

Charakterisierung des humanen F-box Proteins Fbxw5

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

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biotechnol. Anja Puklowski
geboren am 08.01.1981 in Wolfenbüttel

2009

Referent: *Prof. Dr. Nisar Malek*
Koreferent: *Prof. Dr. med. Stefan Kubicka*
Tag der Promotion: 9. Dezember 2009

Diese Arbeit widme ich meiner verstorbenen Mutter,
die mich trotz ihrer Krankheit immer unterstützt hat.

DANKE

Für das Gelingen meiner Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Nisar P. Malek, für die sehr gute fachliche Betreuung und die wertvollen Ratschläge, sowie für die Vergabe dieser interessanten Fragestellung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanken.

Herrn Dr. Andreas Pich danke ich insbesondere für die Analyse und Auswertung der MASDAQ Proben, sowie einer Einführung in die Massenspektrometrie. Frau Dr. Gudrun Brandes gilt mein Dank für die Analyse der TEM Proben.

Herrn Dr. Pierre Gönczy und Fr. Dr. Ingrid Hoffmann, sowie deren beteiligten Mitarbeitern, möchte ich für die Bereitstellung der hSAS6 bzw. der Plk4 Konstrukte und Antikörper danken, sowie zahlreicher Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Malek für das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Frau Dr. Kristine Bousset und Dr. Sangeeta Chauhan für die anregenden Diskussionen, sowie die Unterstützung bei technischen Problemen. Ihr werdet mir fehlen!

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie danke ich für hilfreiche Diskussionen, sowie für technische und soziale Unterstützung. Insbesondere danke ich Dr. Leonie Alten für ihr stets offenes Ohr und ihre Hilfsbereitschaft mir gegenüber.

Ich danke Kerstin Golly, Dr. Kristine Bousset, Michaela Mai und Susann Zirzow für die kritische Durchsicht der Manuskripte, die viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank geht an meinen Mann Patrick, der mich die ganzen Jahre bedingungslos unterstützt und mir den Rücken frei gehalten hat, sowie seiner nie endenden Geduld.

Letztendlich gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären.

1 Zusammenfassungen

1.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das humane F-box Protein Fbxw5 untersucht, von dem zuvor weder seine Funktion noch seine Regulation bekannt waren.

Fbxw5 konnte als substratspezifische Untereinheit einer E3-Ligase identifiziert werden, die den Zentrosomen- mit dem Zellzyklus verbindet.

Mit siRNA Experimenten und Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass Fbxw5 eine wichtige Rolle in der Regulation der Zentrosomenduplikation spielt und den Zellzyklus beeinflusst: Der Verlust dieses Proteins bzw. die Überexpression einer F-box defizienten Variante führte zur Akkumulation von Zentrosomen und zur Bildung multipler Spindeln. Im Gegensatz dazu konnte die Zahl der Zentrosomen durch die Überexpression des Wildtyp Proteins reduziert und eine Arretierung der Zellen am G1/S-Übergang beobachtet werden. Zusätzlich ließ sich Fbxw5 nicht nur im Zytoplasma, sondern auch teilweise am Zentrosom darstellen.

Fbxw5 konnte in dieser Arbeit als Bestandteil des SCF beschrieben werden. Somit wurde untersucht ob es in seiner Funktion als E3-Ligase die Zentrosomenduplikation reguliert. Mit hSAS6 konnte dann das an der Zentrosomenduplikation beteiligte, kritische Substrat von Fbxw5 ermittelt werden: Die Proteinspiegel zeigten eine entsprechende Regulation nach Überexpression bzw. Verlust des Wildtyp Fbxw5 Proteins. Eine Interaktion von Fbxw5 mit hSAS6 konnte nicht nur nach Überexpression, sondern auch mit endogenem Protein durch Co-Immünpräzipitation gezeigt werden. Darüber hinaus konnte in *in vivo* His-Ubiquitinilierungsversuchen nachgewiesen werden, dass der Abbau dieses Proteins durch Fbxw5 beeinflusst wird. In weiteren Untersuchungen wurden mit Hilfe von Deletionsmutanten die letzten beiden WD40 Wiederholungen des Fbxw5 als Interaktionsbereiche bestimmt.

Für den genauen Ablauf der Zentrosomenduplikation ist es wichtig, dass alle beteiligten Proteine zum richtigen Zeitpunkt aktiv sind. Deshalb werden sie beispielsweise durch Phosphorylierung reguliert. In dieser Arbeit konnte bewiesen

werden, dass der Abbau von hSAS6 durch den SCF^{Fbxw5} durch die Polo-like Kinase 4 (Plk4) negativ reguliert wird. In Anwesenheit von Plk4 zeigten sich eine Stabilisierung der hSAS6 Proteinspiegel und eine Abnahme der Ubiquitinierung. Diese Effekte konnten auf die Kinaseaktivität der Plk4 zurückgeführt werden, da eine kinasetote Variante keinen Einfluss auf die Regulation von hSAS6 hatte.

Als wichtiger Regulator des Zentrosomen- und Zellzyklus ist auch für Fbxw5 eine strikte Regulation zu erwarten. In der Tat konnte in dieser Arbeit Fbxw5 als ein im Zellzyklus reguliertes Protein identifiziert werden, das am Übergang von der G1- zur S-Phase akkumuliert. In verschiedenen Versuchen konnte zudem gezeigt werden, dass der Anaphase-Promoting-Complex (APC/C) mit Cdc20 als Adapter für den Abbau von Fbxw5 während der Mitose verantwortlich ist.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein zellzyklusregulierter SCF-Komplex mit Fbxw5 als substratspezifische Untereinheit die Zentrosomenduplikation durch den Abbau von hSAS6 reguliert.

1.2 Abstract

In this work we investigated the so far unknown function and regulation of the human F-box protein Fbxw5. Fbxw5 could be identified as the targeting subunit of an E3-ligase which couples the centrosome- and the cell cycle.

SiRNA experiments and overexpression studies proofed the important role of Fbxw5 in the regulation of the centrosome duplication cycle and its influence on the cell cycle: The loss of this protein as well as the overexpression of an F-box deficient version led to the accumulation of centrosomes and to the formation of aberrant mitotic spindles. Conversely, overexpression of the wildtype protein prevented centrosome duplication and arrested the cells at the G1/S boundary. Furthermore, Fbxw5 localized to the cytoplasm and also partially to the centrosome.

In this work we showed that Fbxw5 is part of a functional SCF complex. Therefore we investigated its function as an E3-ligase in the regulation of centrosome duplication. In these studies the centriolar protein hSAS-6 was identified as a critical substrate of the SCF^{Fbxw5} complex: The protein levels were regulated according to the overexpression and the loss of wildtype Fbxw5. The interaction between Fbxw5 and hSAS6 could be seen after overexpression and also at endogenous levels. Besides that we were able to show that Fbxw5 specifically degrades hSAS6. Further investigations with Fbxw5 deletion mutants mapped the site of interaction to the last two WD40 repeats.

It is important for the exact timing of centrosome duplication that all involved proteins are expressed at the right timepoint. Therefore they are getting regulated through different mechanisms, e.g. by phosphorylation. In this work, we could show that the ability of SCF^{Fbxw5} to ubiquitylate hSAS6 is negatively regulated by Polo-like-kinase 4 (Plk4). In the presence of Plk4 hSAS6 protein levels were stabilized and its degradation by Fbxw5 was reduced. These effects could be proven to be dependent on Plk4 kinase activity.

Fbxw5 is itself a cell cycle regulated protein which starts to accumulate at the G1/S boundary. We also showed in this study that the anaphase promoting complex (APC/C^{Cdc20}) degrades Fbxw5 at the beginning of mitosis.

In summary, we could show in this work that a cell cycle regulated SCF complex with Fbxw5 as the targeting subunit regulates centrosome duplication through the degradation of hSAS6.

1.3 *Schlagworte*

Schlagworte: Zentrosom, Zentrosomenduplikation, Fbxw5
Key words: centrosome, centrosome duplication, Fbxw5

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassungen.....	5
1.2 Abstract.....	7
1.3 Schlagworte.....	9
2. Abkürzungsverzeichnis	14
3. Einleitung	16
3.1 Der eukaryotische Zellzyklus.....	16
3.2 Kontrollpunkte im Zellzyklus garantieren einen fehlerfreien Ablauf	17
3.3 Zentrosomenaufbau	18
3.4 Der Zentrosomenduplikationszyklus.....	19
3.5 Die Polo-like-Kinase 4 ist ein Regulator der Zentrosomenduplikation	22
3.6 hSAS6 übernimmt wichtige Aufgaben während der Zentrosomenduplikation .	24
3.7 Proteinabbaukomplexe übernehmen wichtige Funktionen während der Zentrosomenduplikation	25
3.8 Abbau von Proteinen mittels des E1-E2-E3 Ligase Systems	26
3.9 Der SCF-Komplex und seine Funktion im Zellzyklus	28
3.10 F-box-Proteine und ihre Funktion im Zellzyklus.....	29
3.11 Der APC/C übernimmt wichtige Funktionen im Zellzyklus.....	30
3.12 Das Zentrosom und seine Rolle in der Tumorentstehung	32
3.13 Die Kopplung des Zentrosomen- und Zellzyklus	35
4.Zielsetzung.....	36
5.Methoden	38
5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken.....	38
5.1.1 Kultivierung von adhärenen Monolayerkulturen	38
5.1.2 Subkultivierung von adhärenen Monolayerkulturen	38
5.1.3 Zellzahlbestimmung.....	39
5.1.4 Kryokonservierung von Zellkulturen.....	40
5.1.5 Transfektion.....	40
5.1.5.1 siRNA Transfektion.....	40
5.1.5.2 Polyethylenimin Transfektion	41
5.1.6 Zellsynchronisation.....	41
5.1.6.1 Nocodazolblock	41
5.1.6.2 Doppelter Thymidinblock.....	42

5.1.6.3 Hydroxyureablock	42
5.1.6.4 Aphidicolinblock	43
5.1.7 Durchflusszytometrie	43
5.2 Analytische Zellkulturtechniken	44
5.2.1 Quantifizierung des Proteingehalts mittels Dc Protein-Assay	44
5.2.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran	45
5.2.2.1 SDS-Gelelektrophorese	45
5.2.2.2 Western Blot	47
5.2.2.3 Phos-tag™ Polyacrylamidgelen	49
5.2.3 Probenvorbereitung für die MASDAQ Analyse	49
5.2.4 Immunpräzipitation	50
5.2.5 His-Ubiquitinilierung	51
5.2.6 Halbwertszeitbestimmung von Proteinen	52
5.2.7 RNS Isolierung	53
5.2.7.1 cDNS Synthese	53
5.2.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
5.2.8 Klonierung	55
5.2.8.1 DNS Fällung	55
5.2.8.2 Restriktionsverdau	55
5.2.8.3 DNS Elution aus Agarosegelen	56
5.2.8.4 Ligation	56
5.2.8.5 Transformation	57
5.2.8.6 Plasmidaufreinigung – Mini	57
5.2.8.7 Plasmidaufreinigung – CsCl ₂	58
5.2.9 Immunfluoreszenz	60
5.2.9.1 TUNEL Färbung	61
5.2.10 Antikörperherstellung	61
5.2.10.1 Proteinexpression in Bakterien	61
5.2.10.2 Proteinaufreinigung mittels Elektroelution	62
5.2.10.3 Proteinaufkonzentrierung	62
5.2.10.4 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern	63
5.3 Material	64
5.3.1 Geräte	64
5.3.2 Verbrauchsmaterialien	65
5.3.3 Chemikalien	66
5.3.4 Antikörper	69

