, Gurian-West et al. 1999).

Die beschriebenen Abbauprozesse von Cyclin E, aber auch von p27 erfolgen nur, wenn das Protein polyubiquityliert wird. Diese Ubiquitylierung bildet ein Erkennungssignal für das Proteasom, dieses Protein abzubauen. Im Kapitel 1.6. wird dieser Prozess genauer beschrieben.

1.3. Die S- und M-Phase

Der Eintritt in die S-Phase ist charakterisiert durch die Akkumulation von Cyclin A, das für die Initiation der DNA Replikation essentiell ist. Analysen von Coverely zeigten, dass späte G1-Phase Zellkerne nur in die S-Phase eintreten, wenn sie mit Cyclin A/CDK2 Extrakten versetzt wurden. Cyclin E/CDK2 Extrakte hatten dahingegen keine Auswirkung auf die Initiation der DNA Replikation. Sie zeigten weiterhin, dass nur die Inkubation von Cyclin E/CDK2 Komplexen und anschließende Inkubation mit Cyclin A/CDK2 zu einer Replikation der DNA führt. Wurden G1-Phase Zellkerne erst mit Cyclin A und dann mit

Cyclin E Komplexen inkubiert, erfolgte keine DNA Synthese. Die Initiation der Replikation ist abhängig von der ATPase CDC6, die mit Cyclin E zu der Beladung der Pre-Replikationskomplexe mit MCM Proteinen führt. Die Aktivierung von Cyclin E ist demzufolge notwendig, um die Initiation der Replikation vorzubereiten (Coverley, Laman et al. 2002). Die Aktivierung von Cyclin A/CDK2 führt zu einer Phosphorylierung von CDC6 sowie zu der Translokation des Proteins in das Cytoplasma (Petersen, Lukas et al. 1999). Durch den Abbau von CDC6 in der G1-Phase wird ein erneuter Aufbau des Pre-Replikationskomplexes verhindert. Die Degradation von CDC6 wird katalysiert durch die Ubiquitinylierung des Proteins durch den Anaphase befördernden Faktor (APC)(Petersen, Wagener et al. 2000). Der APC Komplex ist ein Multiproteinkomplex, der durch die Bindung zweier Untereinheiten in seiner Aktivität reguliert wird. In der G1-Phase ist die Bindung der aktivierenden Untereinheit Cdh1 essentiell für die Aufrechterhaltung der G1-Phase. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch APC^{Cdh1} Komplexe u.a. die Degradation des F-Box Proteins Skp2 erfolgt, das den Zellzyklusinhibitor p27 abbaut (Bashir, Dorrello et al. 2004), so führt der Verlust des APC Komplexes in Hepatozyten zu einem Leberversagen, da die Hepatozyten, durch die Akkumulation von Cyclin A in den Zellzyklus eintreten, aber in der Mitose arretieren. Die Funktion der Leber kann somit nicht aufrechterhalten werden (Wirth, Ricci et al. 2004).

Nach einem mitogenen Stimulus muss eine Inaktivierung des APC^{Cdh1} Komplexes erfolgen, um eine Progression durch den Zellzyklus zu gewährleisten. Dies erfolgt durch die Phosphorylierung von Cdh1 durch Cyclin abhängige Kinasen, sowie durch die Akkumulation von Emi1, einem F-Box Protein, das durch die Aktivierung von E2F Komplexen exprimiert wird (Kramer, Scheuringer et al. 2000) (Reimann, Freed et al. 2001). Emi1 akkumuliert, wie Cyclin A, in der S-Phase und seine Überexpression in Drosophila führt zu einem S-Phase Eintritt. Desweiteren inhibiert der Verlust von Emi1 durch siRNA die Akkumulation von Cyclin A. Die Inaktivierung des APC Komplexes durch Emi1 hat demzufolge wichtige Funktionen in der Regulation der S-Phase Progression (Vodermaier and Peters 2002). Am Ende der S-Phase akkumulieren Cyclin B/CDK1 Komplexe, die auch als M-Phase fördernde Faktoren bezeichnet werden (Porter and Donoghue 2003). Cyclin B besitzt kein nukleäres Translokationssignal und akkumuliert demzufolge im Cytoplasma der Zelle, an den Centrosomen (Jackman, Lindon et al. 2003) Centrosomen sind die Primärzentren der Mikrotubuliorganisation, an denen sich in der Mitose die Spindelpole bilden. In der Interphase verdoppeln sich die Centrosomen und wandern zu Beginn der Mitose an die entgegengesetzten Pole der Zelle. CyclinB/CDK1 Komplexe phosphorylieren Lamine, Kondensine und Golgi-Matrix Komponenten, wodurch es zu einer Auflösung der Zellkernmembran kommt (Nigg 2001). Die sich an den Centrosomen bildenden Mikrotubuli können dadurch an die Centrosomenregion der Chromosomen binden, die sich an der Äquatorialebene anordnen und in der Anaphase an die entgegengesetzten Pole gezogen werden. Die Separation der Centrosomen in der Mitose ist u.a. abhängig von der Aktivität von Kinesin Motoren (KRP), zu denen auch Eg5 zählt, dessen Aktivität von der

Phosphorylierung durch Cyclin B/CDK1 Komplexe reguliert wird (Nigg 2001). Desweiteren müssen die Cohesine, die die Chromosomen zusammenhalten, am Beginn der Anaphase gespalten werden, um eine Separation an die Pole zu ermöglichen. Dies wird ermöglicht durch die Bindung von Cdc20 an den APC Komplex. Der APC^{Cdc20} Komplex ubiquitinyliert Securin, wodurch es für den Abbau markiert wird. Die Degradation von Securin führt zu der Freisetzung und Aktivierung der Separase, die die Cohesine zwischen den replizierten Chromosomen spaltet. Weitere Zielproteine dieses Komplexes sind Cycline, nach deren Degradation die Zelle in die Mitose eintreten kann (Wasch and Engelbert 2005). Die Degradation von Securin führt auch zu der Aktivierung der cdc14 Phosphatase, die Cdh1 dephosphoryliert. Cdh1 verdrängt daraufhin Cdc20 aus dem APC Komplex. Dieser Komplex reguliert den Abbau der mitotischen Cycline und hält ihre Proteinspiegel auch in der G1-Phase niedrig (Wasch and Engelbert 2005).

Die bisher beschriebenen Funktionen verschiedener Cyclin Komplexe verdeutlichen, dass die Regulation der Aktivierung und des Abbaus von Cyclinen ein essentieller Prozess ist, der die Zellzyklusprogression kontrolliert. Aufgrund dieser Bedeutung der Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen werden im folgenden die Prozesse der Aktivierung und des Abbaus dieser Proteine genauer beschrieben.

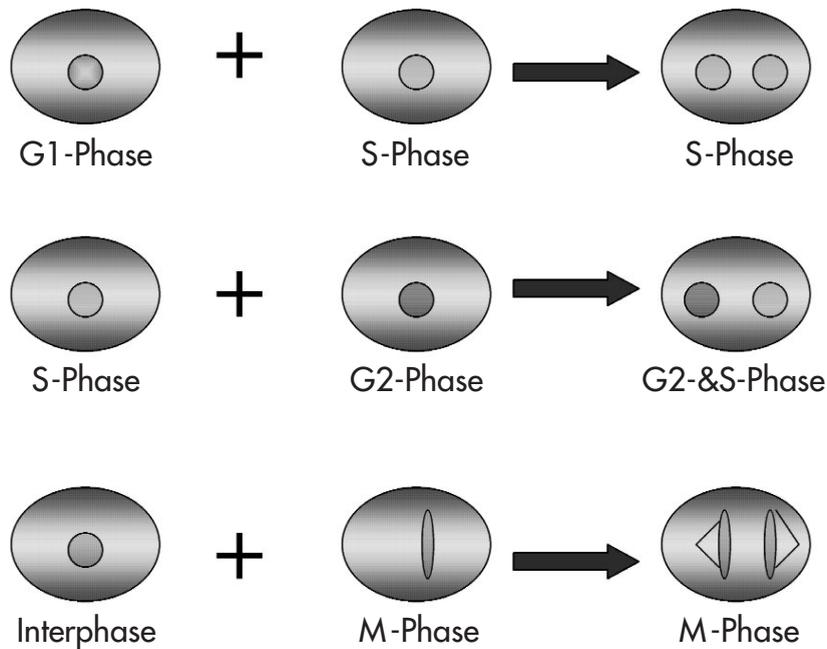
1.4. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen

Erste Hinweise darauf, dass Zellen Faktoren enthalten, die charakteristisch für eine bestimmte Zellzyklusphase sind und diese regulieren, wurden 1970 von Rao und Johnston gefunden. Durch die Fusion von zwei Zellen unterschiedlicher Zellzyklusphasen identifizierten sie lösliche Faktoren der S- und M-Phase (Abbildung 2). Die Fusion eines G1- und S-Phase Zellkernes führte zu einer Induktion der S-Phase im G1-Phase Zellkern, die Fusion eines S-Phase Zellkernes mit einem G2-Phase Zellkern hatte dahingegen keine Auswirkungen, während die Fusion eines M-Phase Zellkernes mit einem Interphase Zellkern eine atypische Mitose zeigte. Rao und Johnston schlussfolgerten, dass S-Phase Zellkerne Faktoren enthalten, die nur in G1-Phase Zellkernen wirken, Zellkerne der G2-Phase enthalten Faktoren, die die Wirkung des S-Phase Faktors inhibieren. Faktoren der M-Phase dahingegen sind in der Lage, in jedem Zellkern Mitose zu induzieren, unabhängig davon, ob eine DNA Replikation stattgefunden hat.

Eine exakte Analyse der Proteine und ihrer Funktion im Zellzyklus erfolgte ca. 10 Jahre später durch T. Hunt, L. Hartwell und P. Nurse, die 2001 den Nobelpreis für ihre Entdeckungen erhielten. Die Entdeckung von periodisch exprimierten Proteinen durch Markierung der Proteine mit radioaktivem Methionin in fertilisierten Seeigeleiern, verbindet die Expression spezifischer Proteine mit Zellzyklusprozessen, wie S-Phase und Mitose. Diese Proteine nannte T. Hunt aufgrund ihres Verhaltens im Zellzyklus Cycline (Hartwell, Culotti et al. 1974; Evans, Rosenthal et al. 1983). Die Progression durch den Zellzyklus ist, wie durch Hart-

wells Analysen von Hefemutanten verdeutlicht wurde, von weiteren Proteinen abhängig. Hartwell analysierte temperatursensitive *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten hinsichtlich ihres Phenotypes und untersuchte dabei folgende Zellzyklusprozesse: die Knospenbildung (budding), die in der G1-Phase initiiert wird und zur Entstehung der Tochterzellen in der Mitose führt; die DNA Synthese; die Zellkernteilung und die Cytokinese. Durch diese Analysen isolierte Hartwell die Cdc28 (cell-division cycle) Mutante, deren Genprodukt für alle Zellteilungsprozesse essentiell ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung des Zellzyklusgenes Cdc28 der erste Schritt in der Zellzyklusprogression ist. Den Prozess, der durch dieses Protein gesteuert wird, bezeichnete Hartwell als Startpunkt, der homolog zu dem Restriktionspunkt in Säugerzellen ist. 1985 zeigte S. Reed, dass Immunpräzipitate gegen das Cdc28 eine Protein Kinaseaktivität besitzen. Er verband die Proteinphosphorylierung mit der Initiation der Zellteilung in Hefe (Reed, Hadwiger et al. 1985; Reed and Wittenberg 1990). Das humane Homolog zu Cdc28 ist Cdc2 und konnte von P. Nurse 1987 kloniert werden. Hartwells Identifikation des Cdc28 Genes war die erstmalige Beschreibung von CDK-Genen (Cyclin abhängige Kinase) (Lee and Nurse 1987). Die Entdeckung der Cycline und CDKs durch Hunt und Hartwell legte die molekulare Basis der Zellzyklusprogression; die Bildung von Cyclin/ CDK Komplexen und der Proteinphosphorylierung.

In Säugerzellen gibt es 5 verschiedene CDK-Untereinheiten: CDK4, CDK2, CDK3 und CDK1 sowie 10 verschiedene Cycline: A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3, E1, E2 und F, die direkt an der Zellzyklusprogression beteiligt sind (Pines 1995; Morgan 1997). Einige Cycline, z.B. D-Typ Cycline haben zwar während der Embryonalentwicklung der Maus äquivalente Funktionen (Ciemerych, Kenney et al. 2002), sind aber essentiell für die Entwicklung (Kozar, Ciemerych et al. 2004). In adulten Tieren zeigen sich gewebsspezifische Expressionsmuster (Carthon, Neumann et al. 2005). Ein anderes Cyclin, z.B. Cyclin E ist für die Embryonalentwicklung der Maus nicht notwendig, übernimmt aber in der Regulation der G0/G1-Phase Transition eine essentielle Funktion (Geng, Yu et al. 2003).



Experiment von Rao und Johnston. Die S- und M-Phase werden durch lösliche Faktoren in der Zelle reguliert. Die Fusion eines S-Phase Kernes mit einem G1-Phase Kern induziert die S-Phase im G1-Phase Kern, während diese löslichen Faktoren im G2-Phase Kernes inhibiert werden. Lösliche Faktoren der M-Phase führen in einem Interphase Zellkern zur Induktion der M-Phase.

Abbildung 2

1.4.1. Die Aktivierung von Cyclin Kinase Komplexen

Die Aktivierung von Cyclin/CDK Komplexen erfolgt: 1. durch die Kontrolle der Expression und Bindung des Cyclins an die Kinase, 2. der Phosphorylierung und Dephosphorylierung und 3. der Bindung von Zellzyklusinhibitoren.

1.4.1.1. Kontrolle durch Bindung und Expression

Die periodische Expression der Cycline, die T. Hunt in fertilisierten Seeigelleiern nachgewiesen hatte, ist spezifisch für die entsprechende Zellzyklusphase. Cyclin-abhängige Kinasen sind in ihrer monomeren Form inaktiv und müssen zu ihrer Aktivierung mit dem entsprechenden Cyclin Partner interagieren. Dieser Regulationsmechanismus hat zwei Konsequenzen. Einerseits trägt die Bindung des Cyclins zur Substratspezifität des Cyclin/CDK-Komplexes bei, andererseits wird die CDK-Aktivierung durch die Expression des entsprechenden Cyclins kontrolliert.

Cycline sind charakterisiert durch eine 100 Aminosäuren lange Konsensus Sequenz, der Cyclin-Box, die die Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen steuert. In Cyclin E ist die Cyclin-Box aus alpha-Helices, die von fünf weiteren Helices gefolgt wird, aufgebaut. Der N-terminale Aufbau der Cyclin-Box ist identisch zu dem N-Terminus von Cyclin A. Auch die C-terminale Cyclin Box von Cyclin E ähnelt in ihrem Aufbau aus fünf weiteren alpha-Helices sehr stark dem C-Terminus von Cyclin A (Honda, Lowe et al. 2005). Neben der Cyclin-Box, die die Bindung an die Cyclin-abhängigen Kinasen steuert, gibt es in Cyclinen weitere regulatorische Sequenzen. Kelly et al. zeigte 2002, dass die C-terminal lokalisierte VXCX Sequenz in Cyclin E für die Bindung an das Retinoblastomprotein wichtig ist (Kelly, Wolfe et al. 1998). Dieses Motiv ähnelt dem LXCXE Motiv in Cyclin D und viralen Onkoproteinen und wurde auch hier mit der Bindung an Pocket Proteine, z.B. Rb, p107 und p103 beschrieben (Hwang and Clurman 2005). Eine weitere Sequenz, die die Bindung an Substrate reguliert, ist MRAIL. Proteine, die an diese Sequenz binden, sind u.a. p27, p21 aber auch der Transkriptionsfaktor E2F-1, die eine RXL Domäne besitzen (Adams, Sellers et al. 1996; Chen, Saha et al. 1996). Die Bindungsdomäne, die diese RXL Motive in den Zielproteinen bindet, ist in der Cyclin-Box lokalisiert und besteht aus hydrophoben Aminosäuren. Sie wurde 1998 von Schulman et al. identifiziert (Schulman, Lindstrom et al. 1998). Viele Cycline interagieren mit hoher Affinität mit den entsprechenden Cyclin-abhängigen Kinasen, während andere zusätzliche Faktoren für den Aufbau benötigen. Die Bindung von Cyclin H an CDK7 benötigt z.B. die Bindung einer dritten Untereinheit Mat1. Auch die Interaktion von Cyclin D mit CDK4 benötigt als Aufbaufaktor den Zellzyklusinhibitor p27 (Pines 1995; Morgan 1997).

Die Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen wird durch die Interaktion der Cyclin-Box mit dem PSTAIRE- Motiv der Kinase vermittelt, das N-terminal lokalisiert ist. Der C-Terminus der Kinasen besteht hauptsächlich aus alpha-Helices. Die ATP Bindungsstelle ist zwischen der N-terminalen und C-terminalen Schleife lokalisiert (Pines 1995; Honda, Lowe et al. 2005). Monomere Cyclin-abhängige Kinasen sind inaktiv, da das ATP nicht richtig positioniert werden kann. Desweiteren wird durch eine große Schleife des C-Terminus die Protein-Substrat Bindungsstelle an der aktiven Seite blockiert.

1.4.1.2. Aktivierung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung

Neben der Expression von Cyclinen und der Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen sind Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen essentiell für die Aktivierung dieser Komplexe.

Die Dephosphorylierung des Threonin 14 und des Tyrosin 15 am Aminoterminus des Proteins, der ATP-Bindungsregion, wirkt inhibitorisch auf den Kinase Komplex (Schafer 1998). Diese Phosphorylierung wird aufrechterhalten durch die Familie der Wee1/ Mik/ Myt1 Protein Kinasen und kann nur durch die Aktivierung der CDC25 Dual-spezifischen

Phosphatase entfernt werden (Busino, Chiesa et al. 2004). Die Familie der CDC25 Phosphatasen setzt sich aus 3 Mitgliedern zusammen. Der nukleär lokalisierten CDC25A Phosphatase, die einerseits den G1-S-Phase Übergang, aber auch den G2/M-Phase Übergang reguliert. Der cytoplasmatisch lokalisierten CDC25B Phosphatase, sowie der CDC25C Phosphatase, die für die Regulation der G2/M-Phase von Bedeutung sind (Donzelli and Draetta 2003). Die aktivierende Phosphorylierung der Cyclin-abhängigen Kinasen erfolgt durch CDK-aktivierende Kinasen (CAK). Diese Komplexe setzen sich aus CDK7 und Cyclin H zusammen und sind ein Beispiel dafür, wie Cyclin/CDK Komplexe zellzyklusspezifische Cycline regulieren. Die Phosphorylierung von Threonin 160 in CDK2 (T161 in CDK1, T172 in CDK4) durch CAK induziert eine Konformationsänderung und stimuliert die Bindung des Cyclins (Morgan 1997; Kaldis and Solomon 2000; Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003).

1.5. Die Funktion von p27

Erste Hinweise darauf, dass die Regulation der Zellzyklusprogression nicht nur abhängig ist von der Aktivierung positiver Zellzyklusmediatoren, sondern auch dem Abbau von Inhibitoren, stammen aus Analysen, in denen Zellen mit dem Wachstumsinhibitor TGF- β (Transforming growth factor) behandelt wurden. Zellen die mit TGF- β behandelt wurden, arretierten in der späten G1-Phase mit normalen Spiegeln an Cyclin E und CDK2. Eine Kinaseaktivität war in Lysaten aus diesen Zellen nicht nachweisbar (Koff, Ohtsuki et al. 1993). Zur gleichen Zeit, 1994, beschrieben Nugroho et al. die Charakterisierung eines Genes in Hefe, dessen Genprodukt in der Lage ist, die Aktivierung von G1-Cyclinen zu inhibieren (Nugroho and Mendenhall 1994). Auch in Säugerzellen erfolgte 1994 die Identifizierung eines 27kDalton großen Proteins (p27), das an Cyclin E /CDK2 Komplexe bindet und deren Aktivierung inhibiert (Polyak, Kato et al. 1994).

p27 inhibiert aber nicht nur Cyclin/Kinase Komplexe, sondern unterstützt auch das Assembly von Cyclin D/CDK4 Komplexen. Diese unterschiedlichen Funktionen werden u.a. durch die Lokalisation des Proteins reguliert.

1.5.1. Die Phosphorylierung von p27 reguliert die Lokalisation des Proteins

Der Transport von p27 zwischen dem cytoplasmatischen und nukleärem Kompartiment der Zelle wird durch verschiedene Phosphorylierungen reguliert. Eine Phosphorylierung, die den Transport von p27 in das Cytoplasma reguliert, ist die Phosphorylierung des Proteins am Serin 10.

Rodier und Mitarbeiter zeigten, dass eine Phosphorylierung von p27 am Serin 10 nach mitogenem Stimulus erfolgt (Rodier, Montagnoli et al. 2001). Sie wird durch die Serin/

Threonin Kinase hKIS (human kinase interacting stathmin), katalysiert (Boehm, Yoshimoto et al. 2002). In Rodiers Untersuchungen akkumulierte eine Mutante, die die Serin 10 Phosphorylierung nachahmt, jedoch im Zellkern. Trotz dieser Aminosäuremutation, erfolgte der Transport von p27 in das Cytoplasma der Zelle in G₀/G₁-Phase Zellen nicht effektiv (Rodier, Montagnoli et al. 2001; Boehm, Yoshimoto et al. 2002). Neben der Lokalisation, die durch die Phosphorylierung des p27 Proteins am Serin 10 beeinflusst wird, zeigen weitere Analysen, dass die Phosphorylierung von p27 am Serin 10 auch die Stabilität des Proteins im Zellkern beeinflusst. Mäuse, die eine Serin 10 Mutante exprimieren, die nicht phosphorylierbar ist, da Serin 10 zu einem Alanin mutiert wurde, weisen geringere Mengen von p27 in der Milz, im Uterus, dem Gehirn und der Leber auf. Auch in Fibroblasten aus diesen Tieren ist die Stabilität von p27 Serin 10A verringert. Vergleiche mit einer weiteren Mutante, die nicht in der Lage ist, an Cyclin/Kinase Komplexe zu binden, führten zu der Schlussfolgerung, dass die Verringerung der Stabilität der p27 Serin 10A Mutante auf eine verstärkte Bindung an Cyclin/Kinase Komplexe zurückzuführen ist (Besson, Gurian-West et al. 2006).

Die Phosphorylierung am Serin 10 ist jedoch nicht die einzige Phosphorylierung, die die Lokalisation von p27 beeinflusst. So führt die Aktivierung von MAP-Kinasen durch mitogene Stimuli zu einer Aktivierung der p90 ribosomalen S6 Kinase, die direkt mit p27 interagiert und zu seiner Phosphorylierung am Threonin 198 führt (Fujita, Sato et al. 2003). Diese Phosphorylierung resultiert in einer verstärkten cytoplasmatischen Lokalisation, da sie die Bindung an 14-3-3 Proteine reguliert. Die 14-3-3 Proteine binden u.a. an Serin/Threonin phosphorylierte Proteine und die Interaktion von am Threonin 198 phosphoryliertem p27 scheint für den Export von p27 in das Cytoplasma essentiell zu sein (Fujita, Sato et al. 2003).

Der Transport von p27 in den Zellkern kann auch aktiv inhibiert werden. Die Aktivierung der Serin/Threonin Protein Kinase Akt führt zu einer Phosphorylierung von p27 am Threonin 157 und vermittelt dadurch eine Resistenz der Zellen gegenüber einem Cytokin-vermitteltem G₁ Arrest. (Liang, Zubovitz et al. 2002). Eine Phosphorylierung von p27 am T157 konnte in humanen Brusttumoren nachgewiesen werden, in denen p27 cytoplasmatisch lokalisiert ist. Eine solche cytoplasmatische Phosphorylierung fördert wahrscheinlich die Tumprogression, da für die zellzyklusinhibitorische Wirkung von p27 eine nukleäre Lokalisation notwendig ist (Viglietto, Motti et al. 2002). Die Ursache für die cytoplasmatische Retention von p27 ist u.a. eine Inhibition der Bindung an Importin alpha, da die Phosphorylierungsstelle im nukleären Lokalisationssignal (NLS) liegt (Shin, Yakes et al. 2002; Shin, Rotty et al. 2005). Importin alpha ist ein cytoplasmatischer Rezeptor für Proteine, die ein NLS tragen. Zusammen mit Importin β bindet es an die cytoplasmatischen Filamente der Kernpore und katalysiert mit weiteren Proteinen den Kerntransport (Gorlich, Vogel et al. 1995). Andere Arbeiten deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von Threonin 157 zu einer verstärkten Bindung an cytoplasmatische 14-3-3 Proteine führt, die p27 im Cytoplasma halten (Sekimoto, Fukumoto et al. 2004).

Die Phosphorylierung von p27 reguliert jedoch nicht nur die Lokalisation des Proteins in der Zelle, sondern kann auch zu dessen Abbau führen.

1.5.2. Die Phosphorylierung von p27 reguliert den Abbau des Proteins

Einer der Abbaumechanismen, der durch Phosphorylierung von p27 am Serin 10 reguliert wird, ist die Degradation durch einen cytoplasmatischen Ligase Komplex, der Kip1 Ubiquitylierungs Komplex (KPC). KPC gehört zu den Ring Finger Protein Komplexen und reguliert den Abbau von p27 in der G1-Phase (Kotake, Nakayama et al. 2005). Die Ligasen werden im Kapitel 1.6. in dieser Arbeit beschrieben.

Nach der Phosphorylierung von p27 am Serin 10 im Zellkern wird das Protein durch die Interaktion mit dem Exportprotein CRM in das Cytoplasma translokalisiert. Hier bindet es an den KPC Komplex, wird ubiquityliert und degradiert (Kamura, Hara et al. 2004). Inwiefern dieser Mechanismus jedoch physiologisch relevant ist, bleibt umstritten, da die Analyse der Serin 10A knock in Mutante zeigte, dass p27 Serin 10A in der G1-Phase im Vergleich zu Wildtypzellen normal abgebaut wird. Die Diskrepanz zwischen den erhaltenen Resultaten wurde von den Autoren damit erklärt, dass die Identifikation von KPC in Zellen erfolgte, in denen p27 überexprimiert wurde (Kotake, Nakayama et al. 2005).

Eine Degradation von p27 im Zellkern beobachtete, wie bereits beschrieben, Rodier bei der Analyse der Serin 10A Mutante, die nicht ins Cytoplasma transportiert wird, im Zellkern aber instabil ist (Rodier, Montagnoli et al. 2001). Wie dieser Abbau im Zellkern erfolgt, konnte bisher jedoch nicht geklärt werden.

Ein weiterer Mechanismus, der zum Abbau des p27 Proteins führt, wird über die Phosphorylierung von p27 am Threonin 187 reguliert. Diese Phosphorylierung erfolgt durch Cyclin E/CDK2 Komplexe. Eine nicht phosphorylierbare Form von p27, in der das Threonin 187 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (T187A), zeigte, dass die Überexpression einer solchen Mutante zu einem Arrest in der G1-Phase führt (Sheaff, Groudine et al. 1997). Diese Beobachtung führte in den folgenden Jahren zu einer genaueren Analyse des Abbaumechanismus. Die Phosphorylierung bildet die Erkennungsstelle für das F-Box Protein Skp2, dass an dem Abbau von p27 beteiligt ist (Carrano, Eytan et al. 1999), wodurch die Zelle in die S-Phase eintreten kann (Sutterluty, Chatelain et al. 1999). Eine spätere Arbeit von Zhu et al. schlägt eine nicht katalytische Funktion von Cyclin A/CDK2 Komplexen in der Degradation von p27 vor, in der Cyclin A/CDK2 Komplexe dem Ligase Komplex das Substrat p27 besser präsentieren als Cyclin E/CDK2 Komplexe (Zhu, Nguyen et al. 2004). Die Generation einer Maus, die p27^{T187A} exprimiert, verdeutlicht die Bedeutung der Phosphorylierung von p27 am Threonin 187. In Zellzyklusexperimenten mit Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass p27 in der frühen G1-Phase durch einen Threonin 187 unabhängigen Degradationsweg abgebaut wird. Bindungsstudien zeigten, dass der Abbau von p27 in dieser Zellzyklusphase abhängig von Skp2 und einer Phosphorylierung ist, da die

Behandlung von Zellextrakten mit Phosphatasen diese Interaktion zerstörten. Am Eintritt in die S-Phase reakkumuliert p27 in den Fibroblasten, da der Abbau durch die Mutation inhibiert ist. Diese Arbeit zeigte, dass der Abbau von p27 im Zellzyklus demzufolge von mindestens zwei Mechanismen kontrolliert wird. Einem, der in der frühen G1-Phase aktiv ist, während der andere in S-Phase Zellen aktiviert wird. Desweiteren zeigte die Analyse von T-Lymphozyten, die aus T187A knock in Mäusen isoliert wurden, dass die Reakkumulation von p27 zu einer verminderten Proliferationsrate führt. Eine verminderte Proliferationsfähigkeit konnte auch in embryonalen Fibroblasten nachgewiesen werden. Der Verlauf des S-Phase Eintritts zeigt hier jedoch, dass der S-Phase Eintritt nicht verzögert ist, sondern weniger Zellen in die S-Phase eintreten (Malek, Sundberg et al. 2001). Trotz der verminderten Proliferationsfähigkeit einiger Zelltypen, z.B. embryonaler Fibroblasten und Keratinozyten, zeigte sich, dass T187A knock in Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren durchschnittlich größer sind (Malek, Sundberg et al. 2001), d.h. nicht alle Zelltypen zeigen eine verminderte Proliferationsfähigkeit.

Wie bereits beschrieben, führt die Akkumulation des Proteins zu einem Zellezyklusarrest (Sheaff, Groudine et al. 1997), während der Abbau den S-Phase Eintritt katalysiert (Sutterluty, Chatelain et al. 1999). Die Bedeutung von p27 in der Regulation der Proliferation verdeutlicht sich auch in dem Phänotyp der p27 knock out Maus, der im folgendem Abschnitt näher beschrieben wird.

1.5.3. Der Verlust von p27 führt zu einer gesteigerten Zellproliferation

Der Verlust von p27 in der Maus führt zu einer Zunahme der Körpergröße nach der Geburt der Tiere. Dies ist auf eine verstärkte Proliferation der Zellen aller Organe zurückzuführen. So zeigt sich in der p27 knock out Maus, dass Leber und Gehirn ca. 20-30% mehr Zellen besitzen. Auch im Thymus und in der Milz wiesen die Autoren einen Anstieg der Zellzahl nach. In diesen Organen befanden sich weiterhin mehr Zellen in der S-Phase als in den Wildtyptieren. Cyclin E Kinaseassays zeigten weiterhin einen signifikanten Anstieg, so das Fero und Mitarbeiter schlussfolgerten, dass die Ursache der erhöhten Proliferation durch die erhöhte Cyclin E Kinaseaktivität verursacht wird, da dieser Proteinkomplex nicht mehr durch p27 inhibiert werden kann (Fero, Rivkin et al. 1996). Diese Arbeit verdeutlicht, wie wichtig die exakte Regulation von zellzyklusregulierenden Proteinen ist.

Im folgenden wird daher genauer auf den Abbau von Proteinen durch Ubiquitinierung eingegangen.

1.6. Die Degradation von Proteinen

In der Zelle gibt es zwei wesentliche Mechanismen für den Abbau von Proteinen. Das endosomale -lysosomale System, durch das Proteine, die durch Endozytose aufgenommen wurden, in der Zelle degradiert werden, sowie das nicht-lysosomale System. Durch das nicht-lysosomale System werden Proteine des Cytoplasmas, des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates abgebaut (Mayer 2000). Ein Mechanismus für die Degradation von Proteinen über den nicht-lysosomalen Weg ist ihre Ubiquitynylierung.

1.6. 1. Der Abbau von Proteinen durch Ubiquitynylierung

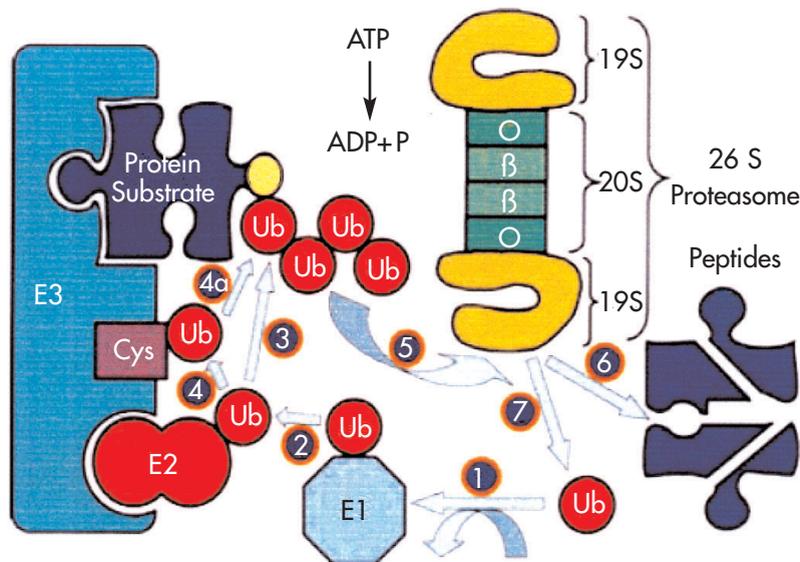
Die Entdeckung eines nicht-lysosomalen Abbauweges für intrazelluläre Proteine durch Poole legte u.a. den Grundstein für die Aufklärung des Ubiquitin-abhängigen Degradationsmechanismus.

Der nicht-lysosomale Abbau von Proteinen wird durch verschiedene Signale im Protein reguliert. Diese Signale sind primär oder sekundär, durch post-translationale Modifikationen erworben. Primäre Motive führen nicht unbedingt zu einem Abbau des Proteins, da sie durch dreidimensionale Strukturen oder durch Heterodimersierungen im Protein verborgen sein können. Eines der am besten analysierten primären Signale ist die Regulation der Halbwertszeit durch N-terminale Aminosäuren. In Säugerzellen führen v.a. die Aminosäuren Asparagin, Glutamin und Cystein zu einer kurzen Halbwertszeit des Proteins (N-terminale Regel). Andere Proteine werden erst durch sekundäre Mechanismen, z.B. Phosphorylierungen für die Degradation markiert. G1 Cycline, z.B. Cyclin D1 und Cyclin E besitzen PEST Domänen, die aus den Aminosäuren Prolin, Glutamin, Serin und Threonin aufgebaut sind. Die Phosphorylierung von Cyclin D am Threonin in dieser Sequenz führt zu dessen Abbau durch Ubiquitynylierung. Mitotische Cycline dahingegen besitzen eine Zerstörungsbox am N-Terminus des Proteins, deren Funktion jedoch nicht vollständig geklärt ist. Da sie nicht als Phosphorylierungs- oder Ubiquitynylierungsstelle fungiert, wird vermutet, dass sie als Anheftungsdomäne für E3 Ligasen, die zu der Ubiquitynylierung des Proteins führen, dient.

Goldstein entdeckte Ubiquitin als einen Lymphozyten-Differenzierungs Faktor, den er aufgrund seiner ubiquitären Expression und immunologischen Eigenschaften UBIP nannte. Die eigentliche Funktion von Ubiquitin wurde durch A. Hershko, I.A. Rose und A. Ciechanover gefunden, die 2004 dafür den Nobelpreis erhielten (Ciechanover 2005; Wilkinson 2005).

Ubiquitin ist ein 76 Aminosäure großes Protein, das in allen eukaryotischen Lebewesen hoch konserviert ist (Lee and Tyers 2001; Ciechanover 2005). Die kovalente Bindung von Ubiquitin an das Zielprotein erfordert die Aktivität von drei weiteren Proteinen, dem E1 und E2 Enzym und der E3 Ligase. Der Mechanismus des Anfügens von Ubiquitin an ein

Zielprotein ist in Abbildung 3 dargestellt. Es wird vermutet, dass nur ein essentielles E1 Enzym die Aktivierung der Ubiquitylierung reguliert. Die Aktivierung von Ubiquitin benötigt MgATP, das zusammen mit dem Ubiquitin an das E1 Enzym bindet. Die Hydrolyse des ATP setzt Energie frei, die genutzt wird, um eine Thioesterbindung zwischen dem E1 und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins auszubilden. E1 Enzyme binden zwei Ubiquitine, eines über die Ausbildung einer Adenylatbindung, die als Zwischenprodukt für die Ausbildung einer Thioester Bindung zu dem zweiten Ubiquitin dient (Fang and Weissman 2004). Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf das E2 Enzym transferiert, das durch eine 150 Aminosäuren lange Sequenz charakterisiert sind. Diese Sequenz wird auch als Ubiquitin Kern Domäne (UBC) bezeichnet. Sie enthält ein Cystein als Akzeptor des Ubiquitins. E2 Enzyme sind Ubiquitin konjugierende Proteine, die das aktivierte Ubiquitin auf das Zielprotein übertragen. Viele E2 Proteine benötigen dafür die katalytische Aktivität der E3 Ligasen. E3 Ligasen sind somit einerseits für die Bindung des Substrates verantwortlich, katalysieren aber auch die Polyubiquitylierung und somit den proteosomalen Abbau von Proteinen (Hershko and Ciechanover 1998).



(Ciechanover 2005), Ubiquitylierung von Proteinen: 1) Ausbildung einer hochaktiven Thioester-Bindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und dem Cystein des Ubiquitin-aktivierenden Enzym E1. 2) Transfer des aktivierten Ubiquitins auf das Ubiquitin konjugierende Enzym. 3) das aktivierte Ubiquitin wird mithilfe der E3 Ligase an das Zielprotein gebunden. Dieser Transfer erfolgt direkt 3) oder über die Ausbildung eines Thioesterzwischenproduktes an der Ligase. Durch Anheften mehrerer Ubiquitine kommt es zur Ausbildung einer Polyubiquitinkette, die zur Erkennung des Zielproteins durch das 26S Proteasom führt 6) und in dessen Abbau resultiert 7) das Ubiquitin wird wiederverwendet

Abbildung 3

1.6.2. Die Familie der E3 Ligasen

E3 Ligasen sind Proteine oder Proteinkomplexe, die den Transfer des Ubiquitins von dem konjugierenden E2 Enzym auf das Zielprotein ermöglichen. Anhand ihrer Struktur unterscheidet man 2 Klassen: E3 Ligasen mit einer HECT Domäne und E3-Ring-Finger Ligasen (Passmore and Barford 2004; Ardley and Robinson 2005). E3-Ring-Finger Ligasen können aus Multiproteinkomplexen aufgebaut sein. Für die Ubiquitylierung von Zielproteinen ist aber der Aufbau von Multiproteinkomplexen keine Voraussetzung, da z.B. für die Degradation von p53 ein einzelnes Ring-Finger Protein, sowie E1 und E2 Enzyme ausreichen (Fang and Weissman 2004).

Zu den Multiprotein-Ring-Finger Ligasen zählen die Cullin-Ring Ligasen, von denen in humanen Zellen 6 verschiedene exprimiert werden. Sie werden charakterisiert durch N-terminale Cullin Repeats (CR), die aus 5 Helix-Schleifen aufgebaut sind. C-terminal schließt sich eine globuläre Domäne, an die das Ring-Finger Protein gebunden ist. In vitro Experimente führen zu der Annahme, dass der Cullin-Ring das konjugierende E2 Enzym rekrutiert und aktiviert (Passmore and Barford 2004; Petroski and Deshaies 2005). Die Aktivität dieser Komplexe, so konnte für den Cullin1 Komplex (SCF) gezeigt werden, erfolgt über Neddylisierung am Lysin 720 des Proteins und beeinflusst wahrscheinlich die Bindung und Positionierung des E2-Ubiquitin konjugierenden Enzyms (Zheng, Schulman et al. 2002). Neddylin ist ein 8 kD großes Protein, das ähnlich wie Ubiquitin an Proteine konjugiert werden kann. Damit wird das entsprechende Protein jedoch nicht für den proteosomalen Abbau markiert, sondern die Neddylisierung der E3 Ligasen ist für den Aufbau der aus Multiproteinkomplexen bestehenden Ring-Finger Ligasen notwendig (Schwechheimer and Calderon Villalobos 2004).

Der Cullin-Ring bietet aber keine Substratspezifität (Passmore and Barford 2004; Petroski and Deshaies 2005). Die Substratspezifität der Cullin-Ring Ligasen erfolgt über die Bindung von Substratrezeptoren, wobei jedes Cullin mit mehreren Rezeptoren interagieren kann (Petroski and Deshaies 2005).

Hinsichtlich dieser Substratrezeptoren erfolgt eine weitere Untergliederung der Cullin-Ring Ligasen.

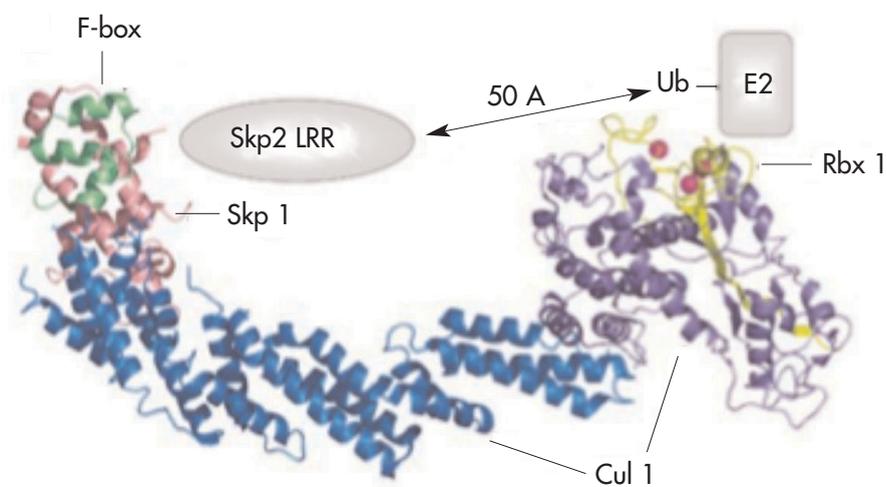
1.6.2.1. Der Skp1-Cullin1-F-Box Protein Komplex

Der SCF Komplex ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus Skp1, Cullin1 und dem F-Box Protein, der zu den Cullin-Ring E3 Ligasen zählt. F-Box Proteine sind die Substratrezeptoren, die das Zielprotein binden und es an die Ubiquitin Ligase bringen. Abbildung 4 zeigt die dreidimensionale Struktur dieses Komplexes. Die Interaktion mit der Ligase erfolgt über ein Adapterprotein Skp1, das die F-Box Domäne des F-Box Proteins bindet (Schulman, Lindstrom et al. 1998). Diese ist charakterisiert durch eine 40 Aminosäuren lange Sequenz

und ist am N-Terminus des Proteins lokalisiert. Das F-Box Motiv ist in Menschen und Hefen stark konserviert (Bai, Sen et al. 1996; Zheng, Schulman et al. 2002). Die Bindung an Cullin1 erfolgt über den N-Terminus des Cullin 1 Proteins, der die Cullin Wiederholungen enthält.

Bai et al. zeigte, dass neben dem F-Box Motiv weitere konservierte Sequenzen zu finden sind, die sich jedoch in den verschiedenen F-Box Proteinen unterscheiden. Diese Sequenzen dienen der Protein-Protein Interaktion und sind aus Leucin reichen (LRR) oder WD 40- Wiederholungen aufgebaut (Bai, Sen et al. 1996; Schulman, Carrano et al. 2000) Die Bindung des Zielproteins an das F-Box Protein erfolgt nur nach Phosphorylierung des Zielproteins. Diese Phosphorylierungen erfolgen in bestimmten Motiven, den Phosphodegrons und werden als ein oder mehr Phosphorylierungsstellen im Substrat definiert, die direkt mit der Protein-Protein Interaktionsdomäne in E3 Ligasen wechselwirken (Ang and Wade Harper 2005).

Die längliche Struktur von Cullin 1 ermöglicht die C-terminale Bindung des Ring Finger Proteins und die N-terminale Bindung des Adapter-Proteins, sowie dem an das F-Box Protein gebundenen Substrat (Petroski and Deshaies 2005).



(Passmore and Barford 2004): Dargestellt ist die Struktur des RBX1-Cul1- Skp1 Komplexes, sowie die Bindung des F-Box Proteins Skp2 Cullin Ring Finger Ligasen bestehen aus einem Ring- Finger Protein RBX1 das an den C-Terminus des Cullin 1 gebunden ist. Die C-terminale Cullin Homologe Domäne ist in lila, die N-terminale in blau dargestellt. In grün gezeigt ist die F-Box Domäne des Skp2 Proteins gebunden and SKP1 (rosa)

Abbildung 4

Bisher ist noch nicht geklärt, wie der SCF Substrate ubiquitinyliert. Es wird angenommen, dass die Hauptfunktion des F-Box Proteins die Rekrutierung der Substrate an den SCF Komplex ist. Desweiteren scheint das F-Box Protein für die optimale Positionierung des Substrates essentiell zu sein (Schulman, Lindstrom et al. 1998).

1.6.2.1.1. Das F-Box Protein Skp2

Zellwachstum und Proliferation müssen miteinander koordiniert werden, um sicherzustellen, dass die Zellgröße nach Zellteilungen konstant bleibt. Wie bereits in Kapitel 1.1.2. G0/G1-Phase beschrieben wurde, gibt es in Hefen, aber auch in Säugerzellen, Kontrollpunkte in der G1-Phase, die sicherstellen, dass eine Zelle ihre Größe konstant beibehält. Die Regulation der Zellgröße kann durch Endoreduplikationszyklen erfolgen, da ein Anstieg in der DNA Menge auch zu einer Zellvergrößerung führt. Sie kann aber auch nur durch eine Zunahme der Zellmasse erfolgen (Hafen and Stocker 2003). Das Wachstum von Zellen bestimmt jedoch nicht alleine die Größe des Organismus, sondern die Größe eines Organismus ist ebenfalls abhängig von der Proliferationsrate der Zellen (Conlon and Raff 1999).

So führt der Verlust des F-Box Proteins Skp2 in der Maus zu einer Reduktion des Körpergewichtes um 2/3 im Vergleich zu Wildtyptieren. Der Verlust eines Skp2 Allels führt zu einem intermediären Phänotyp. Histologische Analysen der Organe der Skp2 knock out Mäuse zeigten, dass die Zellen in der Leber, dem Epithelium der Bronchioli der Lunge, dem Epithelium der proximalen renalen Tubuli und in den Testis sehr stark vergrößert sind. Die Vergrößerung der Hepatozyten konnte auf einen Anstieg des DNA Gehaltes zurückgeführt werden. Andere Organe sind von diesem Phänotyp nicht betroffen. Embryonale Fibroblasten aus diesen Tieren zeigten eine verminderte Proliferationsfähigkeit (Nakayama, Nagahama et al. 2000). Die Induktion der Proliferation in Hepatozyten durch Entnahme von 2/3 der Leber zeigte, dass die Regeneration des Organs nicht wie normalerweise durch Proliferation der verbleibenden Hepatozyten erfolgt, sondern durch Zellwachstum. Die Leber in Skp2 knock out Mäusen erhält demzufolge, nach partieller Hepatektomie, ihre Funktionsfähigkeit durch extensive Vergrößerung der verbleibenden Hepatozyten, die Endoreduplikationszyklen durchlaufen (Minamishima and Nakayama 2002). Molekulare Analysen in Fibroblasten zeigten eine Akkumulation von Cyclin E und dem Zellzyklusinhibitor p27 (Nakayama, Nagahama et al. 2000). Da die Funktionen von Skp2 in der Regulation der Zellzyklusprogression jedoch vielfältig sind, ist die Ursache des Phänotypes in den Skp2 knock out Mäusen nicht vollständig geklärt.

Skp2 reguliert die Transkription c-Myc abhängiger Zielgene durch Ubiquitinylierung, gleichzeitig erfolgt neben der Aktivierung von c-Myc durch die Ubiquitinylierung auch der Abbau des Proteins (Kim, Herbst et al. 2003; von der Lehr, Johansson et al. 2003). Ebenso wird der Transkriptionsfaktor E2F-1 durch die Bindung an Skp2 am Übergang der

S/G2 Phase abgebaut (Marti, Wirbelauer et al. 1999). Des Weiteren reguliert Skp2 die Degradation des humanen ORC1p Proteins. Bereits im Kapitel 1.2.2. wurde der Aufbau der Pre-Replikationskomplexe beschrieben. ORC1p gehört zum Origin Erkennungskomplex, der sich an den Startpunkten der Replikation aufbaut. Die Degradation von ORC1p am Eintritt in die S-Phase ist ein weiterer Mechanismus, der die Rereplikation verhindert (Mendez, Zou-Yang et al. 2002). Neben der Regulation der Degradation von Transkriptionsfaktoren und Proteinen der Replikationsmaschinerie erfolgt durch Skp2 auch der Abbau von Zellzyklusinhibitoren. Zu diesen gehören p57 (Kamura, Hara et al. 2003) und p130 (Tedesco, Lukas et al. 2002), sowie p27 (Sutterluty, Chatelain et al. 1999).

Hinsichtlich der verschiedenen Funktionen dieser Proteine in der Transkription, der Initiation der DNA Replikation und der Zellzyklusprogression, ist es schwierig, den Phänotyp der Skp2 knock out Mäuse auf molekularer Ebene zu erklären.

1.7. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Funktion von Cyclin E und Skp2 in der Zellzyklusregulation untersucht werden. Skp2 ist ein F-Box Protein des SCF Komplexes, das den Abbau des Cyclin-Kinase Inhibitors p27 reguliert. Der Verlust von Skp2 führt zu einer Akkumulation von p27 und Cyclin E. Die Analyse der Hepatozyten dieser Mäuse kann demzufolge helfen, aufzuklären, welche Funktionen Cyclin E und p27 in der Regulation der Zellzyklusprogression des Hepatozyten haben. Diese Analysen sollen im Vergleich zu einer anderen Mauslinie, die eine nicht phosphorylierbare Form von p27 (p27T187A) exprimiert, durchgeführt werden. In Fibroblasten dieser Tiere konnte gezeigt werden, dass nach einem mitogenem Stimulus p27 in der frühen G1-Phase abgebaut wird, jedoch in der S-Phase reakkumuliert, so dass durch die Untersuchungen dieser Mauslinie unterschieden werden kann, in welcher Zellzyklusphase p27 als Kinaseinhibitor wirksam ist.

Des Weiteren ist die Akkumulation von Cyclin E für die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen notwendig und wurde auch mit der Ausbildung genetisch instabiler Zellen in Tumoren und in Zellkultursystemen in Verbindung gebracht. Die Regulation dieser Prozesse in Abhängigkeit von Cyclin E in Hepatozyten wurde jedoch noch nicht untersucht. Da in Skp2 knock out Mäusen neben p27 auch Cyclin E akkumuliert, bietet dieses Mausmodell eine Möglichkeit die Prozesse der Endoreduplikation und genetischen Instabilität zu untersuchen. Diese Analysen sollen durch zwei weitere Mausmodelle, in denen es zur Akkumulation von Cyclin E kommt, erweitert werden. In einem der Modelle wird Cullin 3, welches am Abbau von monomerem Cyclin E beteiligt ist, in den Hepatozyten ausgeschaltet. In einem anderen Mausmodell soll Cyclin E durch adenoviralen Gentransfer in den Hepatozyten von Wildtypen überexprimiert werden.

2. 0. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Sofern es nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von den Firmen Amersham, AppliChem, Baker, Biomol, BioRad, Boehringer, Falcon, Fluka, Gibco BRL, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Promega, Riedel-deHaen, Roth, Santa Cruz, Sigma und Stratagene verwendet. Verbrauchsmaterialien stammen von den Firmen Amersham, Beckman, Biozym, Costar, Eppendorf, Falcon, Fuji, Gilson, Greiner, Kodak, Macherey-Nagel, Pharmacia, Qiagen, Sarstedt, Schleicher&Schuell und Whatman.

2.1.1. Allgemeine Materialien für die Zellkultur

DMEM (Gibco)	mit 4,5 g/l Glucose
Penicillin/Streptomycin (Seromed)	10.000 Einheiten/10.000 µg/ml
Trypsin (Seromed)	
FCS (Gibco)	fötales Kälberserum
Gewebekulturschalen (Falcon)	Durchmesser 6, 10 cm
Gewebekulturflaschen (Falcon)	Volumen 250ml
1 ml Einfriergefäße (Greiner)	

2.1.2. Allgemeine Reagenzien für die Immunhistochemie

Glycerolgelatine	Kaiser
Antigen Demaskierungslösung	Vector
ABC Vectastain Kit	Vector
BrDU staining Kit	Amersham
DAB Färbetabletten	Sigma
Feulgen Lösung	Sigma
Corbit	Hecht

2.2. Pufferlösungen und Lösungen

2.2.1. Pufferlösungen für Immunhistochemie

PBS (Phosphate-buffered saline)	137mM NaCl 2,7mM KCl Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 1,4mM KH ₂ PO ₄
TBS (Tris- buffered saline)	100mM Tris-HCl, pH 7,6 150mM NaCl
Sulfitwasser	0,5% Kaliumdisulfit 0,05M HCL
Tris/EDTA Puffer	40mM Tris 1mM EDTA pH 9,0
Formol	7,8g Na ₂ HPO ₄ 4,8g NaH ₂ PO ₄ 120ml Formalin 37% auf 1,08L mit A.Dest.
3,7 % Paraformaldehyd	14,8g Paraformaldehyd 200ml A.Dest.

auf 60°C erwärmen und tropfenweise 1N NaOH dazugeben, bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat; nach dem Abkühlen 200ml 2xPBS dazugeben, aliquotieren, bei -20°C lagern.

2.2.2. Pufferlösungen und Lösungen für die DNA Extraktion
und Genotypisierung der Mauslinien und PCR Puffer

Proteinase K Puffer:	10mM Tris pH 8,0 5mM EDTA pH 8,0 0,2% SDS 200mM NaCl
PCR Puffer	166mM Ammonium Sulfat 670mM Tris-HCl, pH 8,8 1 mg/ml BSA Fraktion 5
Lysis Puffer	50mM KCl 10mM Tris HCl, pH 8,3 2mM MgCl 0,45% Tween 20 0,45% NP40
10X MGB (Modified Gitschier Buffer)	670mM Tris HCl, pH 8,8 166mM Ammonium Sulfat 65mM MgCl ₂ 0,1% Gelatine
10x PCR Puffer I	100mM Tris-HCl, pH 8,3 500mM KCl 15mM MgCl ₂
Puffer Invitrogen	200mM Tris-HCl, pH 8,4 500mM KCl
GAPDH Puffer	150mM Tris-HCl, pH 8,3 500mM KCl

2.2.3. Pufferlösungen und Lösungen für proteinbiochemische Analysen

RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 8,0 80mM mM NaCl 50mM NaF 20mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1mM EDTA 1mM EGTA 1% (w/v) NP-40 1% (w/v) DOC 0,1% (w/v) SDS
NP-40 Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl 50mM NaF 20mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1mM EDTA 10mM β Glycerophosphat 0,5% (w/v) NP-40
Inhibitoren frisch zugesetzt:	2,5 U/ml Pepstatin A 2,5 U/ml Leupeptin 2,5U/ml Vanadat 0,15 mM Benzamidin 0,5% (w/v) Aprotinin
Ladepuffer	25 mM Tris-HCl, pH 6,8 40 % (v/v) Glycerin 8% (w/v) SDS 0,05% (w/v) Bromphenolblau 10% β-Mercaptoethanol
Laufpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,3-8,6 1,92M Glycin 1% (w/v) SDS
Blotpuffer (TNT)	150mM NaCl 25mM Tris-HCl, pH7,5 0,05%Tween 20

Transferpuffer	25mM Tris 190mM Glycin
ECL Lösung	
Lösung 1	25mM Luminol 0,4mM p- Cumarsäure 100mM Tris- HCl, pH 8,5
Lösung 2	100mM Tris- HCl 0,02% H ₂ O ₂
Histon WaschPuffer	25mM Tris- HCl, pH 7,5 70mM NaCl 10mM MgCl ₂ frisch zugesetzt: 1mM DTT
Histon KinasePuffer	32µl Histon Kinase Waschpuffer 0,1µg/µl Hintone H1 3µM kaltes ATP
2.2.4. Lösungen für die RNA Extraktion	
DEP- Bidest:	20µl DEPC/100ml dH ₂ O Über Nacht, autoklavieren
Lösung D	4M Guanidin Thiocynat 25mM Natriumcitrat, pH 7,0 100mM β-Mercaptoethanol 0,5 % Lauroysarcosine 0,1% Antifoam

2.2.5. Lösungen für die Virusamplifikation

2x Lagerpuffer	80mM Tris pH8,0 100mM NaCl 1mM MgCl 5%Glycerol Frisch zusetzen 10% BSA; steril filtrieren
Dialysepuffer	100mM Tris pH 8,0 10mM MgCl 280mM NaCl
1,4 g Cäsiumchlorid	26,75g CsCl 20mM Tris, pH 7,5 auf 50ml A.Dest.
1,2g Cäsiumchlorid	13,25g CsCl 20mM Tris, pH 7,5 auf 50ml A.Dest.
Tris-EDTA	10mM Tris-HCl, pH 8,0 1mM EDTA
2 x HEPES-Puffer	274mM NaCl 42mM HEPES 1,5mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0
250 mM CaCl ₂	

2.3. Antikörper

Antikörper	Benutzte Verdünnung		ICH/ICF	Firma
	WB	IP		
p27kip1 TDL	1:1000	1:100		BD Transduction Lab.
CDK1	1: 300	1:50		NeoMarkers
Cyclin D DCS-6	1:300			NeoMarkers
Cdk2 M2	1:1000	1: 100		Santa Cruz
Cullin3 H-293	1:1000			Santa Cruz
Cyclin A H-432	1: 1000	1:100		Santa Cruz
Aktin C4	1: 1Mio.			ICN
P Ser10-Histon H3			1: 50	CellSignalling
CycE	1:3000	1: 200		
β-Catenin			1:50	BD Transduction Lab.

2.4. Mausarbeiten

2.4.1. Genotypisierung der Mäuse

2.4.2. DNA Extraktion

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte nach Isolation der DNA aus 0,5-1cm Schwanzspitze.

Die Schwänze wurden in 500µl Proteinase K Puffer und 10µl Proteinase K (20mg/ml Wasser) über Nacht bei 56°C inkubiert. Zur Auftrennung von gelöster DNA und Zellrückständen wurden die Proben bei 13000 rpm für 20 Min. zentrifugiert. Aus dem gewonnenen Überstand wurde die DNA durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde in 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Nach Zugabe von 100 µl ddH₂O erfolgte die Inaktivierung von DNasen bei 65°C für 20 Min.. Bis zu der Genotypisierung wurde die DNA bei 4°C gelagert.

Die Sequenzen für die Primer für die jeweiligen Genotypisierungen werden in Tabelle 1 zusammen mit dem entsprechenden Annealing Temperaturen angegeben. Für alle Genotypisierungen wurde folgendes Programm genutzt:

PCR Programm:

94°C 5min

94°C 0,5min.

x °C 0,5min.

72°C 1,5min.

} 30Zyklen

72°C 5min.

4°C Lagerung

2.4.3. Genotypisierung der Skp2 knock out Mäuse

Die Generation der Skp2 knock out Mäuse erfolgte durch homologe Rekombination die zu einer Deletion der Exone 1-3 des Skp2 Genes führten. Die Generation dieser Mäuse erfolgte in der Arbeitsgruppe Kei-ichi Nakayama (Nakayama, Nagahama et al. 2000).

Die Genotypisierung erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durch die Verwendung spezifischer Primer. Sie beruhen auf dem Nachweis des WT Allels und des mutierten Allels. Der Nachweis des Skp2 knock outs erfolgte mit den Primern KN13 und KN38. Das endogene WT Allel konnte mit den Primern KN3 und KN4 (siehe Tabelle 1) nachgewiesen werden. Die zu erwartenden Fragmente betragen 500bp für das WT Allel und 430bp für das mutante Allel. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 1% Agarose Gel in TBE Puffer. Der folgende PCR Ansatz wurde für die Genotypisierung der Skp2 und p27 knock out Mäuse genutzt.

PCR Ansatz:

20 µl Lysis Puffer

2 µl PCR Puffer

1 µl MgCl₂ (40mM)

1 µl dNTPs (10mM)

1 µl /Primer (10mM)

12 µl ddH₂O

1 µl Taq

2 µl DNA

50 µl

2.4.4. Genotypisierung der p27 ko Mäuse

Der knock out des p27 Genes erfolgte durch die Deletion von Exon 1 und 2. Die Generation der Mäuse wurde durch M. Fero (Fero, Rivkin et al. 1996) beschrieben.

Der Nachweis des p27 knock outs erfolgte mit den Primern mgk3 und Neo1, die in der Neo Kasette liegen. Das WT Allel wurde mit den Primern KNOF1 und KNOB1 (siehe Tabelle 1) nachgewiesen. Beide Amplifikationen zeigten eine Bande bei 500bp.

PCR Ansatz:	20 µl Lysis Puffer
	2 µl PCR Puffer
	1 µl MgCl ₂ (40mM)
	1 µl dNTPs (10mM)
	1 µl /Primer (10mM)
	12 µl ddH ₂ O
	1 µl Taq
	2 µl DNA
	<hr/>
	50 µl

2.4.5. Genotypisierung der p27T187A Mäuse

Die Generation der p27T187A knock in Mäuse erfolgte durch Mutation des Threonin 187 im Exon 2 des p27 Genes zu einem Alanin (Malek, Sundberg et al. 2001).

WT Allel und knock in Allel wurden durch die Primer H3 und Y1 (siehe Tabelle 1) amplifiziert.

Die zu erwartende Bande für den WT liegt bei 250bp, die für den knock in bei 284bp.

PCR Ansatz:	2,5 µl 10xMGB
	2,5 µl DMSO
	0,125µl β-ME
	1 µl dNTPs (10mM)
	1 µl /Primer (10mM)
	14,8 µl ddH ₂ O.
	1 µl Taq
	2 µl DNA
	<hr/>
	25 µl

2.4.6. Genotypisierung der CDK2 knock out Mäuse

Die Generation der CDK2 knock out Mäuse erfolgte durch homologe Rekombination, in der Exon 4 und Exon 5 durch eine Neomycin Kasette ersetzt wurden. Diese Exone kodieren die Kinase Domäne, durch deren Verlust CDK2 inaktiviert wird (Berthet, Aleem et al. 2003). Der Nachweis des CDK2 knock outs erfolgte mit Hilfe der PCR durch den Nachweis der Neo-kassette. Das knock out Allel zeigte eine Bande bei 150bp, das WT Allel eine Bande bei 500bp. Die Auftrennung des PCR Produktes erfolgte auf einem 2% Agarose Gel. Die Primersequenzen sind in Tabelle 1 angegeben.

PCR Ansatz:	2,5 µl 10xMGB
	2,5 µl DMSO
	0,125 µl β-ME
	1 µl dNTPs (10mM)
	1 µl/Primer (10mM)
	14,8 µl ddH ₂ O
	1 µl Taq
	2 µl DNA
	<hr/>
	25 µl

2.4.7. Genotypisierung der Cullin 3 konditionellen knock out Mäuse

Die Generation der konditionellen Cullin3 knock out Mäuse erfolgte durch J.Singer. Der knock out des Genes durch die Cre-Rekombinase beruht auf einem Ausschnitt des 4.-7. Genes, die jeweils von einer loxP Stelle flankiert werden. Der knock out des Cullin3 Genes in adulten Hepatozyten erfolgte durch die Injektion eines Adenovirus,, der die Cre-Rekombinase exprimiert. Das Enzym erkennt eine 34bp lange Rekombinationsstelle, die loxP Stelle, die an beiden Seiten des zu deletierenden Genteiles inseriert wurde und führt zu einer Rekombination, an deren Ende das Gen zwischen den beiden loxP Stellen deletiert wurde (Santoro and Schultz 2002). Die Identifikation von Tieren, die homozygot für diese loxP Stelle sind, erfolgte durch PCR. Die Amplifikation des WT Allels ergibt eine Bande bei 87bp, die des Knock in Allels, das die loxP Stelle besitzt, liefert eine Bande bei 187bp. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 2% Agarose Gel. Die Primersequenzen sind in Tabelle 1 angegeben.

PCR Ansatz:

2,5 µl Puffer Invitrogen
2,5 µl 10xBSA
1,25 µl DMSO
4 µl 25 mM MgCl
1 µl dNTPs (10mM)
1 µl /Primer (10mM)
10,25 µl ddH₂O.
1 µl Taq
2 µl DNA

25 µl

KN13: 5`GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG 3`

KN38: 5`TTCCCA CCC CCA CAT CCA GTC AAT 3`

Annealing: 62°C

KN3: 5`AGA GTG GAA GAA CCC AGG CAG GAC 3`

KN4: 5`CCC GTG GAG GGA AAA AGA GGG ACG 3`

Annealing: 62°C

mgk3: 5`GAG CAG ACG CCC AAG AAG C 3`

Neo1: 5`CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG 3`

Annealing: 57°C

KNOF1: 5`CCG AGG AGG AAG ATG 3`

KNOB1: 5` CGC TGG AGA AAG CAA GTGAAC AG 3`

Annealing: 59°C

H3: 5`CCA ATA TGG CGG TGG AAG GGA GGC TGA 3`

Y1: 5`GAG CAG GTT TGT CAG TCG TAC ACC TCC 3`

Annealing: 55°C

PKO0292: 5`GTG ACC CTG TGGTAC CGA GCA CCT G 3`

PKO 0294: 5`CCC GTG ATA TTG CTG AAG AGC TTG GCG G 3`

PKO 0294: 5`GGT TTT GCT CTT GGA TGT GGG CAT GG3`

Annealing: 62°C

Ckobj1: 5`CTG GGA GTC AAG AGA ACT CAG TGC ATG G 3`

Ckor1: 5`TTG TGA GGC ACA TGA TTA ACA CAT GCA T 3`

Annealing: 62°C

Tabelle 1

*Angegeben sind die
Primersequenzen und
die Annealingtemperatur
für die Genotypisierung
der Mäuse*

2.5. Partielle Hepatektomie

Skp2knock out, Skp2/p27 doppel knock out Mäuse, sowie T187A knock in Mäuse und WT Tiere im Alter von 8-10 Wochen wurden partiell hepatektomiert. Dazu wurden die Mäuse mit 10 µl Anästhesielösung/g Körpergewicht narkotisiert und der linke laterale, der linke mediane sowie der rechte mediane Leberlappen wurden nach dem Abbinden entfernt und als 0 Stunden Zeitpunkt genutzt. Die Tiere wurden zu den angegebenen Zeitpunkten, nach intraperitonealer Injektion von BrDU 100 µl/g Körpergewicht 2 Stunden vor der Tötung, durch cervikale Dislokation getötet. Die Leberproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in 4% Formollösung zur Anfertigung von Parafinschnitten fixiert. Ein weiterer Teil der Leber wurde für die Anfertigung von Cryostatschnitten in OCT-Tissue Compound eingebettet. Die Lagerung der Gefrierproben erfolgte bei -80°C.

Jeweils 3 Tiere pro Zeitpunkt und Genotyp wurden analysiert.

Anästhesie: 25mg/ml Ketanest
2% Rompun
in 0,9% NaCl

2.6. Immunhistochemische- und Immunfluoreszenz-Färbungen

Die immunhistochemischen BrDU und Histon H3 Färbungen wurden auf 6µm dicken Gefrierschnitten, mit einem Cryostatgerät CM3000 von Jung angefertigt. Die Feulgen Färbung und β-Catenin Färbung erfolgten auf 3-5µm dicken Parafinschnitten. Die Anfertigung der 3µm Parafinschnitte erfolgte im Institut der Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Alle Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger geschmolzen und getrocknet. Die Lagerung der Gefrierschnitte erfolgte bei -20°C gelagert, Parafinschnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.1. Beschichtung von Objektträgern

Die Objektträger wurden mit flüssiger Seife gewaschen und für 30min. mit A.dest. gespült. Die Beschichtung erfolgte mit Poly-L-Lysin, das nach den Herstellerangaben angesetzt wurde. Die Objektträger wurden 1 Stunde bei 70°C, oder bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

2.6.2. Immunhistochemische BrDU Färbung

BrDU Färbungen wurden mit Hilfe des Amersham Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Quantifizierung des S-Phase Eintrittes wurden mindestens 3 Blickfelder von 2 Schnitten von jeweils 3 Tieren pro Genotyp in einer 20 fache Vergrößerung analysiert. Dazu wurden positive und negative Zellen gezählt, um dann die Prozentzahl der Zellen in der S-Phase zu berechnen. Die Standardabweichung wurde mit Hilfe des Excel Programms erstellt.

Die gefrorenen Cryostatschnitte wurden in eiskaltem Methanol/ Aceton- Gemisch fixiert und anschließend für jeweils 5 Min. in 0,05% TBS-Tween, pH 7,6 gewaschen. Zum Trocknen der Schnitte wurden diese erst für 1/2 Stunde in 70% Ethanol inkubiert. Danach erfolgte die Blockade endogener Peroxidasen durch eine Inkubation der Schnitte in 3% H₂O₂/ Methanol für 10 Min.. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 70°C im Wasserbad, indem die Schnitte zuerst in einer Küvette, die 0,05N NaOH in Formamid enthielt für genau 30 Sek. inkubiert wurden. Die Schnitte wurden dann in eine zweite Küvette überführt, in der sie mit TBS Tween 0,05% pH 7,6 für 5 Min. gewaschen wurden. Anschließend erfolgte eine Neutralisation in 10mM Tri-Natrium-citrat/Formamid Puffer für 15 Min. bei ebenfalls 70°C. Die Reaktion wurde durch waschen der Schnitte in eiskaltem TBS-Tween für 15 Min. gestoppt.

Vor der Zugabe des Antikörpers erfolgte eine Extrafixierung für 30 Min. bei RT in 1% Formaldehyd in PBS, sowie nach nochmaligem Waschen in TBS-Tween eine Fixierung in 10% Glutaraldehyd/PBS bei Raumtemperatur für 10 Min.. Die Antikörperreaktion erfolgte nach dem Waschen über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte in TBS-Tween gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis des Antigens erfolgte durch die DAB Farbreaktion, für die jeweils eine Tablette in einem ml Wasser gelöst wurde. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und durch Waschen der Schnitte in PBS abgestoppt. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Mit Hilfe von Glycerolgelatine wurden die gefärbten Schnitte eingedeckelt.

2.6.3. Phospho-Histon H3 Färbung

Phospho-Histon H3 Färbungen wurden zur Amplifizierung des Signals mit Hilfe des ABC Vectastain Kits nach Anweisung des Herstellers angefertigt. Die Anfertigung dieser Färbung erfolgte auf Gefrierschnitten.

Zur Quantifizierung des M-Phase Eintrittes wurden mindestens 3 Blickfelder von 2 Schnitten und 3 Tieren des entsprechenden Genotypes in einer 20-fachen Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung erfolgte wie bereits im Kapitel 3.2. beschrieben.

Die Cryoschnitte wurden für 10 Min. in 3,7% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und erst 5 Min. in PBS, anschließend 5 Min. in H₂O gewaschen. Zur Antigenfreilegung wurden die Schnitte für 20 Min. in Antigen Unmasking Solution gekocht. Nachdem sie 15 Min. auskühlen konnten, erfolgte die Blockade endogener Peroxidasen für 20 Min. in 1% H₂O₂ in PBS. Um Kreuz-

reaktionen des primären und sekundären Antikörpers zu vermindern erfolgte eine Blockade der Leberschnitte mit Ziegenserum in 0,1% PBS-Tween nach Anweisung des ABC-Vectastain Kits. Der Antikörper wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und 1:50 in Ziegenserum in 0,1% PBS-Tween verdünnt. Nach dem Waschen der Schnitte am nächsten Morgen wurde nach den Anweisungen im ABC Vectastain Kit der sekundäre und tertiäre Antikörperkomplex angesetzt und auf den Schnitten für jeweils eine Stunde inkubiert.

Der Nachweis des Antigens erfolgte durch die DAB Farbreaktion, für die jeweils eine Tablette in einem ml Wasser gelöst wurde. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop beobachtet und durch Waschen der Schnitte in PBS abgestoppt. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Mit Hilfe von Glycerolgelatine wurden die gefärbten Schnitte eingedeckelt.

2.6.4. Feulgen Färbung

Die Feulgen Färbung wurde zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes in Hepatozyten angefertigt. Dazu wurden 3 µm Parafinschnitte genutzt. Die Ploidiebestimmung erfolgte mit dem Ahrens ICM, Zytometrie System nach den Anweisungen des Herstellers. Es wurden mindestens 300 Zellen von jeweils 2-3 Tieren pro Genotyp analysiert.

Im weiteren wurde diese Färbung zur Messung der Zellkerngröße der Hepatozyten genutzt. Diese Messung erfolgte mit dem analySIS 3.0 Soft Imaging System; mindestens 150 Zellen von mindestens 2 Genotypen wurden analysiert. Auch hier erfolgte die statistische Analyse im Institut für Biometrie. Es wurde das Gemischte Modell, sowie der multiple Post-Hoc Test genutzt. Das Gemischte Modell zeichnet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf, ohne jedoch zu benennen, zwischen welchen Gruppen diese Unterschiede liegen. Der Post-Hoc Test (Scheffe), dient der Analyse der verschiedenen Genotypen im Vergleich zum Wildtypier. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe des Excel-Programms. Zum Entparafinieren der Schnitte wurden diese für ca. 10 Min. in einen 74°C Wärmeschrank gestellt, um das Parafin zu verflüssigen. Die Entfernung des Parafins erfolgte durch eine 10 minütige Xylol Behandlung. Anschließend wurde zur Wässerung der Schnitte eine absteigende Ethanol Reihe 100, 90, 70% und Wasser durchgeführt. Die Schnitte wurden eine Stunde in 4% Formalin gepuffert, pH7, bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Die Denaturierung der DNA erfolgte für 50 Min. in 5M Salzsäure. Nachdem die Schnitte für ca. 2 Min. mit destilliertem Wasser gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in Schiffsreagenz für 20 Min. bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden danach wieder mit destilliertem Wasser gewaschen und zur Farbreaktion für 20 Min. in Sulfidwasser inkubiert. Danach erfolgte ein 5 minütiger Waschgang mit Leitungswasser. Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Ethanol Reihe 50, 70, 80, 96% jeweils für 1 Min. entwässert und nach einem weiteren Entwässerungsschritt in Xylol mit Corbit eingedeckelt.