5.3.4.1 Primäre Antikörper.....	69
5.3.4.2 Sekundäre Antikörper.....	71
5.3.5 Primer	72
5.3.6 Zellkulturmaterialien	73
5.3.6.1 Zellkulturen	73
5.3.6.2 Zellkulturmedien	74
5.3.7 Verwendete Software	75
6 Ergebnisse	76
6.1 Funktion.....	76
6.1.1 Mikroskopische Untersuchung Fbxw5 siRNA behandelter Zellen	76
6.1.1.1 Der Verlust von Fbxw5 führt zur Bildung multipolarer Spindeln.....	76
6.1.1.2 Der Verlust von Fbxw5 führt zum Anstieg der Zentrosomenzahl pro Zelle.....	78
6.1.1.3 Effekte der Überexpression von Myc-Fbxw5 auf die Zentrosomenzahl.....	79
6.1.1.4 Effekte der Fbxw5 siRNA Behandlung auf die Zellzahl.....	81
6.1.1.5 Zelluläre Lokalisation von Myc-Fbxw5 nach Überexpression	82
6.1.2 Identifizierung von Fbxw5 als Komponente eines SCF-Komplexes	84
6.1.2.1 Assoziation von Fbxw5 mit den Komponenten des SCF-Komplexes	84
6.1.2.2 Assoziation des endogenen Fbxw5 Proteins mit Komponenten des SCF-Komplexes.....	85
6.1.2.3 Effekte der Überexpression von Myc deltaFbox Fbxw5 auf die Zentrosomenzahl	86
6.1.3 Zellzyklusunabhängiger Einfluss von Fbxw5 auf die Zentrosomenduplikation	88
6.1.3.1 Zentrosomenüberduplikation in Hydroxyurea und Aphidicolin behandelten Zellen	88
6.2 Regulation	91
6.2.1 Modifikation der Fbxw5 Proteinmenge in Abhängigkeit der Zellzyklusphase.....	91
6.2.1.1 Veränderung der Fbxw5 Proteinmenge zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus	91
6.2.1.2 Veränderung der Fbxw5 Proteinmenge nach Nocodazolblock	93
6.2.1.3 Veränderung der Fbxw5 RNS Konzentration nach Thymidinblock	94
6.2.2 Fbxw5 Proteinabbau durch den APC/C	95
6.2.2.1 Identifizierung von Cdc20 als Interaktionspartner von Fbxw5.....	96
6.2.2.2 Cdc20 abhängiger Proteinabbau von Fbxw5	97
6.2.2.3 Inhibition des Proteinabbaus von Fbxw5 durch Emi1	98
6.3 Interaktionspartner	99
6.3.1 hSAS6 ist ein möglicher Interaktionspartner von Fbxw5	99
6.3.1.1 Veränderung der hSAS6 Proteinspiegel in Abhängigkeit von Fbxw5	99
6.3.1.2 Identifizierung von Fbxw5 als Interaktionspartner von hSAS6.....	100
6.3.1.3 Stabilisierung der hSAS6 Halbwertszeit.....	102
6.3.1.4 Fbxw5 abhängiger Proteinabbau von hSAS6	104

6.3.1.5 hSAS6 Interaktion mit verschiedenen deltaWD40 Deletionsmutanten von Fbxw5.....	105
6.3.1.6 Proteinabbau von hSAS6 in Abhängigkeit der deltaWD40 Deletionsmutanten	106
6.3.2 Zyklin E ist kein Interaktionspartner von Fbxw5	108
6.4 Regulation der hSAS6/Fbxw5 Interaktion.....	109
6.4.1 Aurora Kinasen.....	109
6.4.1.1 Aurora A ist ein möglicher Interaktionspartner von Fbxw5.....	109
6.4.1.2 Aurora A ist kein Substrat von Fbxw5	110
6.4.2 Polo-like Kinasen.....	111
6.4.2.1 Plk1 ist kein Interaktionspartner von Fbxw5.....	111
6.4.2.2 Plk3 ist kein Interaktionspartner von Fbxw5.....	112
6.4.2.3 Plk4 interagiert mit Fbxw5 nach Überexpression	113
6.4.2.3.1 Plk4 ist kein Substrat von Fbxw5	114
6.4.2.3.2 Plk4 reguliert den Abbau von hSAS6 durch Fbxw5	115
6.4.2.3.3 Plk4 verlängert die Halbwertszeit von hSAS6 in Anwesenheit von Fbxw5.....	116
6.4.2.3.4 Plk4 führt zum Anstieg von hSAS6 Proteinspiegeln in Anwesenheit von Fbxw5	117
6.4.2.3.5 Plk4 abhängige Phosphorylierung von Fbxw5	119
7. Diskussion.....	121
7.1 Aufklärung der biologischen Funktion des humanen F-box Proteins Fbxw5 .	121
7.1.1 Verlust von Fbxw5 mittels siRNA Technologie.....	121
7.1.2 Überexpression des humanen F-box Proteins Fbxw5.....	124
7.2 Die Zentrosomenüberduplikation nach Fbxw5 Verlust ist Zellzyklus unabhängig	125
7.3 Fbxw5 bildet einen SCF-Komplex	127
7.4 Fbxw5 ist im Zellzyklus reguliert und wird durch den APC/C ^{Cdc20} abgebaut..	129
7.5 Fbxw5 reguliert die Zentrosomenduplikation durch den Abbau von hSAS6..	131
7.6 Plk4 abhängige Phosphorylierung reguliert Fbxw5 Interaktion mit hSAS6	134
7.7 Modell zur Funktion und Regulation von Fbxw5 im Zentrosomenzyklus	137
8. Anhang.....	141
8.1 Literaturverzeichnis	141
8.2 Lebenslauf.....	158

2 Abkürzungen

A	Ampère
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ABI	<i>Applied Biosystems Incorporated</i>
APC/C	Anaphase Promoting Komplex Zyklusom
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C-	Carboxy-
cDNS	<i>complementary</i> DNS
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
d	2'-Desoxyribo-
Da	Dalton
dd	doppelt destiliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Dinatriumsalz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
et al.	und andere
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
m	milli (10^{-3})
M	molar
MG132	z-leu-leu-leu-ala
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNS	messenger RNS
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
n	Nano (10^{-9})
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte

PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
PP	Polypropylen
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SCF	Skp1 – Cullin1 – F-box Protein
s.o.	siehe oben
Std	Standard
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUNEL	Terminale Desoxynukleotidyltransferase mediated dUTP Nick END Label
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
W	Watt

3 Einleitung

3.1 Der eukaryotische Zellzyklus

Exponentiell wachsende Säugetierzellen durchlaufen während ihrer Lebenszeit wiederholt einen streng regulierten Zyklus, an dessen Ende grundsätzlich die Teilung der Zelle steht. Dieser Zyklus garantiert den Fortbestand des Organismus, da er für Wachstum und Erneuerung steht. Die Zellteilung kann in zwei unterschiedliche Abschnitte eingeteilt werden: die Mitose und die Interphase (s. Abb. 1). Während der Interphase sind drei distinkte Abschnitte zu unterscheiden: G1 (G = Gap, z.D. Lücke), Synthese (S) und G2. Während in den beiden Gap Phasen primär Zellwachstum stattfindet, erfolgt die komplette Verdopplung des Chromosomensatzes in der S-Phase.

Die Mitose hingegen kann in fünf Bereiche unterteilt werden: Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zellteilung (Zytokinese). Die ersten vier Phasen bereiten die Chromosomen auf die bevorstehende Zellteilung vor und sorgen für eine gleichmäßige Anordnung an der Metaphasenplatte, damit eine gleichmäßige Verteilung auf die neuentstehenden Tochterzellen ermöglicht wird. Die anschließende Zellteilung beendet den Zellzyklus durch die Teilung des Zytoplasmas mit der Einschnürung der Zellmembran durch einen kontraktilen Ring. Zellen, die z. B. aufgrund von Differenzierung den Zellzyklus nicht mehr durchlaufen, befinden sich in der Gap 0 (G0) Phase. In diesem Zustand sind die meisten Zellen, da der vorliegende, einfache Chromosomensatz weniger anfällig für Mutationen (= spezielle Veränderung der DNS) ist. Einige Zellarten können jedoch aus diesem „Ruhezustand“ nach Stimulation z.B. unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wieder zurück in den Zellzyklus gelangen. Eine Missregulation dieses elementaren Ablaufs führt zur Veränderung des Erbguts und/oder zum Zelltod. Sind die Zellen durch weitere Veränderungen der DNS (Mutationen) nicht mehr in der Lage, den programmierten Zelltod einzugehen oder im Zellzyklus zu arretieren bis alle Schäden behoben sind, führt dieses zur Tumorbildung.

3.2 Kontrollpunkte im Zellzyklus garantieren einen fehlerfreien Ablauf

Damit der Zellzyklus nicht fehlerhaft abläuft, existieren vor den Übergängen zur nächsten Phase Kontrollpunkte. Hierzu zählen der Restriktionspunkt (G1/S), der G2-Kontrollpunkt (G2/M), der Spindelaufbaukontrollpunkt in der M-Phase (SAC) und der DNS Beschädigungskontrollpunkt in der S-Phase. Der G1-Phase Restriktionspunkt entscheidet, ob die Umgebung und die Vitalität der Zelle eine Zellteilung begünstigen. Während der S-Phase wird überprüft, ob die Replikation der DNS vollständig und richtig durchgeführt wurde. Ist dieses nicht der Fall, wird die Zellteilung solange unterbrochen, bis die notwendigen Reparaturen abgeschlossen sind. Anschließend kann die Zelle die Zellteilung beenden. Ein weiterer, sehr wichtiger Kontrollpunkt liegt in der M-Phase. Der SAC wird so lange aktiviert, bis alle Chromosomen mit dem Spindelapparat verbunden werden können. Dieses verhindert eine vorschnelle Zellteilung und die DNS kann gleichmäßig auf die neuentstehenden Tochterzellen verteilt werden (Salmon et al. 2007).

Viele verschiedene Moleküle sind für den fehlerfreien Übergang zwischen den Phasen verantwortlich. Zu den wichtigsten Regulatoren gehören die Zykline und Zyklin-abhängigen Kinasen (englisch: cyclin dependent kinase; Cdk). Die Menge der Zykline ist im Gegensatz zu den Kinasen zyklischen Schwankungen unterworfen (Murray 2004). Daher kann jede Zellzyklusphase durch ein bestimmtes Zyklin charakterisiert werden. Beispielsweise wird die Akkumulation des B Typ Zyklin benötigt, damit Cdk1 aktiviert werden kann und die Zelle in die Mitose eintritt. Im Gegensatz dazu muss Zyklin B zum Ende der Mitose abgebaut werden, damit Cdk1 inaktiviert wird und die Zelle mittels Zytokinese den Zellzyklus beenden kann.

Darüber hinaus hemmen inhibitorische Proteine, wie z.B. p27, p53, p21, die Arbeit dieser Komplexe durch reversible Phosphorylierung. Die Aktivität der zyklischen Kinasen ist essentiell für den Verlauf im Zellzyklus.

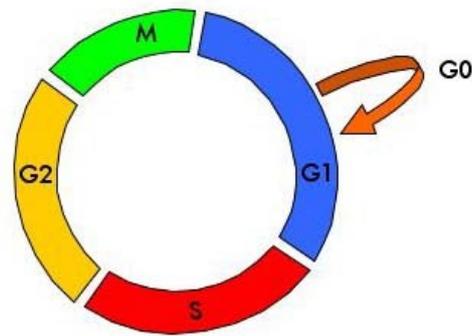


Abb. 1: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus.

3.3 Zentrosomenaufbau

Dass das Zentrosom eine wichtige und zentrale Funktion in der Zelle übernimmt, erkannte bereits sein Namensgeber Theodor Boveri im frühen 20. Jahrhundert. Es besteht aus zwei Zentriolen, die im rechten Winkel zueinander angeordnet sind. Diese $0,5 \mu\text{m} \times 0,2 \mu\text{m}$ großen, fassähnlichen Strukturen bestehen aus neun ringförmig angeordneten Mikrotubuli-Triplets, die von einem elektronendichten Bereich, dem Perizentriolären Material (PCM) umgeben sind (Bettencourt-Dias und Glover 2007; Doxsey 2001; Chretien et al. 1997; Kuriyama und Borisy 1981; Paintrand et al. 1992; Vorobjev und Chentsov 1982) (s. Abb. 2). Der Hauptbestandteil dieser Matrix sind große Doppelwendelproteine der Perizentrin Familie, wie beispielsweise Perizentrin, die zusammen eine salatblattähnliche Struktur formen. Sie bilden die Plattform für andere regulatorische Proteine, wie zum Beispiel Ninein, Centriolin und Nlp. Dabei dient dieser Proteinkomplex zusätzlich als Startpunkt für die spindelbildenden Mikrotubuli. Dieser Bereich wird daher auch als primäres Mikrotubuli Organisationszentrum (MTOC) bezeichnet (Stearns et al. 1991; Zheng et al. 1991; Zheng et al. 1995; Doxsey et al. 1994; Stearns und Kirschner 1994; Moritz et al. 1995; Dichtenberg et al. 1998; Schnackenberg et al. 1998). Die wichtigsten Bestandteile hierbei sind der gamma Tubulin Ringkomplex (γ -TuRC), der für die Bildung der Mikrotubuli verantwortlich ist. Dieser Proteinkomplex besteht aus dem gamma-tubulin Subkomplex (γ -TuSC), der aus zwei gamma Tubulin und jeweils einem GCP2 & GCP3 Protein aufgebaut ist. Mehrere dieser Tetramere formen eine ringförmige Struktur, die durch mindestens vier weitere Proteine stabilisiert wird und

somit den funktionierenden γ -TuRC bildet. Bei Verlust des γ -Tubulins ist die Zelle nicht mehr in der Lage, geordnete Spindeln auszubilden.

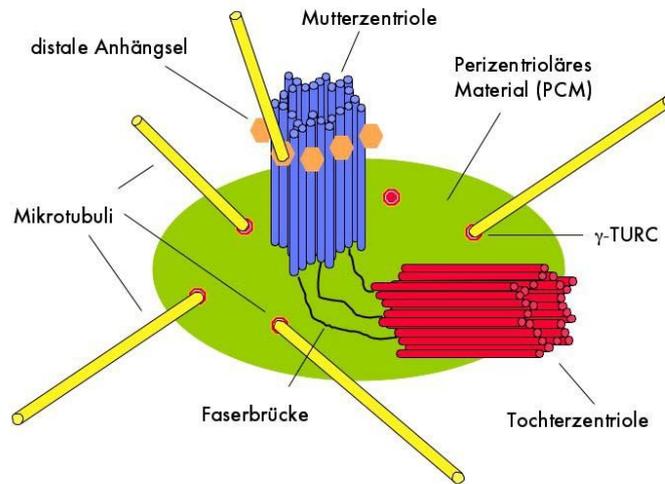


Abb. 2: Schematischer Aufbau des menschlichen Zentrosoms.

3.4 Der Zentrosomenduplikationszyklus

Bis heute sind noch nicht alle Funktionen des Zentrosoms vollständig geklärt. Neben seiner Aufgabe in der Mikrotubuliorganisation und des Aufbaus des Spindelapparates in der Mitose übernimmt es während der Interphase zusätzlich noch weitere Aufgaben in der Zellmotilität, -adhäsion und -polarität (Bettencourt-Dias und Glover 2007; Sankaran und Parvin 2006; Luders und Stearns 2007; Azimzadeh und Bornens 2007).

Und auch Boveris Vorhersage eines unersetzlichen Zentrosoms mit zentralen Aufgaben konnte nicht vollkommen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass selbst in Zellen, die keine Zentrosomen besitzen, wie beispielsweise weibliche Oozyten und höheren Pflanzen, eine geordnete Mitose abläuft. Die Aufgabe der Zentrosomen wird hierbei durch Basalkörperchen übernommen, die für die Mikrotubuliverankerung und Definition der Spindelpolenden wichtig sind (Lloyd und Chan 2006; Luders und Stearns 2007).

Der Aufbau des Spindelapparates erfolgt in tierischen Zellen mit Hilfe des PCMs. Hier keimen die Mikrotubuli und wachsen mit ihrem Plusende in Richtung der Metaphasenplatte. Obwohl das PCM sowohl Tochter- als auch Mutterzentriole

umgibt, besitzt nur die Mutter entsprechende Auswüchse für die Verankerung der Filamentfasern. Diese Auswüchse gelten als Anhaftungsstelle für die Mikrotubuli am Zentriol und auch als Verankerungsstelle an der Plasmamembran während der Ziliabildung. Es dauert in etwa eineinhalb Zellteilungen, bis die neu synthetisierten Tochterzentriolen die Größe und das Aussehen ihrer Müttern erhalten.

Die Duplikation der Zentrosomen kann in vier distinkte Abschnitte, die eng mit dem Zellzyklus verbunden sind, unterteilt werden (Abb. 3):

1. Disorientierung
2. Duplikation
3. Reifung
4. Separation

Der erste Schritt während des Zentrosomenzyklus ist die Disorientierung. Sie beginnt am Ende der vorhergehenden Mitose und kann bis in die nachfolgende G1-Phase andauern. Der genaue Mechanismus konnte noch nicht geklärt werden, es wird jedoch vermutet, dass zwei Komplexe, die den Abbau von Proteinen im Zellzyklus regulieren, der SCF-Komplex (Skp1-Cullin1-F-Box Proteinabbaukomplex) (Hinchcliffe und Sluder 2001) und der APC/C (Anaphase Promoting Komplex/Zyklosom) (Vidwans et al. 1999) zusammen mit dem Enzym Separase (Tsou und Stearns 2006) für die Entkopplung verantwortlich sind. Nach der anschließenden Zellteilung befinden sich die neu gebildeten Tochterzellen, die jeweils ein Zentrosom besitzen, bestehend aus zwei Zentriolen, in der G1-Phase. Im weiteren Verlauf entfernen sich die beiden Mutterzentriolen voneinander. Sie sind aber weiterhin am proximalen Ende durch eine Faserbrücke, hauptsächlich bestehend aus Rootletin und C-Nap1, miteinander verbunden (Xiaoqing Liu et al. 2002). Die Initiation der Duplikation erfolgt beim Übergang der G1- zur S-Phase. Ein Proteinkomplex bestehend aus Zyklin E und Cdk2 signalisiert dem Zentrosom, dass die Verdopplung beginnen kann (Okuda et al. 2008).

Als Folge der Initiation bilden sich am apikalen Ende der Mutterzentriolen kleine Knospen, die Tochterzentriolen (Chretien et al. 1997; Kuriyama und Borisy 1981;

Paintrand et al. 1992; Vorobjev und Chentsov 1982). Aufgrund des symmetrischen Aufbaus wird diese sich initial bildende Struktur auch als Wagenrad (englisch: cartwheel) bezeichnet.

Der genaue Mechanismus der Zentriolenduplikation konnte bisher noch nicht geklärt werden (Strnad et al. 2007). Berichte, in denen die Mutterzentriole als Vorlage für die heranwachsende Tochterzentriole dient (Pelletier, 2007; Duensing et al. 2007), konnten nicht bestätigt werden (Loncarek et al. 2008). Es scheint vielmehr, dass die Größe des PCMs einen Einfluss auf die Anzahl der sich neubildenden Töchter hat. Nach Überexpression von Perizentrin zeigte sich eine Korrelation zwischen der Zunahme an Tochterzentriolen und der Größe des PCMs. Die Mutter war in diesen Versuchen vernachlässigbar, da im gesamten PCM Zentriolen de Novo gebildet wurden. Dennoch ist die Mutterzentriole unabkömmlich, wenn es darum geht, funktionsfähige Tochterzentriolen zu bilden.

Im Verlauf der S-Phase erfolgt die Maturation der duplizierten Zentriolen. Während der Reifung, die bis zum Ende der G2-Phase dauert, wachsen die Tochterzentriolen bis zu 80 % der Muttergröße an. Den Abschluss dieser Phase bildet das Beladen des PCMs auf die neu gebildeten Töchter sowie die Assoziation der zweiten Mutterzentriole mit spezifischen Anhängseln an ihrem distalen Ende (Bornens 2002). Die Zelle besteht zu diesem Zeitpunkt des Zellzyklus aus zwei vollständig funktionsfähigen Zentrosomen.

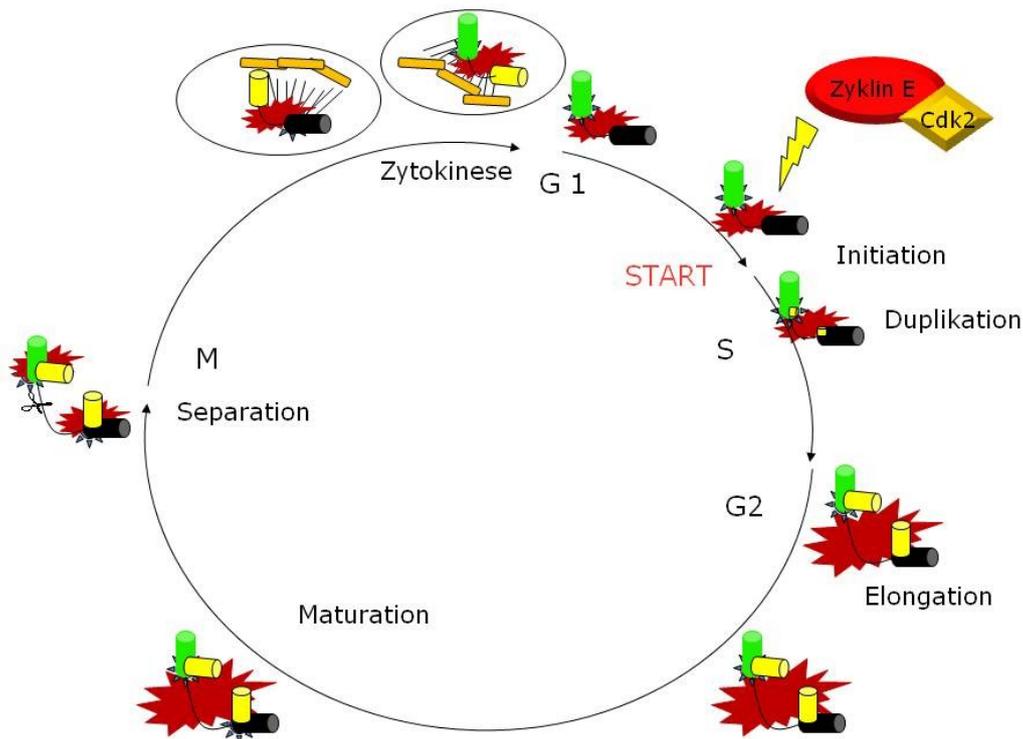


Abb. 3: Schematische Darstellung des Zentrosomenduplikationszyklus.