2.6.5. β -Catenin Färbung

Die β -Catenin Färbungen wurden zur Bestimmung der Zellgröße der Hepatozyten und der Lungenepithelien auf 3 μm Paraffinschnitten angefertigt. Die Ausmessung erfolgte mit dem analy SIS 3.0 Soft Imaging System. In der Leber wurden mindestens 100 Zellen von 2-3 Tieren pro Genotyp, in der Lunge die Epithelien der Bronchioli von 3 Blickfeldern und bis zu 4 Tieren pro Genotyp analysiert. Durch das Umrunden der Zellen in einer 40 x Vergrößerung konnte mit Hilfe des Computerprogramms die Fläche der entsprechenden Zelle bestimmt werden. Die Standardabweichung für die Zellkerngröße der Hepatozyten und Lungenepithelzellen erfolgte auch hier mit Hilfe des Exel-Programms. Die statistischen Analysen für die β -Catenin Färbung der Lungenepithelien wurden im Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover angefertigt, mit Hilfe des Gemischten Modells sowie des multiplen Post-Hoc Testes.

Des weiteren diente diese Färbung auch der Bestimmung der Zellzahl pro mikroskopischen Feld. Für diese Analyse wurde die Zellzahl von mindestens 3 Blickfeldern von 4 Tieren pro Genotyp bestimmt. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte mit Hilfe des Exel-Programms.

Die Entparafinierung erfolgte wie im Abschnitt 2.4.4. beschrieben. Die Antigenfreilegung erfolgte durch Kochen der Schnitte für 20 Min. in Tris/EDTA Puffer. Die Schnitte wurden für eine Stunde im Puffer ausgekühlt und anschließend für 5 Min. in Wasser und danach in PBS gewaschen. Eine Blockade erfolgte für eine Stunde in 1% BSA FraktionV in PBS. Nach dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 20 Min. wurde der primäre Antikörper auf den Schnitten inkubiert. Der anti- β -Catenin Antikörper wurde 1:50 in 0,05% BSA in PBS verdünnt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit Dapi 1:9000 in ddH₂O gegengefärbt. Das Eindeckeln erfolgte mit Vectashield (Vector).

2.7. **Proteinchemische Analysen in Leberlysaten**

2.7.1. Herstellung der Proteinlysate aus Leber

Die schockgefrorenen Leberstückchen wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das so entstandene Gewebepulver wurde in 1ml Eppendorfgefäße überführt, die 500 μl Ripa-Puffer oder NP-40 Puffer sowie frisch zugesetzte Proteinase- und Phosphataseinhibitoren enthielten. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut, gevortext und bei 40 Amp für 20 Sek. sonifiziert. Die Trennung von Proteinlysat und Zellrückständen erfolgte durch 20 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der lysate erfolgte bei -80°C .

2.7.1.1. Analyse der Proteinlysate im Western Blot

Eine Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe des DC Protein Assays von Biorad nach den Anweisungen des Herstellers.

Die Proben wurden in vierfach konzentriertem Ladepuffer und Lysepuffer mit jeweils 10 µg Protein/µl gemischt, 5 Min. bei 95°C gekocht und 100 µg des Proteinlysates wurden auf 12% Polyacrylamidgele geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70-80V. Zur Identifizierung des Größenbereiches der verschiedenen Proteine wurde ein gefärbter Proteingrößenstandard geladen. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte über Nacht bei 30 V und 90 mAmp. in einer semitrockenen Blotkammer. Dazu wurde die auf Gelgröße zugeschnittene Membran erst mit Methanol und anschließend in 1x Transferpuffer angefeuchtet. Anschließend wurde die Membran in 5% Milchpulver/TNT für 20 Min. geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte nach zweimaligen Waschen für 6 Stunden bei Raumtemperatur. Um überschüssigen primären Antikörper zu entfernen, wurde die Membran in TNT gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion der Proteine mit ECL Lösung. Diese Lösung wurde 1:1 gemischt und für 1 Min. auf der Membran inkubiert. Es folgte die Belichtung mit ECL Hyperfilm (Amersham) für 1, 2 und 2,5 Min..

2.7.1.2. Immunpräzipitation und Kinase Assays

Immunpräzipitationen wurden durchgeführt, um Protein-Protein Interaktionen zu bestimmen, bzw. um Proteinaktivität in Kinase Assays genauer zu analysieren. Die Herstellung der Lysate erfolgte wie bereits unter 4.2. beschrieben, mit der Ausnahme, dass für CDK1 Kinase Assays der weniger stringente NP40-Lysepuffer genutzt wurde.

Immunpräzipitationen wurden mit 500 µg Leberlysat in einem Volumen von insgesamt 500 µl Lysepuffer durchgeführt. Die Lysate wurden vor der Zugabe des Antikörpers mit Protein A beschichteten Perlen für 30 Min. inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen an die Protein A Perlen vor Zugabe des Antikörpers zu vermindern. Diese Perlen wurden durch eine kurze Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 10 µl des entsprechenden Antikörpers für 2 Stunden bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Die an den Antikörper gebundenen Proteine wurden durch eine einstündig dauernde Inkubation mit 25 µl Protein A beschichteten Perlen pelletiert. Weitere unspezifische Bindungen wurden durch dreimaliges Waschen mit dem entsprechenden Lysepuffer minimiert.

Für die Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen wurden die gewaschenen Beads in zweifach konzentriertem Ladepuffer aufgenommen und wie unter 2.5.1.1. beschrieben zur weiteren Analyse elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Analyse der Aktivität verschiedener zellzyklusregulierender Proteine wurden das immunpräzipitierte Lysat nach dem Waschen in Lysepuffer noch zweimal in Histon Waschpuffer gewa-

schen. Zu dem pelletierten Lysat wurden 30 µl Histon Kinase Lösung gegeben. Dieser Ansatz wurde bei 30°C. inkubiert. Die Kinasereaktion wurde nach 30 Min. durch Zugabe von 15 µl zweifach konzentriertem Ladepuffer gestoppt. Nach dem Aufkochen der Proben wurden diese auf ein 12% Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das getrocknete Gel wurde auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) über Nacht oder für 3 Stunden exponiert.

2.8. Analyse der Expression auf RNA Ebene

Die RNA wurde aus schockgefrorenen Leberstückchen extrahiert. Diese RNA wurde für die Herstellung von cDNA genutzt, um im weiteren Verlauf durch semiquantitative PCR die Expression von Cyclin E und Cyclin A zu bestimmen.

2.8.1. RNA Extraktion

Alle für die RNA Extraktion benötigten Puffer wurden in DEP-behandeltem Wasser angesetzt. Die gefrorenen Leberstückchen wurden in 8 ml Lösung D mit Hilfe des Polytron für 30 Sek. homogenisiert. Das Homogenisat wurde mit 1/10 des Volumens 2M Natriumacetat pH 4,0; einmal Volumen Phenol (H₂O gesättigt) sowie 1/10 des Gesamtvolumens Chloroform versetzt. Die Proben wurden gevortext und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Die Abtrennung von Zellrückständen und Proteinen erfolgte durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm bei 4°C. Aus der oberen wässrigen Phase wurde die RNA durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol für Stunde bei -20°C und durch anschließende Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min. gefällt. Das Pellet wurde in 1ml DEPC-Wasser gelöst und zur weiteren Aufreinigung nochmals mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform versetzt. Die Proben wurden bei 3000 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Aus der flüssigen Phase erfolgte durch Zugabe von 0,5 Volumen 7,5M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen 100% Ethanol, einer Inkubation für 10 Min. bei RT und anschließender Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 Min. die Fällung der RNA. Das Pellet wurde in 100 µl DEP- behandeltem Wasser gelöst und nach der Konzentrationsbestimmung (OD260) bei -80°C gelagert.

2.8.1.1. Reverse Transkription der RNA in cDNA

Zur reversen Transkription wurde die SuperScriptTM Reverse Transcriptase (Invitrogen) genutzt. Die Synthese erfolgte mit 2 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl.

Reaktionsansatz für die cDNA Synthese:

4 µl 5x Puffer (geliefert mit Superscript)
2 µl 0.1M DTT
0,5 µl 10 mM dNTP
2 µl 10 µM Oligo (dT)₁₅ Primer

Dieser Ansatz wurde für 10 Min. bei 70°C inkubiert, um sekundäre Strukturen in der RNA zu denaturieren. Das Oligo Annealing erfolgte für 1 Min. bei 4°C. Nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase erfolgte die cDNA Synthese bei 42°C für 2 Stunden. Eine Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte bei 70°C für 15 Min.

2.8.1.2. Semiquantitative RT-PCR zur Expressionsanalyse

Zur Amplifikation von Ziel-Genen wurde 1 µl cDNA genutzt. Das PCR Produkt wurde auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Fragmentgröße der PCR Produkte beträgt 70 bp.

Cyclin A2: 5'TCGACGGGTTGCTCCTCTTAA 3',
5'CTGCTGGTCCTTCATGGAAAG 3';

Cyclin E1: 5'TGATGAAGGCCCTTAAGTGG 3`
5'GGCCACTTGGACATAGACAT 3`

PCR Ansatz: 2 µl 10xPuffer I
1 µl dNTPs (10mM)
1 µl /Primer (10mM)
12 µl ddH₂O
1 µl Taq
1 µl cDNA

20 µl

PCR Programm: 94°C 2 Min.

94°C	0,5 Min.	}	30 Zyklen
57°C	0,5 Min.		
72°C	0,45 Min.		

72°C 5 Min.

4°C Lagerung

Die Amplifikate der Targetsequenzen von Cyclin E1 und Cyclin A2 wurden nach der PCR in den pCR II TOPO Vector nach den Anweisungen des Herstellers subkloniert und von der Familie Agowa, Berlin sequenziert, um die Amplifikation der Targetsequenzen zu bestätigen.

Zur Kontrolle der korrekten Konzentrationsbestimmung der RNA wurde die konstitutiv exprimierte Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) amplifiziert.

GAPDH: 5'TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC 3',
5'GGTCCACCACCCTGT TGCTGTA 3'

PCR Ansatz: 2 µl 10x GAPDH Puffer
2 µl dNTPs (10mM)
2 µl /Primer (10mM)
12 µl ddH₂O.
1 µl Taq
1 µl MgCl₂ (50mM)
1 µl cDNA

20 µl

PCR Programm: 94°C 5 Min.

94°C	0,5 Min	}	25 Zyklen
54°C	1 Min		
72°C	1 Min		

72°C 8 Min.

4°C Lagerung

2.9. Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden für die Amplifikation von Adenoviren durchgeführt.

Dazu wurden HEK293 Zellen in DMEM mit 10% (v/v) FCS, mit 4,5 g/l Glucose mit 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin gehalten. Die Zelllinie geht aus einer embryonalen Nierenzelllinie (ATCC CRL-1573) hervor, die mit dem Adenovirus5 (Ad-5) transformiert wurde.

2.9. 1. Kryokonservierung von Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgte mit 10% DMSO in FCS, in dem die mit PBS gewaschenen Zellen resuspendiert wurden. Jeweils 1ml wurde in Einfriergefäße gegeben. Diese wurden in Papier eingewickelt und über Nacht bei -80°C langsam eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -150°C.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfriergefäße kurz bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 10% FCS/DMEM gewaschen und in frischem Medium ausplattiert.

2.10. Virusamplifikation

Im Verlauf dieser Arbeit wurden folgende Viren amplifiziert: AdCyclin E (AdCycE), AdCre-Rekombinase (AdCre) sowie der Kontrollvirus AdTrack.

Die in diesen Experimenten als Vektoren genutzten Adenoviren exprimieren keine E1 und E3 Proteine. Die Deletion dieser Proteine vermindert einerseits die Immunantwort des Empfängers und führt andererseits dazu, dass diese Viren in Zellen, die kein E1 Protein exprimieren replikationsdefizient sind. Die Amplifikation von Viren kann demzufolge nur in Zellen erfolgen, die E1 Proteine exprimieren. Zu solchen kompletierenden Zellen zählt die HEK293 Zelllinie.

2.10.1. Virusanzucht und Präparation

2.10.1.1. Transfektion des adenoviralen Plasmids in 293 Zellen

Bevor das Plasmid transfektiert wurde, musste es linearisiert und aufgereinigt werden.

Die Linearisierung erfolgte mit folgendem Ansatz:

6 µg Plasmid
2,5 µl NEBI
1,5 µl PacI
auf 25 µl Gesamtvolumen mit ddH₂O auffüllen
1h 37°C H₂O-Bad
1 µl für Kontrollgel

Dieser Ansatz musste vor der Transfektion in HEK293 Zellen gefällt werden. Dazu wurde der Linearisierungsansatz auf 100 µl mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurde das gleiche Volumen Phenol/TE und Chloroform gegeben. Der Ansatz wurde gevortext und für 5 Min. mit maximaler Drehzahl zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit einem 1/10 des Volumens 3M Natriumacetat pH 5,2 und dem 2,5 fachen Volumen 100% Ethanol gemischt. Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei -20°C gefällt und anschließend für 15 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µl TE aufgenommen. Bis zur Transfektion kann das linearisierte Plasmid bei -20° gelagert werden.

2.10.1.2. Calcium-Phosphat Transfektion

Die Transfektion adhärenter Zellen erfolgte nach der Calcium-Phosphat-Methode (Chen and Okayama 1988). Dabei kopräzipitiert die DNA in einem Komplex mit Calciumphosphat und wird von den Zellen vermutlich über Endozytose aufgenommen.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ pro 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Die DNA für 6 cm Schalen wurde in 250 µl CaCl₂ aufgenommen. Unmittelbar vor der Transfektion wurde 250 µl 2x Hebs-Puffer tropfenweise zugegeben, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und Tröpfchenweise in das Kulturmedium gegeben. Die Schalen wurden kurz geschwenkt und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden nach 6 Tagen für die Gewinnung des Virusüberstandes geerntet, in PBS gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wird das Pellet bei -20°C gelagert.

2.10.1.3. Gewinnung der Virussuspension aus den Zellen zur Amplifikation des Virus

Das eingefrorene Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen im 37°C Wasserbad wurden die Proben jeweils einmal gevortext. Der Virusüberstand wurde durch eine 10 minütige Zentrifugation der Proben bei 2000 U gewonnen. Der Virusüberstand einer 6 cm Schale nach der Transfektion wurde zum Animpfen einer 10 cm Zellkulturschale genutzt. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und die neue Virussuspension wurde zur nächsten Amplifikation erst auf vier 10 cm Schalen angeimpft. Diese Zellen wurden wiederum nach 48 Stunden zur Gewinnung des Virusüberstandes geerntet und dann auf fünfzehn 75 cm² Flaschen gegeben. Das so amplifizierte Virus wurde dann, wie im folgenden beschrieben, aufgereinigt und getitert.

Für weitere Virusamplifikationen wurden aufgereinigte und getiterte Viren genutzt. Die Amplifikation erfolgte in Zellkulturflaschen. Die Animpfung der Viren erfolgte mit einer MOI 5-10 auf 90% konfluenten Zellkulturflaschen in 2% FCS/DMEM.

2.10.1.4. Aufreinigung und Titer des Virus

Alle Aufreinigungsschritte erfolgten auf Eis und mit gekühlten Reagenzien.

3,5 ml des 1,4 g Cäsiumchlorids wurden mit dem gleichen Volumen 1,2 g/ml Cäsiumchlorid überschichtet. Auf diesen Gradienten wurde die Virussuspension aufgetragen, die im Anschluss mit PBS überschichtet wurde, um die Zentrifugenröhrchen zu füllen. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 100.000 xg für 4 Stunden. Die Virusbande wurde mit Hilfe einer 2 ml Spritze durch Punktion des Zentrifugenröhrchens unterhalb der Virusbande abgenommen. Diese Virussuspension wurde 1:3 mit PBS gemischt und auf einen weiteren Gradienten geladen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für eine Stunde bei 100.000 xg. Der aufgereinigte Virus wurde mit dem gleichen Volumen zweimal Storage Buffer gemischt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zur Bestimmung der Viruspartikel erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 260 nm.

Die Proben wurden hierzu 1:20 in 0,1% SDS verdünnt, für 30 Sek. gevortext und dann zur Doppelbestimmung genutzt. Der Leerwert wurde wie folgend angesetzt.

- Leerwert:**
- CsCl 1,4 g/ml und 1,2 g/ml 1:1 mischen
 - gleiches Volumen an Storage Puffer dazugeben
 - Mischung 1:20 in 0,1% SDS

Von den ermittelten OD wurden die Mittelwerte gebildet und die Anzahl der Viruspartikel bestimmt.

$$\text{Anzahl der Viruspartikel/ml (AVP)} = \text{Mittelwert } X_{\text{OD}} \times 20 \times (1 \times 10^{12})$$

Die Titerung des Virus, d.h. die Bestimmung der infektiösen Partikel (IP) erfolgte mit dem Adeno-XTMRapid Titer Kit (BD Transduction Lab.) genau nach den Benutzer Anweisungen. Die im folgenden angegebene Formel kann genutzt werden, um zu berechnen jeder wievielte Partikel (X) infektiös ist.

$$X = \text{Anzahl der Viruspartikel pro ml/infektiösen Partikel pro ml}$$

Je nach Virus gibt dieser Quotient an, wie gut die Viruspräparation erfolgt ist. Die in dieser Arbeit amplifizierten Viren zeigten, dass jeder 30-40 Partikel der Viruspräparation infektiös war.

2.10.1.5. Injektion des Virus in Mäuse

Der Virus wurde vor der Injektion in die Tiere dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei 4°C für mindestens 2x30 Min.. Nach der Dialyse wurde die optische Dichte der Viruspartikel im Dialysat bestimmt, um die Ausbeute zu determinieren. Dazu wurde das Virusdialysat 1:20 in 0,1% SDS verdünnt, 30 Sek. gevortext, um anschließend die OD bei 260 nm zu bestimmen.

$$\begin{aligned} & \text{Anzahl der Viruspartikel pro ml nach der Dialyse (AVPD)} \\ & = \text{Mittelwert } X_{OD} \times 20 \times (1 \times 10^{12}) \end{aligned}$$

$$\text{Bestimmung der Ausbeute in Prozent} = (\text{AVP} / \text{AVPD}) \times 100$$

Mit Hilfe dieser OD konnten die infektiösen Partikel im Dialysat bestimmt werden.

$$\begin{aligned} & \text{Bestimmung der infektiösen Partikel im Dialysat} \\ & = \text{AVPD/IP durch Titerbestimmung} \end{aligned}$$

In Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment wurden bis zu 1×10^8 infektiöse Partikel/g Maus in die Schwanzvene injiziert. Dazu wurden die Schwänze der Mäuse in warmes Wasser getaucht, um die Schwanzvenen zu dilatieren. Die Injektion des Virus erfolgte mit einer Insulinkanüle. Es wurden maximal 500 µl Virussuspension, im gegebenen Fall mit Dialysepuffer verdünnt, injiziert.

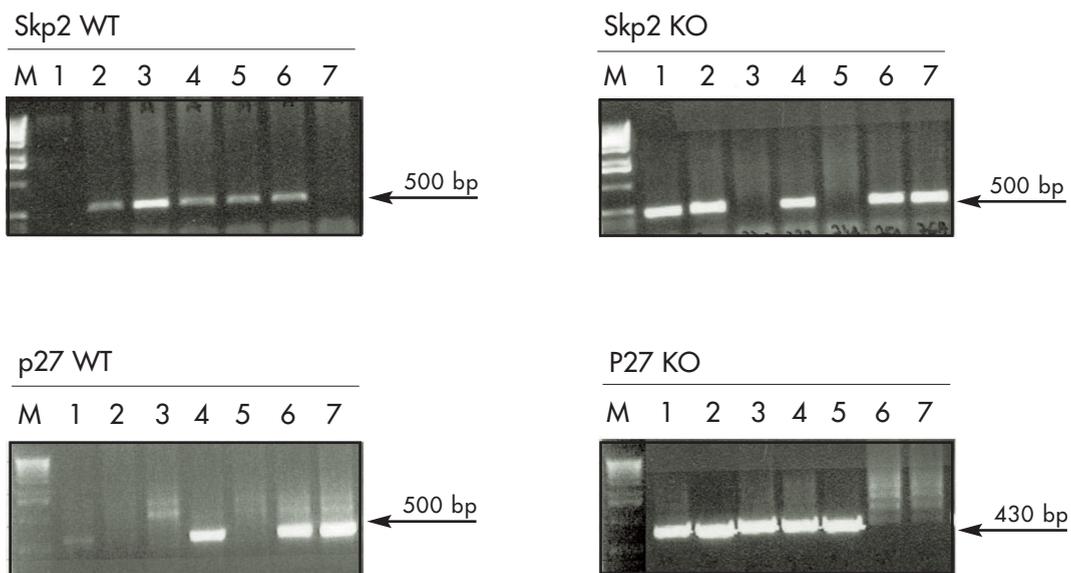
3.0. RESULTATE

3.1. Die Funktion von Skp2 in der Regulation der Zellzyklusprogression

3.1.2. Genotypisierung der Mäuse

3.1.2.1. Generation und Identifizierung der Skp2/p27 doppel knock out Mäuse

Um die Bedeutung der p27 Akkumulation in der Ausbildung des Skp2 knock out Phänotyps genauer zu analysieren, wurden p27 knock out Mäuse mit Skp2 knock out Mäusen gekreuzt. Weibliche homozygote p27 knock out Mäuse sind infertil. Deshalb erfolgte die Erzeugung von doppel knock out Tieren durch die Verpaarung von p27 heterozygoten Tieren in einem Skp2 knock out oder Skp2 heterozygoten Hintergrund (Fero, Rivkin et al. 1996). Die Identifikation der Skp2 knock out und Skp2/p27 doppel knock out Mäuse erfolgte nach der Isolation der DNA aus Schwanzspitzenbiopsien. Abbildung 5 zeigt die Genotypisierung von Skp2 knock out, Skp2/p27 doppel knock out und Wildtypen durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die Genotypisierung zeigt ein Skp2/p27 doppel knock out und ein Skp2 knock out Tier und beruht auf dem Nachweis des Wildtypallels und dem knock out des 1.-3. Allels des Skp2 Genes.



Genotypisierung von Skp2/P27 knock out Mäusen

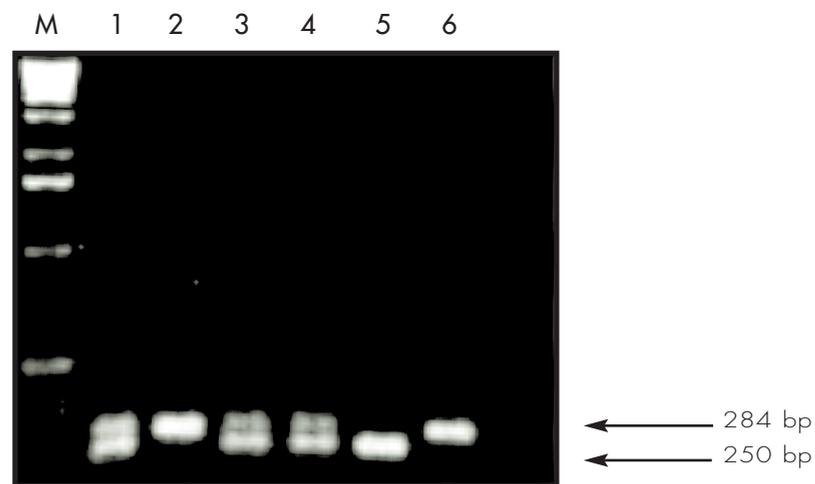
Tiere, die das Skp2 WT Allel tragen zeigen ein PCR Produkt bei 500bp. Bei Tieren, die ein knock out Allel tragen, ist eine Bande bei 430bp nachzuweisen. Die Analyse des p27 knock outs erfolgte auch durch den Nachweis des Wildtyp und knock out Allels, deren PCR Produkte beide eine Bande bei 500bp zeigten. M bezeichnet den 1Kb Basenpaarmarker, 1: Skp2/p27 doppel knock out, 7: Skp2 knock out, p27 WT

Abbildung 5

3.1.2.2. Genotypisierung der p27T187A knock in Mäuse

Die p27T187A knock in Mäuse wurden in die Analysen mit einbezogen, um die Effekte der Reakkumulation von p27 in der S-Phase auf das Proliferationsverhalten der Hepatozyten in vivo genauer zu untersuchen. Die Zucht erfolgte mit heterozygoten Tieren, um auch Wildtyptiere als Kontrolltiere zu erhalten. Die Identifikation erfolgte mit Hilfe der PCR. Der Nachweis des Wildtyp und knock in Allels erfolgte durch ein Primerpaar, das für den Wildtypen eine Bande von 250 bp lieferte, während das gleiche Primerpaar das knock in Allel amplifiziert, jedoch durch die Insertion einer LoxP Stelle, die von der Cre-Rekombinase erkannt wird, um 34 bp vergrößert ist.

Abbildung 6 zeigt die Genotypisierung der p27T187A knock in Mäuse.



Genotypisierung der p27T187A knock in Mäuse. Das Wildtypallel zeigt eine Bande bei 250bp, das knock in Allel eine Bande bei 284bp. M bezeichnet den 1kb Basenpaarmarker, Probe 1, 3, 4 tragen ein p27T187A knock in und ein Wildtypallel. Bei Probe 2 und 6 handelt es sich um p27T187A homozygote knock in Tiere, während Tier Nr. 5 ein Wildtypier ist.

Abbildung 6

3.1.3. Die Analyse der Phänotypen der Skp2/p27 doppel knock out Mäuse

Um die Phänotypen der Skp2, Skp2/p27 doppel knock out Mäuse der Wildtypiere sowie der p27T187A knock in Tiere zu untersuchen, wurden verschiedene Analysen durchgeführt, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind. Wildtypiere mit denen die Phänotypen verglichen wurden, sind jeweils aus den gleichen Zuchtansätzen, aus denen auch die Skp2 knock out und Skp2/p27 doppel knock out Tiere hervorgegangen sind. Da p27T187A knock in Tiere durch Inzuchten erhalten wurden, erfolgte der Vergleich hier, mit Wildtypieren, die ebenfalls aus dieser Zucht erhalten wurden.

Histologische Analysen
Hämatoxilin- Eosin Färbung

Abb. 7

Abbildung der β -Catenin Färbung

Abb. 8

Bestimmung der Zellzahl
der Hepatozyten pro mikroskopischen Feld

Abb. 9

Bestimmung der
Zellgröße der Hepatozyten

Abb. 10

Bestimmung der Zellkerngröße

Abb. 12

Bestimmung des DNA Gehaltes
der Hepatozyten durch Feulgen Färbung

Abb. 11,13

Bestimmung der Zellgröße der Lungenepithelzellen

Abb. 14

Analysen der Zellzyklusprogression

Messung des S-Phase Eintrittes der Hepatozyten durch BrDU Aufnahme
in Wildtyp, Skp2ko, doppel knock Tieren

Abb. 15

Messung des M-Phase Eintrittes der Hepatozyten durch Phospho-HH3-Färbung
in Wildtyp, Skp2ko, doppel knock Tieren

Abb. 16

Messung des S-Phase Eintrittes der Hepatozyten
durch BrDU Aufnahme in Wildtyp und p27T187A knock in Tieren

Abb. 17

*Auflistung der
Analysen,
die zur Untersuchung
der Phänotypen
und der Zellzyklus-
regulation
durchgeführt wurden.*

Messung des M-Phase Eintrittes der Hepatozyten durch HH3-Färbung
in Wildtyp und p27T187A knock in Tieren

Abb. 18

Molekulare Analysen der Zellzyklusprogression

Analyse der Akkumulation eines anderen Skp2 Zielproteines
in Wildtyp, Skp2ko, doppel knock out
und p27T187A knock in Tieren

Abb. 19

Analysen der G1-Cycline

Bestimmung der G1-Cycline durch Western Blots

Abb. 20

Analyse der Expression des G1-Cyclins Cyclin E

Abb. 21

Bestimmung der Cyclin E/CDK2-Kinaseaktivität

Abb. 22

Bestimmung der Bindung von p27 an
Cyclin E- Kinase Komplexe

Abb. 22

Analyse des S-Phase Cyclins

Analyse des S-Phase Cyclins Cyclin A

Abb. 23

Analyse der Expression von Cyclin A

Abb. 24

Untersuchung der Cyclin A Kinaseaktivität

Abb. 25

Untersuchung der Bindung von p27 an Cyclin A Komplexe

Abb. 25

Analyse der mitotischen Cycline

Untersuchung des mitotischen CDK1-Komplexes

Abb. 26

Untersuchung der CDK1 Kinaseaktivität

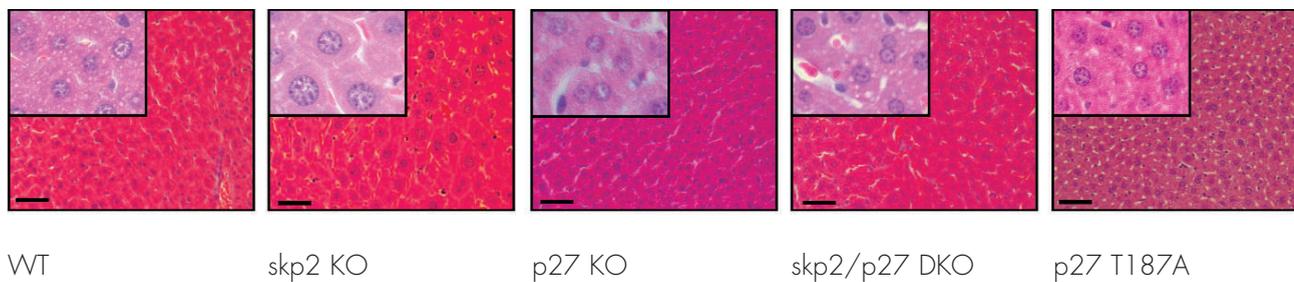
Abb. 26

Untersuchung der Fähigkeit von p27 mitotische CDK1-Komplexe zu inhibieren

Abb. 26,27

3.1.3.1. Histologische Analyse von Lebergewebe der Skp2, p27/Skp2 doppel knock out Maus und der p27T187A knock in Mäuse

Der prägnanteste Phänotyp der Skp2 knock out Mäuse wurde in Hepatozyten beschrieben. Diese Zellen zeigen einen stark erhöhten DNA Gehalt, der sich auch in der Zellgröße der Hepatozyten und ihrer Zellkerne widerspiegelt (Nakayama, Nagahama et al. 2000). Die weitere Untersuchung der Phänotypen stützte sich demzufolge auf eine genaue Analyse der Hepatozyten. Diese Untersuchungen beinhalteten die Auswertung histologischer Hämatoxilin-Eosin Färbungen, sowie die Bestimmung der Anzahl der Hepatozyten pro mikroskopischen Feld, der Zell- und Zellkerngröße, aber auch die Untersuchung des DNA Gehaltes der Hepatozyten. Abbildung 7 zeigt repräsentative histologische Schnitte der verschiedenen Genotypen im Vergleich zu Wildtyptieren. Bereits der mikroskopische Vergleich zeigt eine deutliche Vergrößerung der Zellen der Skp2 knock out Mäuse im Vergleich zu den anderen Genotypen. Auch die Zellkerne der Skp2 knock out Mäuse sind stark vergrößert. In Skp2/p27 doppel knock out Mäusen zeigt sich diese Zellvergrößerung nicht. Die Zellgröße der Hepatozyten und ihrer Zellkerne ist in diesen Tieren vergleichbar mit den Wildtyptieren, den p27 knock out Tieren und den p27T187A knock in Tieren.

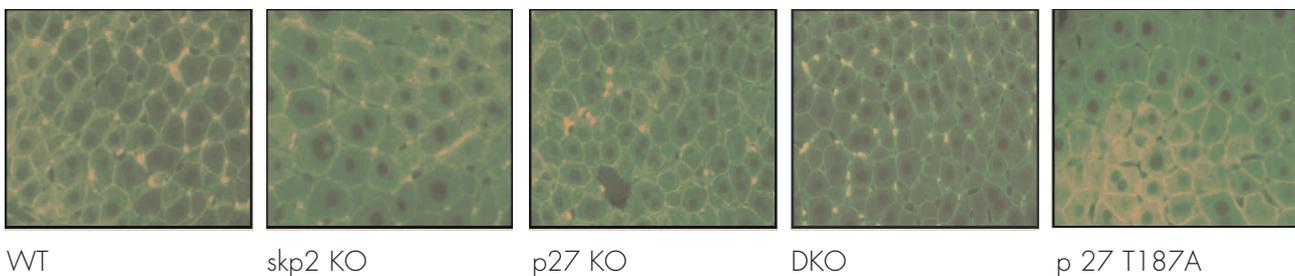


Hämatoxilin-Eosin Färbungen von Leberschnitten der Skp2 und Skp2/p27 knock out Mäuse im Vergleich zu den anderen Genotypen. Die Hepatozyten und die Zellkerne sind in den Skp2 knock out Mäusen sehr stark vergrößert. Im Gegensatz dazu zeigen Skp2/p27 Tiere knock out eine normale Hepatozytengröße.

Abbildung 7

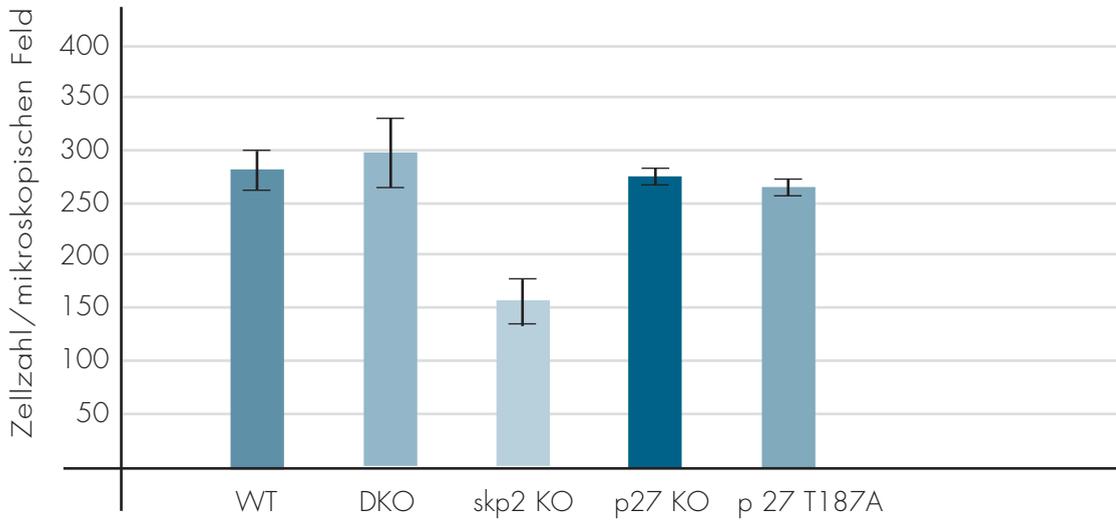
Die indirekte Bestimmung der Zellgröße erfolgte durch die Analyse der Zellzahl pro mikroskopischen Feld, mit Hilfe der β -Catenin Färbung. Die β -Catenin Färbung ist eine Zellmembranfärbung, die es erlaubt einzelne Zellen voneinander zu unterscheiden. Catenine sind Verbindungsproteine zwischen Zelladhäsionsmolekülen und dem Zytoskelett, so können Zell/Zellverbindungen aufgebaut werden. Der intrazelluläre Catenin Komplex besteht aus den gamma-, alpha- und beta-Cateninen, die die Verbindung zwischen Cadherin, welches den Kontakt zu extrazellulären Komponenten aufbaut und dem intrazellulären Aktinskelett aufrecht erhalten. Beta-Catenin ist demzufolge an der intrazellulären Membranseite lokalisiert (Alberts, 3. Auflage).

Abbildung 8 zeigt die β -Catenin Färbung von Leberschnitten der verschiedenen Genotypen.