Damit sich die beiden Zentrosomen in der folgenden Separationsphase trennen können, muss die verbindende Faserbrücke durch ein Enzym gelöst werden. Im Laufe der nun stattfindenden Mitose wandern die Zentrosomen in entgegengesetzte Richtungen der Zelle und definieren somit die Lage der Spindel. Darüber hinaus markieren diese zwei Spindelpole die Positionen, zu denen die DNS hingezogen wird. Nach der nun folgenden Zytokinese erhält jede der zwei Tochterzellen ein funktionsfähiges Zentrosom bestehend aus zwei Zentriolen.

3.5 Die Polo-like Kinase 4 (Plk4) ist ein wichtiger Regulator während der Zentrosomenduplikation

Als Folge der Initiierung bilden sich am apikalen Ende der Mutterzentriolen kleine Knospen, die Tochterzentriolen. Der genaue Mechanismus konnte bisher noch nicht geklärt werden (Strnad et al. 2007). Berichte, in denen die Mutterzentriole als Vorlage für die heranwachsende Tochterzentriole dient (Pelletier, 2007; Duensing et al.

2007), konnten nicht bestätigt werden (Loncarek et al. 2008). Wie in Abb. 4 vereinfacht dargestellt ist, sind sehr viele Proteine an den ersten Schritten der Zentrosomenduplikation beteiligt. Als aller erstes Signal gilt die Phosphorylierung von Nucleophosmin durch den Proteinkomplex Zyklin E und Cdk2, welche zu seiner Translokation vom Zentrosomen führt (Okuda 2002). Diese Initiierung hat zur Folge, dass nun sequentiell eine ganze Gruppe von konservierten Proteinen unter der Kontrolle von Plk4 rekrutiert wird (Kleylein-Sohn et al. 2007; Habedanck et al. 2005; Salisbury et al. 2002). Hierzu gehören nach bisherigen Erkenntnissen hSAS6, CEP135 und CPAP, welche eine Art Startplattform für das nun folgende Zentriolenwachstum bilden (Kleylein-Sohn et al. 2007). Neben Cdk2 und Zyklin E gehört Plk4 zu den wichtigsten Initiatoren der Zentrosomenduplikation sowohl in humanen Zellen als auch in *D. melanogaster* (Habedank et al. 2005; Bettencourt-Dias et al. 2005). Für verschiedene Organismen konnte gezeigt werden, dass bei Verlust des Proteins die Zellen keine neuen Zentriolen bilden können (Bettencourt-Dias et al. 2005). Während Plk4 knockout Mäuse direkt nach der Gastrulation in ihrer Entwicklung anhalten, waren Heterozygote Wurfgeschwister lebensfähig und zeigten zudem eine Zunahme an spontanen Tumoren in der Leber und in anderen Organen aufgrund von Haploinsuffizienz (Habedanck et al. 2005; Ko et al. 2005). Unterstützend dazu zeigten verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass die Überexpression von Plk4 in Säugetierzellen zur Bildung von multiplen Prozentriolen an einer Mutterzentriole führte. Diese Strukturen haben unter dem Mikroskop eine charakteristische Blütenstruktur (Kleylein-Sohn et al. 2007; Habedanck et al. 2005). Beide Experimente weisen daraufhin, dass Plk4 eine unersetzliche Rolle in der Zentrosomenduplikation einnimmt. Die komplette Funktion und Regulation ist bis heute noch nicht geklärt. Bisher ist jedoch bekannt, dass Plk4 sehr früh in der Zentrosomenduplikation agiert. Sobald es aktiviert wird, lädt es hSAS6 zusammen mit hSAS5 und CPAP auf das sich bildende Wagenrad. In mehreren Veröffentlichungen wird aufgrund dieser wichtigen Funktion postuliert, dass der Plk4 Proteinspiegel stark reguliert werden muss (Kleylein-Sohn et al. 2007) und dass es nur ein kleines Zeitfenster im Zellzyklus geben dürfe, währenddessen dieses Protein aktiv sei. Bisher konnte gezeigt werden, dass Plk4 Proteinspiegel während der G2-Phase zunehmen bis zu einem Maximum in der Mitose (Cunha-Ferreira et al. 2008; Rogers et al. 2009). Der Abbau von Plk4 erfolgt anschließend aufgrund

unterschiedlicher Mechanismen. Michel Bornens konnte zeigen, dass Plk4 am Ende der Mitose einer starken Autophosphorylierung unterliegt, die zu einer SCF unabhängigen Degradation dieses Proteins führt. Des Weiteren zeigen verschiedene Publikationen, dass Plk4 in der Mitose vom APC reguliert wird, und für *D. melanogaster* (Bettencourt-Dias) und Säugerzellen (Duensing) konnte gezeigt werden, dass β -TRCP das Protein während der G1-Phase abbaut.

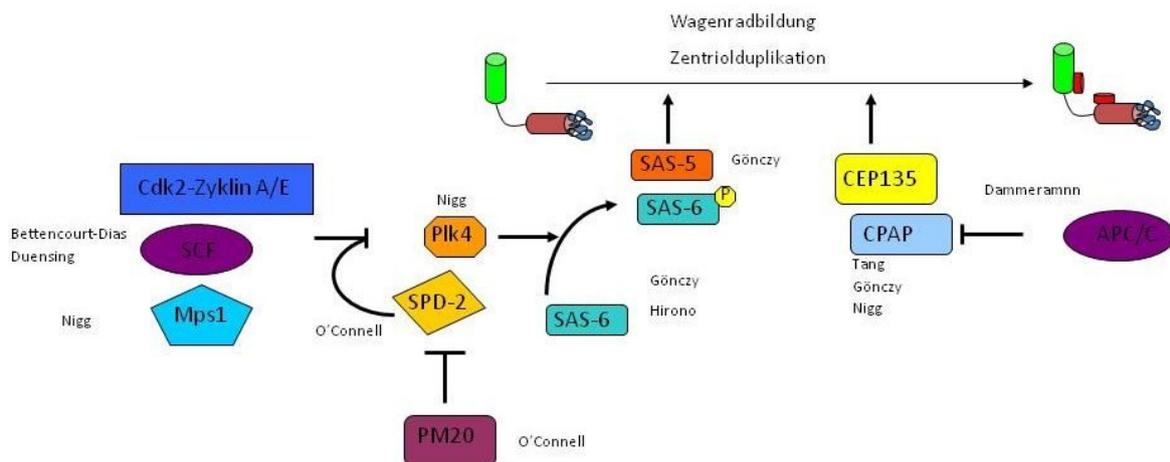


Abb. 4: Schematische Darstellung der Initiierung der Zentrosomenduplikation.

3.6 HSAS6 übernimmt wichtige Aufgaben während der Zentrosomenduplikation

HSAS6 ist ein konserviertes Doppelwendelprotein, das eine wichtige Rolle in verschiedenen Organismen während der Prozentriolformation einnimmt (Strnad et al. 2007; Dammermann et al. 2004; Leidel et al. 2005; Peel et al. 2007). Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass dieses Protein sowohl in Säugerzellen (Strnad et al. 2007) als auch in *D. melanogaster* (Rodrigues-Martins et al. 2007) asymmetrisch an der Zentriole während der Prozentriolformation angelagert ist. Der genaue Wirkmechanismus konnte bisher noch nicht geklärt werden. Aufgrund der konservierten Sequenz wird vermutet, dass hSAS6 ähnlich agiert wie die Vorläufer

der Spindelpolkkörper in *S. cerevisiae* (Adams und Kilmartin 1999; Byers und Goetsch 1974).

Es konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass der Verlust von hSAS6 in verschiedenen Organismen zu einem Anstieg an monopolaren Spindeln und zu einem Verlust von Zentriolen führt (Strnad et al. 2007; Rodrigues-Martins et al. 2007). Im Gegensatz dazu erhält man nach Überexpression dieses Proteins multiple Punkte an der Mutterzentriole, die mit zentriolären Markern übereinstimmen. Dieses spiegelt sich auch in einer erhöhten Frequenz von multipolaren Spindeln in diesen Proben wieder (Strnad et al. 2007; Leidel et al. 2005). In *Drosophila*embryonen führt diese Überrepräsentation von DSAS-6 zur zusätzlich Neubildung von MTOCs (Rodrigues-Martins et al. 2007), während sich in *C. elegans* Mutanten ungewöhnliche Strukturen bildeten, die auf mögliche Intermediate der Prozentriolformation hindeuten (Pelletier et al. 2006).

Aufgrund seiner wichtigen Funktion während der Zentrosomenduplikation wird ein enges Aktivitätszeitfenster dieses Proteins während des Zellzyklus gefordert. Hierzu konnten verschiedene Versuche zeigen, dass hSAS6 beginnend in der S-Phase akkumuliert und sich dieses bis zur Mitose fortsetzt. Zum Ende der Mitose wird das Protein dann vom APC^{Cdh1} abgebaut und kann anschließend im nächsten Zentrosomenzyklus wieder neu gebildet werden (Strnad et al. 2007).

Strnad et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass hSAS6 bereits sehr früh während der Prozentriolformation rekrutiert wird und dass dieses Plk4 unabhängig zu sein scheint. Die Plk4 Kinaseaktivität scheint eher bei der Aufrechterhaltung der zentriolären Lokalisation von hSAS6 eine wichtige Rolle zu spielen.

3.7 Proteinabbaukomplexe übernehmen wichtige Funktionen während der Zentrosomenduplikation

Das Zentrosom erhält eine immer größer werdende Bedeutung als Regulator der Zellzyklusübergänge, einschließlich des G1/S Übergangs (Hinchliffe et al. 2001; Khodjakov und Rieder 2001), des Metaphase-Anaphase Übergangs (Huang und Raff 1999; Wakefield et al. 2000) und Abschluss der Zytokinese (Khodjakov und Rieder

2001; Piel et al. 2001). Der genaue Mechanismus, wie das Zentrosom diese regulatorische Funktion übernimmt, ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Ein weit verbreitetes Modell sieht das Zentrosom als eine Art Plattform, auf der Enzyme und Substrate in engen Kontakt treten und alle wichtigen Signale von dieser zentralen Stelle aus in die Zelle geleitet werden können (Hansen et al. 2002). In früheren Veröffentlichungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Komponenten der proteolytischen Maschinerie phasenweise am Zentrosom lokalisiert sind. Bereits 1999 haben verschiedene Gruppen gezeigt, dass Proteinabbaukomplexe, wie der SCF-Komplex und der APC-Komplex, nicht nur den Chromosomenzyklus kontrollieren, sondern auch grundlegende Funktionen in der Zentrosomenduplikation haben (Freed et al. 1999; Hinchcliffe et al. 1999; Lacey et al. 1999; Meraldi et al. 1999; Vidwans et al. 1999; Cunha-Fereirra et al. 2008; Rogers et al. 2009; Korzeniewski et al. 2009). Freed et al. konnten zeigen, dass in Säugetieren die SCF Untereinheiten Skp1 und Cul1 nicht nur am Interphase Zentrosom, sondern auch am mitotische Zentrosom lokalisiert sind. Wurde die Funktion dieser Proteine durch spezifische Antikörper inhibiert, hatte dieses eine Störung der Zentriolenseparation zur Folge. Ein weiteres Indiz für die Beteiligung ubiquitinabhängiger Ligasen in der Regulation des Zentrosomenzyklus zeigte sich bei der Hemmung des 26S Proteasomes. Der Verlust führte zu einer Blockade der Zentriolenseparation *in vitro* sowie nach Injektion von Proteasominhibitoren in *Xenopus* Embryonen zu einer Blockade der Zentrosomenduplikation (Freed et al. 1999). Neben den Säugetieren konnte zusätzlich in anderen Organismen, wie beispielsweise *Drosophila*, der Einfluss verschiedener Abbaukomplexe auf den Zentrosomenzyklus gezeigt werden (Wojcik et al. 2000; Bettencourt-Dias et al. 2005; Patton et al. 1998; Peters 1998; McDonald und Byers 1997).

3.8 Abbau von Proteinen mittels des E1-E2-E3 Ligase Systems

Damit Proteine mittels des 26S Proteasome abgebaut werden können, müssen sie durch an Lysine gekoppelte Ubiquitinketten für den Abbau markiert werden. Für die Aufarbeitung der Ubiquitinmoleküle werden drei unterschiedliche Enzyme benötigt (s. Abb. 5). Zu Beginn wird das Ubiquitin durch die E1-Ligase mittels ATP aktiviert

und an ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym gebunden (Pagano 1997). Diese E2-Ligase wiederum interagiert mit einer E3-Ligase. Beispiele für E3-Ligasen sind der SCF-Komplex, der APC/C oder pVHL (Patton et al. 1998; Peters 1998; Deshaies 1999; Pause et al. 1999). Durch diese Interaktion wird das Ubiquitinmolekül in räumliche Nähe zum Substrat gebracht (del Pozo und Estelle 2000). Nach der Übertragung des ersten Ubiquitins können dem Zielprotein noch mehrere Moleküle angehängt werden, so dass ein verzweigtes Netz aus Ubiquitinmolekülen entsteht. Die E3-Ligasen bestimmen durch ihre Assoziation mit unterschiedlichen Co-Aktivatoren bzw. F-box Proteinen das entsprechende Zielprotein. (Hansen et al. 2002).

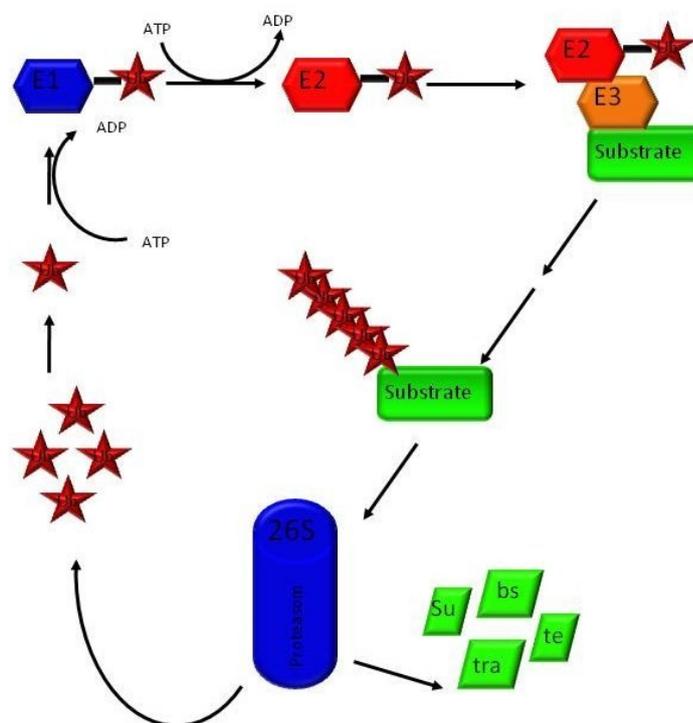


Abb. 5: Schematische Darstellung der Proteindegradation mittels des 26 S Proteasoms.

Der Abbau bestimmter zellzyklusassoziierter Substrate mittels ubiquitinabhängiger Proteolyse ist ein weit verbreiteter Mechanismus (Deshaies 1999; Freed et al. 2000).

3.9 Der SCF-Komplex und seine Funktion im Zellzyklus

Der SCF-Komplex erhielt seinen Namen durch die Zusammensetzung seiner Untereinheiten: Skp1 (Bai et al. 1996), Cullin 1 (Cul1) und einem austauschbaren F-box Protein (s. Abb. 6). Zusätzlich zu diesen drei Komponenten ist eine Zink-bindende Untereinheit, das RING-Protein Rbx1, integriert (Patton et al. 1998; Deshaies 1999). Während Cul1 und Rbx1 das Rückgrat für die Interaktion zwischen dem E2-Enzym und dem abzubauenen Substrat bilden, wird Skp1 als Bindestelle für das F-box Protein benötigt. Hierbei ist die F-box die entscheidende Proteindomäne, da bei Infunktionalität keine Anlagerung erfolgen kann. Zusätzlich bildet das F-box Protein in diesem Komplex die substratspezifische Einheit, d.h. je nachdem welches F-box Protein mit dem SCF-Komplex assoziiert ist, werden unterschiedliche Substrate abgebaut bzw. Funktionen übernommen (Freed et al. 2000; Skowyra et al. 1997; del Pozo und Estelle 2000).

Die Interaktion zwischen dem F-box-Protein und seinem Substrat spielt in der Zellzyklus Regulation eine zentrale Rolle. Die große Flexibilität dieses Systems wird durch das gleichbleibende Rückgrat und die variierende Affinität zwischen Substrat und F-box-Protein erreicht. Das Substrat wird in den meisten Fällen erst nach einer Phosphorylierung durch Cdk und anderer Kinasen durch das F-box Protein erkannt. Die enge Regulation dieser Kinasen führt wiederum zu einem zellzyklusspezifischen Abbau dieser Proteine.

Beispielsweise erkennt das humane F-box Protein Skp2 spezifisch phosphoryliertes p27, welches auf einen selektiven Abbau dieses Protein durch den SCF^{Skp2} hindeutet (Carrano et al. 1999; del Pozo und Estelle 2000).

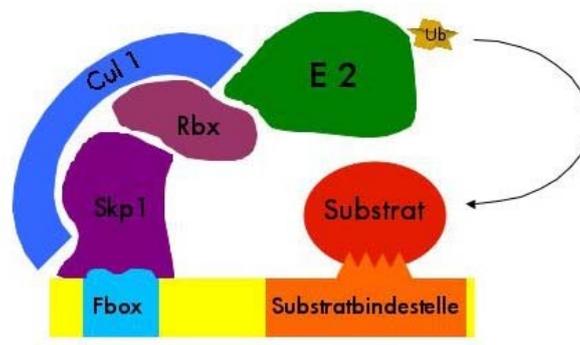


Abb. 6: Aufbau des SCF – Komplexes.

3.10 F-box-Proteine und ihre Funktion im Zellzyklus

F-box Proteine gehören zu einer sehr inhomogenen Proteinfamilie, die ein gemeinsames 40 Aminosäuremotiv, die F-box, haben, das für Protein-Protein Interaktionen benötigt wird (Kipreos und Pagano 2000; Cenciarelli et al. 1999). Ein Großteil dieser Proteine hat zusätzlich Sekundärdomotive (Jin et al. 2004), wie beispielsweise Zinkfinger, Zyklindomänen, Leucinreißverschlüsse, Ringfinger-protein sowie Tetratricopeptidwiederholungen (TPR) und prolinreiche Regionen (Kipreos und Pagano 2000).

Diese breitgefächerte Familie konnte bisher in allen Organismen bis auf Prokaryoten nachgewiesen werden (Kipreos und Pagano 2000). Hierbei gab es jedoch teilweise große Abweichungen in der Gruppenanzahl. Während beispielsweise für Arabidopsis an die 700 F-box Proteine gezählt wurden (Lechner et al. 2006), konnten im Menschen bisher nur 68 identifiziert werden. Den Namen erhielt die F-box Familie von dem Zellzyklusprotein Zyklin F, da in diesem Protein zum ersten Mal die charakteristische F-box Domäne entdeckt wurde. Aufgrund der teilweise sehr großen Anzahl an Familienmitgliedern einigte man sich auf eine allgemeine Nomenklatur, die die einzelnen Proteine nochmals in drei Unterklassen aufteilt. Diese Einordnung ist davon abhängig, welche weiteren Proteindomänen enthalten sind: Fbxw (WD 40 Wiederholungen – Trp, Asp), Fbxl (Leucin reiche Regionen) und Fbxo (ohne weitere bisher bekannte Motive) (Kipreos und Pagano 2000; Cenciarelli et al. 1999; Winston et al. 1999). Während es für die ersten beiden Klassen für fast jedes Protein ein Gegenstück in *C.elegans* und größtenteils auch in Hefe gibt, ist nur die Hälfte der

Fbxo Klasse in Nematoden oder Hefe konserviert (Kipreos und Pagano 2000). Diese Homologie spiegelt sich in gemeinsamen Abbauwegen in unterschiedlichen Organismen wieder. Beispielsweise wird Notch sowohl in Säugetieren als auch in *C. elegans* von Sel-10/Fbxw7 abgebaut (Hubbard et al. 1997; Wu et al. 2001).

Es konnte bereits durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass F-box Proteine eine wichtige Funktion im Zellzyklus einnehmen. Beispielsweise ist Skp2 das Produkt eines Proto-Onkogens, während Fbxw7 ein Tumorsuppressor ist (Pagano und Benmaamar 2003; Yamasaki und Pagano 2004). Die Überexpression von β -TRCP1 führt teilweise zur Transformation in einigen Epithelgeweben (Kudo et al. 2004). Emi1/Fbxo5, ein Inhibitor des APC/C, ist in vielen Tumorzelllinien überexprimiert (Hsu et al. 2002; van't Veer et al. 2002). Zusätzlich gibt es viele Beispiele von F-box Proteinen, die bei Verlust zu verschiedenen Krankheiten führen (Basel et al. 2003; Masuda et al. 2002; Bodine et al. 2001; Gomes et al. 2001). Aufgrund der oben erwähnten Eigenschaften sind F-box Proteine interessante Kandidaten für neue Therapieansatzpunkte, da sie in sehr vielen Signalwegen kritische Aufgaben übernehmen (Jin et al. 2004; Cardozo und Pagano 2004).