β -Catenin Färbung von Leberschnitten der Wildtypmäuse, Skp2 knock out, p27 knock out und Skp2/p27 doppel knock out Mäuse, sowie der p27T187A knock in Mäuse. Die Hepatozyten der Skp2 knock out Mäuse sind im Vergleich zu den anderen Genotypen stark vergrößert. Abbildung 8

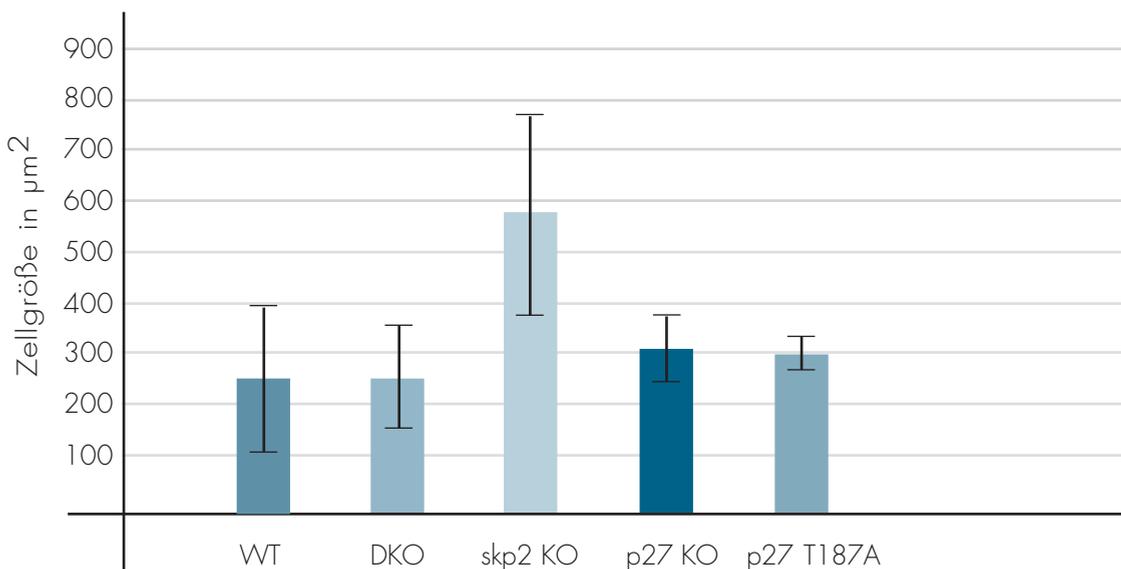
Die Quantifizierung einzelner Hepatozyten und somit die Bestimmung der Zellzahl pro mikroskopischen Feld erfolgte durch die Auszählung von 3 Blickfeldern von 4 Tieren für jeden Genotyp. In Abbildung 9 ist die Auswertung dieser Analyse dargestellt. Sie zeigt die durchschnittliche Anzahl von Hepatozyten in einem Blickfeld. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte mit Hilfe des Excel Programms, das die Standardabweichung ausgehend von einer Grundgesamtheit, berechnet. Die Anzahl der Hepatozyten pro mikroskopischen Feld der Skp2/p27 doppel knock out Mäuse gleicht der Anzahl der Hepatozyten pro mikroskopischen Feld der Wildtyp, p27 knock out und p27T187A knock in Tiere. Die Analysen der Skp2 knock out Leberschnitte jedoch weist deutlich weniger Zellen pro mikroskopischen Feld auf. Diese Untersuchungen bestätigen die Hämatoxylin-Eosin Färbungen, in denen bereits erkennbar war, dass die Vergrößerung der Hepatozyten, wie sie in den Skp2 knock out Tieren beobachtet werden kann, durch den Verlust von p27 revertiert wird, d.h. die Zellen der Skp2 knock out Mäuse sind stark vergrößert, während die der doppel knock out Tiere eine normale Zellgröße aufweisen.



Bestimmung der Zellzahl der Hepatozyten pro mikroskopischen Feld. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der Hepatozyten. Der Verlust von p27 in der Skp2 knock out Maus führt zu einem Anstieg der Zellzahl pro mikroskopischen Feld, vergleichbar zu den wt, p27 knock out, p27T187A knock in.

Abbildung 9

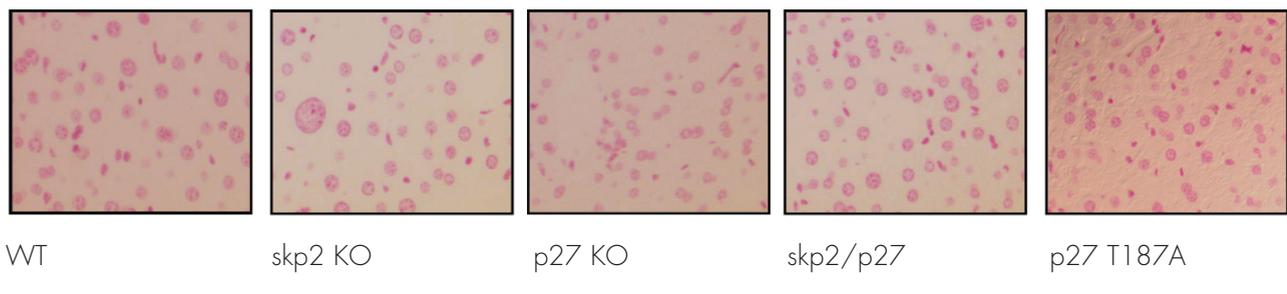
Der direkte Nachweis der Zellgröße erfolgte durch die Ausmessung der Zellen auf Leberschnitten, die für β -Catenin gefärbt waren, mit Hilfe des analySIS^{3.0} Soft Imaging System. Durch das Umrunden der Zellen mit Hilfe der Maustaste berechnet dieses Programm nach der Eichung, automatisch den Zellumfang der entsprechenden Zelle. Mit dieser Methode wurden mindestens 100 Zellen von 2-3 Tieren pro Genotyp analysiert. Abbildung 10 zeigt die Auswertung der Zellgröße. Dies bestätigt die mikroskopischen Untersuchungen und beweist, dass die Skp2 knock out Hepatozyten fast zweimal so groß sind als die Hepatozyten der anderen Genotypen.



Bestimmung der Zellgröße der Hepatozyten. Dargestellt ist die durchschnittliche Zellgröße der Hepatozyten der unterschiedlichen Genotypen. Die Skp2 knock out Hepatozyten sind stark vergrößert im Vergleich zu Wildtypen und anderen Genotypen.

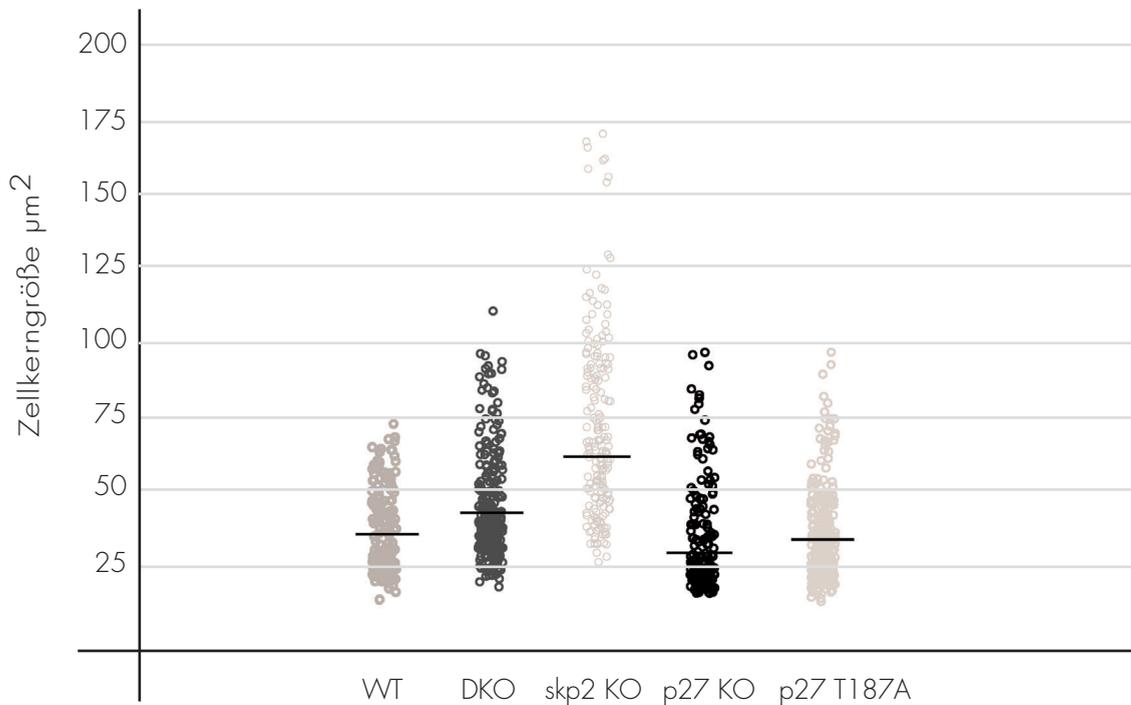
Abbildung 10

Die histologischen Untersuchungen zeigen auch, dass Skp2 knock out Hepatozyten stark vergrößerte Zellkerne haben. Um diesen Phänotyp zu untersuchen, wurden Feulgen Färbungen angefertigt. In Abbildung 11 sind repräsentative Abbildungen dieser Feulgen-Färbung zu sehen.



Feulgen Färbung von Leberschnitten der Wildtypmäuse, Skp2 knock out, p27 knock out, Skp2/p27 doppel knock out und p27T187A knock in Mäuse. *Abbildung 11*

Die Färbung der Zellkerne ermöglicht eine Bestimmung der Zellkerngröße. Dabei wurde der Durchmesser der Zellkerne mit Hilfe des *analySIS* 3.0 Soft Imaging System bestimmt. Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover. Es wurde das gemischte Modell, sowie der Post-Hoc Test verwendet. In Abbildung 12 ist die Auswertung der Zellkerngröße dargestellt. Auch hier wurden mindestens 150 Zellkerne von mindestens 2 Tieren pro Genotyp analysiert. Die Analyse bestätigt die bisherigen Analysen und zeigt, dass Skp2 knock out Tiere stark vergrößerte Zellkerne im Vergleich zu den Wildtyptieren und anderen Genotypen haben. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant (siehe Anhang). Der Verlust von p27 in der Skp2 knock out Maus revertiert auch diesen Skp2 knock out Phänotyp.

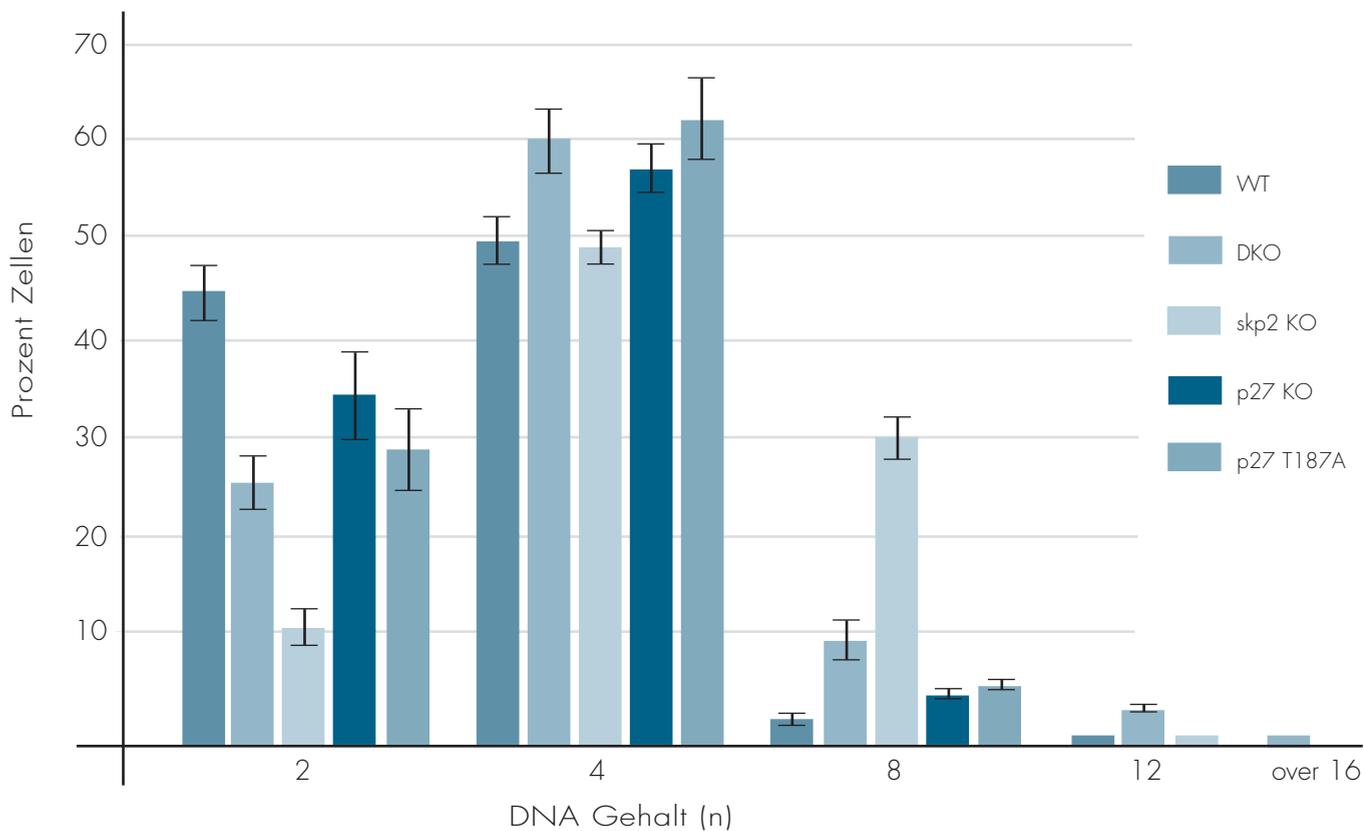


Bestimmung der Zellkerngröße auf Leberschnitten. Der Verlust von p27 in der Skp2 knock out Maus führt zu einer Normalisierung der Zellkerngröße.

Abbildung 12

Die Feulgen Färbung ist eine densitometrische Färbung, die es erlaubt, durch die Bestimmung der optischen Dichte der Zellkerne nach der Färbung, Rückschlüsse auf den DNA Gehalt der Zelle zu ziehen (Hardie, Gregory et al. 2002)(Vilhar, B. 2001). Mit Hilfe des Vergleichs zu Lymphozytenzellkernen, die einen DNA Gehalt von $2n$ haben, lässt sich der DNA Gehalt der Hepatozyten bestimmen.

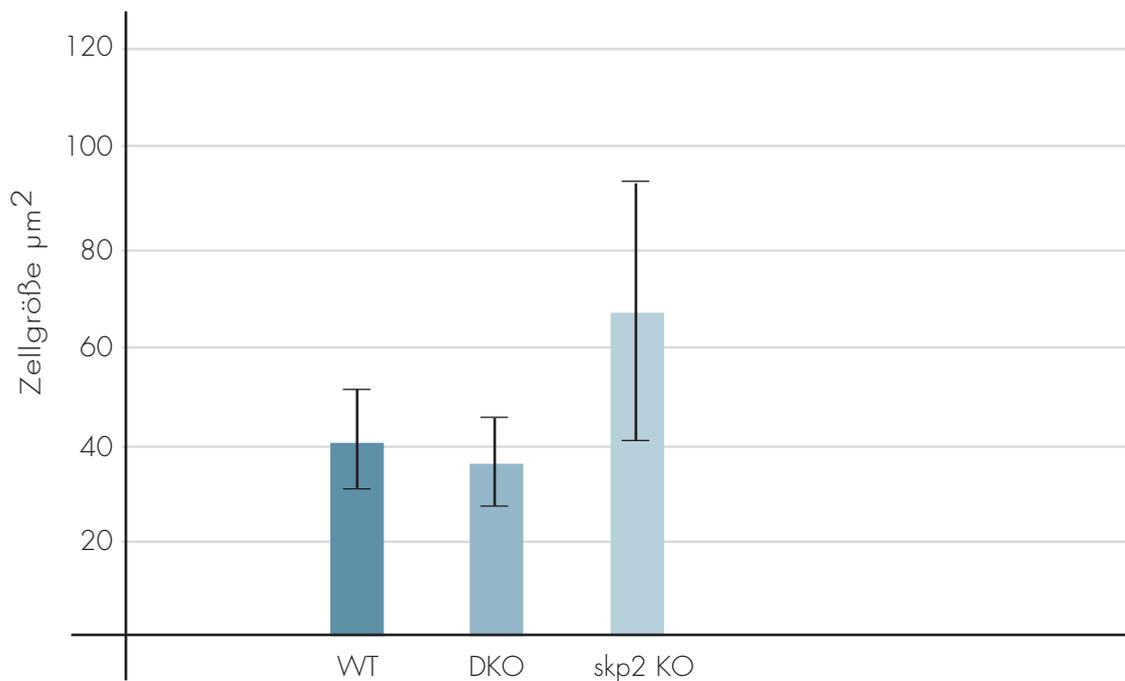
Da der Skp2 knock out Phänotyp auch durch den Anstieg des DNA Gehaltes der Hepatozyten charakterisiert ist (Nakayama, Nagahama et al. 2000), wurde die Feulgen Färbung genutzt, um den DNA Gehalt in den Hepatozyten der verschiedenen Genotypen zu untersuchen. Dazu wurden 300 Hepatozyten von mindestens 2-3 Tieren pro Genotyp analysiert wurden. Die Auswertung ist in Abbildung 13 dargestellt. Der DNA Gehalt der Wildtyp Hepatozyten liegt hauptsächlich zwischen $2n$ und $4n$. Nur sehr wenige Zellen (unter 5%) weisen einen DNA Gehalt von $8n$ auf. Der DNA Gehalt (Ploidie) der p27 knock out und p27T187A knock in Mäuse, ist mit den für die Wildtypen erhaltenen Werten vergleichbar. In Skp2 knock out Lebern dahingegen finden sich hauptsächlich Hepatozyten mit einem DNA Gehalt von $4n$ (ca. 50% der Zellen), sowie Zellen mit einem DNA Gehalt von $8n$ (ca. 30%). Der Anstieg der Ploidie in Skp2 knock out Hepatozyten, wird somit durch den Verlust von p27 zum Großteil revertiert. So zeigen 10% der Hepatozyten dieser Tiere einen DNA Gehalt von $2n$, ca. 50% einen $4n$, aber nur 10% der Hepatozyten weisen einen DNA Gehalt von $8n$ auf. Der Anstieg der Ploidie in den Skp2 knock out Mäusen kann demzufolge u.a. auf die Akkumulation von p27 zurückgeführt werden.



Bestimmung des DNA Gehaltes der Hepatozyten der aufgezeichneten Genotypen. Dargestellt sind die Prozentzahlen der Hepatozyten mit einem DNA Gehalt von $2n$, $4n$, $8n$, $12n$ und über $16n$. Der Verlust von p27 führt zu einer annähernden Normalisierung des DNA Gehaltes im Skp2 knock out Hintergrund, deren Hepatozyten einen deutlich höheren DNA Gehalt (bis zu $12n$) aufweisen.

Abbildung 13

Um zu überprüfen, ob der Verlust von p27 auch zu der Normalisierung des Skp2 knock out Phänotyps in anderen Geweben führt, wurden histologische Präparate von Lungengewebe ebenfalls mit dem β -Catenin Antikörper gefärbt, da der Phänotyp der Skp2 knock out Mäuse auch in den Lungeneithelien der Bronchioli auftritt (Nakayama, Nagahama et al. 2000). Abbildung 14 zeigt die Auswertung von mindestens 3 Blickfeldern von bis zu 4 Tieren pro Genotyp. Wie in den Hepatozyten führt auch hier der Verlust von p27 im Skp2 knock out Hintergrund zu einer Normalisierung der Zellgröße der Eithelien der Bronchioli. Die Analyse der statistischen Signifikanz erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover. Auch hier wurde das gemischte Modell, sowie der Post-Hoc Test verwendet. Die Unterschiede zwischen den Skp2 knock out Tieren, den Wildtypen und dem Doppel knock out sind signifikant (siehe Anhang).



Bestimmung der Zellgröße in den der Lungeneithelien. Der Verlust von p27 in der Skp2 knock out Maus führt auch hier zu einer Normalisierung der Zellgröße, die für den Skp2 knock out charakteristisch ist.

Abbildung 14

Zusammenfassend zeigen die histologischen Analysen zur Zellgröße, Zellkerngröße und der Bestimmung des DNA Gehaltes, dass in Skp2/p27 doppel knock out Tieren die Phänotypen der Skp2 knock out Maus nicht nachzuweisen sind. Der Phänotyp der Skp2 knock out Maus wird charakterisiert durch eine starke Vergrößerung der Hepatozyten sowie einen erhöhten DNA Gehalt (Nakayama, Nagahama et al. 2000) und wird, wie bisher gezeigt wurde durch die Akkumulation von p27 verursacht. Auch in der Lunge führt der Verlust von p27 zu einer Normalisierung des Phänotyps.

3.1.3.2. Induktion von Proliferation in Hepatozyten durch partielle Hepatektomie

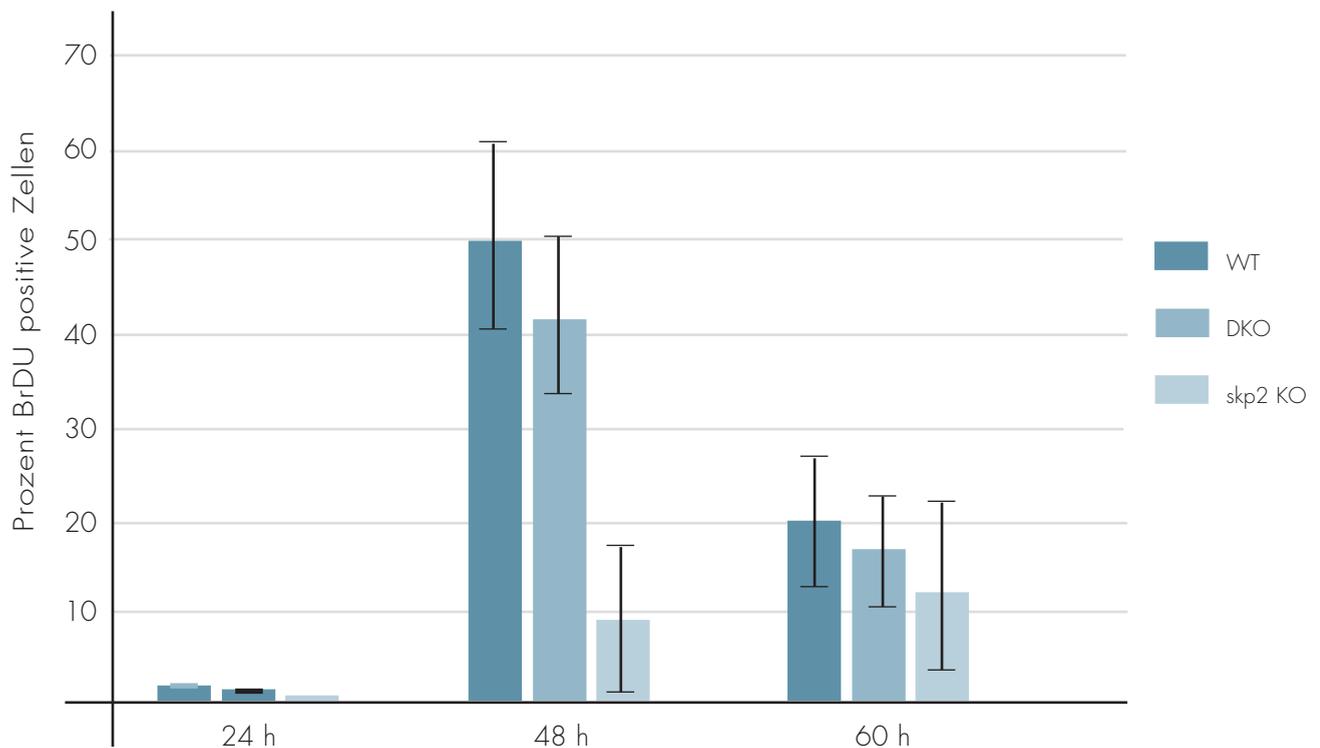
Die Induktion der Proliferation der Hepatozyten erfolgte durch partielle Hepatektomie von 2/3 der Leber. In Kapitel 1.1.1. Methoden zur Analyse der Zellzyklusprogression wurde bereits beschrieben, dass ein synchroner Eintritt der verbleibenden Hepatozyten in den Zellzyklus durch partielle Hepatektomie erfolgt. Dadurch ist eine Analyse der Zellzyklusprogression der verschiedenen Genotypen möglich. 24 Stunden nach partieller Hepatektomie befinden sich die Hepatozyten in der G1-Phase des Zellzyklus (Michalopoulos and DeFrances 1997). Die meisten Hepatozyten treten 48 Stunden nach der Leberentnahme in die S-Phase ein und gehen 12 Stunden später in die Mitose über.

Wie bereits in Kapitel 1.6.2.1.1. beschrieben, ist der Skp2 knock out Phänotyp auch durch einen Proliferationsdefekt gekennzeichnet. Die Analyse der Proliferationsfähigkeit

der Skp2/p27 doppel knock out Mäuse erfolgte im Vergleich zu den Skp2 knock out und Wildtyptieren.

Um den S-Phase Eintritt zu untersuchen, wurde den Tieren zwei Stunden vor der Tötung durch cervikale Dislokation BrDU intraperitoneal injiziert. Diese Substanz ist ein Thymidinanalogon, das während der DNA-Synthese in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. BrDU wird im weiteren Verlauf durch eine Antikörperfärbung auf Gefrierschnitten nachgewiesen. Die Bestimmung der Zellen in der S-Phase erfolgte durch die Auszählung der BrDU positiven Zellen sowie der negativen Zellen, so dass die Prozentzahl der Zellen, die in die S-Phase eintreten, berechnet werden konnte. Dazu wurden 3 Blickfelder von jeweils 2 Schnitten und 3 Tieren pro Zeitpunkt analysiert. Die Standardabweichung wurde mit Hilfe des Excel Programmes berechnet.

Der S-Phase Eintritt in Wildtyp und Skp2/p27 doppel knock out Hepatozyten erfolgte, wie in Abbildung 15 dargestellt ist, 48 Stunden nach partieller Hepatektomie. Zu diesem Zeitpunkt proliferierten 40-50% der Zellen. Nach 60 Stunden waren dahingegen nur noch ca. 20% der Zellen in der S-Phase. In den Skp2 knock out Hepatozyten erfolgte nur eine minimale Aufnahme von BrDU. 48 Stunden nach partieller Hepatektomie befanden sich nur 10% der Zellen in der S-Phase. Auch nach 60 Stunden proliferierten nur 10% der Skp2 knock out Hepatozyten.

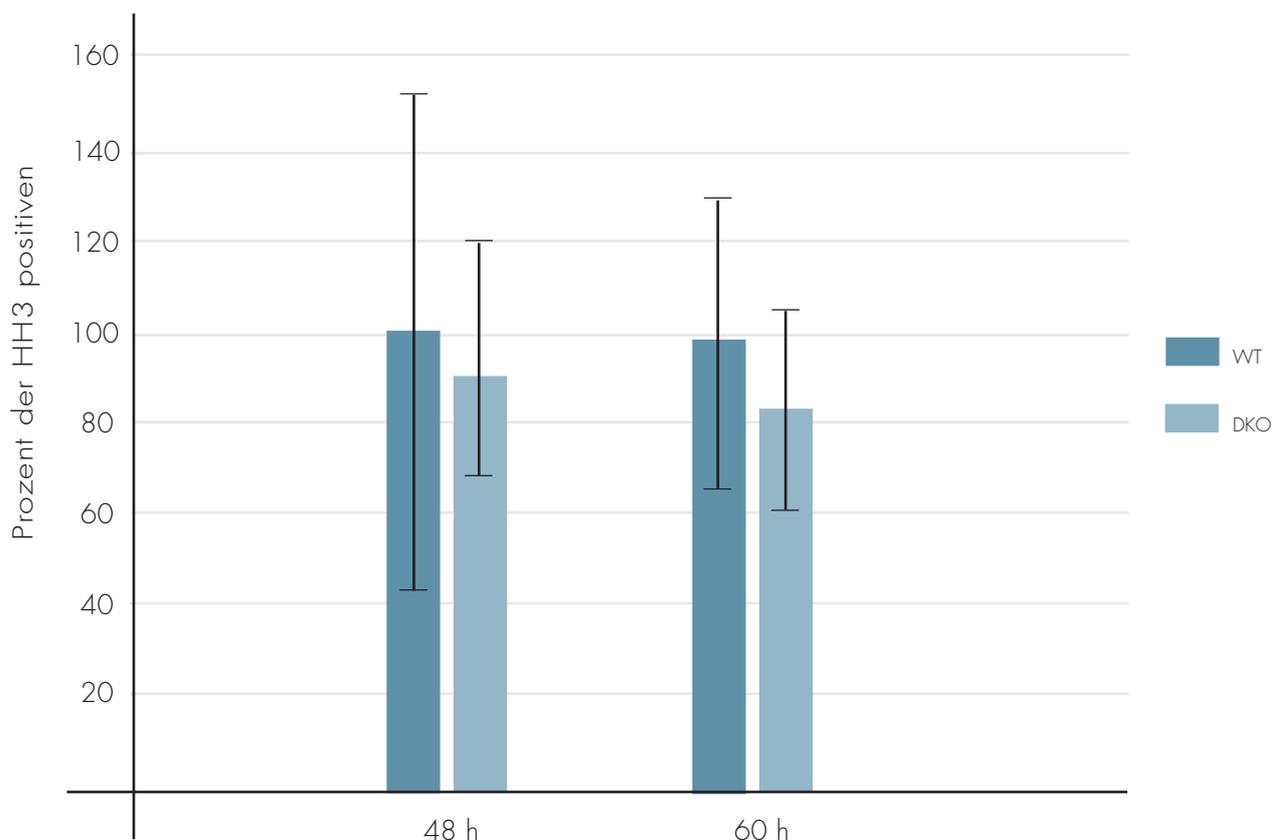


S-Phase Eintritt in Hepatozyten durch BrDU Aufnahme in Wildtyp, Skp2 knock out und doppel knock out Tieren. Dargestellt sind die Prozentzahlen der Zellen, die nach 48 Stunden, bzw. 60 Stunden in die S-Phase eingetreten sind. Der Verlust von p27 führt zu einem S-Phase Eintritt, der vergleichbar mit dem der Wildtypiere ist.

Abbildung 15

Um zu überprüfen, ob die Hepatozyten den gesamten Zellzyklus durchlaufen, wurden Histon H3 Färbungen angefertigt, die den mitotischen Eintritt der Hepatozyten markieren. Die Histon H3 Phosphorylierung erfolgt am Übergang der G2 in die M-Phase punktförmig um die Centrosomen. Wenn die Zelle in die Mitose übergeht breitet sich diese Phosphorylierung auf das gesamte Genom aus. Am Ende der Mitose wird Histon H3 dephosphoryliert (Prigent and Dimitrov 2003).

Diese Färbungen zeigen, dass Skp2/p27 doppel knock out Mäuse in die Mitose eintreten (Abbildung 16). Dabei konnten keine Unterschiede in der Prozentzahl, der in die Mitose eintretenden Hepatozyten im Vergleich zum Wildtypen festgestellt werden. Dagegen konnte in Skp2 knock out Hepatozyten keine Histon H3 Phosphorylierung und mitotischen Ereignisse, nachgewiesen werden.



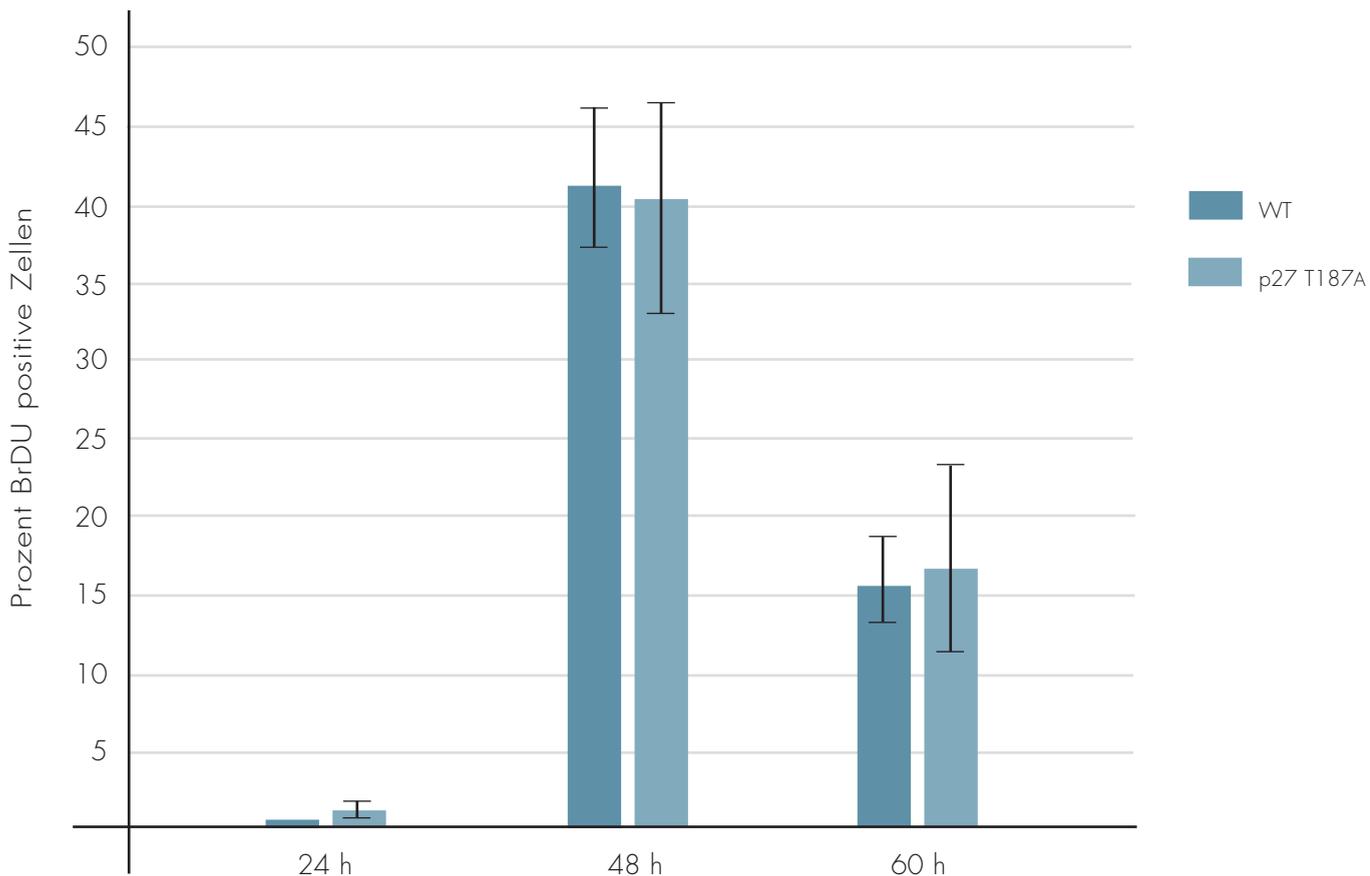
M-Phase Eintritt der Hepatozyten; HH3 Färbung in Wildtyp, Skp2 knock out und doppel knock out Tieren, 48 Stunden und 60 Stunden nach partieller Hepatektomie. p27/Skp2 doppel knock out Mäuse zeigen eine normale Zellzyklusprogression und einen normalen mitotischen Eintritt. Dargestellt ist die Prozentzahl der HH3 positiven Zellen im Verhältnis zum Wildtypen.

Abbildung 16

Im weiteren wurden in diese Analysen auch die p27T187A knock in Tiere einbezogen. In Abbildung 17 ist der Eintritt von p27T187A knock in Hepatozyten in die S-Phase dargestellt. Auch in diesen Tieren erfolgte die Induktion der Proliferation durch partielle Hepatektomie. Der S-Phase Eintritt der Hepatozyten wurde durch Antikörperfärbungen für BrDU nachgewiesen. Dazu wurden 3 Blickfelder von jeweils 2 Schnitten und 3 Tieren pro

Zeitpunkt analysiert. Die Standardabweichung wurde mit dem Excel Programm berechnet. Da es sich bei der p27T187A knock in Zucht um eine Inzucht handelt, wurde die Zellzyklusprogression in Wildtyptieren aus dieser Inzucht analysiert.

Die Färbungen zeigen, dass in p27T187A Hepatozyten ein normaler Eintritt in die S-Phase erfolgt.