3.11 Der APC/C übernimmt wichtige Funktionen im Zellzyklus

Neben dem SCF-Komplex ist der APC/Zyklosom (APC/C) ein weiterer wichtiger Abbaukomplex im Zellzyklus. Er war einer der ersten Multikomponenten Ubiquitinligasen, die identifiziert werden konnte. (Hansen et al. 2002). Ähnlich wie der SCF-Komplex besitzt der APC/C Cullin- und RING-Finger Domänen. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind im Menschen mindestens zwölf unterschiedliche Untereinheiten bekannt. Der APC/C kann mit einem von zwei Co-Aktivatoren assoziieren: Cdh1 oder Cdc20 (Burton und Solomon 2000; Hilioti et al. 2001; Pfleger et al. 2001; Schwab et al. 2001) (s. Abb. 7). Zu seinen wichtigsten Funktionen gehören der Abbau von Zielproteinen, die den Metaphase-Anaphase Übergang kontrollieren und das Ende der Mitose einleiten, sowie die Replikation der DNS während der S-Phase. Verschiedene Publikationen weisen daraufhin, dass der APC/C zusätzlich noch wichtige Aufgaben während der Meiose übernimmt. Zu den wichtigsten Substraten gehören deshalb beispielsweise Aurora-Kinasen und Polo-

like-Kinase 1 sowie mitotische Zyklone, welche Cdk1 und Cdk2 aktivieren. Zusätzlich bewirkt die Ubiquitinierung des Substrates Securin die Trennung der Schwesterchromatiden.

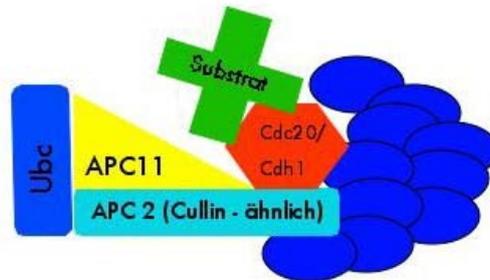


Abb. 7: Schematische Darstellung des APC/C Komplexes.

Im Gegensatz zum SCF-Komplex benötigt der APC/C neben dem E2-Enzym (UBCH5 oder UBCH10) zusätzlich einen von zwei Co-Aktivatoren, Cdc20 oder Cdh1. Ähnlich wie bei einigen F-box Proteinen besitzen beide Proteine an ihrem C-terminalen Ende WD40 Motive, die für die Interaktion mit dem Substrat notwendig sind. Der APC/C erkennt seine Substrate anhand von zwei Abbaumotiven, der Destruktionsbox (D-Box) und der KEN Box (Pfleger und Kirschner, 2000). Der Co-Aktivator Cdc20, der hauptsächlich während der Mitose aktiv ist, erkennt seine Zielproteine grundsätzlich anhand der D-Box, während Cdh1 sowohl diese als auch die KEN-Box erkennt. Cdc20 wird in der späten Mitose durch Cdh1 abgelöst und sogar von APC Cdh1 abgebaut (Glotzer et al. 1991; Pfleger und Kirschner 2000).

Die Ubiquitinierung von APC Substraten kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen reguliert werden, durch Phosphorylierung der APC Untereinheiten und/oder durch die Phosphorylierung von Cdh1 (Kramer et al. 2000). Zusätzlich wird dieser Komplex durch inhibitorisch wirkende Proteine gehemmt, wie z.B. Mad2 und Emi1, das als Pseudosubstrat von Cdc20 und Cdh1 agiert und somit den Abbau anderer Zielproteine verhindert (Shah and Cleveland 2000; Hsu et al. 2002; Reimann et al. 2001). Eine weitere Funktion des APC^{Cdh1} in der G1-Phase konnte durch Wenji Wie et al. (2004) gezeigt werden. Die Versuche bestätigten, dass das F-box Protein Skp2, Teil eines SCF-Komplexes, vom APC in der G1-Phase durch Ubiquitinierung

für den Abbau markiert wird. Dieses ist nur ein Beispiel, wie der APC/C Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus nimmt, da ohne die Degradation von Skp2 die Zelle nicht in die S-Phase gehen kann.

3.12 Das Zentrosom und seine Rolle in der Tumorentstehung

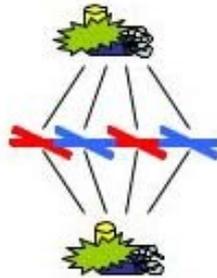
Einer der wichtigsten Aufgaben während des Zellzyklus ist die gleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die sich bildenden Tochterzellen, die durch die Ausbildung einer binären mitotischen Spindel erreicht wird. Damit diese Bipolarität etabliert werden kann, werden kleine Organellen, die Zentrosomen, auch Zentralkörperchen genannt, benötigt. Die Duplikation dieser Zentrosomen findet nur einmal pro Zellzyklus statt. Falls dieser Mechanismus gestört ist und keine Vervielfältigung erfolgt, wird in der nachfolgenden Mitose nur eine monopolare Spindel aufgebaut, die nicht in der Lage ist, die Zelle zu teilen. Diese Fehlregulation kann zur Entstehung polyploider Zellen führen. Wenn im Gegensatz hierzu, zu viele Zentrosomen pro Duplikationszyklus gebildet werden, bewirkt dieses in den meisten Fällen die Ausbildung von multipolaren Spindeln, die den Chromosomensatz ungleichmäßig auf die entstehenden Tochterzellen aufteilen und somit zur Aneuploidie führen (Strnad et al. 2007) (Abb. 8). In der sich nun anschließenden G1-Phase besitzen diese Zellen dann zu viele Zentrosomen und möglicherweise einen tetraploiden Chromosomensatz. Wenn die Zelle dann nicht beispielsweise durch einen p53 induzierten Zellzyklusarrest aufgehalten wird, erhöht sich das Risiko weiterer Mutationen, die dann als Resultat zur Tumorentstehung führen können (Mikule et al. 2006).

Die einzige Möglichkeit der Zelle mit überzähligen Zentrosomen eine normale Zellteilung zu erreichen, besteht in der Gruppierung bzw. Anhäufung dieser, um eine binäre Spindel aufzubauen (Jaspersen und Stearns 2008). Mit diesem Trick schafft die Zelle es zwar sich zu teilen, spätestens aber im folgenden Zyklus wird sie durch Kontrollmechanismen aufgehalten.

Ein Zentrosom



Zwei Zentrosomen



Multiple Zentrosomen

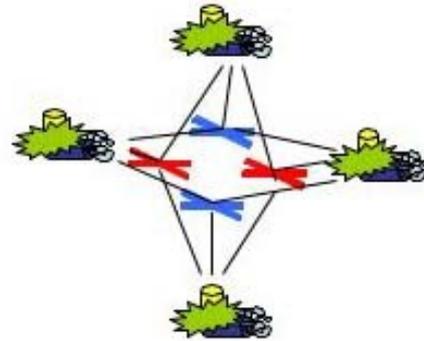


Abb. 8: Exemplarische Anordnung mitotischer Spindeln verursacht durch ungleiche Zentrosomenduplikation.

Fehler in der normalen Zentrosomenduplikation wurden in sehr vielen unterschiedlichen Tumoren beobachtet (Nigg 2002; Hinchcliffe und Sluder 2001; Sankaran und Parvin 2006). Hierbei korrelierte das Ausmaß der Überduplikation häufig mit einer schlechteren Prognose für den Patienten.

Bisher konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Amplifikation der Zentrosomen zur Tumorbildung geführt hat, oder ob diese eine Folge der Krebsentstehung ist. (Srsen und Merdes et al. 2006; Parvin et al. 2006). Eine Theorie sieht die Zentrosomenduplikation als Ursache bzw. ersten Schritt in der Tumorentstehung. Es wird argumentiert, dass Fehler während des Zentrosomenzyklus weitere Zellveränderungen in Richtung Tumorentstehung begünstigen (D'Assoro et al. 2002; Pihan et al. 2003). Diese Fehlregulation der Zentrosomenzahl kann durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen werden. Die erste Möglichkeit entsteht durch Ungenauigkeiten/Fehler in der Zellteilung, und zum zweiten kann der Zentrosomenzyklus selbst von der Fehlregulierung betroffen sein (Nigg 2002; Duensing 2005). Zur Unterscheidung, welcher der beiden Mechanismen für die inkorrekte Anzahl verantwortlich ist, hilft es, die Tochterzentriolen näher zu betrachten. Guarguaglini et al. postulierte in 2005, dass die Überduplikation von Zentrosomen durch das Vorhandensein vieler unreifer Tochterzentriolen gekennzeichnet ist (Guarguaglini et al. 2005). Diese Zentrosomenabnormalitäten

können auf unterschiedliche Art und Weise in den Tumorzellen auftreten. Zu den strukturellen Veränderungen zählen der Anstieg in Zentrosomenanzahl und –volumen sowie überzählige Zentriolen, Akkumulation überschüssigen PCMs sowie die unkontrollierte Phosphorylierung von zentrosomalen Proteinen (Lingle et al. 1998; Pihan et al. 1998). Im Gegensatz dazu sind die Möglichkeiten, überzählige Zentrosomen zu erhalten, bisher auf vier Mechanismen begrenzt (Nigg 2002):

- 1) Die Reduplikation der Zentrosomen während einer Zellteilungsrunde.
- 2) Fehler in der Zytokinese und somit wiederholte Duplikation im nächsten Zellzyklus.
- 3) Die Fragmentierung von Zentrosomen und zentrosomalen Komponenten.
- 4) Anstieg der Zentrosomenzahl durch Zellfusionsereignisse.

Bisher konnte kein Kontrollpunkt identifiziert werden, der bei einer falschen Zentrosomenanzahl eingreift und den Fehler korrigiert (Uetake und Sluder 2004; Wong und Stearns 2003). Dieses führt bei Überduplikation zu einer fatalen Konstellation, die nur noch durch kontrollierten Zelltod oder Zellzyklusarrest aufgehalten werden kann. Ansonsten wäre die Folge, wie bereits oben beschrieben, An- bzw. Polyploidie sowie eine begünstigte Grundlage für die Tumorentstehung. Einer der wenigen existierenden Kontrollmechanismen in der Zentrosomen-duplikation greift ein, wenn die Struktur des Zentrosoms seine Intaktheit verliert und arretiert die Zelle am G1/S Übergang (Hinchcliffe et al. 2001; Mikule et al. 2007; Srsen et al. 2006). Dieses konnten Doxsey und Mitarbeiter anhand des nachfolgenden Experimentes beweisen: Nach Deletion von 15 verschiedenen zentrosomalen Proteinen mittels siRNA Technologie, die wichtig für die Integrität des Zentrosoms sind, entstand mit einer Ausnahme grundsätzlich ein p53 abhängiger G1-Arrest in diesen Zellen. Daraus schlussfolgerte er, dass bei Verlust dieser wichtigen Proteine ein Kontrollmechanismus ausgelöst wird, der die Zelle zwingt, am G1/S Übergang zu arretieren.

3.13 Die Kopplung des Zentrosomen- und Zellzyklus

Damit die Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung bzw. fehlerhaften Zentrosomen- und Zellteilung möglichst gering ist, ist es sowohl für den Zell- als auch für den Zentrosomenzyklus wichtig, dass diese unidirektional und streng kontrolliert ablaufen. Durch die Verbindung beider Zyklen während der Duplikationsinitiation sowie während der Mitose ergibt sich ein gekoppeltes System. Dieses wird durch gemeinsame regulatorische Komplexe während der DNS Replikation und Zentrosomenduplikation ermöglicht. Hierfür gibt es unterschiedliche Beispiele. Die Initiation sowohl der Zentrosomenduplikation als auch der DNS Replikation wird durch denselben Cdk2/Zyklus E Proteinkomplex initiiert (Hinchcliffe et al. 1999; Lacey et al. 1999; Matsumoto et al. 1999; Meraldi et al. 1999; Stearns 2001). In manchen Zelltypen kann auch Zyklus A die Rolle von Zyklus E übernehmen. Zudem konnte in verschiedenen Organismen gezeigt werden, wenn der Proteinabbau durch das SCF Ubiquitin-Ligase System nicht-funktionell ist, dass dieses zur Reduplikation der DNS und der Zentrosomen führte. Kandidaten hierfür sind z.B. Cdk1, SkpA, Geminin, β -TRCP sowie MCM 2-7 (Blow und Dutta 2005; Vidwans et al. 2003; Tachibana et al. 2005; Wojcik et al. 2000; Murphy 2003).