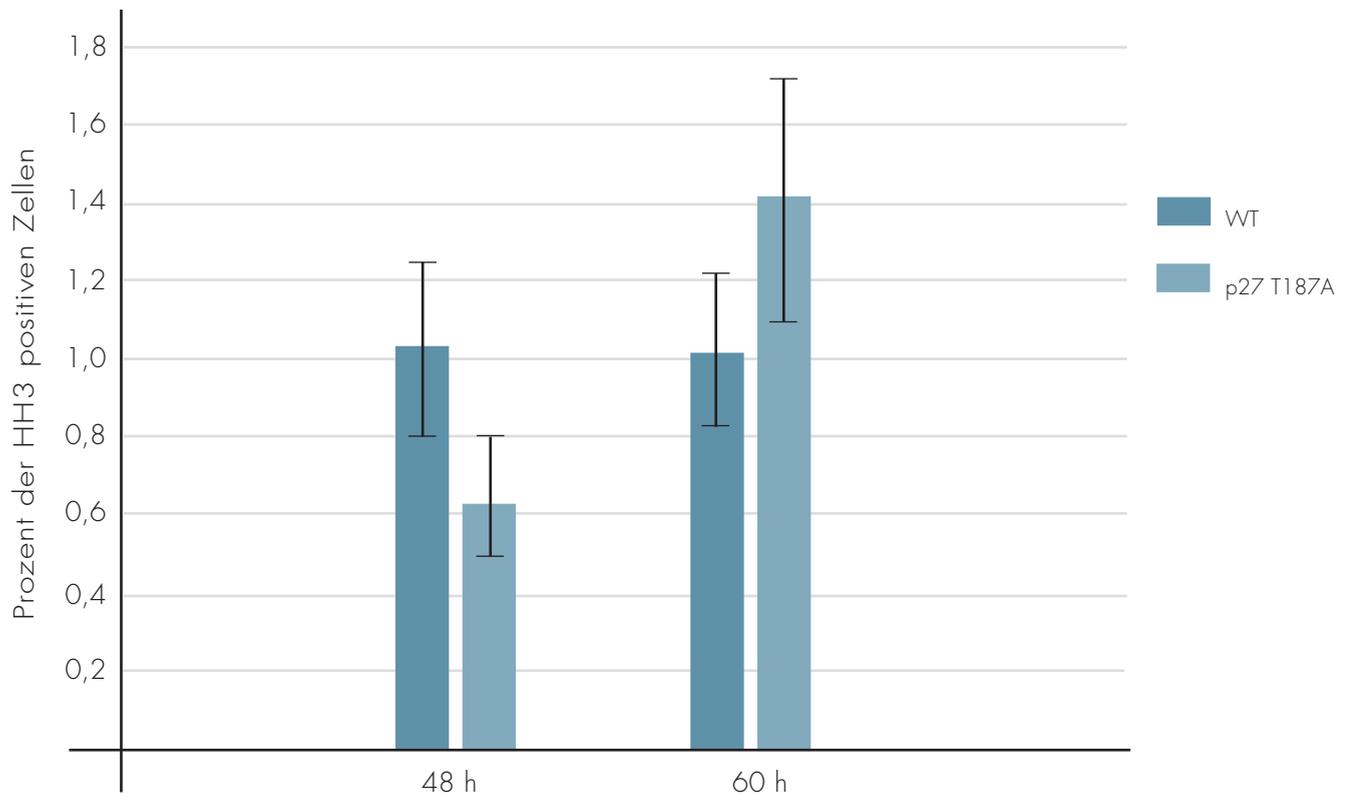


S-Phase Eintritt in Hepatozyten durch BrDU Aufnahme in p27T187A knock in und Wildtyptieren.

Der Eintritt in die S-Phase erfolgt in p27T187A knock in Hepatozyten, im Vergleich zu den Wildtypen, normal. 48 Stunden nach partieller Hepatektomie befinden sich ca. 40% der Zellen in der S-Phase.

Abbildung 17

Der mitotische Eintritt jedoch ist in p27T187A Hepatozyten verzögert. Die Auswertung der Histon H3 Färbung ist in Abbildung 18 dargestellt. Bezogen auf den Wildtypen treten 48 Stunden nach partieller Hepatektomie nur 60% der Zellen in die Mitose ein. 60 Stunden nach der Operation sind jedoch 40% mehr Hepatozyten in der Mitose. Der Eintritt in die Mitose erfolgt demzufolge zwar in den p27T187A knock in Hepatozyten; ist jedoch um 12 Stunden verzögert.



M-Phase Eintritt in Hepatozyten durch BrDU Aufnahme in p27T187A knock in und Wildtypmieren. Die Expression von p27 T187A führt zu einem verzögerten M-Phase Eintritt. Histon H3 Färbungen in Hepatozyten der T187A knock in Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen.

Abbildung 18

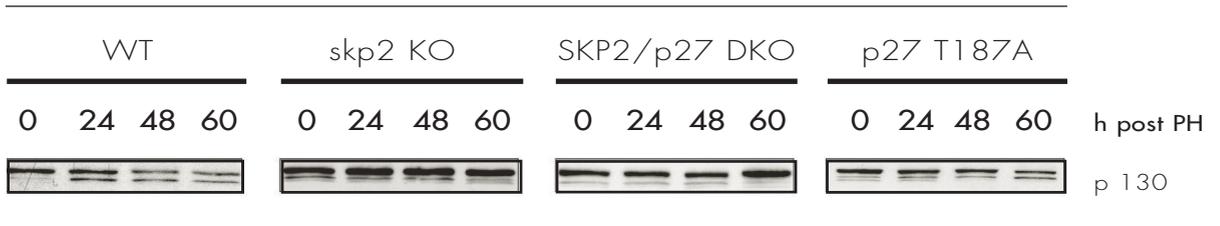
Zusammenfassend beeinflusst die Reakkumulation von p27T187A nicht den S-Phase Eintritt in Hepatozyten, sie verzögert jedoch den Eintritt in die Mitose. Die Ursache des Zellzyklusarrestes in den Skp2 knock out Hepatozyten, sowie die Ausbildung von vergrößerten Hepatozyten und der Anstieg des DNA Gehaltes ist auf die Akkumulation von p27 in der Skp2 knock out Maus zurückzuführen, da der Verlust von p27 diese Phänotypen revertiert.

3.1.3.3. Molekulare Analysen zur Zellzyklusprogression

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die molekularen Mechanismen untersucht werden, die zum Zellzyklusarrest in der Skp2 knock out Maus führten. In Zusammenhang mit der Analyse der Skp2/p27 knock out Maus und der p27T187A knock in Maus, sollten diese Untersuchungen klären, welche Funktion p27 in der Regulation von Zellwachstum und Zellteilung hat.

Der Verlust von p27 in der Skp2 knock out Maus führt zu einer Normalisierung aller untersuchten Phänotypen, so dass die Frage bestand, ob durch den Verlust von p27 auch die Akkumulation anderer Proteine, für die gezeigt wurde, dass sie durch den Skp2

abhängigen SCF Komplex abgebaut werden (Tedesco, Lukas et al. 2002), beeinflusst wird. Um diese Frage zu klären, wurden Western Blots für p130 aus den Leberlysaten nach partieller Hepatektomie angefertigt. Abbildung 19 zeigt, dass in den Skp2 knock out Tieren und den Skp2/p27 doppel knock out Tieren p130 akkumuliert. Seine Akkumulation in den Skp2/p27 doppel knock out Tieren zeigt, dass der Verlust von p27 nicht zu einer generellen Beeinflussung der Stabilität anderer Proteine führt. Der zu diesem Experiment angefertigte Aktin Western Blot, der als Ladungskontrolle dient, ist in Abbildung 26 dargestellt.



Analyse der Akkumulation von p130 in Skp2 knock out, doppel knock out und p27T187Aknock in Hepatozyten im Vergleich zum Wildtypen. In p27/Skp2 doppel knock out Mäusen erfolgt, wie auch in Skp2 knock out Mäusen, eine Akkumulation von p130.

Abbildung 19

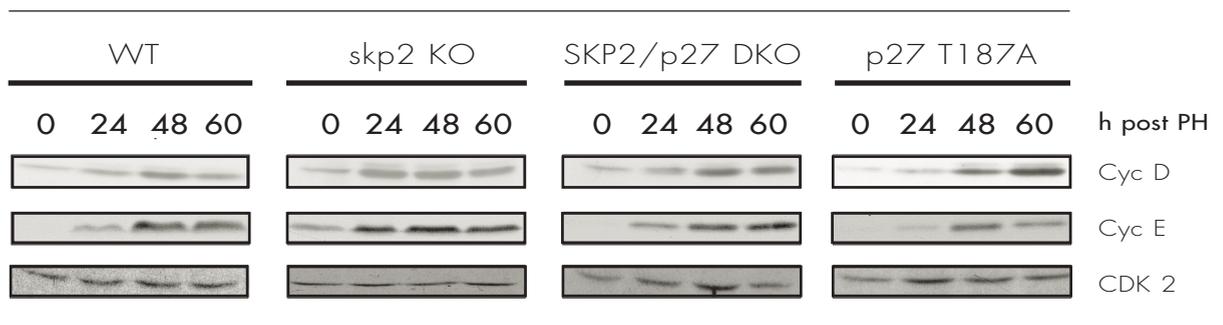
3.1.3.4. Molekulare Analysen der G1-Phase Proteine

Die Progression durch den Zellzyklus ist u.a. abhängig von der Expression von Cyclinen, die die Transition in die S-Phase regulieren. Die Aktivierung von Cyclin D erfolgt durch einen mitogenen Stimulus, der die ER-Kinase aktiviert (Welsh, Roovers et al. 2001) und führt zu der Aktivierung der Transkription, durch die Monophosphorylierung des Retinoblastomproteins durch Cyclin D-Kinase Komplexe. Eines der frühen Zielgene ist Cyclin E (Kitagawa, Higashi et al. 1996; Grana, Garriga et al. 1998; Trimarchi and Lees 2002) (Ohtani, DeGregori et al. 1995). Aktive Cyclin E/CDK2 Komplexe führen zu der vollständigen Freisetzung des E2F Transkriptionsfaktors und ermöglichen so den S-Phase Eintritt (Hwang and Clurman 2005) (Resnitzky and Reed 1995; Kitagawa, Higashi et al. 1996; Morgan 1997) (vergleiche Einleitung Kapitel 1.1.2. Die G0/ G1-Phase).

Im weiteren Verlauf der Arbeit bestand die Frage, ob frühe G1-Phase Ereignisse in den Skp2 knock out Tieren erfolgen. Die Untersuchung dieser frühen G1-Phase Ereignisse erfolgte durch die Analyse der Proteinexpression von Cyclin D1 und Cyclin E, der Kontrolle der Expression sowie der Analyse der Kinaseaktivität von Cyclin E.

Western Blots für Cyclin D1 und Cyclin E sind in Abbildung 20 dargestellt und zeigen einen Anstieg der Proteinexpression der G1-Cycline nach 24 Stunden. Cyclin D1, das die Monophosphorylierung des Retinoblastomproteins katalysiert, wird in allen Genotypen 24 Stunden nach partieller Hepatektomie exprimiert. Auch die Proteinspiegel von Cyclin E,

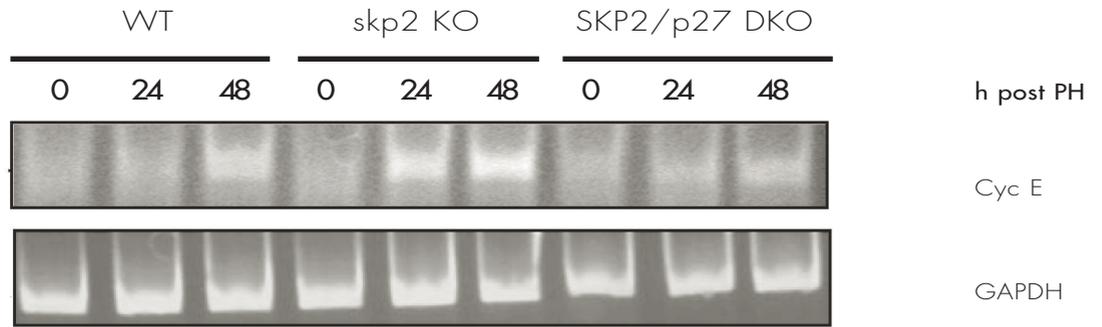
das für die Initiation der S-Phase essentiell ist (siehe auch Kapitel 1.1.2. Die G0/ G1 Phase), akkumuliert in allen Genotypen. In den Skp2/p27 doppel knock out und den Skp2 knock out Mäusen erfolgt die Akkumulation von Cyclin E 24 Stunden nach partieller Hepatektomie. Diese Akkumulation entspricht dem Zeitverlauf der Cyclin E Akkumulation in den Wildtyptieren. Neben dem Anstieg zeigt sich in Skp2 knock out Hepatozyten im deutlichen Gegensatz zu den Wildtyptieren und doppel knock out Tieren auch in ruhenden Zellen eine gesteigerte Expression des Cyclin E Proteins. In p27T187A knock in Tieren erfolgt die Akkumulation von Cyclin E im Vergleich zum Wildtypen normal. Für Cyclin-abhängige Kinase (CDK2) erfolgt, wie erwartet, keine Zellzyklusregulation in den verschiedenen Mausstämmen.



Western Blots der G1 Cycline, Cyclin D1 und Cyclin E nach partieller Hepatektomie. Skp2 knock out und Skp2/p27 doppel knock out Hepatozyten akkumulieren Cyclin D1 und Cyclin E 24 Stunden nach partieller Hepatektomie. Cyclin E ist in den Skp2 knock out Mäusen bereits in ruhenden Zellen nachzuweisen.

Abbildung 20

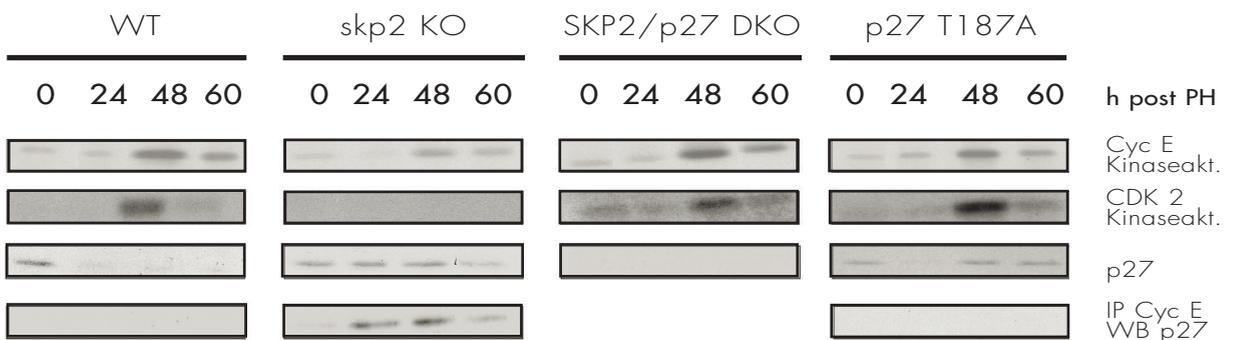
Neben der Bestimmung der Proteinspiegel in den Lebern wurde auch die Induktion der Expression von Cyclin E bestimmt. Dies erfolgte durch eine semiquantitative Bestimmung der RNA Spiegel. Abbildung 21 zeigt, dass parallel zum Anstieg der Proteinspiegel auch ein Anstieg der Cyclin E mRNA erfolgt, wobei jedoch in den Skp2/p27 doppel knock out Mäusen der Nachweis von Cyclin E mRNA bereits nach 24 Stunden möglich ist. Wie bereits durch Western Blots für Cyclin E gezeigt wurde, führt die frühere Expression der Cyclin E mRNA jedoch nicht zu einer verfrühten Akkumulation des Cyclin E Proteins.



Analyse der Expression des G1 Cyclins Cyclin E. Nachweis der RNA Spiegel in den Wildtyp, Skp2 und Skp2/p27 knock out Hepatozyten. GAPDH wurde als Kontrolle verwendet. Abbildung 21

Ein weiterer wichtiger Schritt in der Zellzyklusprogression ist die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase Komplexe. Die Aktivierung der Cyclin E Kinaseaktivität ist wie bereits im Kapitel 1.1.2. beschrieben, wichtig für die S-Phase Progression. Deshalb wurde als nächstes die Aktivierung der Cyclin E Kinaseaktivität nach partieller Hepatektomie untersucht. Abbildung 22 zeigt, dass die Aktivierung von Cyclin E Kinase Komplexen in Immunpräzipitaten für Cyclin E, die in den Wildtyptieren in der S-Phase erfolgt, vergleichbar zu den Skp2/p27 knock out und p27T187A knock in Hepatozyten ist. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung von Cyclin E assoziierten Kinaseaktivität in Skp2 knock out Mäusen nur minimal.

Die Immunpräzipitation von CDK2 zeigt die Aktivierung dieser Kinase durch Bindung an Cyclin E und Cyclin A. Auch hier erfolgt eine Aktivierung in der S-Phase nach 48 Stunden.



Bestimmung der Cyclin E/CDK2 Kinaseaktivität nach partieller Hepatektomie. Die Aktivierung der Kinase erfolgt 48 Stunden nach partieller Hepatektomie. Die Skp2 knock out Mäuse zeigen eine stark verringerte Kinaseaktivität in der Immunpräzipitation gegen Cyclin E. CDK2 Immunpräzipitationen zeigen in den Wildtyptieren, doppel knock out und T187A knock in Tieren ebenfalls eine Aktivierung der Kinase. Abbildung 22
 Die Bindung von p27 an Cyclin E/CDK2 führt zu einer Inhibition der Kinaseaktivität in den Skp2 knock out Mäusen in denen p27 stark akkumuliert. In den T187A knock in Mäusen erfolgt ein Abbau des Proteins in der frühen G1-Phase und eine Reakkumulation in der S-Phase.

Wahrscheinlich antikörperabhängig ist in den Skp2 knock out Mäusen keine CDK2 Kinaseaktivität nachzuweisen.

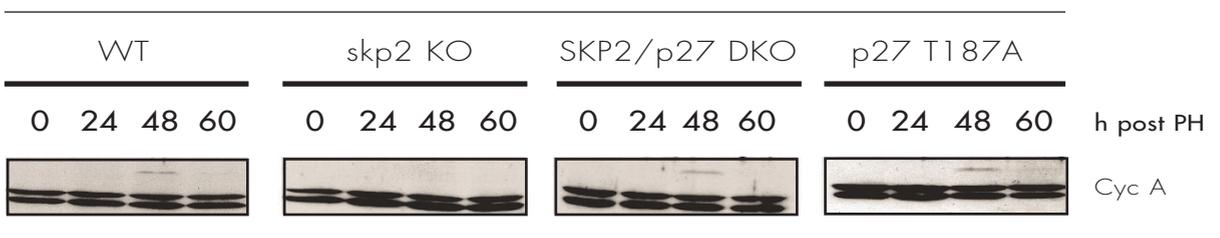
Im weiteren Verlauf bestand die Frage, warum die Cyclin E Kinaseaktivität in den Skp2 knock out Mäusen so stark vermindert ist. Wie die Abbildung 22 weiterhin zeigt, akkumuliert p27 in den Skp2 knock out Mäusen, während es in Wildtypmäuern in der G1-Phase abgebaut wird. Auch in den p27T187A knock in Mäusen wird p27 in der frühen G1-Phase abgebaut. Es reakkumuliert dann jedoch in der S-Phase. Da p27 an Cyclin E/CDK2 Komplexe bindet und deren Kinaseaktivität inhibiert (Polyak, Kato et al. 1994), wurden Immunpräzipitationen gegen Cyclin E durchgeführt, um solche trimeren Komplexe zu isolieren. Die Western Blots für p27 aus dieser Immunpräzipitation zeigen, dass in den Skp2 knock out Hepatozyten p27 an Cyclin E Komplexe gebunden ist, wodurch es zu einer fast vollständigen Inhibition der Kinase kommt (Abbildung 22), während in p27T187A knock in Hepatozyten p27 nicht an Cyclin E/CDK2 Komplexe gebunden ist.

Zusammenfassend akkumulieren Skp2 knock out Hepatozyten p27 nach mitogenem Stimulus, während in Wildtypmäuern p27 in der frühen G1-Phase abgebaut wird. In p27T187A knock in Tieren erfolgt in der S-Phase die Reakkumulation des Proteins. Die Bindung von p27 an Cyclin E Komplexe inhibiert in Skp2 knock out Tieren die Cyclin E Kinaseaktivität.

3.1.3.5. Molekulare Analyse der S-Phase

Der Eintritt in die S-Phase erfolgt nach der Akkumulation von Cyclin A/CDK2 Komplexen, die zu der Initiation der Replikation führen.

Abbildung 23 zeigt, dass Cyclin A 48 Stunden nach partieller Hepatektomie in den Wildtypmäusen exprimiert wird. In den Skp2 knock out Mäusen konnte das Cyclin A Protein nicht nachgewiesen werden. Dahingegen, führt der Verlust von p27 in Skp2/p27 doppel knock out Tieren zu einer normalen Regulation von Cyclin A. Auch die Reakkumulation von p27 in den p27T187A knock in Mäusen hat keinen Einfluss auf den Anstieg der Cyclin A Proteinspiegel.

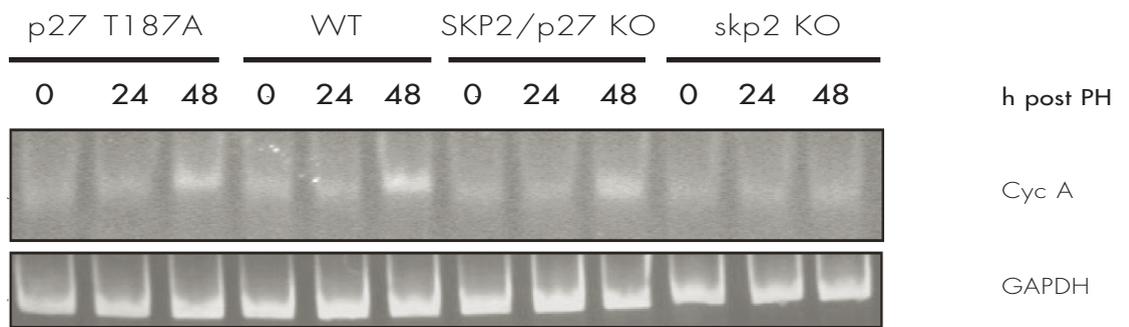


Analyse des S-Phase Cyclins Cyclin A.

Western Blot für Cyclin A nach partieller Hepatektomie. Der Verlust von p27 ermöglicht den Anstieg der Cyclin A Proteinspiegel 48 Stunden nach partieller Hepatektomie. Eine Akkumulation von Cyclin A ist in den Skp2 knock out Tieren nicht nachweisbar.

Abbildung 23

Die Transkription von Cyclin A erfolgt, wie in Abbildung 24 gezeigt, 48 Stunden nach partieller Hepatektomie, also in der S-Phase. In den Skp2 knock out Tieren konnte keine Expression von Cyclin A nachgewiesen werden, d.h. die Inhibition der Akkumulation des Cyclin A Proteins kann nicht auf einen verstärkten Abbau oder eine verminderte Translation zurückgeführt werden. Die Expression von Cyclin A erfolgt in den p27T187A knock in Mäusen und den doppel knock out Tieren im Vergleich zum Wildtyp normal.

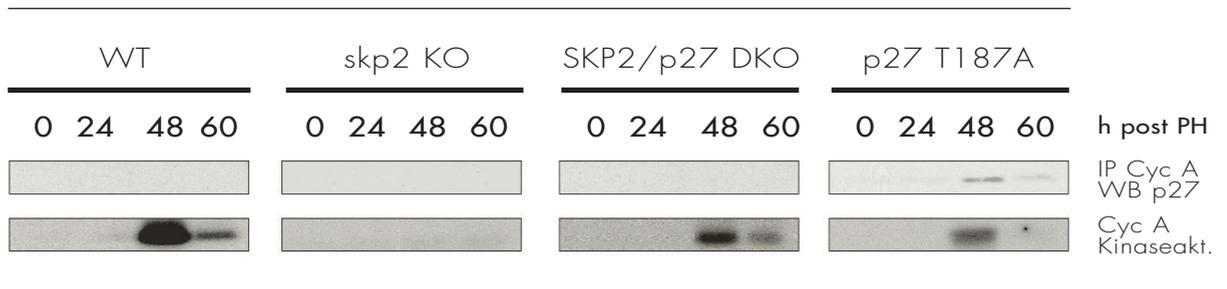


Analyse der Expression von Cyclin A nach partieller Hepatektomie. Skp2 knock out Mäuse exprimieren kein Cyclin A. Der Verlust von p27 ermöglicht die Expression des Proteins 48 Stunden nach partieller Hepatektomie. Der signifikanteste Unterschied in den Gene Arrays zeigte, dass Skp2 knock out Tiere weder Cyclin A noch Cyclin B exprimieren.

Abbildung 24

Da die Reakkumulation von p27 in den p27T187A knock in Mäusen zu einem verzögerten M-Phase Eintritt führt, dies jedoch nicht auf die Inhibition der Transkription zurück geführt werden kann, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Cyclin A Kinase und Cyclin B Kinaseaktivität untersucht. Diese Analysen sollten klären, warum es zu einem verzögerten Eintritt in die Mitose in den T187A knock in Tieren kommt (Abbildung 18).

In Abbildung 25 ist die Analyse der Kinaseaktivität dargestellt. Erwartungsgemäß ist in den Skp2 knock out Mäusen keine Kinaseaktivität nachweisbar. In den Skp2/p27 doppel knock out Mäusen erfolgt die Aktivierung von Cyclin A-abhängigen Kinase Komplexen 48 Stunden nach der Operation und ist mit der Aktivierung von Cyclin A in Wildtyptieren zu vergleichen, während sie in den p27T187A knock in Tieren jedoch vermindert ist. Die Inhibition der Cyclin A-Kinaseaktivität in diesen Hepatozyten ist auf die Bindung von p27 an Cyclin A/CDK2 Komplexe zurückzuführen.

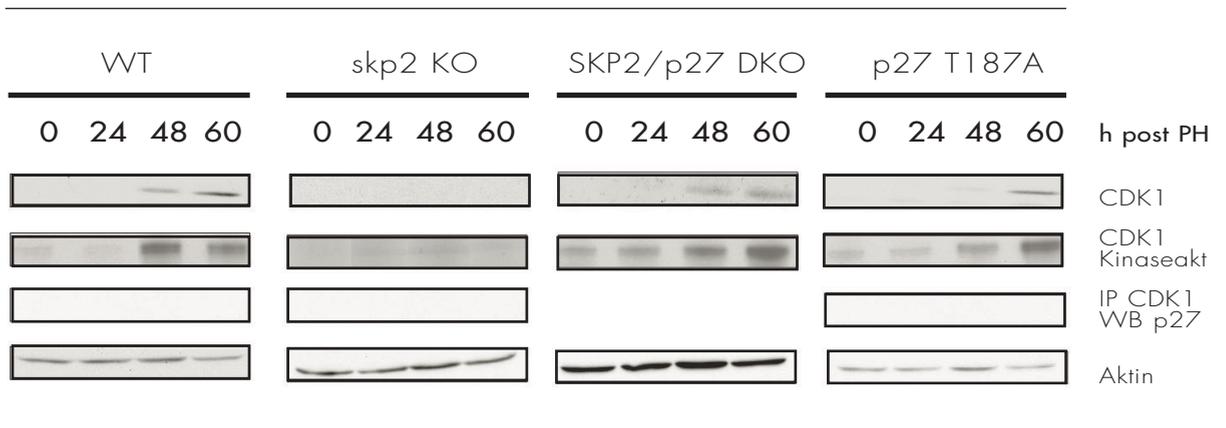


Die Cyclin A Kinase Aktivität ist in p27T187A knock in Hepatozyten stark vermindert. Immunpräzipitationen zeigen, dass dies durch die Bindung von p27 verursacht wird.

Abbildung 25

3.1.3.6. Die molekulare Analyse der mitotischen Komplexe

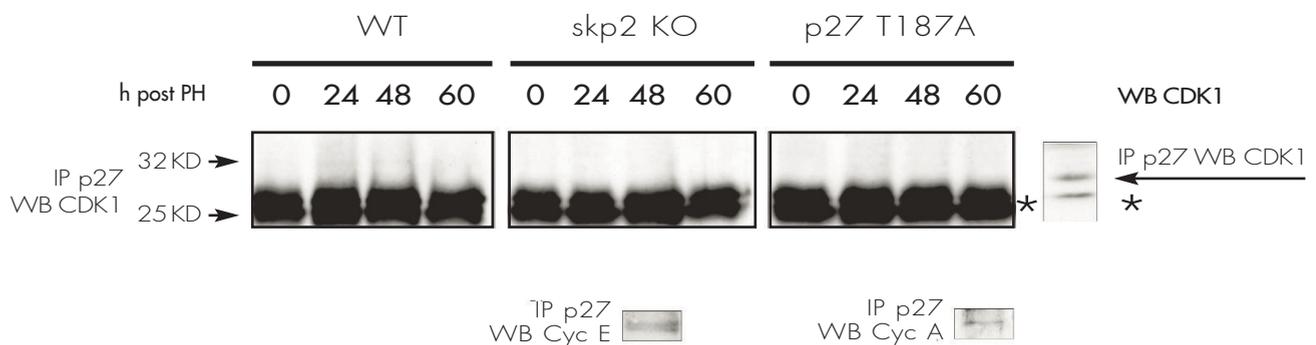
Im Kapitel 1.4. wurde bereits die Funktion von Cyclin B/CDK1 Komplexen in der Initiation der Mitose beschrieben. Die Aktivierung von Cyclin B/CDK1 Komplexen am S-/G2-/M-Phase Übergang führt u.a. zu der Auflösung der Kernmembran (Nigg 2001) und dem Eintritt der Zellen in die M-Phase. Im weiteren Verlauf der Arbeit bestand die Frage, warum die Hepatozyten der p27T187A knock in Mäuse verzögert in die M-Phase eintreten. Da p27 in diesen Tieren in der S-Phase reakkumuliert (Abbildung 22) erfolgte die Bestimmung der Aktivierung der Cyclin B/CDK1 Kinaseaktivität u.a. durch Kinaseassays. Abbildung 26 zeigt, dass die Aktivität des mitotischen Cyclin B Komplexes 48 Stunden nach partieller Hepatektomie in den Wildtyp-Tieren und den Skp2/p27 doppel knock out Tieren ansteigt, in den p27T187A knock in Mäusen jedoch verzögert ist. Auch Western Blots mit einem Antikörper, der spezifisch für die aktivierende Phosphorylierung der Cyclin-abhängigen Kinase CDK1 ist, zeigen, dass CDK1 in den p27T187A knock in Tieren verzögert aktiviert wird. Immunpräzipitationen gegen CDK1 und Western Blots gegen p27 schließen eine Inhibition der Kinaseaktivität durch die Bindung von p27 an diesen Komplex dagegen aus. Das gleiche Ergebnis wurde in Immunpräzipitationen gegen p27 und Western Blots gegen CDK1 erhalten (Abbildung 27).



Untersuchung des mitotischen CDK1 Komplexes.

Die Aktivierung von Cyclin B/ CDK1 Komplexen ist in p27T187A knock in Mäusen verzögert. Kinase Assays für CDK1 zeigen eine verzögerte Aktivierung des mitotischen Komplexes, die nicht auf die Bindung von p27 an CDK1 zurückzuführen ist, da in Immunpräzipitationen kein p27 in diesen Komplexen nachgewiesen werden kann.

Abbildung 26



Untersuchung der Bindungsfähigkeit von p27 an CDK1 Komplexe.

Immunpräzipitationen gegen p27 und Western Blots gegen CDK1. p27 bindet nicht an CDK1 Komplexe. Western Blots gegen Cyclin E und Cyclin A wurden als Kontrollen mitgeführt. Mit Sternchen ist die Hintergrundbande durch die leichte Kette des Antikörpers markiert, der Pfeil deutet auf CDK1.

Abbildung 27

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Reakkumulation von p27 in der S Phase die Zellzyklusprogression nicht inhibiert. p27T187A knock in Hepatozyten treten normal in die S-Phase ein, weisen jedoch eine Verzögerung des mitotischen Eintrittes auf, der auf eine verzögerte Aktivierung von Cyclin B/CDK1 Kinasekomplexen zurückzuführen ist. In der Skp2 knock out Maus wird p27 in der frühen G1-Phase jedoch nicht abgebaut, diese Hepatozyten treten nicht in den Zellzyklus ein, da in diesen Hepatozyten keine vollständige Aktivierung von Cyclin E Kinasekomplexen erfolgen kann. In den Skp2 knock out Hepatozyten wird die Aktivierung an Cyclin E/CDK2 Kinasekomplexen durch die Bindung von p27 inhibiert. Demzufolge ist der Abbau von p27 in der frühen G1-Phase essentiell für die Zellzyklusprogression. Die Bedeutung von p27 in der Regulation der Zellzyklusprogression wurde auch durch die Analyse der Skp2/p27 doppel knock out Tiere bestätigt.

Der Verlust von p27 im Skp2 knock out Hintergrund führt zu einer normalen Zellzyklusprogression und zu einer Normalisierung des Skp2 knock out Phänotyps.

3.2. Endoreduplikation versus genomische Instabilität

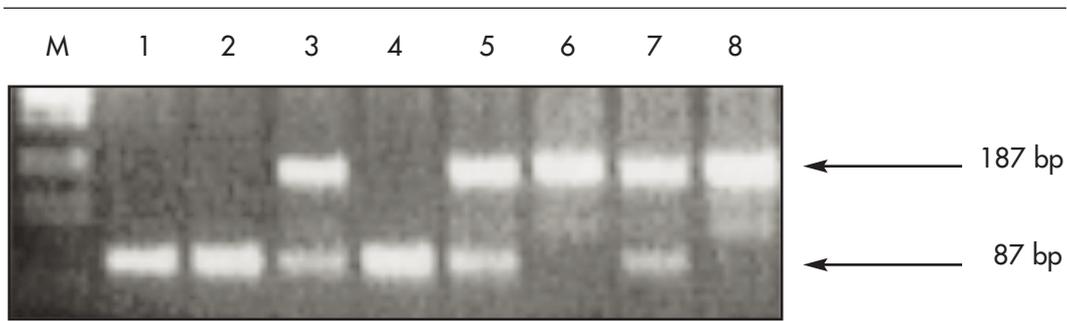
Die Analyse der Skp2 knock out Maus zeigt, dass die Hepatozyten dieser Maus endoreduplizieren. Gleichzeitig zeigt sich in diesen Tieren eine Akkumulation von Cyclin E. Die Kinaseaktivität des Cyclin E/CDK2 Komplexes ist jedoch durch die Bindung von p27 an diese Komplexe weitestgehend inhibiert. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass Cyclin E notwendig für die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen ist (Weiss, Herzig et al. 1998) (Geng, Yu et al. 2003) (Parisi, Beck et al. 2003). Desweiteren ergab die Untersuchung von Tumoren, dass die Akkumulation von Cyclin E stark mit der Tetraploidie und Aneuploidie von Zellen korreliert (Hubalek, Widschwendter et al. 2004). Die Akkumulation von Cyclin E führt auch zu einer Ausbildung genomisch instabiler Zellen (Rajagopalan, Jallepalli et al. 2004). Warum die Akkumulation von Cyclin E in der Skp2 knock out Maus, Endoreduplikationszyklen hervorruft, während in anderen Systemen Cyclin E auch die Entstehung der genomischen Instabilität fördert, ist unklar.

Um die Rolle des zellzyklusregulierten Abbaus von Cyclin E auf die Entstehung genetisch instabiler Zellen und die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen genauer zu untersuchen, verwendeten wir eine Mauslinie in der der Verlust von Cullin 3 durch die Expression der Cre-Rekombinase erfolgt. Cullin 3 gehört, wie in der Einleitung bereits beschrieben, zu den Cullin- Ring Ligasen und führt zum Abbau von monomerem Cyclin E (Singer, Gurian-West et al. 1999).

3.2.1. Genotypisierung der Mäuse

3.2.1. 1. Genotypisierung der Cullin 3 LoxP Mäuse

Die Insertion der LoxP Stelle erfolgte zwischen dem 3. und 4. Intron sowie dem 7. und 8. Intron. Die Genotypisierung der Mäuse beruhte auf dem Nachweis der LoxP Stelle zwischen dem 7. und 8. Intron, mit Hilfe von Primern, die 3' und 5' dieser Insertionsstelle binden. Dadurch ist ein Nachweis der Wildtypiere möglich, in denen die Amplifikation eine Bande bei 87bp liefert, sowie eine Amplifikation des homozygoten knock in Allels mit einer Bandengröße von 187bp. Heterozygote Tiere zeigten beide Banden (Abbildung 28).



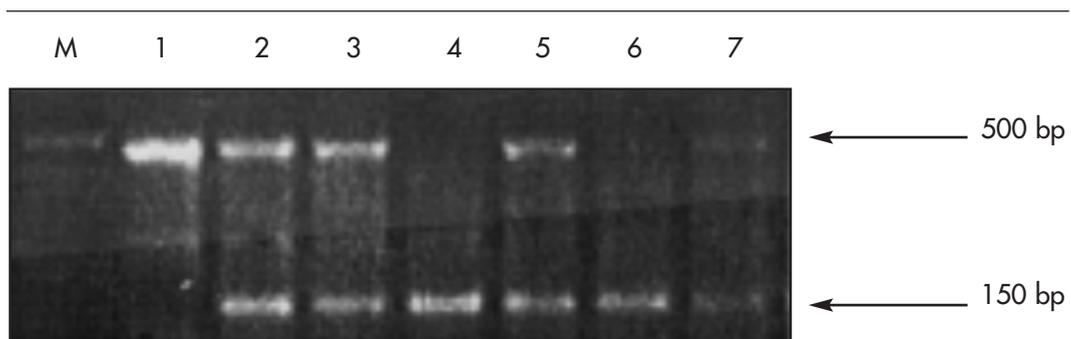
Genotypisierung der *Cullin 3 LoxP* Mäuse. Bei Proben 1, 2 und 4 handelt es sich um Wildtypiere, Proben 3, 5 und 7 handelt es sich um DNA Extraktionen aus heterozygoten Tieren. Proben 6 und 8 stammen von homozygoten Tieren, die eine *LoxP* Stelle tragen. M = 1 kb Marker

Abbildung 28

3.2.1.2. Genotypisierung der *Cdk2* knock out Mäuse

Die Genotypisierung der *CDK2* knock out Mäuse erfolgte durch den Nachweis der Neo-Kassette durch den Primer PKO 0294 sowie dem antisens Primer PKO 0344. Das Wildtypallel wurde mit einem der Primerkombination PKO 0344 und PKO 0292 nachgewiesen.