Nach erfolgter Duplikation sorgt ein Enzym zu Beginn (beim Zentrosom) bzw. nach Inaktivierung des SAC (bei den Schwesterchromatiden) zu einer Auflösung der Proteinbrücken zwischen den replizierten Strukturen. Würde die Teilung des Zentrosoms nicht zeitlich korrekt erfolgen, dann wäre der Aufbau des Spindelapparates betroffen, und die Chromosomen könnten nicht gleichmäßig auf die entstehenden Tochterzellen verteilt werden.

4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe der siRNA Interferenz Proteine wichtiger regulatorischer Familien in Zellen auszuschalten, um dadurch einen interessanten, bisher in der Literatur unbekanntem Kandidaten herauszusuchen, um seine Funktionen im Zellzyklus näher zu charakterisieren.

Hierfür wurden nacheinander alle Familienmitglieder der humanen F-box - und Cullin-Familien mit Hilfe der siRNA Interferenz ausgeschaltet. Damit mögliche Nebeneffekte ("offtarget effects") ausgeschlossen werden konnten, wurden für jedes Gen drei unterschiedliche siRNAs hergestellt und in Kombination eingesetzt. Die Auswertung der Genverluste hatte ihren Schwerpunkt auf Zellzyklusphänotypen. Hierfür wurden FACS Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Proteine, die einen Zellzyklusarrest zeigten, wurden gesondert unter dem Mikroskop mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt und auf abnormales Aussehen der DNS hin begutachtet.

Bei diesen Versuchen zeigte sich das F-box Protein Fbxw5 aufgrund seines sehr auffälligen DNS Phänotyps als ein interessanter Kandidat für tiefergehende Untersuchungen.

Fbxw5 gehört zur ersten Gruppe der F-box Proteine, da es neben dem namensgebenden Motiv noch drei weitere WD40 Domänen besitzt (s. Abb. 9). Es ist ein 64 kDa Protein, das ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert wird. Bezüglich seiner Funktion konnten Tsou et al. 2007 zeigen, dass es mit Cullin 4 zusammen einen Degradationskomplex bildet, der das tuberöse Sklerose Protein TSC2 abbaut. Außerdem konnte in einer weiteren Veröffentlichung (Minoda et al. 2009) Fbxw5 als negativer Regulator der MAP3 Kinase TAK1 identifiziert werden. Mittels vergleichender Sequenzanalysen postulierte Winston et al., dass Fbxw5 zusätzlich die Möglichkeit besitzt, einen SCF-Komplex zu formen.

Eigene Sequenzanalysen zeigten zudem das Vorhandensein einer D-Box, welche auf eine mögliche Interaktion mit dem APC/C hinweist.

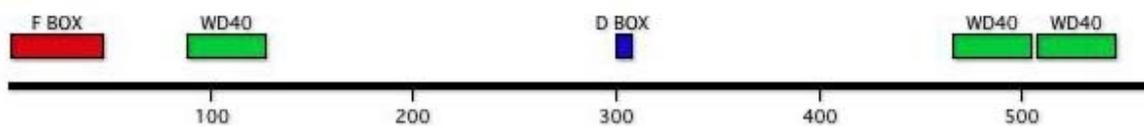


Abb. 9: Schematischer Aufbau des Fbxw5 Proteins.

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich daher mit der genauen Charakterisierung von Fbxw5 in Hinblick auf seine Funktion, Regulation und möglicher Interaktionspartner.

5 Methoden

5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

5.1.1 Kultivierung von adhärennten Monolayerkulturen

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärennten Monolayerkulturen wurden in einer 10 cm² Kunststoffzellkulturplatte kultiviert. Um die *in-vivo* Umgebungsbedingungen möglichst nahe zu simulieren, wurden die Zellen mit 8 ml Medium in einer Wasserdampf gesättigten CO₂-Atmosphäre (5 %) inkubiert. Die während der Kultivierung entstandenen Abfallprodukte wurden durch einen Mediumwechsel, der alle zwei Tage erfolgte, entfernt.

5.1.2 Subkultivierung von adhärennten Monolayerkulturen

Eine Eigenschaft von Monolayerkulturen ist, dass sie durch Kontaktinhibition ihr Wachstum einstellen. Um dieses Absterben der Kultur zu verhindern, müssen die Zellen spätestens bei einer 90 %igen Bodenbedeckung (Konfluenz) in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt (passagiert) werden.

Vor Beginn des Passagierens wurden das Medium und das Trypsin/EDTA auf 37 °C erwärmt. Das alte Medium wurde abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal mit je 5 ml 1 x PBS gewaschen. Nach dem Absaugen wurden 5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und für etwa 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Trypsin löst die Saccharidbindungen auf, die die Zellen zur Verankerung auf dem Flaschenboden gebildet haben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension mit PBS im Verhältnis 1 : 3 verdünnt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1200 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Das verbleibende Pellet wurde je nach Größe in 5 - 15 ml Medium resuspendiert.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte anhand einer mikroskopischen Zählung in einer Neubauer-Zählkammer (siehe 5.2.1.3).

5.1.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden zunächst 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl Trypanblau (Stocklösung 0,5 % in 100 ml NaCl/K₂PO₄) vermischt und für 1 min bei RT inkubiert. Das Prinzip dieser Vitalfärbung beruht auf der Aufnahme des Farbstoffes Trypanblau durch die permeabel gewordenen Zellmembranen von toten Zellen. Die Membran ist intakt eine natürliche Barriere für diesen Farbstoff. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 25 µl der Suspension in eine vorbereitete Zählkammer gefüllt. Es wurden nur die angefärbten, lebenden Zellen gezählt. Durch diese Methode sind tote Zellen farblich abgrenzbar von lebenden.

Zur Vorbereitung der Zellzählung wurde ein Deckgläschen auf eine Neubauer-Zählkammer gedrückt, bis die Newtonschen Ringe zu sehen waren. Dieses Erkennungsmerkmal signalisierte, dass die gewünschte Spaltbreite von 0,2 mm zwischen Deckglas und Kammer erreicht war.

Die Zählkammer besteht aus 16 Großquadraten, die wiederum in 16 Kleinquadrate aufgeteilt sind. Bei einer Fläche von je 1 mm² und einer Tiefe von 0,2 mm ergibt sich ein Volumen von 0,2 µl pro großes Quadrat. Ausgezählt wurden jeweils vier Großquadrate, die sich zueinander auf einer Diagonalen befanden. Zellen, die auf dem oberen oder linken Rand lagen, wurden beim Zählen nicht berücksichtigt. Beim rechten und unteren Rand wurden alle Zellen bis zur mittleren der drei Begrenzungslinien gezählt. Von den vier Quadraten wurde der Mittelwert berechnet und zur Bestimmung der Zellzahl in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Glg. 1: } Z = \frac{n}{N} * 2 * V$$

Z	:	Gesamtzellzahl
V	:	Ausgangsvolumen
N	:	Anzahl der ausgezählten Großquadrate
n	:	gezählte Zellzahl
V	:	Ausgangsvolumen

5.1.4 Kryokonservierung von Zellkulturen

Einfrieren:

Das Einfrieren dient der langfristigen Lagerung von Zellen unter Erhalt ihrer Lebensfähigkeit. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte analog zu 5.1.2. Nach dem Sedimentieren wurden die Zellen in ihrem Wachstumsmedium resuspendiert. Mittels Trypanblaufärbung wurde die Zellzahl bestimmt. Das Einfrieremedium war das entsprechende Wachstumsmedium, das zusätzlich 10 % DMSO und 10 % FKS enthielt. DMSO verhindert die Wasserkristallbildung im Inneren und Äußeren der Zelle und bewahrt die Zellen vor Membranschäden. Es wurden je 1 Million Zellen in einem Volumen von 1 ml in ein beschriftetes Kryoröhrchen pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht auf -80 °C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryogefäße in den Stickstofftank (-169 °C) überführt.

Auftauen:

Die benötigten Zellen wurden aus dem Stickstofftank genommen und direkt bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Sobald die Zellsuspension vollständig flüssig war, wurde das gesamte Volumen auf eine 6 cm² Kunststoffzellkulturplatte mit 4 ml vorgewärmtem Wachstumsmedium gegeben. Die Zellen wurden im Brutschrank über Nacht kultiviert. Damit die restlichen DMSO Rückstände die Zellen nicht schädigen konnten, erfolgte am darauf folgenden Tag ein Medienwechsel. Sobald eine Konfluenz von 80 - 90 % erreicht wurde, konnten die Zellen in eine 75 cm² Flasche überführt werden. Alle Zellarten konnten, sobald sie die gewünschte Dichte erreicht hatten, für Versuche verwendet werden.

5.1.5 Transfektion

5.1.5.1 siRNA Transfektion

Am Vortag wurden jeweils $1,7 \times 10^5$ Zellen in eine 12-Lochplatte ausgesät. Für die nachfolgende Transfektion wurden 30 nM siRNA eingesetzt. Hierfür wurde die siRNA in 100 µl serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt. Nach Zugabe von 12 µl HiPerfect Transfektionsreagenz erfolgte eine zehnmünütige Inkubation bei RT. Der

Transfektionsansatz wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Bis zur Analyse wurden die Zellen für weitere 48 h im Inkubator kultiviert.

5.1.5.2 Polyethylenimin Transfektion

Für alle Versuche wurde das kationische Polymer Polyethylenimin (PEI) verwendet. Es bildet zusammen mit der DNS Polyplexe, die dann von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden können.

Am Vortag wurden jeweils 5×10^5 Zellen auf eine 6 cm^2 Zellkulturplatte ausgesät. Für die nachfolgende Transfektion wurden $5 \mu\text{g}$ Plasmid eingesetzt. Hierfür wurde die DNS in einem $1,5 \text{ ml}$ Eppendorfgefäß vorgelegt und mit $400 \mu\text{l}$ serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt. Nach Zugabe von $10 \mu\text{l}$ PEI erfolgte ein kurzes Durchmischen mit Hilfe eines Vortexers. Der verwendete pH-Wert wurde in Abhängigkeit der Zelllinie entweder auf 6,4 für 293- und U2OS-Zellen oder auf 7,3 für HeLa-Zellen eingestellt. Die Komplexbildung erfolgte in der anschließenden zehnminütigen Inkubationszeit bei RT. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Medium von der Platte entfernt und der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach zehn Minuten im Inkubator erfolgte die Zugabe von 7 ml Vollmedium. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion analysiert.

5.1.6 Zellsynchronisation

5.1.6.1 Nocodazolblock

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) erfolgte in Zellkulturplatten. Für den Versuch wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ 10 cm^2 Platte ausgesät. Nocodazol gehört zu den Spindelgiften und sorgt durch die Depolymerisation der Spindelfilamente während der Mitose für eine Blockade in der Metaphase.