Abbildung 29 zeigt die Genotypisierung dieser Tiere mit DNA, die durch eine Schwanzbiopsie gewonnen wurde.



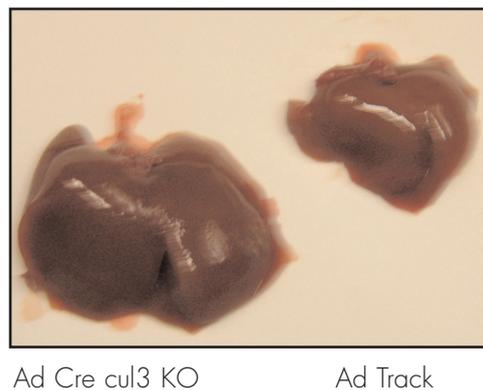
Genotypisierung der *CDK2* knock out Mäuse. Probe 1 stammt von einem knock out Tier, die Proben 2, 3, 5, und 7 stammen von heterozygoten und Probe 4 und 6 von Wildtypieren. M ist der 1 kb Marker

Abbildung 29

3.2.2. Endoreduplikation und genetische Instabilität durch Cyclin E

Da bekannt ist, dass Hepatozyten auch unter physiologischen Bedingungen endoreduplizieren (Guidotti, Bregerie et al. 2003), wurde in den folgenden Versuchen die Endoreduplikationsfähigkeit von Hepatozyten genauer untersucht.

Um eine Akkumulation von Cyclin E in Hepatozyten zu erzielen, erfolgte der knock out der Cullin 3 Ring Ligase, die die Degradation von Cyclin E reguliert (siehe Einleitung Kapitel 1.2.3.). Der knock out des Cullin 3 Genes erfolgte durch die Injektion von Adenoviren, die die Cre-Rekombinase exprimieren. Dazu wurden jeweils 4 Mäusen 1×10^8 Cre Adenoviren pro Gramm Maus, sowie anderen Tieren die gleiche Menge des Kontrollvirus in die Schwanzspitze injiziert. 3 Wochen nach Injektion wurden diese Tiere durch cervikale Dislokation getötet. Die Leber wurde entnommen und ein Teil für die Herstellung von Proteinlysaten, der andere für die Anfertigung von Parafinschnitten verwendet. Abbildung 30 zeigt, dass der Verlust von Cullin 3 in der Leber 3 Wochen nach Injektion des Virus zu einem verstärkten Leberwachstum führt.



Der Verlust von Cullin 3 in der Leber führt 3 Wochen nach Injektion des Virus zu einem Leberwachstum.

Abbildung 30

Um diesen Phänotyp zu analysieren wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Untersuchungen durchgeführt.

Analyse

Tabelle 3

Histologische Analysen
Hämatoxilin-Eosin Färbung

Auflistung der Analysen, die der Untersuchung Cullin 3 knock out des Phänotyps dienen

Abb. 31

Feulgen Färbung zur Bestimmung des DNA Gehaltes

Abb. 33

β -Catenin Färbung und DAPI Färbung
zur Identifizierung genomisch instabiler Zellen

Abb. 34

Molekularbiologische Analysen
Western Blot für Cullin 3 und Cyclin E

Abb. 32

Analysen zur Ursache des Phänotyps
Western Blots für Cyclin E in Leberlysaten der Wildtypiere

Abb. 35

Analyse des DNA Gehaltes durch Feulgen Färbung

Abb. 36

β -Catenin Färbung und DAPI Färbung
zur Identifizierung genomisch instabiler Zellen

Abb. 37

Analyse des DNA Gehaltes nach Überexpression
von Cyclin E in CDK2 knock out Hepatozyten

Abb. 38

Histologische Untersuchung der Feulgen Färbung

Abb. 39

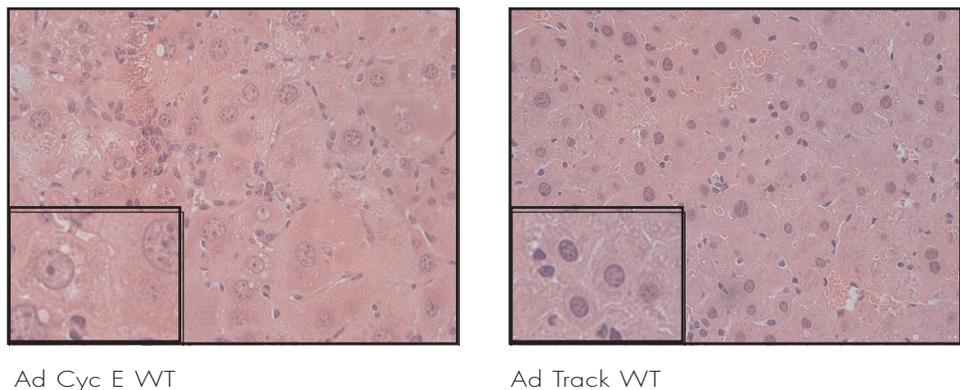
Histologische Befunde der Cullin 3 knock out Lebern

Abb. 40, 41

Western Blot für Cullin 3
12 Wochen nach knock out des Genes

Abb. 42

Histologische Analysen dieser Lebern zeigten, dass dieser Phänotyp durch das Wachstum von Hepatozyten verursacht wird (Abbildung 31). Hepatozyten der Cullin 3 knock out Tiere sind im Vergleich zu den mit Kontrollvirus behandelten Tieren sehr stark vergrößert. Insgesamt zeigten alle 4 analysierten Cullin 3 knock out Lebern diesen Phänotyp, im Vergleich zu Tieren, die mit einem Kontrollvirus injiziert wurden.

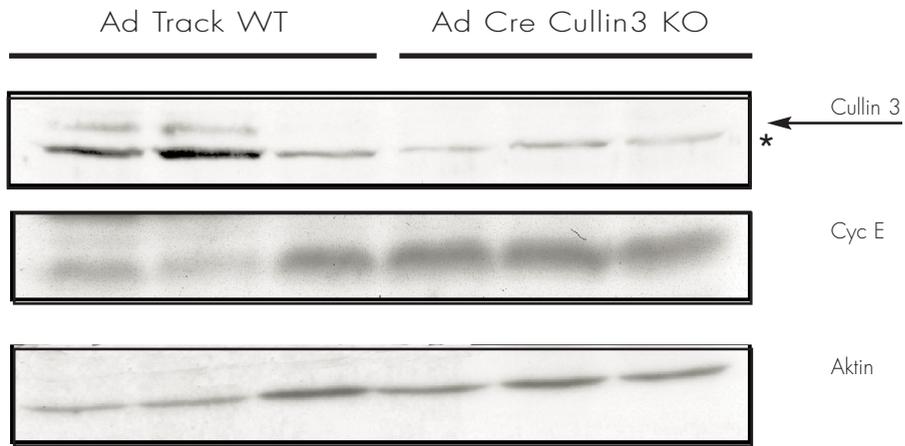


Hämatoxylin-Eosin Färbung der Leberschnitte der Cullin 3 knock out Lebern und der Kontrolltiere. Der Verlust von Cullin 3 führt zu einem verstärkten Wachstum der Cullin 3 knock out Hepatozyten.

Abbildung 31

Die Expression des Cre Adenovirus führt zu einem Verlust des Cullin 3 Genes. Dieser Verlust wurde auf Proteinebene durch die Anfertigung des Western Blots aus Leberlysaten überprüft.

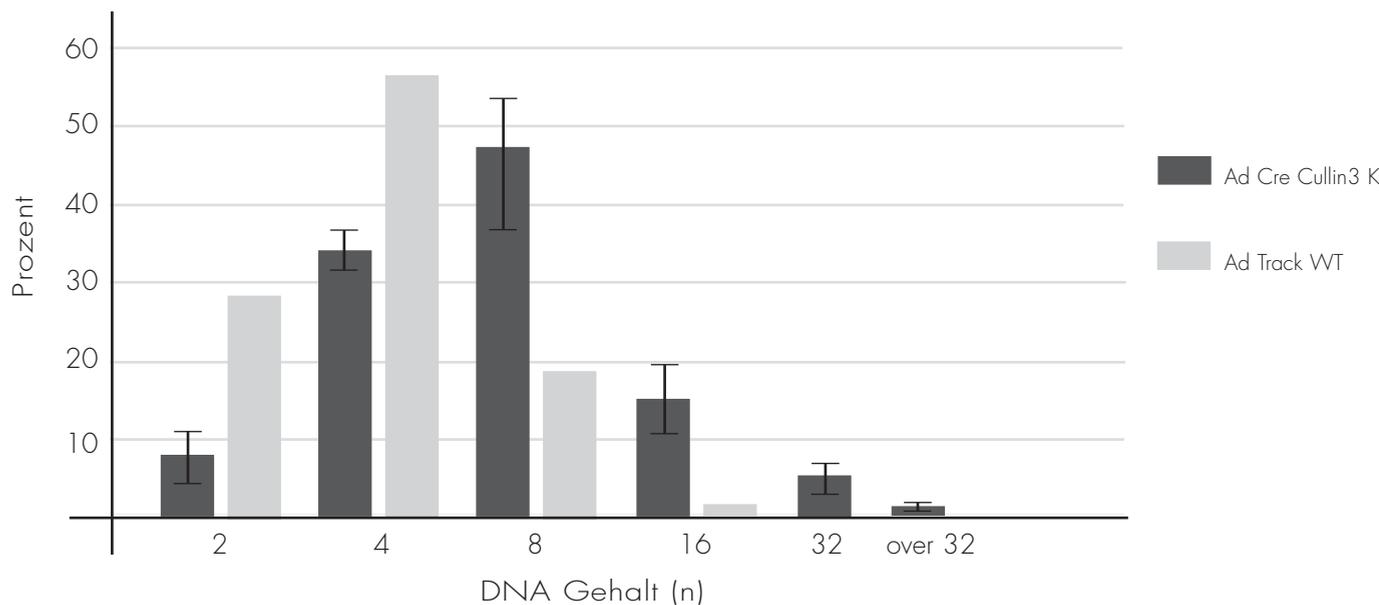
Der Vergleich mit Kontrolltieren zeigt, dass die Injektion des Virus zu einer Reduktion des Cullin 3 Proteins führt. Die nachweisbare Restmenge stammt wahrscheinlich aus infiltrierenden Blutzellen bzw. Endothelzellen. Abbildung 32 zeigt auch, dass der Verlust der Cullin 3 Ligase zu einem Anstieg des Cyclin E Proteins führt.



Western Blot für Cullin 3 und Cyclin E. Der Verlust der Cullin 3 Ligase führt zu einem Anstieg der Cyclin E Spiegel. Tiere, die mit dem Cre Adenovirus injiziert wurden, zeigen einen Verlust des Cullin 3 Proteins und eine Akkumulation von Cyclin E. Der Pfeil deutet auf das Cullin 3 Protein, * Hintergrundbande

Abbildung 32

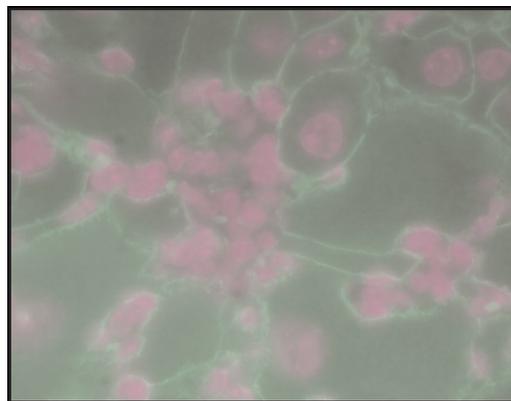
Analog zu den Skp2 knock out Hepatozyten legt der Phänotyp des Zellwachstums nahe, dass diese Zellen endoreduplizieren. Die Bestimmung des DNA Gehaltes mit Hilfe der Feulgen Färbung zeigt in Abbildung 33, dass der Cullin 3 knock out Hepatozyten einen stark erhöhten DNA Gehalt aufweisen, der mit dem der Skp2 knock out Mäuse vergleichbar ist. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Exel Programm.



Feulgen Färbung zur Bestimmung des DNA Gehaltes. Der konditionelle knock out des Cullin 3 Genes führt in adulten Hepatozyten zu Endoreduplikationszyklen.

Abbildung 33

Die Akkumulation von Cyclin E führt auch zu der Bildung genomisch instabiler Zellen (Bartkova, Horejsi et al. 2005), so dass im weiteren Verlauf der Arbeit die Frage bestand, ob es in den Cullin3 knock out Hepatozyten auch zu der Ausbildung genomisch instabiler Zellen kommt. Deshalb wurde eine β -Catenin angefertigt. Diese Färbung ermöglicht, wie bereits beschrieben, die Identifikation einzelner Hepatozyten. Werden diese Bilder mit der DAPI-Färbung übereinander gelegt, ist es möglich die Anzahl der Zellkerne pro Zelle zu bestimmen. Abbildung 34 zeigt eine repräsentative Darstellung einer solchen Analyse. In Cullin 3 knock out Lebern kommt es zu einer Ausbildung genomisch instabiler Zellen. Solche Zellen sind durch das Vorkommen mehrerer Zellkerne pro Zelle unterschiedlicher Größe charakterisiert (Hollander, M.C. et al. 1999)

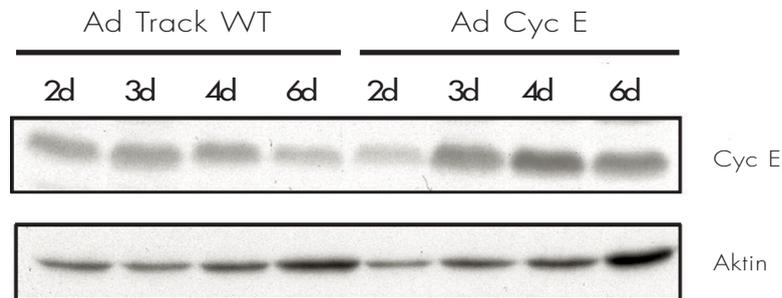


Ad Cre
Cul3 out KO

β -Catenin Färbung und DAPI Färbung in Schnitten von Cullin3 knock out Lebern. In diesen Lebern kommt es zur Ausbildung genomisch instabiler Zellen.

Abbildung 34

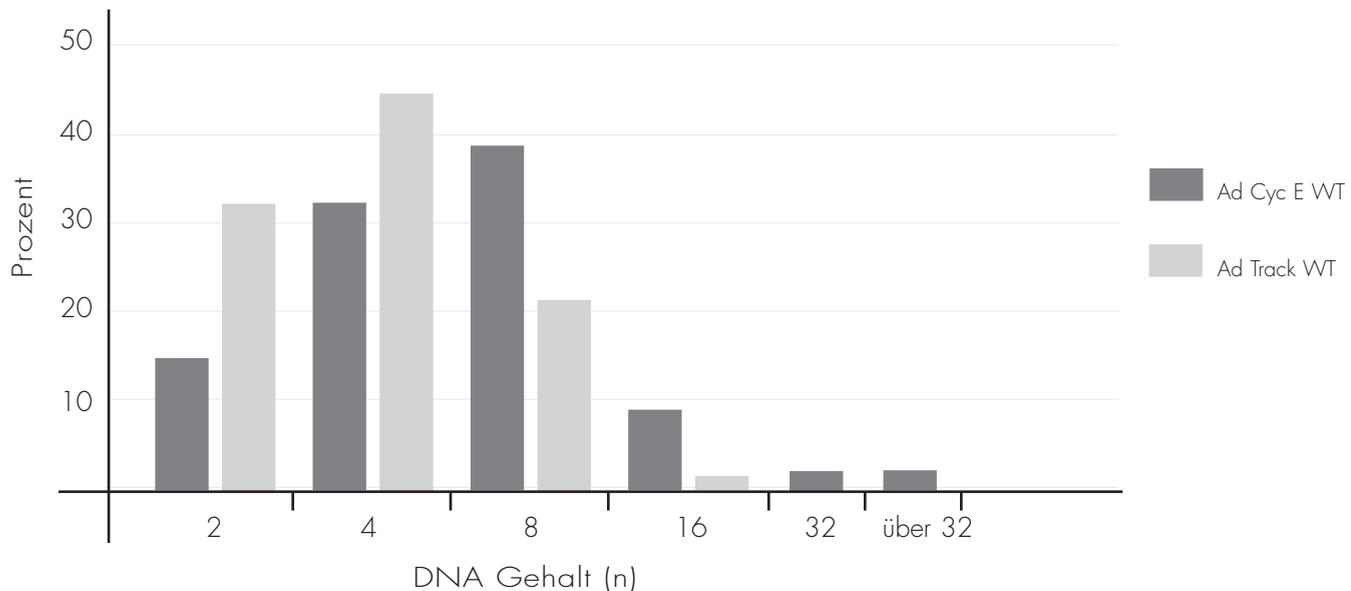
Da Cullin 3 nicht nur die Degradation von Cyclin E reguliert, sondern auch die vieler anderer Substrate bestand die Frage, ob nur die Akkumulation von Cyclin E die Ursache der Ausbildung des beschriebenen Phänotyps ist. Um diese Frage zu klären, wurden Cyclin E Adenoviren in Wildtypmäuse injiziert. Wie auch in den folgenden Adenovirusexperimenten erfolgte die Injektion von 1×10^8 Adenoviren, die Cyclin E überexprimieren, pro Gramm Maus in die Schwanzvene. Abbildung 35 zeigt, dass zwischen dem 3. und 6. Tag nach der Injektion eine Akkumulation von Cyclin E in den Hepatozyten erfolgt.



Western Blot für Cyclin E in Leberlysaten der Wildtypiere. Die Injektion eines Adenovirus, der Cyclin E exprimiert, führt zwischen dem 3. und 6. Tag zu einer Akkumulation des Proteins in Wildtypelibern.

Abbildung 35

Ob die Injektion des Cyclin E Adenovirus auch zu einem Anstieg des DNA Gehaltes der Hepatozyten führt, konnte durch die Feulgen Färbung geklärt werden. Die Auswertung ist in Abbildung 36 dargestellt. Mäuse, denen ein Adenovirus, der Cyclin E exprimiert intravenös injiziert wurde, zeigen einen deutlichen Anstieg des DNA Gehaltes der Hepatozyten. Die Bestimmung der Ploidie erfolgte am 6. Tag nach der Injektion.

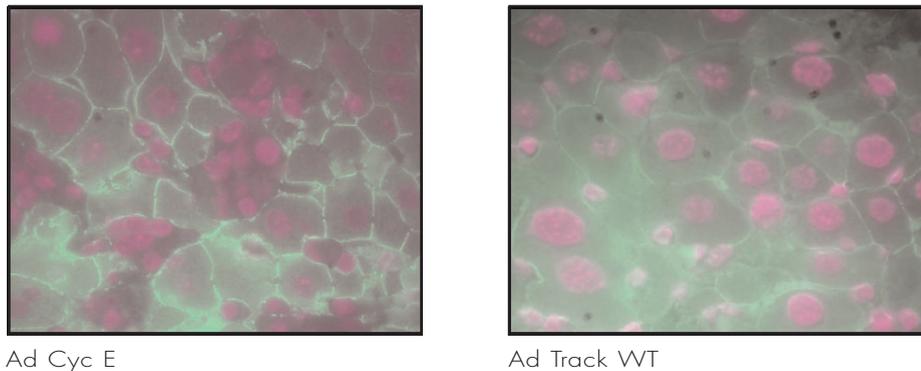


Analyse des DNA Gehaltes durch Feulgen Färbung in Hepatozyten von Wildtypieren und Cyclin E überexprimierenden Hepatozyten. Cyclin E überexprimierende Hepatozyten zeigen einen Anstieg des DNA Gehaltes im Vergleich zu den Tieren, die mit dem Kontrollvirus injiziert wurden.

Abbildung 36

Wie bereits beschrieben, wird der Verlust von Cullin 3 in den Hepatozyten auch durch die Ausbildung genomisch instabiler Zellen charakterisiert, so dass in Wildtypieren, die Cyclin E überexprimieren ebenfalls β -Catenin Färbungen der Leberschnitte angefertigt wurden, um zu überprüfen, ob sich in diesen Lebern auch genomisch instabile Zellen ausbilden.

Die Färbung erfolgte in Leberschnitten 6 Tage nach der Injektion des Adenovirus. Abbildung 37 zeigt die β -Catenin Färbung und Zellkernfärbung von Kontrolltieren und Cyclin E akkumulierenden Hepatozyten. Auch in Cyclin E akkumulierenden Wildtyphepatozyten erfolgt die Entwicklung genomisch instabiler Zellen, während in den Kontrolltieren keine Zellen mit Mikronuklei nachzuweisen sind.

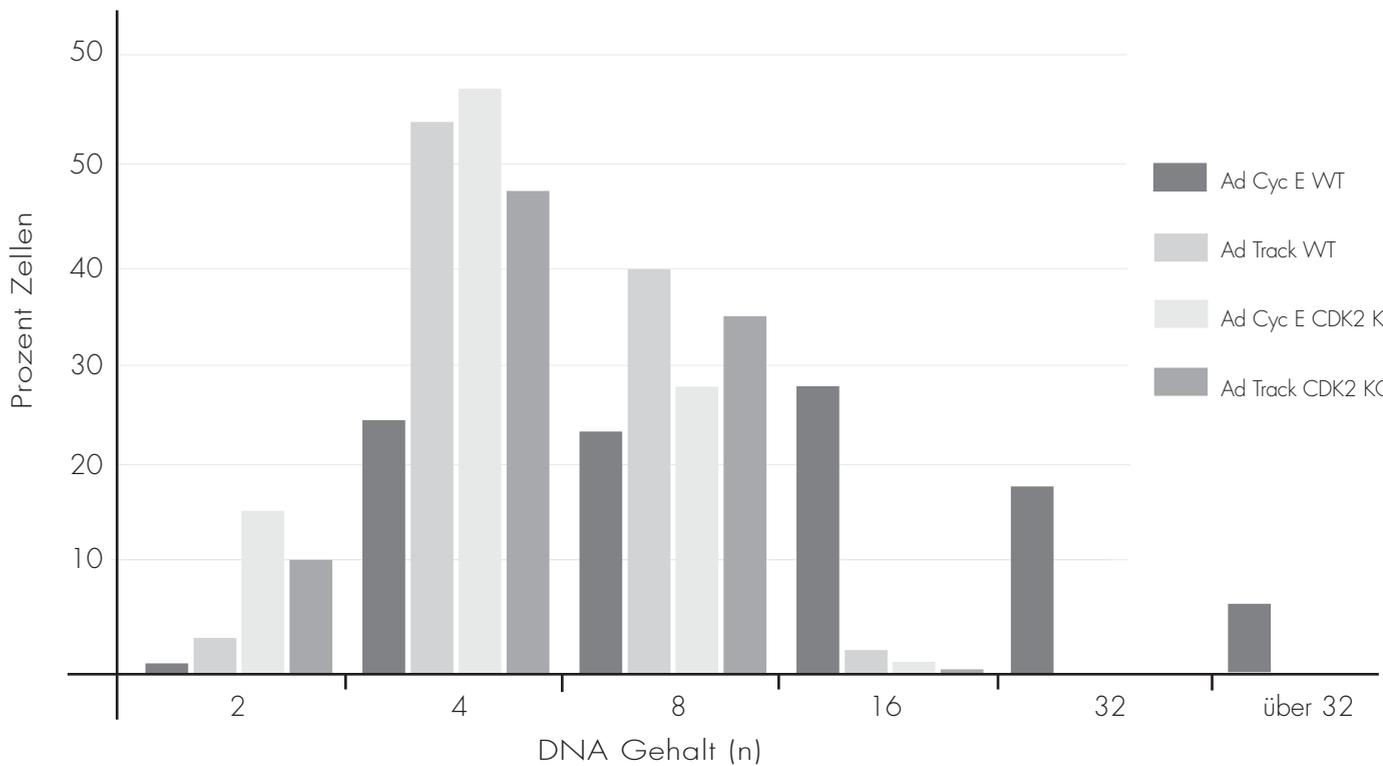


β -Catenin und Zellkernfärbung von Hepatozyten, die Cyclin E akkumulieren und der Kontrolle. Genetisch instabile Zellen sind nur in Cyclin E akkumulierenden Hepatozyten nachzuweisen.

Abbildung 37

Der Vergleich der Hepatozytenmorphologie in Skp2 knock out Mäusen und Cullin 3 knock out Tieren zeigt, dass es in beiden Systemen zu einer Akkumulation von Cyclin E kommt. Weiterhin endoreduplizieren die Hepatozyten in beiden Tieren. Die Endoreduplikation kann die Akkumulation von Cyclin E zurückgeführt werden, da die Injektion des Cyclin E Adenovirus auch in Wildtyptieren diesen Phänotyp hervorruft. Warum jedoch einerseits in den Cullin 3 knock out Hepatozyten und in den Cyclin E überexprimierenden Zellen genomisch instabile Hepatozyten zu finden sind, während Skp2 knock out Hepatozyten diesen Phänotyp nicht zeigen, ist nicht bekannt. Allerdings führt der Vergleich der Systeme zu der Hypothese, dass die Bildung genomisch instabiler Zellen abhängig von der Aktivierung der Cyclin E/CDK2 Kinaseaktivität ist. Um zu überprüfen, ob die Kinaseaktivität von Cyclin E/CDK2 wichtig für die Bildung genomisch instabiler Zellen ist, wurden CDK2 knock out Mäuse ebenfalls mit einem Cyclin E exprimierenden Adenovirus injiziert. Für dieses Experiment wurden jeweils 2 Tiere mit einem Cyclin E Adenovirus oder einem Kontrollvirus injiziert.

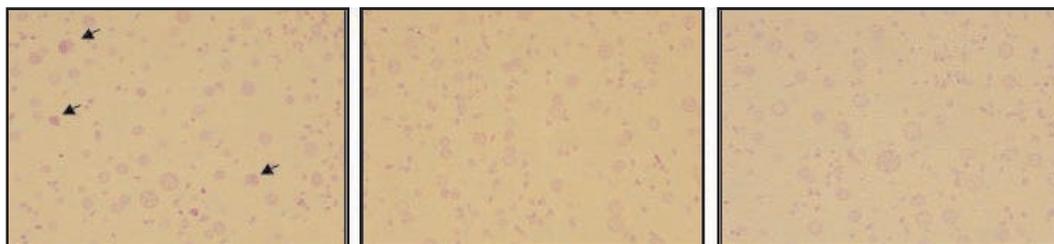
Von jeweils einem Tier wurden Leberschnitte angefertigt und Feulgen gefärbt, um den DNA Gehalt zu bestimmen. In Abbildung 38 ist die Auswertung dieser vorläufigen Analyse abgebildet. Die Akkumulation von Cyclin E in den Wildtyptieren führt, wie bereits beschrieben, auch in diesem Experiment zu einem Anstieg des DNA Gehaltes, während der DNA Gehalt der CDK2 knock out Leber nicht ansteigt.



Feulgen Analyse in CDK2 knock out Hepatozyten. CDK2 knock out Hepatozyten zeigen keinen Anstieg im DNA Gehalt der Zellen.

Abbildung 38

Die genauere Betrachtung der Feulgen Färbung zeigt, dass in CDK2 knock out Hepatozyten viele mitotische Zellen sichtbar sind (Abbildung 39), die in Wildtypieren nicht nachgewiesen werden können. Diese mitotischen Zellen wurden vermehrt in den Leberschnitten beider mit Cyclin E Adenovirus injizierten CDK2 knock out Mäuse gefunden.



CDK2 KO + Ad E

CDK2 KO + Ad control

WT + Ad E

Histologische Analyse der CDK2 knock out Hepatozyten. In Hepatozyten der CDK2 knock out Mäuse, die Cyclin E überexprimieren zeigen sich Mitosen.

Abbildung 39

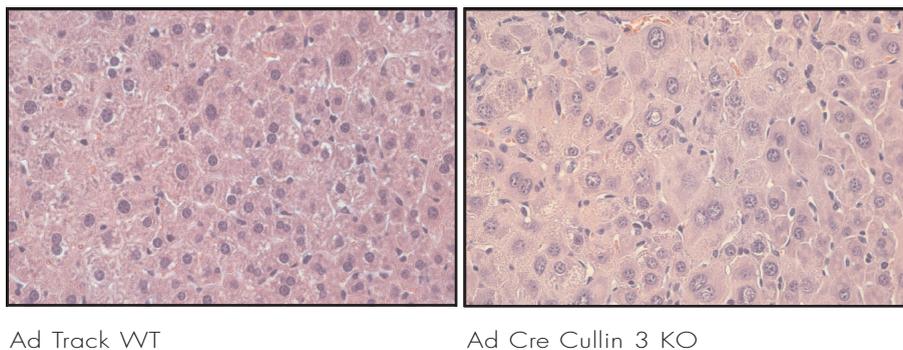
Zusammenfassend deuten diese Analysen darauf hin, dass die Bildung endoreduplizierender Zellen durch die Akkumulation von Cyclin E verursacht wird, während die Bildung genomisch instabiler Zellen von der Aktivität der Cyclin E/CDK2 Kinase abhängig ist.

3.2.3. Genetische Instabilität und Tumorentstehung

In Tumoren, in denen das Cyclin E abbauende F-Box Protein FbW7 mutiert ist, treten vermehrt genomisch instabile Zellen auf (Rajagopalan, Jallepalli et al. 2004). Diese genomisch instabilen Zellen können unter Umständen die Ursache für die Tumorentstehung sein (Hubalek, Widschwendter et al. 2004).

Ob der Verlust von Cullin 3 und die Akkumulation von Cyclin E, die zur Bildung genetisch instabiler Zellen führt, auch die Tumorentstehung in den Cullin 3 knock out Lebern begünstigt, wurde durch die Analyse von Tieren 12 Wochen nach Injektion des Cre Adenovirus geprüft. Wie bereits beschrieben, wurden 1×10^8 Adenoviren pro Gramm Maus, die für die Cre-Rekombinase codieren, sowie Kontrollviren in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. Die Tiere wurden 12 Wochen nach der Injektion des Virus, demzufolge dem knock out des Cullin 3 Genes, durch cervikale Dislokation getötet. Auch hier wurde ein Teil der Leber verwendet, um histologische Schnitte anzufertigen, der andere Teil wurde genutzt, um Leberproteinlysate herzustellen.

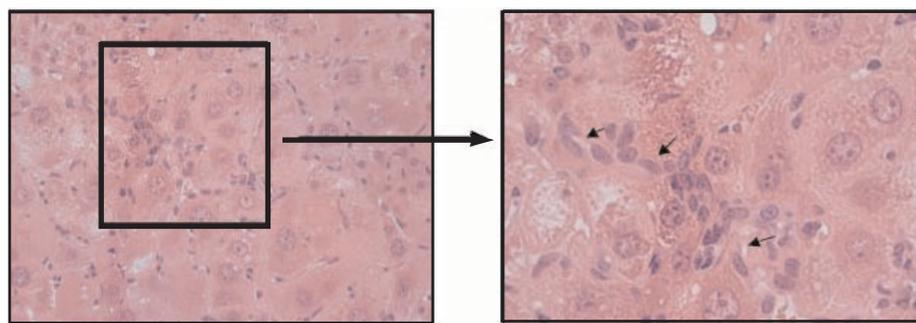
Histologische Befunde der Hämatoxilin-Eosin Färbungen der Cullin 3 knock out Lebern, die im Institut für Zell- und Molekularpathologie der Medizinischen Hochschule angefertigt wurden, zeigten hier jedoch nicht die Entstehung von Tumorstufen durch genetische Instabilität, sondern eine vollkommene Normalisierung des Phänotyps. Abbildung 40 zeigt, dass 12 Wochen nach Verlust des Cullin 3 Genes, die Hepatozyten normal erscheinen. Die starke Zellvergrößerung und Zellkernvergrößerung die 3 Wochen (vergleiche Abbildung 31) nach dem knock out von Cullin 3 zu beobachten war, kann in diesen Lebern nicht mehr nachgewiesen werden.



Normalisierung des Cullin 3 knock out Phänotyps 12 Wochen nach knock out des Proteins. Die Oval Zellproliferation führt zu einer Regeneration der Leber. Abbildung 40

Im weiteren Verlauf der Arbeit bestand nun die Frage, wie es zu einer Normalisierung der Hepatozyten kommen kann. Deshalb wurden die Lebern der Cullin 3 knock Tiere 3 Wochen nach Verlust des Cullin 3 Genes mit den Lebern 12 Wochen nach Verlust des Cullin 3 Genes verglichen.

Die pathologischen Befunde zeigten eine verstärkte Proliferation von Leberstammzellen. Diese Zellen werden aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften auch Oval Zellen genannt (Abbildung 41). Die Proliferation der Oval-Zellen ist in allen 4 Cullin 3 knock out Lebern, im Vergleich zu den Wildtyptieren zu sehen. Die Oval-Zell Hyperplasie ist v.a. drei Wochen nach dem Verlust des Cullin 3 Genes zu diagnostizieren. Während 12 Wochen nach dem Cullin 3 knock out nur noch minimale herdförmige Oval-Zell Hyperplasien zu identifizieren sind. Diese Oval-Zellen proliferieren und differenzieren sich dann in Hepatozyten. Die Hepatozyten, die 3 Wochen nach dem Verlust von Cullin 3 einen starken Anstieg im DNA Gehalt zeigten und auch genomisch instabil sind, sterben durch Nekrose. Auch dies konnte durch pathologische Untersuchungen nachgewiesen werden.

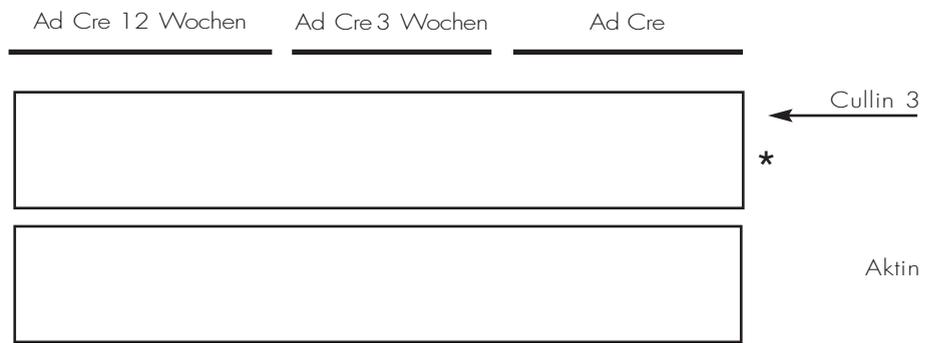


Ad Cre Cullin 3 KO

Cullin 3 knock out Hepatozyten werden durch die Proliferation von Oval Zellen ersetzt.

Abbildung 41

Die aus den Oval-Zellen gebildeten Hepatozyten tragen, wie die Analyse der Cullin 3 Proteinexpression zeigt, immer noch den Cullin 3 knock out. Western Blots, die aus Leberlysaten 12 Wochen nach dem knock out von Cullin 3 angefertigt wurden, zeigen keinen Anstieg des Cullin 3 Proteins. Im Vergleich wurden auch Proben von Tieren 3 Wochen nach knock out des Cullin 3 Genes geladen (Abbildung 42).



Western Blot für Cullin 3 12 Wochen nach der Injektion des Cre-Adenovirus. Zellen die zu der Regeneration der Leber zwischen 3 und 12 Wochen nach Verlust von Cullin 3 führen sind exprimieren kein Cullin 3. Western Blot für Cullin 3 12 Wochen nach knock out, im Vergleich dazu, der knock out nach 3 Wochen. Pfeil deutet auf Cullin 3 Protein, *Hintergrundbande

Abbildung 36

Zusammenfassend führt der Verlust von Cullin 3 in adulten Hepatozyten zu Endoreduplikationszyklen und genomischer Instabilität. Pathologische Befunde deuten darauf hin, dass Cullin 3 knock out Hepatozyten nekrotisch werden. Die Nekrose der Hepatozyten führt zu einer Normalisierung des Phänotyps 12 Wochen nach knock out. Die neu gebildeten Hepatozyten gehen aus einer Leberstammzellproliferation hervor, die kein Cullin3 exprimieren.

4.0. DISKUSSION

4.1. Die Funktion von Cyclin E in der Zellproliferation und Endoreduplikation

Die Aktivierung von Cyclin E/CDK2 Komplexen in der G1-Phase führt zum Eintritt von ruhenden Zellen in den Zellzyklus. Cyclin E im Komplex mit CDK2 übernimmt dabei wichtige Funktionen, wie z.B. die vollständige Freisetzung des E2F Transkriptionsfaktors durch Hyperphosphorylierung des Retinoblastomproteins (Hwang and Clurman 2005). Die essentielle Funktion von Cyclin E in der Regulation des Zellzykluseintrittes von ruhenden Zellen konnte durch Versuche mit Fibroblasten aus Cyclin E knock out Mäusen gezeigt werden. Ruhende Fibroblasten, die kein Cyclin E exprimieren, können nicht in die S-Phase eintreten (Geng, Yu et al. 2003) (Parisi, Beck et al. 2003). Die Ursache hierfür liegt in der unvollständigen Beladung der Replikationsursprünge mit Replikationskomplexen, wodurch die DNA Replikation nicht erfolgen kann (Geng, Yu et al. 2003)(vergleiche Einleitung 1.2.). Weiterhin wird Cyclin E auch für die Auflockerung der Chromosomenstruktur im Rahmen der Initiation der Replikation benötigt (Coverley, Laman et al. 2002; Pelizon 2003)(vergleiche Einleitung Kapitel 1.2.). Die Überexpression von Cyclin E führt einerseits zu einer Verkürzung der G1-Phase und somit zu einem schnelleren S-Phase Eintritt (Resnitzky and Reed 1995), andererseits aber auch zur Ausbildung von Endoreduplikationszyklen und genomisch instabilen Zellen (Geng, Yu et al. 2003; Parisi, Beck et al. 2003) (Rajagopalan, Jallepalli et al. 2004) (Hubalek, Widschwendter et al. 2004) (Barkkova, Horejsi et al. 2005).

Als Endoreduplikation bezeichnet man Replikationszyklen der DNA ohne anschließende mitotische Zellteilung. Diese Endoreduplikationszyklen führen zu einem Anstieg des DNA Gehaltes, so dass sich polyploide Zellen bilden. Die Polyploidisierung ist eine alternative Strategie des Zellwachstums. Sie ermöglicht der Zelle durch eine Erhöhung der Genkopiezahl eine Steigerung ihrer metabolischen Leistung und stellt somit eine Alternative zur Zellteilung dar (Storchova and Pellman 2004).

Die molekularen Mechanismen der Polyploidisierung sind nicht vollständig geklärt. Verschiedene Arbeiten zeigen jedoch, dass die Funktion von Cyclin E für die Ausbildung polyploider Zellen essentiell ist. Die Überexpression von Cyclin E in *Drosophila* führt zu Endoreduplikationszyklen, die aber nur aufrecht erhalten werden können, wenn Cyclin E nach der Initiation des ersten Replikationszyklus kurzzeitig inaktiviert wird (Weiss, Herzog et al. 1998). Auch in Säugerzellen ist Cyclin E für die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen notwendig. So zeigte die Generation von Cyclin E knock out Mäusen, dass sich Trophoblasten in diesen Tieren nicht entwickeln, wodurch die Tiere am Tag 11,5 nach der Gestation sterben (Geng, Yu et al. 2003) (Parisi, Beck et al. 2003).

Die Untersuchungen zu der Funktion von Cyclin E in der Ausbildung von Endoreduplikationszyklen wurden, wie eben beschrieben, v.a. in *Drosophila*, Trophoblasten oder in vi-

tro Systemen in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Die Analyse von Hepatozyten, in denen die Endoreduplikation wie auch in Trophoblasten einen physiologischen Prozess darstellt (Storchova and Pellman 2004), ist bislang unvollständig. Guidotti und Mitarbeiter zeigten, das Lebern postnataler Ratten während der ersten 22 Tage hauptsächlich aus diploiden Hepatozyten bestehen. Die Zahl an tetraploiden Zellen steigt jedoch bis zum 39. Tag nach der Geburt an. Die Polyploidisierung von Hepatozyten ist demzufolge ein Prozess, der mit dem Alter zunimmt (Guidotti, Bregerie et al. 2003).

Um die Bedeutung von Cyclin E in der Regulation der Zellzyklusprogression und Ausbildung polyploider Zellen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Mausmodelle untersucht, die eine Analyse dieser Prozesse in Hepatozyten erlauben. Dieses System bietet v.a. drei Vorteile. Erstens befinden sich Hepatozyten in einem Ruhezustand und treten durch Entnahme von 2/3 der Leber synchron in den Zellzyklus ein. Zweitens ist die Überexpression von Proteinen, z.B. Cyclin E in der Leber durch die Infektion der Maus mit Adenoviren, die bestimmte Proteine exprimieren, möglich und bietet demzufolge ein System zur Untersuchung der Endoreduplikation durch Akkumulation von Cyclin E. Drittens stellen Endoreduplikationszyklen in Hepatozyten, wie bereits beschrieben, einen physiologischen Prozess dar.

In einem der in dieser Arbeit untersuchten Mausmodelle, der Skp2 knock out Maus, akkumuliert das p27 Protein, weil der Degradationsweg des Proteins durch den Verlust von Skp2 inhibiert ist. Durch partielle Hepatektomie in diesen Tieren und anschließende molekulare Analysen konnte gezeigt werden, dass p27 an Cyclin E/CDK2 Komplexe bindet und die Aktivität dieses Kinasekomplexes weitestgehend inhibiert (Abbildung 16-18). Analog zu den Cyclin E knock out Mäusen erfolgt in diesen Tieren kein Eintritt in den Zellzyklus. Die Hepatozyten arretieren in der frühen G1-Phase (Abbildung 11, 12, 19, 20). Die Aktivierung von Cyclin E Komplexen ist demzufolge ein wichtiger Schritt in der Regulation der Zellzyklusprogression der Leberzellen.

Neben der Regulation der Zellzyklusprogression ist Cyclin E auch für die Endoreduplikationszyklen notwendig. Die in dieser Arbeit analysierten Skp2 knock out Hepatozyten akkumulieren weitestgehend inaktive Cyclin E/CDK2 Komplexe und endoreduplizieren (Abbildung 7,9). Wie die Ausbildung der Endoreduplikationszyklen in der Skp2 knock out Maus erfolgt, ist nicht geklärt. Die Initiation der DNA Replikation in der S-Phase ist abhängig von dem Aufbau von Replikationsursprüngen auf der DNA. Diese Komplexe bestehen in der G1-Phase aus dem Origin-Erkennungskomplex und den MCM-Proteinen, welche die Funktion haben, sicher zu stellen, dass das Genom während der S-Phase nur einmal repliziert wird. Diese Bindung ist abhängig von der Cyclin E/CDK2 Kinaseaktivität. Die Fähigkeit der Skp2 knock out Hepatozyten Endoreduplikationszyklen zu durchlaufen, könnte dadurch erklärt werden, dass die geringe Cyclin E assoziierte Kinaseaktivität in den Hepatozyten ausreicht, um die Replikationsursprünge mit MCM-Proteinen zu beladen und eine Initiation der Replikation zu verursachen. Normalerweise wird durch die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins die Expression des Cyclin A Genes aktiviert.

Cyclin A kann CDC6, ein Protein des Replikationskomplexes, phosphorylieren. Diese Phosphorylierung beendet den Aufbau der Replikationskomplexe und verhindert so eine Re-Replikation der DNA (Coverley, Laman et al. 2002; Takeda and Dutta 2005). Dass CDC6 eine wichtige Funktion in Endoreduplikationszyklen übernimmt, konnte bereits durch Bermejo et al. gezeigt werden. Die Überexpression von CDC6 in Zellen führte in diesen Untersuchungen zu der Ausbildung von Endoreduplikationszyklen (Bermejo, Vilaboa et al. 2002). Wie die Analyse der Genexpression nach partieller Hepatektomie des Cyclin A Genes mit Hilfe von RT-PCRs zeigte, erfolgt der G1-Arrest in den Skp2 knock out Hepatozyten nach der Aktivierung des Cyclin E Genes aber vor der Expression des Cyclin A Genes (Abbildung 21,24). Die geringe Kinaseaktivität in den Skp2 knock out Hepatozyten ist demzufolge ausreichend, um Replikation zu initiieren, sie reicht aber nicht, um einen vollständigen Zellzykluseintritt durch die Expression von Cyclin A zu katalysieren. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass z.B. das Retinoblastomprotein nicht hyperphosphoryliert wird und somit keine vollständige Aktivierung des E2F Transkriptionsfaktors erfolgt. Die Expression des Cyclin A Genes und die Phosphorylierung von CDC6 können somit nicht erfolgen, wodurch die Replikationskomplexe auf der DNA gebunden bleiben und eine ständig erfolgende Initiation der Replikation erlauben.

Zusammenfassend besagt die hier aufgestellte Hypothese, dass Cyclin E/CDK2 Komplexe, die keine vollständige Kinaseaktivität aufbauen, die Initiation der DNA Replikation katalysieren, aber nicht den Eintritt in die S-Phase, da Cyclin A nicht exprimiert wird. Es ergeben sich demzufolge zwei experimentelle Ansätze, um diese Hypothese zu überprüfen. Um zu überprüfen, ob eine geringe Cyclin E assoziierte Kinaseaktivität nur Endoreduplikationszyklen hervorruft, könnten Cyclin E Adenoviren, die keine volle Kinaseaktivität ausbilden in die Lebern von Wildtyptieren injiziert werden. Eine Charakterisierung verschiedener Cyclin E Mutanten erfolgte bereits durch Moroy et al. und Kelly et al. (Kelly, Wolfe et al. 1998; Geisen and Moroy 2002). Die Analysen von Moroy et al. zeigen, dass Cyclin E Mutanten, die keine oder nur eine geringe Kinaseaktivität besitzen, in Transfektionsexperimenten zwar Foci bilden, dass diese jedoch nicht in der Lage sind, als etablierte Zelllinie zu wachsen (Geisen and Moroy 2002). Die Injektion solcher Adenoviren würde jedoch nicht die Frage klären, warum eine geringe Cyclin E/CDK2 Kinaseaktivität ausschließlich Endoreduplikationszyklen auslöst.

Wie bereits beschrieben, phosphorylieren Cyclin E/CDK2 Komplexe das Retinoblastomprotein, wodurch es zu einer vollständigen Aktivierung des E2F Transkriptionsfaktors kommt, der die Expression von S-Phase Genen aktiviert. Die geringe Cyclin E/CDK2 Kinaseaktivität könnte dazu führen, dass dieser Schritt nicht erfolgen kann. Um dies zu überprüfen, könnten Cyclin E Adenoviren, die das Retinoblastomprotein nicht mehr binden können, in Wildtyptiere injiziert werden. Diese Bindungssequenz in Cyclin E wurde durch Kelly et al. identifiziert (Kelly, Wolfe et al. 1998). Die Injektion eines Adenovirus, der eine Mutante von Cyclin E, die in dieser Bindungsstelle defizient ist, exprimiert, könnte zeigen, dass die Inhibition der Phosphorylierung des RB Proteins Endoreduplikationszyklen hervorruft, da

die Expression von Cyclin A inhibiert ist. Analog könnten weitere Mutanten, auf ihre Fähigkeit Endoreduplikation zu verursachen, untersucht werden, um die molekularen Ursachen der Cyclin E induzierten Endoreduplikation zu untersuchen.

4.2. Die Funktion von Cyclin E/CDK2 in der Ausbildung genomisch instabiler Zellen

Neben der Polyploidisierung induziert Cyclin E genomische Instabilität. Der knock down von CDC4, einem F-Box Protein, das am Abbau von Cyclin E beteiligt ist, führte in HCT-116 Zellen (Kolonkarzinomzellen) zur Ausbildung genomisch instabiler Zellen. Diese sind u.a. durch die Bildung von Mikronuklei charakterisiert (Rajagopalan, Jallepalli et al. 2004). Die Ergebnisse von Rajagopalan et al. stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Skp2 knock out Mäuse. Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben akkumulieren Hepatozyten dieser Mäuse Cyclin E und endoreduplizieren; sie bilden jedoch keine genomisch instabilen Zellen.

Um diesen Widerspruch experimentell zu untersuchen, erfolgte u.a. die Analyse von Cullin 3 knock out Mäusen. Die Injektion eines Adenovirus, das die Cre Rekombinase exprimiert, führt zu einem selektiven Verlust des Cullin 3 Genes in Hepatozyten (vergleiche Kapitel 1.2.3. und 2.4.7.).

Durch histologische Analysen, Feulgen Färbungen und β -Catenin Färbungen (Abbildung 26, 28,29) kommt es in den Cullin 3 knock out Hepatozyten ähnlich wie in den Skp2 knock out Hepatozyten zur Ausbildung von Endoreduplikationszyklen. Gleichzeitig zeigen hier jedoch β -Catenin und Dapi Färbungen, dass es in dieser Maus zusätzlich zur Entstehung genetisch instabiler Zellen kommt. In einem weiteren in dieser Arbeit analysierten Mausmodell wurden Cyclin E Adenoviren in Wildtypiere injiziert. Der Phänotyp der Hepatozyten gleicht dem der Cullin 3 knock out Hepatozyten (Abbildung 30). Auch hier führt die Akkumulation von Cyclin E zur Ausbildung von Endoreduplikationszyklen und genetisch instabilen Zellen (Abbildung 29, 31).

Der Unterschied zwischen den Cullin 3 knock out und Wildtyphepatozyten und den Skp2 knock out Hepatozyten besteht nach dem in dieser Arbeit identifiziertem Mechanismus zur Entstehung des Phänotypes, nach Akkumulation von Cyclin E, in der Fähigkeit zur Ausbildung der Cyclin E assoziierten Kinaseaktivität. So führt, wie bereits dargelegt, die Akkumulation von p27 in der Skp2 knock out Maus durch den Verlust von Skp2 zu einer Inhibition der Kinaseaktivität. Cullin 3 knock out Tiere und Wildtypiere können p27 jedoch weiterhin abbauen und demzufolge eine Cyclin E abhängige Kinaseaktivität aufbauen. Die Analyse des Cyclin E induzierten Phänotypes in CDK2 knock out Mäusen unterstützt diese Hypothese. Die Hepatozyten dieser Mäuse endoreduplizieren nicht. Des Weiteren sind auch keine genomisch instabilen Zellen nachweisbar, jedoch viele mitotische Zellen, d.h. Zellen in denen CDK2 nicht vorhanden ist, endoreduplizieren nicht und werden nicht

genetisch instabil. Die Akkumulation von Cyclin E führt hier zu Proliferationszyklen. Die molekularen Mechanismen dieses Wechsels zwischen Proliferation und genetischer Instabilität sind unbekannt. Eine Erklärung könnte sein, dass Cyclin E auch an CDK1 binden kann. Dies konnte durch die Analyse von CDK2 knock out Fibroblasten gezeigt werden. Die Proliferationsrate von CDK2 knock out Fibroblasten entspricht der der Wildtypen, wird jedoch durch den knock down von CDK1 stark inhibiert (Aleem, Kiyokawa et al. 2005). Die Bindung von Cyclin E an CDK1 kann demzufolge die Zellzyklusprogression regulieren. Hinsichtlich der Zellzyklusprogression scheinen diese Komplexe die gleiche Funktion zu haben, wie Cyclin E/CDK2 Komplexe, d.h. Cyclin E/CDK1 Komplexe sind in der Lage zum Abbau von p27 zu führen (Aleem, Kiyokawa et al. 2005), und sie müssten weiterhin in der Lage sein, das Retinoblastomprotein zu phosphorylieren sowie die Freisetzung des E2F Transkriptionsfaktors zu katalysieren. Cyclin E/CDK1 Komplexe müssten demzufolge auch die DNA Replikation initiieren können. Dass Cyclin E/CDK1 Komplexe in der Lage sind, alle diese Funktionen zu übernehmen, könnte evtl. auf die Lokalisation dieser Komplexe zurückzuführen sein. Andererseits ist es möglich, dass die Substratspezifität von Cyclin/CDK Komplexen auf den Zeitpunkt ihrer Expression und Aktivierung im Zellzyklus zurückzuführen ist, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass Cycline, die an unterschiedliche CDK's binden, auch andere Substratspezifitäten aufweisen. So kann z.B. Cyclin A obwohl es an CDK1 bindet, keine Mitose induzieren (Murray 2004). Ob es jedoch spezifische Funktionen für Cyclin E/CDK2 und Cyclin E/CDK1 Komplexe gibt, ist unbekannt.

Da überexprimiertes Cyclin E in den CDK2 knock out Mäusen möglicherweise an CDK1 bindet und diese Komplexe Mitose induzieren, kann die Frage, ob Cyclin E auch ohne CDK2 Endoreduplikationszyklen auslöst aus den vorliegenden Daten derzeit nicht beantwortet werden. Das Cyclin E eventuell, auch ohne CDK2 Bindung Endoreduplikationszyklen auslöst, geht aus der Analyse der CDK2 knock out Maus hervor, in der sich die Trophoblasten normal entwickeln.

Um diese Frage in dem in dieser Arbeit benutzten Mausmodell zu beantworten, müsste der knock down von CDK1 durch siRNA in der CDK2 knock out Maus und die gleichzeitige Überexpression von Cyclin E erfolgen. Wenn in der CDK2 knock out Maus die Mitosen nur durch die Bindung von Cyclin E an CDK1 hervorgerufen werden, müsste der Verlust von CDK1 die Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten inhibieren und eventuell Endoreduplikationszyklen hervorrufen. Alternativ kann ein Adenovirus, das eine Mutante von Cyclin E, die nicht an CDK's bindet, in den Lebern exprimiert werden.

Die Induktion der Proliferation in CDK2 knock out Mäuse durch Cyclin E Überexpression zeigt, dass CDK2 für Endoreduplikation und genetische Instabilität essentiell ist, jedoch für die normale Proliferation von Hepatozyten nicht notwendig ist. Dadurch wird CDK2 zu einem möglichen Angriffspunkt in der Tumorthherapie. Durch die Inhibition von CDK2 könnte die Anreicherung genetisch instabiler Zellen und somit die Akkumulation weiterer Muta-

tionen in Tumoren verhindert werden, gleichzeitig würde die Induktion der Proliferation die Zellen gegenüber Chemotherapien anfällig machen.

Gleichzeitig deutet die Induktion der Proliferation in Hepatozyten in der CDK2 knock out Maus darauf hin, dass die fehlende Hyperphosphorylierung des Retinoblastomproteins in den Skp2 knock out Mäusen unter Umständen nicht die Ursache der Endoreduplikation ist, sondern, dass akkumuliertes p27 in den Skp2 knock out Tieren diese Endoreduplikationszyklen auslöst. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass in Cyclin E knock out Fibroblasten das Retinoblastomprotein phosphoryliert ist, d.h. in diesen Zellen übernimmt ein anderer Kinasekomplex, wahrscheinlich Cyclin D/CDK4, die Funktion des Cyclin E/CDK2 Komplexes (Parisi, Beck et al. 2003; Berthet, Klarmann et al. 2006). Die Funktion von p27 in der Ausbildung von Endoreduplikationszyklen könnte durch die Regulation der Genexpression erklärt werden. Diese Hypothese wird gestützt durch Beobachtungen, in denen das N-terminale Ende von p27 die Differenzierung von Neuronen induziert. Diese Funktion von p27 ist unabhängig von der Cyclin Kinase Inhibition (Delobel, Lavenir et al. 2006). Weiterhin ist der C-terminale Teil von p27 auch an der Migration von Zellen, z.B. Fibroblasten beteiligt (Besson, Gurian-West et al. 2004). Diese Beobachtungen führen zu der Fragestellung, ob p27 in Hepatozyten neben der Inhibition von Cyclin E/CDK2 Komplexen nicht auch die Genexpression, z.B. des Cyclin A Genes kontrolliert. Die Regulation der Cyclin A Expression muss in der frühen G1-Phase erfolgen, wenn p27 in den p27T187A knock in Hepatozyten abgebaut wird, da die Rekumulation von p27 keine Auswirkungen auf die Akkumulation der Cyclin A RNA und Zellzyklusprogression hat. Um zu bestimmen, ob der Cyclin A Promotor durch p27 kontrolliert wird, könnten Cyclin A Luciferase-Promotorkonstrukte in Mausfibroblasten transfektiert werden. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität gibt dann Hinweise auf eine Inhibition durch Bindung von p27 an den Cyclin A Promotor. Hier könnten im weiteren verschiedene Ansätze gewählt werden. Einerseits können verschiedene Promotormutanten in Transkriptionsfaktorbindungsstellen zusammen mit p27 transfektiert werden, um zu determinieren, ob die Bindung in Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren erfolgt. Die jeweilige Mutante könnte Hinweise auf einen Bindungspartner von p27 liefern. Andererseits könnten verschiedene p27 Mutanten transfektiert werden, die Hinweise auf Phosphorylierungen oder bestimmte Domänen, die zur Inhibition der Transkription benötigt werden, liefern. Eine Inhibition der Cyclin A Transkription durch p27 würde p27 eine neue Funktion zuschreiben, die unabhängig von der Inhibition der Cyclin-Kinaseaktivität ist. Gleichzeitig bedeutet dies, dass der Abbau von p27 in der frühen G1-Phase und die Aktivierung der Cyclin A Expression der Schalter zwischen Endoreduplikation und genetischer Instabilität darstellen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit schlussfolgern, dass die Endoreduplikationszyklen durch katalytisch nahezu inaktive Cyclin E/CDK2 Komplexe ausgelöst werden, während genetische Instabilität nur in Zellen entsteht, die aktive Cyclin E/CDK2 Komplexe exprimieren.

Der Schalter zwischen Endoreduplikation und genetischer Instabilität könnte nach den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen die Expression von Cyclin A sein, da inaktive Cyclin E/CDK2 Komplexe nicht in der Lage sind, die Expression von Cyclin A zu aktivieren.

4.3. Die Funktion von Cyclin E/CDK2 in der Tumorprogression

Genetische Instabilität wird in vielen Tumoren beobachtet. Der Verlust von *cdc4*, dem F-Box Protein, das am Abbau von Cyclin E beteiligt ist, in Tumoren zeigt, dass Zellen die Cyclin E akkumulieren, genomisch instabil werden (Rajagopalan, Jallepalli et al. 2004). Weitere Analysen in Tumoren zeigen, dass Tetraploidie und Aneuploidie sehr stark mit erhöhten endogenen Cyclin E Spiegeln korrelieren. Des Weiteren konnten in diesen Tumoren auch Mutationen des *cdc4*-Genes nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen führten zu einem Modell, indem Mutationen des *cdc4* Genes zu einer Akkumulation von Cyclin E führen; Cyclin E wiederum fördert die Bildung genomisch instabiler Zellen, die daraufhin zusätzliche Mutationen anhäufen können (Hubalek, Widschwendter et al. 2004). Dieses Modell klärt jedoch nicht, ob nur solche Zellen Onkogene, wie z.B. Cyclin E, überexprimieren, die bereits den Verlust von Kontrollpunkten aufweisen oder ob der Verlust der Kontrollpunkte einer der letzten Schritte in der Tumorentstehung ist (Storchova and Pellman 2004).

4.3.1. Die Ausbildung genetisch instabiler Zellen wird durch die Aktivierung eines Kontrollpunktes verhindert

Die Aktivierung von Kontrollpunkten in der Zelle erfolgt durch DNA Schäden, die durch UV-Licht, ionisierende Strahlung oder durch chemische Reagenzien verursacht wurden. Auch Replikationsstress, der zu DNA Strangbrüchen führen kann, resultiert in der Aktivierung der Kontrollpunkte (Checkpoints).

Schädigungen, die in der DNA auftreten, werden durch sogenannte Sensorproteine erkannt. Diese Proteine aktivieren über bisher unbekannte Mechanismen Proteine der Familie der Phosphoinositol-3-Kinasen, zu denen die ATM (Ataxia-telangiectasia-mutiert) und die ATR-Kinase (ATM and Rad-3 verwandt) gehören. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Serin-Threonin Kinasen, die im weiteren Verlauf der Kontrollpunktaktivierung regulatorische Proteine, aber auch andere Kinasen aktivieren. Die Aktivierung von Effektorproteinen führt dann zur Antwort der Zelle auf die jeweilige Situation. Solche zellulären Antworten können einerseits zur Apoptose führen, oder zum Zellzyklusarrest, um der Zelle die Möglichkeit zu geben, die Schäden zu reparieren. Ein solcher Zellzyklusarrest kann in der G1-, S- oder in der G2-Phase ausgelöst werden (Abraham 2001).

Der G1-Phase Kontrollpunkt wird v.a. durch genotoxischen Stress induziert und führt zu der Akkumulation des p53 Proteins, dessen wichtigstes transkriptionelles Target p21 ist. Da p21 wie auch p27 Cyclin/CDK2 Komplexe inhibieren kann, erfolgt eine Inhibition der Kinaseaktivität, wodurch die Progression in die S-Phase inhibiert wird (Molinari 2000). Die Stabilisierung von p53 ist auf die Aktivierung von ATM zurückzuführen, wird aber durch die Fähigkeit von ATR p53 ebenfalls zu phosphorylieren unterstützt (Abraham 2001). Auch der S-Phase Kontrollpunkt kann durch beide Kinasen; ATM und ATR kontrolliert werden. ATM wird v.a. durch extrinsischen Stress, z.B. ionisierende Strahlung aktiviert und führt zu der Aktivierung der CHK2 Kinase, die den Abbau von CDC25 inhibiert. Die Aktivierung von Cyclin E und Cyclin A Komplexen ist somit verzögert (vergleiche Einleitung 1.4.). So erfolgt die Inhibition der DNA Synthese. Intrinsische Faktoren, wie z.B. Replikationsfehler führen v.a. zu der Aktivierung von ATR. Die Aktivierung dieses Kontrollpunktes, der auch durch die Aktivierung der CHK1 Kinase kontrolliert wird, verhindert eine mitotische Katastrophe, die durch Replikationsfehler verursacht wird. Gleichzeitig aktiviert dieser Kontrollpunkt Reparaturmechanismen, z.B. durch homologe Rekombination. Ein dritter Kontrollpunkt führt zu einem G2 Arrest. Dieser Kontrollpunkt wird v.a. durch ATR reguliert und stellt für die Zelle den letzten Kontrollpunkt dar, um nicht mit geschädigter DNA in die Mitose eintreten zu müssen. Dieser Kontrollpunkt beruht auf der Inaktivierung von Cyclin B/CDK1 Komplexen, die für den Eintritt in die Mitose essentiell sind. Die Inhibition erfolgt durch eine Phosphorylierung von CDC25 durch CHK1, die zwei Auswirkungen hat: 1. ist die phosphorylierte CDC25 Phosphatase inaktiv; 2. erfolgt durch die Phosphorylierung die Ausbildung einer Bindungsstelle für 14-3-3 Proteine, die CDC25 binden und es im Cytoplasma sequestrieren.

Die Funktion dieser ATM und ATR Kinase in der Etablierung der jeweiligen Kontrollpunkte kann jedoch nicht vollständig voneinander getrennt werden. So scheint zum Beispiel die Aktivierung von ATM als Teil des G2-Phase Kontrollpunktes essentiell für die Aufrechterhaltung des Zellzyklusblocks zu sein. Zurückgeführt werden kann dies eventuell auf die Fähigkeit von ATM die CHK2 Kinase zu aktivieren, die ebenfalls in der Lage ist, Cyclin B Komplexe zu inhibieren (Abraham 2001).

Ein weiterer Kontrollpunkt, der in der Metaphase der Mitose lokalisiert ist, ist der Spindel-Checkpoint. Er wird aktiviert, wenn die Schwesterchromatiden nicht richtig an die mitotische Spindel angeheftet sind und verhindert dadurch die Ausbildung polyploider oder aneuploider Zellen. In Hefen wurden zwei Genfamilien identifiziert, BUB-Gene (budding uninhibited by benomyl) und MAD-Gene (mitotic arrest deficient), die essentiell für die Ausbildung dieses Arrestes sind und auch Homologe in Säugern haben. Die Proteine der MAD-Gene wirken zum Beispiel durch Inaktivierung des APC^{CDC20} Komplexes, der für den Abbau mitotischer Cycline notwendig ist (Molinari 2000).

Die Analyse der Cullin 3 knock out und Wildtyphepatozyten zeigt, dass die Akkumulation von Cyclin E und die Aktivierung des Cyclin E abhängigen Kinasekomplexes zur Ausbildung genomisch instabiler Zellen führt. Gleichzeitig zeigt sich jedoch auf den Schnitten,

dass nicht alle Zellen genomisch instabil sind, sondern einige Hepatozyten bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme nur endoreduplizieren. Dies kann auf zwei Möglichkeiten zurückgeführt werden. Die im vorhergehenden Abschnitt aufgestellte Hypothese, dass die Aktivierung der Cyclin E/CDK2 Kinaseaktivität notwendig für die Ausbildung genetisch instabiler Zellen ist, kann zu dem Rückschluss führen, dass in den endoreduplizierenden Zellen die Cyclin E/CDK2 Kinaseaktivität noch nicht vollständig aktiviert worden ist. Dies kann zum Beispiel auf eine ungleichmäßige Infektion der Hepatozyten mit Cyclin E Adenoviren zurückzuführen sein, so dass die Zellen, die am Tag der Probenentnahme nicht genetisch instabil sind, eine geringere Akkumulation von Cyclin E und der assoziierten Kinaseaktivität aufweisen. Andererseits zeigen Veröffentlichungen, dass die Akkumulation von Cyclin E zu der Bildung von Replikationsgabeln führt, d.h. Replikationsstress durch Bildung von DNA Strangbrüchen verursacht (Ekholm-Reed, Mendez et al. 2004). Wie gerade beschrieben, können solche Strangbrüche zu der Aktivierung von Kontrollpunkten führen, die den Eintritt der Zelle in die Mitose verhindern. D.h., Zellen die genetisch instabil sind, haben den Kontrollpunkt, der eine mitotische Katastrophe durch die Auslösung eines G2 Zellzyklusarrestes verhindert, überschritten, während in den Zellen, die bis zu diesem Zeitpunkt nur endoreduplizieren, dieser Kontrollpunkt aktiviert ist.

Ein direkter Vergleich zwischen endoreduplizierenden und genetisch instabilen Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern, die spezifisch für aktivierte Kontrollproteine sind, könnte u.a. Hinweise darauf geben, welche Kontrollpunkte die Ausbildung genomisch instabiler Zellen verhindern. Zum Vergleich des Genexpressionsmusters von genetisch instabilen und endoreduplizierenden Zellen könnten Laser-Mikrodissektierte Proben mit Hilfe von Genearray Untersuchungen analysiert werden. Des weiteren könnten verschiedene Mausmodelle, die durch genetische Manipulation einen Defekt in der Aktivierung und Aufrechterhaltung von Kontrollpunkten aufweisen, genutzt werden, um Cyclin E mit Hilfe von Adenoviren überzuexprimieren. Einer der Kontrollpunkte, die den Eintritt der Zellen in die Mitose kontrollieren, wird durch p53 reguliert. p53 ist in der Lage, zur Repression des Cyclin B Promotors, zu führen (Innocente, Abrahamson et al. 1999). Die Repression des Cyclin B Promotors so konnte durch weitere Arbeiten von Innocente et al. gezeigt werden, ist abhängig von der Bindung von p53 an den Transkriptionsfaktor Sp-1 (Innocente and Lee 2005). Des weiteren bilden p53 knock out Mäuse spontan Tumoren, wodurch die Bedeutung von p53 als Kontrollpunkt am Eintritt in die G2-Phase unterstrichen wird (Johnson and Walker 1999). Auch p21 kann den Übergang der Zelle in die G2/M-Phase inhibieren. p21 bindet an Cyclin B/CDK1 Komplexe und verhindert so die Dephosphorylierung des Cyclin/CDK Komplexes durch die CDC25 Phosphatase, der Eintritt in die Mitose wird dadurch verhindert (Nyberg, Michelson et al. 2002).

Ob die Ausbildung genomisch instabiler Zellen die Ursache für die Entstehung von Tumoren ist oder eine Konsequenz der zellulären Transformation darstellt, ist jedoch nicht geklärt (Molinari 2000). Es wird vermutet, dass die Ausbildung genomisch instabiler Zellen durch den Verlust von Kontrollpunkten ein wichtiger Schritt in der Tumorentwicklung ist.

Betrachtet man die Analyse der Cullin 3 knock out Lebern, 12 Wochen nach Verlust von Cullin 3, zeigt sich, dass in diesen Lebern keine Tumorstufen nachweisbar sind.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der oben aufgestellten Hypothese, dass genetisch instabile Zellen nur entstehen können, wenn ein Kontrollpunkt überschritten wird, führt dies zu der Fragestellung, warum diese genetisch instabilen Zellen 1. in den Cullin 3 knock out Hepatozyten nicht mehr nach 12 Wochen nachweisbar sind und 2. warum die genetisch instabilen Zellen, die 3 Wochen nach dem Verlust des Cullin 3 Genes nachweisbar waren, nicht zur Bildung von Tumorstufen führen.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Zellen die den G2-Phase Kontrollpunkt überschritten haben, genetisch instabile Zellen bilden, aber nicht in die Cytokinese eintreten. So konnte z.B. gezeigt werden, dass p53 und p21 essentiell für einen Zellzyklusarrest vor dem Eintritt in die Mitose sind. Der Verlust beider Proteine in humanen Kolonkarzinomzellen zeigte, dass nach Bestrahlung dieser Zellen, solche die kein p53 oder p21 exprimieren die Mitose durchlaufen, nicht aber die Cytokinese. Solche Zellen waren v.a. binukleär und wiesen auch Mikronuklei auf (Bunz, Dutriaux et al. 1998). Die Aktivierung eines Kontrollpunktes, der die Cytokinese genetisch instabiler Zellen inhibiert, könnte die Tumprogression, wie es die Cullin 3 knock out Hepatozyten zeigen, inhibieren. Gleichzeitig bedeutet dies auch, dass die Entstehung von Tumorzellen neben der Akkumulation von Onkogenen und der Inaktivierung von Kontrollpunkten, z.B. von p53 auch abhängig von der Inaktivierung eines Kontrollpunktes in der Cytokinese ist.

Wie sich ein solcher Kontrollpunkt etabliert, ist bisher nicht bekannt. In *Saccharomyces cerevisiae* wird die Cytokinese durch den SIN Komplex (septation initiation network) kontrolliert. Dieser Komplex besteht aus multiplen Proteinen, die mit dem Spindel Pol Körper assoziieren. Der Verlust des SIN Signaltransduktionsweges führt zu der Bildung von multinukleären Zellen, während die Aktivierung die Cytokinese nach der Mitose katalysiert. Dieser Signaltransduktionsweg führt zu der Kontraktion des kontraktiven Ringes und der Synthese des Teilungsseptums. Es wird vermutet, dass SIN für einen Kontrollpunkt notwendig ist, der den Aufbau des kontraktiven Ringes überprüft. Es ist jedoch bisher noch nicht klar, ob der SIN Signaltransduktionsweg notwendig ist, um den Aufbau dieses Ringes zu ermöglichen oder ob SIN die Ring Kontraktion katalysiert.

In Säugern scheint die Induktion der Cytokinese abhängig von dem kleinen G-Protein Rho-A zu sein, dessen Zielproteine in der Zelle sehr vielfältig sind. So reguliert Rho-A über seinen Effektor ROCK die Aktivierung von Myosin II und es aktiviert die LIM Kinase, die durch die Inhibition von Cofilin dazu führt, dass existierende Aktinfilamente stabilisiert werden, wodurch u.a. der Aufbau des kontraktiven Ringes erfolgen kann. Ob einer der Signaltransduktionswege, die den Aufbau des kontraktiven Ringes regulieren, in genetisch instabilen Zellen inhibiert ist, kann durch Immunfluoreszenzfärbungen überprüft werden.

5.0 ZUSAMMENFASSUNG

Die Induktion der Proliferation in ruhenden Zellen ist abhängig von der Aktivierung von Cyclin-Kinasekomplexen sowie ihren Inhibitoren. Eines der wichtigsten Cycline in der Regulation des G1/S-Phase Überganges ist Cyclin E, dessen Verlust in Fibroblasten den Übergang in die S-Phase inhibiert. Des Weiteren zeigte die Generation der Cyclin E knock out Maus, dass Cyclin E für die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen in Trophoblasten essentiell ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Cyclin E/CDK2 Komplexen und dessen Inhibitor p27 in der Kontrolle der Zellproliferation und Entstehung von Endoreduplikationszyklen sowie genetischer Instabilität zu untersuchen. Hierzu wurden unterschiedliche Mausmodelle analysiert. Alle Mausmodelle zeigten eine Akkumulation von Cyclin E, die einerseits sekundär durch die Bindung von p27 an Cyclin E/CDK2 (Skp2 knock out Maus), andererseits durch den Verlust eines Proteins des Cyclin E Degradationskomplexes Cullin 3 oder durch die adenovirale Überexpression von Cyclin E in Hepatozyten verursacht wurde. Die Untersuchung der Proliferation von Hepatozyten in der Skp2 knock out Maus zeigte, dass durch die Akkumulation von p27 und seine Bindung an Cyclin E/CDK2 Komplexe die Kinaseaktivität inhibiert wird und die Hepatozyten in der frühen G1-Phase arretieren. Anstatt einer Regeneration der Leber durch Zellteilung erfolgt in diesen Tieren ein Zellwachstum, um die Funktion des Organes aufrecht zu erhalten. p27 fungiert demzufolge als Schalter zwischen Zellteilung und Zellwachstum. Essentiell ist hierbei der Abbau von p27 während der frühen G1 Phase, was wir durch die Analyse einer Mausmutante in der der Abbau von p27 während der S Phase blockiert ist (p27T187A knock in).

Die Akkumulation inaktiver Cyclin E/CDK2 Komplexe in der Skp2 knock out Maus ist für die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen verantwortlich. Die Ausbildung genetisch instabiler Zellen dahingegen kann nur durch die Akkumulation von aktiven Cyclin E/CDK2 Komplexen erfolgen. Dies konnte durch Untersuchungen in Cullin 3 knock out Hepatozyten und Wildtyp-hepatozyten, die Cyclin E durch adenoviralen Gentransfer überexprimieren, gezeigt werden. In beiden Mauslinien ist der Abbau von p27 durch den Skp2 Komplex möglich und führt somit zu einer Aktivierung der Cyclin E abhängigen Kinaseaktivität. Die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen und genetisch instabilen Zellen ist, wie durch die Injektion von Cyclin E Adenoviren in CDK2 knock out Mäuse gezeigt werden konnte, abhängig von CDK2. In CDK2 knock out Mäusen führt die Akkumulation von Cyclin E zur Induktion von Proliferationszyklen, wodurch gezeigt wurde, dass CDK2 für die Induktion der Proliferation nicht notwendig ist, jedoch essentiell für die Ausbildung von Endoreduplikationszyklen und genetisch instabilen Zellen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Aktivierung von Cyclin E/CDK2 Komplexen durch den Abbau von p27 in der frühen G1-Phase essentiell für den Eintritt der Hepatozyten in den Zellzyklus ist. Des Weiteren erfolgen Endoreduplikationszyklen in Hepatozyten durch die Akkumulation von inaktiven Cyclin E/CDK2 Komplexen, die, wenn sie aktiviert werden, die Ausbildung genetisch instabiler Zellen beschleunigen. Für beide Prozesse ist die Bindung von Cyclin E an CDK2 notwendig, während die Zellzyklusprogression des Hepatozyten nicht abhängig von CDK2 ist.

5.1. SUMMARY

The induction of proliferation in quiescent cells depends on the activation of cyclin kinase complexes as well as on the degradation of cyclin kinase inhibitors. The most important cyclin in the regulation of the G1/S-transition is Cyclin E, whose loss in fibroblasts leads to an inhibition of S-phase entry. In addition to its function in the regulation of cell cycle progression it has been shown that cyclin E is necessary for the generation of endoreduplication cycles in trophoblast cells.

The aim of the study was to analyze the function of Cyclin E/CDK2 complexes and its inhibitor p27 in the control of proliferation and the generation of endoreduplication cycles as well as genetic instability in hepatocytes. For this purpose different mouse models were used. All of these mouse models showed an accumulation of cyclin E, which is caused by a) binding of the cyclin kinase inhibitor p27 to Cyclin E/CDK2 complexes (Skp2 knock out mouse) or b) by the loss of the cyclin E degradation promoting protein Cullin3. In another mouse model cyclin E accumulation was achieved by the overexpression of Cyclin E by adenoviral transfer into hepatocytes. The analysis of the proliferative capacity of Skp2 knock out hepatocytes showed that the accumulation of p27 and its binding to Cyclin E/CDK2 complexes inhibits its kinase activity and leads to an arrest of the hepatocytes at the G1/S- transition. Instead of regenerating the liver by cell proliferation and division Skp2 knock out mice regenerate their livers by massive cell growth to maintain liver function. The degradation of p27 is therefore essential for cell cycle progression; thereby acting as a switch between cell division and cell growth. The regulation of these two functions could be localized to the early G1-phase through the analysis of a p27^{T187A} knock in mouse strain in which p27, due to a defect in its turnover, is only degraded during the early G1-phase.

In this study also shows that the accumulation of inactive Cyclin E/CDK2 complexes in the results in the generation of endoreduplication cycles, while genetically instable cells only arise when these complexes can be activated. These results were obtained through the analysis of Cullin 3 knock out and wildtype hepatocytes which accumulate cyclin E due to defective cyclin E turnover and by analyzing hepatocytes which overexpressed cyclin E after adenoviral transfer of Cyclin E. These experiments lead to the conclusion that CDK2 is dispensable for normal cell proliferation but necessary for the generation of endoreduplication cycles and genetically instable cells.

To conclude: this work demonstrated that the activation Cyclin E/CDK2 complexes is essential for the entry of hepatocytes into the cell cycle. This process is regulated by the degradation of p27 during the early G1-phase. Furthermore the generation of polyploid cells through endoreduplication cycles is only possible when Cyclin E/CDK2 kinase activity is inhibited. In contrast the unscheduled activation of these complexes leads to genetically instable hepatocytes. Cyclin E therefore acts as a master regulator of hepatocyte homeostasis by regulating cell proliferation, endoreduplication and genetic instability depending on the activation of its associated CDK2 kinase.

6.0 LITERATURVERZEICHNIS

- Abraham, R. T. (2001).
"Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." *Genes Dev* 15(17): 2177-96.
- Adams, P. D., W. R. Sellers, et al. (1996).
"Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors." *Mol Cell Biol* 16(12): 6623-33.
- Aleem, E., H. Kiyokawa, et al. (2005).
"Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition." *Nat Cell Biol* 7(8): 831-6.
- Ang, X. L. and J. Wade Harper (2005).
"SCF-mediated protein degradation and cell cycle control." *Oncogene* 24(17): 2860-70.
- Ardley, H. C. and P. A. Robinson (2005).
"E3 ubiquitin ligases." *Essays Biochem* 41: 15-30.
- Bagchi, S., R. Weinmann, et al. (1991).
"The retinoblastoma protein copurifies with E2F-1, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F." *Cell* 65(6): 1063-72.
- Bai, C., P. Sen, et al. (1996).
"SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box." *Cell* 86(2): 263-74.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, et al. (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." *Nature* 434(7035): 864-70.
- Bashir, T., N. V. Dorrello, et al. (2004).
"Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase." *Nature* 428(6979): 190-3.
- Bermejo, R., N. Vilaboa, et al. (2002).
"Regulation of CDC6, geminin, and CDT1 in human cells that undergo polyploidization." *Mol Biol Cell* 13(11): 3989-4000.
- Berthet, C., E. Aleem, et al. (2003).
"Cdk2 knockout mice are viable." *Curr Biol* 13(20): 1775-85.
- Berthet, C., K. D. Klarmann, et al. (2006).
"Combined loss of Cdk2 and Cdk4 results in embryonic lethality and Rb hypophosphorylation." *Dev Cell* 10(5): 563-73.
- Besson, A., M. Gurian-West, et al. (2006).
"A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression." *Genes Dev* 20(1): 47-64.

- Besson, A., M. Gurian-West, et al. (2004).
"p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation."
Genes Dev 18(8): 862-76.
- Boehm, M., T. Yoshimoto, et al. (2002).
"A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression." *Embo J* 21(13): 3390-401.
- Bunz, F., A. Dutriaux, et al. (1998).
"Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage."
Science 282(5393): 1497-501.
- Busino, L., M. Chiesa, et al. (2004).
"Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis."
Oncogene 23(11): 2050-6.
- Campisi, J., E. E. Medrano, et al. (1982).
"Restriction point control of cell growth by a labile protein: evidence for increased stability in transformed cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(2): 436-40.
- Carrano, A. C., E. Eytan, et al. (1999).
"SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27."
Nat Cell Biol 1(4): 193-9.
- Carthon, B. C., C. A. Neumann, et al. (2005).
"Genetic replacement of cyclin D1 function in mouse development by cyclin D2."
Mol Cell Biol 25(3): 1081-8.
- Chen, C. A. and H. Okayama (1988).
"Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA." *Biotechniques* 6(7): 632-8.
- Chen, J., P. Saha, et al. (1996).
"Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1." *Mol Cell Biol* 16(9): 4673-82.
- Ciechanover, A. (2005).
"Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture)." *Angew Chem Int Ed Engl* 44(37): 5944-67.
- Ciemerych, M. A., A. M. Kenney, et al. (2002).
"Development of mice expressing a single D-type cyclin." *Genes Dev* 16(24): 3277-89.
- Cobrinik, D. (2005).
"Pocket proteins and cell cycle control." *Oncogene* 24(17): 2796-809.
- Coleman, M. L. and C. J. Marshall (2001).
"A family outing: small GTPases cyclin' through G1." *Nat Cell Biol* 3(11): E250-1.

- Coller, H. A., L. Sang, et al. (2006).
"A new description of cellular quiescence." *PLoS Biol* 4(3): e83.
- Conlon, I. and M. Raff (1999).
"Size control in animal development." *Cell* 96(2): 235-44.
- Coverley, D., H. Laman, et al. (2002).
"Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation." *Nat Cell Biol* 4(7): 523-8.
- Dannenberg, J. H., A. van Rossum, et al. (2000).
"Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions." *Genes Dev* 14(23): 3051-64.
- Delobel, P., I. Lavenir, et al. (2006).
"Cell-cycle markers in a transgenic mouse model of human tauopathy: increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1." *Am J Pathol* 168(3): 878-87.
- Donzelli, M. and G. F. Draetta (2003). "Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation." *EMBO Rep* 4(7): 671-7.
- Dyson, N. (1998).
"The regulation of E2F by pRB-family proteins." *Genes Dev* 12(15): 2245-62.
- Ekhholm-Reed, S., J. Mendez, et al. (2004).
"Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly." *J Cell Biol* 165(6): 789-800.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, et al. (1983).
"Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." *Cell* 33(2): 389-96.
- Fang, S. and A. M. Weissman (2004).
"A field guide to ubiquitylation." *Cell Mol Life Sci* 61(13): 1546-61.
- Fero, M. L., M. Rivkin, et al. (1996).
"A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice." *Cell* 85(5): 733-44.
- Fujita, N., S. Sato, et al. (2003).
"Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization." *J Biol Chem* 278(49): 49254-60.
- Gao, F. B. and M. Raff (1997).
"Cell size control and a cell-intrinsic maturation program in proliferating oligodendrocyte precursor cells." *J Cell Biol* 138(6): 1367-77.

- Geisen, C. and T. Moroy (2002).
"The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein." *J Biol Chem* 277(42): 39909-18.
- Geng, Y., Q. Yu, et al. (2003).
"Cyclin E ablation in the mouse." *Cell* 114(4): 431-43.
- Gorlich, D., F. Vogel, et al. (1995).
"Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import." *Nature* 377(6546): 246-8.
- Grana, X., J. Garriga, et al. (1998).
"Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth." *Oncogene* 17(25): 3365-83.
- Guidotti, J. E., O. Bregerie, et al. (2003).
"Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes." *J Biol Chem* 278(21): 19095-101.
- Hafen, E. and H. Stocker (2003).
"How are the sizes of cells, organs, and bodies controlled?" *PLoS Biol* 1(3): E86.
- Hardie, D. C., T. R. Gregory, et al. (2002).
"From pixels to picograms: a beginners' guide to genome quantification by Feulgen image analysis densitometry." *J Histochem Cytochem* 50(6): 735-49.
- Hartwell, L. H., J. Culotti, et al. (1974).
"Genetic control of the cell division cycle in yeast." *Science* 183(120): 46-51.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998).
"The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* 67: 425-79.
- Honda, R., E. D. Lowe, et al. (2005).
"The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles." *Embo J* 24(3): 452-63.
- Hubalek, M. M., A. Widschwendter, et al. (2004).
"Cyclin E dysregulation and chromosomal instability in endometrial cancer." *Oncogene* 23(23): 4187-92.
- Hwang, H. C. and B. E. Clurman (2005).
"Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles." *Oncogene* 24(17): 2776-86.
- Innocente, S. A., J. L. Abrahamson, et al. (1999).
"p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(5): 2147-52.
- Innocente, S. A. and J. M. Lee (2005).
"p53 is a NF-Y- and p21-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription." *FEBS Lett* 579(5): 1001-7.

- Iritani, B. M. and R. N. Eisenman (1999).
"c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development."
Proc Natl Acad Sci U S A 96(23): 13180-5.
- Jackman, M., C. Lindon, et al. (2003).
"Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase." Nat Cell Biol 5(2):
143-8.
- Johnson, D. G. and C. L. Walker (1999).
"Cyclins and cell cycle checkpoints." Annu Rev Pharmacol Toxicol 39: 295-312.
- Johnston, L. A., D. A. Prober, et al. (1999).
"Drosophila myc regulates cellular growth during development." Cell 98(6): 779-90.
- Kaldis, P. and M. J. Solomon (2000).
"Analysis of CAK activities from human cells." Eur J Biochem 267(13): 4213-21.
- Kamura, T., T. Hara, et al. (2003).
"Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation."
Proc Natl Acad Sci U S A 100(18): 10231-6.
- Kamura, T., T. Hara, et al. (2004).
"Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase."
Nat Cell Biol 6(12): 1229-35.
- Kelly, B. L., K. G. Wolfe, et al. (1998).
"Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation
of the retinoblastoma protein." Proc Natl Acad Sci U S A 95(5): 2535-40.
- Kim, S. Y., A. Herbst, et al. (2003). "Skp2 regulates Myc protein stability and activity."
Mol Cell 11(5): 1177-88.
- Kitagawa, M., H. Higashi, et al. (1996).
"The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for
phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2." Embo J 15(24): 7060-9.
- Koepp, D. M., L. K. Schaefer, et al. (2001).
"Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase."
Science 294(5540): 173-7.
- Koff, A., F. Cross, et al. (1991).
"Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2
gene family." Cell 66(6): 1217-28.
- Koff, A., M. Ohtsuki, et al. (1993).
"Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent
kinase by TGF-beta." Science 260(5107): 536-9.

- Kotake, Y., K. Nakayama, et al. (2005).
"Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation." *J Biol Chem* 280(2): 1095-102.
- Kozar, K., M. A. Ciemerych, et al. (2004).
"Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins." *Cell* 118(4): 477-91.
- Kramer, E. R., N. Scheuringer, et al. (2000).
"Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1." *Mol Biol Cell* 11(5): 1555-69.
- Lee, M. G. and P. Nurse (1987).
"Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*." *Nature* 327(6117): 31-5.
- Lee, T. A. and M. Tyers (2001).
"Ubiquitin junction, what's your function?" *Genome Biol* 2(10): REPORTS4025.
- Lee, W. H. (1989).
"The molecular basis of cancer suppression by the retinoblastoma gene." *Princess Takamatsu Symp* 20: 159-70.
- Lew, D. J., V. Dulic, et al. (1991).
"Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast." *Cell* 66(6): 1197-206.
- Liang, J., J. Zubovitz, et al. (2002).
"PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest." *Nat Med* 8(10): 1153-60.
- Malek, N. P., H. Sundberg, et al. (2001).
"A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase." *Nature* 413(6853): 323-7.
- Marti, A., C. Wirbelauer, et al. (1999).
"Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation." *Nat Cell Biol* 1(1): 14-9.
- Massague, J. (2004).
"G1 cell-cycle control and cancer." *Nature* 432(7015): 298-306.
- Mateyak, M. K., A. J. Obaya, et al. (1999).
"c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points." *Mol Cell Biol* 19(7): 4672-83.
- Matsumoto, Y. and J. L. Maller (2004).
"A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry." *Science* 306(5697): 885-8.

- Mayer, R. J. (2000).
"The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis."
Nat Rev Mol Cell Biol 1(2): 145-8.
- Mendez, J., X. H. Zou-Yang, et al. (2002).
"Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication." *Mol Cell* 9(3): 481-91.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997).
"Liver regeneration." *Science* 276(5309): 60-6.
- Minamishima, Y. A. and K. Nakayama (2002).
"Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice." *Cancer Res* 62(4): 995-9.
- Mitchison, J. M. and P. Nurse (1985).
"Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *J Cell Sci* 75: 357-76.
- Mittnacht, S., J. A. Lees, et al. (1994).
"Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation." *Embo J* 13(1): 118-27.
- Molinari, M. (2000).
"Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer." *Cell Prolif* 33(5): 261-74.
- Moolten, F. L. and N. L. Bucher (1967).
"Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation." *Science* 158(798): 272-4.
- Morgan, D. O. (1997).
"Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 261-91.
- Murray, A. W. (2004).
"Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* 116(2): 221-34.
- Nakayama, K., H. Nagahama, et al. (2000).
"Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication." *Embo J* 19(9): 2069-81.
- Nevins, J. R., S. P. Chellappan, et al. (1991).
"E2F transcription factor is a target for the RB protein and the cyclin A protein." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56: 157-62.
- Nigg, E. A. (2001).
"Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 21-32.

- Nugroho, T. T. and M. D. Mendenhall (1994).
"An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells."
Mol Cell Biol 14(5): 3320-8.
- Nyberg, K. A., R. J. Michelson, et al. (2002).
"Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints."
Annu Rev Genet 36: 617-56.
- Ohtani, K., J. DeGregori, et al. (1995).
"Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1."
Proc Natl Acad Sci U S A 92(26): 12146-50.
- Pardee, A. B. (1974).
"A restriction point for control of normal animal cell proliferation."
Proc Natl Acad Sci U S A 71(4): 1286-90.
- Parisi, T., A. R. Beck, et al. (2003).
"Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells." *Embo J* 22(18): 4794-803.
- Passmore, L. A. and D. Barford (2004).
"Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation."
Biochem J 379(Pt 3): 513-25.
- Pelizon, C. (2003).
"Down to the origin: Cdc6 protein and the competence to replicate."
Trends Cell Biol 13(3): 110-3.
- Petersen, B. O., J. Lukas, et al. (1999).
"Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization." *Embo J* 18(2): 396-410.
- Petersen, B. O., C. Wagener, et al. (2000).
"Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1." *Genes Dev* 14(18): 2330-43.
- Petroski, M. D. and R. J. Deshaies (2005).
"Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases."
Nat Rev Mol Cell Biol 6(1): 9-20.
- Pines, J. (1995).
"Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view."
Biochem J 308 (Pt 3): 697-711.
- Polyak, K., J. Y. Kato, et al. (1994).
"p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest." *Genes Dev* 8(1): 9-22.
- Porter, L. A. and D. J. Donoghue (2003).
"Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators."
Prog Cell Cycle Res 5: 335-47.

- Prigent, C. and S. Dimitrov (2003).
"Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?"
J Cell Sci 116(Pt 18): 3677-85.
- Prober, D. A. and B. A. Edgar (2000).
"Ras1 promotes cellular growth in the Drosophila wing." Cell 100(4): 435-46.
- Pruitt, K. and C. J. Der (2001).
"Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis."
Cancer Lett 171(1): 1-10.
- Rajagopalan, H., P. V. Jallepalli, et al. (2004).
"Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability."
Nature 428(6978): 77-81.
- Reed, S. I., J. A. Hadwiger, et al. (1985).
"Protein kinase activity associated with the product of the yeast cell division cycle gene CDC28." Proc Natl Acad Sci U S A 82(12): 4055-9.
- Reed, S. I. and C. Wittenberg (1990).
"Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of Saccharomyces cerevisiae."
Proc Natl Acad Sci U S A 87(15): 5697-701.
- Reimann, J. D., E. Freed, et al. (2001).
"Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." Cell 105(5): 645-55.
- Resnitzky, D. and S. I. Reed (1995).
"Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition."
Mol Cell Biol 15(7): 3463-9.
- Rodier, G., A. Montagnoli, et al. (2001).
"p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis." Embo J 20(23): 6672-82.
- Sage, J., G. J. Mulligan, et al. (2000).
"Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization." Genes Dev 14(23): 3037-50.
- Santoro, S. W. and P. G. Schultz (2002).
"Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase."
Proc Natl Acad Sci U S A 99(7): 4185-90.
- Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review."
Vet Pathol 35(6): 461-78.
- Schulman, B. A., A. C. Carrano, et al. (2000).
"Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex."
Nature 408(6810): 381-6.

- Schulman, B. A., D. L. Lindstrom, et al. (1998).
"Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10453-8.
- Schwechheimer, C. and L. I. Calderon Villalobos (2004).
"Cullin-containing E3 ubiquitin ligases in plant development."
Curr Opin Plant Biol 7(6): 677-86.
- Sekimoto, T., M. Fukumoto, et al. (2004).
"14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1)." *Embo J* 23(9): 1934-42.
- Sheaff, R. J., M. Groudine, et al. (1997).
"Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1." *Genes Dev* 11(11): 1464-78.
- Shin, I., J. Rotty, et al. (2005).
"Phosphorylation of p27Kip1 at Thr-157 interferes with its association with importin alpha during G1 and prevents nuclear re-entry." *J Biol Chem* 280(7): 6055-63.
- Shin, I., F. M. Yakes, et al. (2002).
"PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization." *Nat Med* 8(10): 1145-52.
- Singer, J. D., M. Gurian-West, et al. (1999).
"Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells." *Genes Dev* 13(18): 2375-87.
- Steiner, P., A. Philipp, et al. (1995).
"Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes." *Embo J* 14(19): 4814-26.
- Storchova, Z. and D. Pellman (2004).
"From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(1): 45-54.
- Sutterluty, H., E. Chatelain, et al. (1999).
"p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells." *Nat Cell Biol* 1(4): 207-14.
- Takeda, D. Y. and A. Dutta (2005).
"DNA replication and progression through S phase." *Oncogene* 24(17): 2827-43.
- Tedesco, D., J. Lukas, et al. (2002).
"The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2)." *Genes Dev* 16(22): 2946-57.
- Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002).
"Sibling rivalry in the E2F family." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(1): 11-20.

- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, et al. (2003).
"The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer."
Cell Prolif 36(3): 131-49.
- Viglietto, G., M. L. Motti, et al. (2002).
"Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer."
Nat Med 8(10): 1136-44.
- Vodermaier, H. C. and J. M. Peters (2002).
"Conspiracy to disarm APC in interphase." *Nat Cell Biol* 4(5): E119-20.
- von der Lehr, N., S. Johansson, et al. (2003).
"The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription." *Mol Cell* 11(5): 1189-200.
- Wasch, R. and D. Engelbert (2005).
"Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells." *Oncogene* 24(1): 1-10.
- Weiss, A., A. Herzig, et al. (1998).
"Continuous Cyclin E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*." *Curr Biol* 8(4): 239-42.
- Welcker, M., A. Orian, et al. (2004).
"A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size."
Curr Biol 14(20): 1852-7.
- Welcker, M., J. Singer, et al. (2003).
"Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation."
Mol Cell 12(2): 381-92.
- Welsh, C. F., K. Roovers, et al. (2001).
"Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho."
Nat Cell Biol 3(11): 950-7.
- Wilkinson, K. D. (2005).
"The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis."
Proc Natl Acad Sci U S A 102(43): 15280-2.
- Wirth, K. G., R. Ricci, et al. (2004).
"Loss of the anaphase-promoting complex in quiescent cells causes unscheduled hepatocyte proliferation." *Genes Dev* 18(1): 88-98.
- Zetterberg, A. and O. Larsson (1985).
"Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(16): 5365-9.
- Zhang, W. and H. T. Liu (2002).
"MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells."
Cell Res 12(1): 9-18.

Zheng, N., B. A. Schulman, et al. (2002).

"Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex."
Nature 416(6882): 703-9.

Zhou, Y., Y. P. Ching, et al. (2002).

"The APC regulator CDH1 is essential for the progression of embryonic cell cycles in Xenopus." Biochem Biophys Res Commun 294(1): 120-6.

Zhou, Y., Y. P. Ching, et al. (2003).

"Differential expression, localization and activity of two alternatively spliced isoforms of human APC regulator CDH1." Biochem J 374(Pt 2): 349-58.

Zhu, X. H., H. Nguyen, et al. (2004).

"Noncatalytic requirement for cyclin A-cdk2 in p27 turnover."
Mol Cell Biol 24(13): 6058-66.

Lebenslauf

Uta Kossatz
Holteistrasse 10
30175 Hannover

geb. 15.4.1976	Vater: Reinhard Kossatz Mutter: Dr. med. Helgard Kossatz geb. Meister
verheiratet	4.2.2006
1996	Abitur, Internatsgymnasium Schloß Torgelow
1993- 1994	High School Besuch in Sioux Falls, South Dakota
Jan.- Apr. 1997	Sprachschule in Paris
1997 - 2002	Studium der Humanbiologie an der Ernst- Moritz Arndt Universität in Greifswald
1999	Vordiplom
Jan.- Aug. 2001	Diplomarbeit am Deutschen Rheuma Forschungszentrum in Berlin zum Thema "CD14 bei der Phagozytose apoptotischer Zellen in den Keimzentren der Maus" (PhD C. Berek, Prof. Dr. Jack)
2002	Erteilung des Diplom durch die Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald
Seit 10/2002	Promotionsarbeit seit 1.Oktober 2002 im Institut für Molekularbiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. A. Gossler, Arbeitsgruppe Dr. med. N.P. Malek)
Veröffentlichungen	
Originalarbeiten	Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression Kossatz U, Dietrich N, Zender L, Buer J, Manns MP, Malek NP. Genes Dev. 2004 Nov 1;18(21):2602-7. C-terminal phosphorylation controls the stability and function of p27kip1 Uta Kossatz, Jörg Vervoorts, Irina Nিকেleit, Holly A. Sundberg, Simon Arthur, Michael P. Manns, Nisar P. Malek EMBO, in Revision

Testing the importance of p27 degradation by the SCFSkp2 pathway in murine models of lung and colon cancer
Inke Timmerbeul, Carrie M. Garrett-Engele, Uta Kossatz, Xueyan Chen, Eduardo Firpo, Viktor Grünwald, Kenji Kamino⁴, Ludwig Wilkens, Jan Buer, Robert Geffers, Stefan Kubicka, Michael P. Manns, Peggy L. Porter, James M. Roberts and Nisar P. Malek
PNAS, akzeptiert

Abstracts

p27 Kip1 defines a switch between cell growth and cell division
Uta Kossatz, Nils Dietrich, Lars Zender, Michael Manns, Nisar P. Malek
Cell Cycle Meeting 2002, N.Y.

The degradation of p27 in early G1 is essential for cell cycle progression in hepatocytes
Uta Kossatz, Nils Dietrich, Lars Zender, Michael Manns, Nisar P. Malek
European Association for Study of the liver 2005; Paris

The Cullin 3 dependent ubiquitinylation system regulates the genetic stability of hepatocytes
Uta Kossatz, J.Singer, M.P. Manns, N.P. Malek
European Association for Study of the liver 2006; Wien

Regulation von genetischer Stabilität durch das Cullin 3 abhängige Ubiquitilierungssystem der Leber
Uta Kossatz, Jeff Singer, Michael P. Manns und Nisar P. Malek
Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Köln

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

Uta Kossatz-Böhlert

Danksagung

Mein erster Dank geht an Dr. N. P. Malek für die Überlassung des Themas, seine fachliche Betreuung, seine Ratschläge und Hinweise während der Bearbeitung desselben und an Herrn Prof. Dr. Kubicka für die Übernahme des Koreferats.

Die Bedingungen im Institut für Molekularbiologie, unter denen ich diese Arbeit anfertigen konnte, sind ausgezeichnet - dafür danke ich Prof. Dr. Gossler und Dr. N. P. Malek.

Danken möchte ich den Mitgliedern des Instituts für Pathologie, des Instituts für Biometrie, der Arbeitsgruppe von PD Dr. I. Rudolph und der Abteilung für Gastroenterologie für ihre großzügige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe und des Instituts.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meinem Mann Ingo für die Unterstützung während der langen anstrengenden Zeit.

```

0      1      9829.63047758
1      2      9567.30645743      0.00000000

```

Konvergenzkriterien erfüllt.

13:42 Tuesday, May 16, 2006 2

Die Prozedur MIXED

Kovarianzparameterschätzwerte

Kov. Parm	Schätzwert	Standardfehler	Z-Wert	Pr Z	Alpha	Untere	Obere
tier	179.32	91.7806	1.95	0.0254	0.05	80.6102	685.61
Residual	357.62	15.3680	23.27	<.0001	0.05	329.31	389.76

Anpassungsstatistiken

```

-2 Res Log-Likelihood      9567.3
AIC (kleiner ist besser)  9571.3
AICC (kleiner ist besser) 9571.3
BIC (kleiner ist besser)  9572.4

```

Lösung für feste Effekte

Effekt	gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits- grade	t-Wert	Pr > t	Alpha
Intercept		37.7801	7.8111	7.95	4.84	0.0013	0.05
gruppe	1	9.0713	11.0528	7.97	0.82	0.4357	0.05
gruppe	2	38.2180	11.0828	8.06	3.45	0.0086	0.05
gruppe	3	-1.7609	12.3610	7.98	-0.14	0.8902	0.05
gruppe	4	-0.4609	12.3564	7.97	-0.04	0.9712	0.05
gruppe	5	0

Lösung für feste Effekte

Effekt	gruppe	Untere	Obere
Intercept		19.7497	55.8104
gruppe	1	-16.4318	34.5744
gruppe	2	12.6933	63.7428
gruppe	3	-30.2768	26.7549
gruppe	4	-28.9735	28.0516
gruppe	5	.	.

Typ 3 Tests der festen Effekte

Effekt	Zähler Freiheits- grade	Nenner Freiheits- grade	F-Statistik	Pr > F
gruppe	4	8.02	4.30	0.0377

13:42 Tuesday, May 16, 2006 3

Die Prozedur MIXED

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits- grade	t-Wert	Pr > t	Alpha
gruppe	1	46.8514	7.8199	7.99	5.99	0.0003	0.05
gruppe	2	75.9981	7.8622	8.16	9.67	<.0001	0.05
gruppe	3	36.0192	9.5802	8	3.76	0.0055	0.05
gruppe	4	37.3192	9.5742	7.98	3.90	0.0046	0.05
gruppe	5	37.7801	7.8111	7.95	4.84	0.0013	0.05

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	Untere	Obere
gruppe	1	28.8149	64.8878
gruppe	2	57.9305	94.0658
gruppe	3	13.9271	58.1112
gruppe	4	15.2313	59.4070
gruppe	5	19.7497	55.8104

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits-		
					grade	t-Wert	Pr > t
gruppe	1	2	-29.1468	11.0890	8.08	-2.63	0.0300
gruppe	1	3	10.8322	12.3665	8	0.88	0.4066
gruppe	1	4	9.5322	12.3619	7.98	0.77	0.4629

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Korrektur	Adj P	Alpha	Untere	Obere
gruppe	1	2	Scheffe	0.2364	0.05	-54.6760	-3.6176
gruppe	1	3	Scheffe	0.9360	0.05	-17.6875	39.3519
gruppe	1	4	Scheffe	0.9584	0.05	-18.9842	38.0487

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Adj	
			Lower	Upper
gruppe	1	2	-72.5729	14.2794
gruppe	1	3	-37.5970	59.2614
gruppe	1	4	-38.8789	57.9433

13:42 Tuesday, May 16, 2006 4

Die Prozedur MIXED

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits-		
					grade	t-Wert	Pr > t
gruppe	1	5	9.0713	11.0528	7.97	0.82	0.4357
gruppe	2	3	39.9790	12.3934	8.06	3.23	0.0120
gruppe	2	4	38.6790	12.3887	8.05	3.12	0.0141
gruppe	2	5	38.2180	11.0828	8.06	3.45	0.0086
gruppe	3	4	-1.3000	13.5442	7.99	-0.10	0.9259
gruppe	3	5	-1.7609	12.3610	7.98	-0.14	0.8902

gruppe 4 5* -0.4609 12.3564 7.97 -0.04 0.9712

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Korrektur	Adj P	Alpha	Untere	Obere
gruppe	1	5	Scheffe	0.9485	0.05	-16.4318	34.5744
gruppe	2	3	Scheffe	0.1162	0.05	11.4398	68.5182
gruppe	2	4	Scheffe	0.1318	0.05	10.1431	67.2149
gruppe	2	5	Scheffe	0.0886	0.05	12.6933	63.7428
gruppe	3	4	Scheffe	1.0000	0.05	-32.5399	29.9399
gruppe	3	5	Scheffe	0.9999	0.05	-30.2768	26.7549
gruppe	4	5	Scheffe	1.0000	0.05	-28.9735	28.0516

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Adj Lower	Adj Upper
gruppe	1	5	-34.2132	52.3557
gruppe	2	3	-8.5553	88.5133
gruppe	2	4	-9.8372	87.1952
gruppe	2	5	-5.1840	81.6201
gruppe	3	4	-54.3413	51.7413
gruppe	3	5	-50.1685	46.6466
gruppe	4	5	-48.8504	47.9285

7.2.

Statistische Analyse der Zellgröße der Epithelzellen der Bronchioli

Die Prozedur MIXED

Modellinformationen

```

Datei TMP1.MAEUSELUNGE1
Abhängige Variable wert
Kovarianzstruktur Variance Components
Schätzmethode REML
Residuenvarianzmethode Profil
Feste-Effekte-SE-Methode Modellbasiert
Freiheitsgradmethode Satterthwaite
    
```

Klassifizierungsausprägungsinformationen

Klasse	Ausprägungen	Werte
tier	6	1 2 3 4 5 6
gruppe	3	1 2 3

Dimensionen

Kovarianzparameter	2
Spalten in X	4
Spalten in Z	6
Subjekte	1
Max Beob. je Subjekt	316

Anzahl der Beobachtungen

Number of Observations Read	316
Number of Observations Used	316
Number of Observations Not Used	0

Die Prozedur MIXED

Effekt	Zähler Freiheits- grade	Nenner Freiheits- grade	F-Statistik	Pr > F
gruppe	2	2.66	106.18	0.0029

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits- grade	t-Wert	Pr > t	Alpha	Untere	Obere
gruppe	1	30.5019	2.2569	2.91	13.52	0.0010	0.05	23.1903	37.8136
gruppe	2	75.7515	2.2706	2.99	33.36	<.0001	0.05	68.5147	82.9883
gruppe	3	43.5405	2.1289	2.3	20.45	0.0012	0.05	35.4443	51.6367

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits- grade	t-Wert	Pr > t	Korrektur	Adj P	Alpha
gruppe	1	2	-45.2496	3.2014	2.95	-14.13	0.0008	Scheffe	0.0031	0.05
gruppe	1	3	-13.0386	3.1026	2.6	-4.20	0.0325	Scheffe	0.0668	0.05
gruppe	2	3	32.2110	3.1125	2.64	10.35	0.0033	Scheffe	0.0071	0.05

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Untere	Obere	Lower	Upper
gruppe	1	2	-55.5359	-34.9632	-60.4659	-30.0332
gruppe	1	3	-23.8377	-2.2894	-27.7852	1.7081
gruppe	2	3	21.4853	42.9367	17.4170	47.0050

Effekt	Zähler Freiheits- grade	Nenner Freiheits- grade	F-Statistik	Pr > F
gruppe	2	2.66	106.18	0.0029

Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits- grade	t-Wert	Pr > t	Alpha	Untere	Obere
gruppe	1	30.5019	2.2569	2.91	13.52	0.0010	0.05	23.1903	37.8136
gruppe	2	75.7515	2.2706	2.99	33.36	<.0001	0.05	68.5147	82.9883
gruppe	3	43.5405	2.1289	2.3	20.45	0.0012	0.05	35.4443	51.6367

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Schätzwert	Standardfehler	Freiheits- grade	t-Wert	Pr > t	Korrektur	Adj P	Alpha
gruppe	1	2	-45.2496	3.2014	2.95	-14.13	0.0008	Scheffe	0.0031	0.05
gruppe	1	3	-13.0386	3.1026	2.6	-4.20	0.0325	Scheffe	0.0668	0.05
gruppe	2	3	32.2110	3.1125	2.64	10.35	0.0033	Scheffe	0.0071	0.05

Differenzen Kleinste-Quadrate-Mittelwerte

Effekt	gruppe	_gruppe	Untere	Obere	Adj Lower	Adj Upper
gruppe	1	2	-55.5359	-34.9632	-60.4659	-30.0332
gruppe	1	3	-23.8377	-2.2394	-27.7852	1.7081
gruppe	2	3	21.4853	42.9367	17.4170	47.0050

Die Prozedur MIXED

Modellinformationen

Datei TMP1.MAEUSELEBER1
 Abhängige Variable wert
 Kovarianzstruktur Variance Components
 Schätzmethode REML
 Residuenvarianzmethode Profil
 Feste-Effekte-SE-Methode Modellbasiert
 Freiheitsgradmethode Satterthwaite

Klassifizierungsausprägungsinformationen

Klasse	Ausprägungen	Werte
tier	13	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
gruppe	5	1 2 3 4 5

Dimensionen

Kovarianzparameter	2
Spalten in X	6
Spalten in Z	13
Subjekte	1
Max Beob. je Subjekt	2190

Anzahl der Beobachtungen

Number of Observations Read	2190
Number of Observations Used	1096
Number of Observations Not Used	1094

Iterationsverlauf

Iteration	Evaluierungen	-2 Res Log Like	Kriterium
-----------	---------------	-----------------	-----------

Schlagworte

- Skp2
- Cyclin E
- Endoreduplikation