Für jeden Zeitpunkt wurden doppelt so viele Zellkulturplatten eingeplant, wie nach dem Arrest benötigt werden. Am nächsten Tag erfolgte, wenn nötig, die Transfektion der Zellen (s. 5.1.5). Anschließend wurden die Proben für 12 – 14 h mit 400 ng/ml Nocodazol inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch leichtes Abklopfen an der Arbeitsplatte. Nach zweimaligem Waschen mit warmen Wachstumsmedium und

anschließender Zentrifugation bei 800 Upm für 5 min wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat der benötigten Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ 10 cm^2 Zellkulturplatte. In regelmäßigen Abständen von zwei bzw. vier Stunden wurden Proben genommen und für die SDS-Gelelektrophorese (s. 5.2.2.1) bis zum Gebrauch bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ weggefroren bzw. für die Durchflusszytometrie (s. 5.1.7) in 70 %igen Ethanol fixiert.

5.1.6.2 Doppelter Thymidinblock

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) erfolgte in Zellkulturplatten. Für den Versuch wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ 10 cm^2 Platte ausgesät. Thymidin ist ein Basenanalogen, das bei überschüssigem Vorhandensein in der Zelle die Transferase inhibiert und somit die Zellen zu Beginn der S-Phase anhält. Für den doppelten Thymidin Arrest wurden die Zellen für 18 h mit 2 mM Thymidin blockiert und anschließend nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS für neun Stunden von der Blockade befreit. Danach erfolgte der zweite Arrest für wiederum 18 h mit 2 mM Thymidin. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, und die Blockade wurde durch Zugabe des Wachstumsmediums aufgehoben. Die Probenahme erfolgte nach null Stunden (S-Phase), drei Stunden (S-Phase), fünf Stunden (G2-Phase), acht Stunden (M-Phase), zehn Stunden (frühe G1-Phase) und 12 Stunden (G1-Phase). Die Zellen wurden entweder für die SDS-Gelelektrophorese (s. 5.2.2.1) bis zum Gebrauch bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ weggefroren oder für die Durchflusszytometrie (s. 5.1.7) in 70 %igen Ethanol fixiert.

5.1.6.3 Hydroxyureablock

Hydroxyurea hemmt spezifisch die DNS-Synthese durch die Inhibition des zellulären Enzyms Ribonukleotid-Reduktase. Dieses Enzym wird für die Bereitstellung der Nukleotide benötigt.

Die U2OS Zellen wurden analog zu 5.1.2 in 10 cm^2 Zellkulturplatten vorkultiviert. Sobald eine entsprechende Zelldichte erreicht wurde, erfolgte die Aussaat auf unbeschichtete Deckgläser in 6 cm^2 Platten. Am nächsten Tag wurden die Zellen

12 h vor Zugabe von 5 mM Hydroxyurea mit 5 µg unterschiedlicher Plasmid DNS oder mit 20 nM siRNA transfiziert (s. 5.1.5). Nach Ablauf der 48-stündigen Inkubation erfolgte die Fixierung der Zellen in 100 %igem, eiskaltem Methanol für 10 min bei -20 °C. Hierfür wurden die Proben zuerst 3 Mal mit 1 x PBS gewaschen, anschließend fixiert und dann nochmals einem Waschschrift mit PBS unterzogen. Bis zum Gebrauch (s. 5.2.9) wurden die Deckgläser bei 4 °C in 1 x PBS gelagert. Die Analyse mittels Immunfluoreszenz wurde analog zu Abschnitt 5.2.9 durchgeführt.

5.1.6.4 Aphidicolinblock

Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Diterpen, das aus dem Pilz *Cephalosporium aphidicola* gewonnen wird. Dieses Toxin ist in der Lage, die eukaryotische DNS Replikation durch die Inhibierung der DNS- Polymerasen α und δ reversibel zu hemmen.

Die Kultivierung der Zellen (s. 5.1.2) und Transfektion (s. 5.1.5) erfolgte analog zum Abschnitt 5.1.1.6.3. Für den Aphidicolin Arrest wurden die Zellen mit 2 mM des Toxins für 48 h kultiviert und anschließend in Methanol fixiert. Die Analyse mittels Immunfluoreszenz wurde analog zu Abschnitt 5.2.9 durchgeführt.

5.1.7 Durchflusszytometrie

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) erfolgte in Zellkulturplatten. Nach dem Abtrypsinieren der Zellen wurden die Zellpellets bei 800 Upm für 5 min zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde einmal in 1 x kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Probe wurde anschließend mit 5 ml 70 %igen EtOH tropfenweise unter ständigem Mischen fixiert. Bis zur Analyse erfolgte die Lagerung bei 4 °C.

Kurz vor der Messung wurden die fixierten Proben bei 1200 Upm pelletiert und anschließend in 1 x PBS + 1 % FKS gewaschen. In der Zwischenzeit wurde die 1 x Propidiumiodid (PI) Gebrauchslösung hergestellt. Die Zellzahl jeder Probe wurde mittels dieser Lösung auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend erfolgte eine halbstündige Inkubation bei 37 °C im Wasserbad. Für die Messung wurde ein

Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo OSX.

5.2 Analytische Zellkulturtechniken

5.2.1 Quantifizierung des Proteingehalts mittel D_c Protein-Assay

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) erfolgte in Zellkulturplatten. Nach dem Abtrypsinieren der Zellen wurden die Zellpellets entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20 °C über Nacht eingefroren.

Je nach Ausgangsplatte wurden die Zellen im nachfolgenden Volumen Lysispuffer aufgenommen: 300 µl für eine 6 cm²- und 500 µl für eine 10 cm²-Zellkulturplatte.

Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vollständig im Lysispuffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellyse durch Sonifikation. Die Zellen wurden für 15 s bei einer Amplitude von 30 und einem Zyklus von 1 sonifiziert. Die anschließende 20-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm und 4 °C diente zur Abtrennung der Zelltrümmer und –kerne. Während der Zentrifugationszeit konnte die Verdünnungsreihe für die benötigten Proteinstandards und die Arbeitslösung angesetzt werden. Für die Verdünnung der BSA-Stammlösung (1,24 µg/ µl) wurde RIPA Puffer ohne Inhibitoren verwendet. Es wurden vier Verdünnungen entsprechend der nachfolgenden Tabelle erstellt. Für die Arbeitslösung wurden die im Kit mitgelieferten Reagenzien A und S im Verhältnis 1 ml : 20 µl gemischt.

Tab. 1: Schema der Verdünnungsreihe zur Herstellung des Protein-Standards.

Lösung	1	2	3	4
Stammlösung [µl]	10	10	20	10
RIPA [µl]	63	19,2	19,2	-
Endkonzentration [µg/µl]	0,2	0,5	1,0	1,24

Die Proben wurden 10fach mit RIPA Puffer ohne Inhibitoren verdünnt. Entsprechend des nachfolgenden Pipettierschemas wurden je 5 µl Zellysat bzw. Protein-Standard in die Vertiefung einer 96-Napfplatte gefüllt. Mit einer Multipette wurden jeweils 25 µl

vom Gemisch A + S zu jeder Probe hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Reagenz B. Die nun fertige Napfplatte wurde für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die spektralphotometrische Messung erfolgte bei 650 nm im Mikrotiterplatten Photometer. Die Daten wurden mit Hilfe von Excel mittels linearer Regression ausgewertet und graphisch dargestellt.

Tab. 2: Auftragsschema für die Proteinbestimmung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 1	Std 1	Std 1	Std 2	Std 2	Std 2	Std 3	Std 3	Std 3	Std 4	Std 4	Std 4
B	Probe 1	Probe 1	Probe 1	Probe 2	Probe 2	Probe 2	Probe 3	Probe 3	Probe 3	Probe 4	Probe 4	Probe 4
C	Probe 5	Probe 5	Probe 5	Probe 6	Probe 6	Probe 6	Probe 7	Probe 7	Probe 7	Probe 8	Probe 8	Probe 8
D	Probe 9	Probe 9	Probe 9	Probe 10	Probe 10	Probe 10	Probe 11	Probe 11	Probe 11	Probe 12	Probe 12	Probe 12
E	Probe 13	Probe 13	Probe 13	Probe 14	Probe 14	Probe 14	Probe 15	Probe 15	Probe 15	Probe 16	Probe 16	Probe 16
F	Probe 17	Probe 17	Probe 17	Probe 18	Probe 18	Probe 18	Probe 19	Probe 19	Probe 19	Probe 20	Probe 20	Probe 20
G	Probe 21	Probe 21	Probe 21	Probe 22	Probe 22	Probe 22	Probe 23	Probe 23	Probe 23	Probe 24	Probe 24	Probe 24
H	Probe 25	Probe 25	Probe 25	Probe 26	Probe 26	Probe 26	Probe 27	Probe 27	Probe 27	Probe 28	Probe 28	Probe 28

5.2.2 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

5.2.2.1 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer molaren Masse erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli. Hierfür wurde zu Beginn des Versuches ein 10 %iges Polyacrylamidgel gegossen.

Nach einer gründlichen Reinigung mit 70 %igem EtOH wurden die Abstandsplatte und die Deckplatte mit Hilfe einer Halterung fixiert und in den Gießstand eingespannt. Anschließend wurde die Gellösung für das Trenngel in einem Erlenmeyerkolben vorbereitet (s. Tabelle 3) und nach Zugabe aller Bestandteile vorsichtig in die Gelkassette gegossen. Damit sich während der Polymerisation eine glatte Grenzfläche ausbilden konnte, erfolgte eine Überschichtung der Trenngellösung mit

100 %igem Ethanol. Nach einer Polymerisationszeit von etwa 20 min wurde der Alkohol vollständig entfernt. Anschließend wurde die Gellösung für das Sammelgel vorbereitet (s. Tabelle 3) und bis zum oberen Rand in die Gelkassette gefüllt. Sofort wurde die Schablone für die Probenaschen eingesetzt. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von etwa 20 min konnte das Gel für die Elektrophorese verwendet oder bei 4 °C über einen kurzen Zeitraum gelagert werden.

Tabelle 3: Mischungsverhältnis eines 10%igen Polyacrylamidgels.

	Sammelgel	Trenngel
ddH ₂ O [ml]	1,13	4,1
Acrylamid [ml]	3,92	3,3
1,5M Tris pH 8.8 [ml]	-	2,5
0,5M Tris pH 6,8 [ml]	1,75	-
10% SDS [μl]	70	100
10% APS [μl]	70	105
TEMED [μl]	7	15

Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 4 mit einem 4 x Probenpuffer gemischt und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Gelkassette entsprechend den Herstellerangaben in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Nach dem Befüllen mit 1 x SDS Laufpuffer konnten die Proben inklusive einer Proteingrößenleiter in die entsprechenden Probenaschen pipettiert werden. Die Aufkonzentrierung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 70 V. Sobald die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hatte, konnte die Spannung auf 90 V erhöht werden. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Proteingrößenleiter die gewünschte Auftrennung zeigte. Die Gele wurden aus der Apparatur herausgenommen, und das Sammelgel wurde entfernt. Die Gele wurden entsprechend der Fragestellung weiterbearbeitet.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Proteinladepuffers.4 x Probenpuffer:

	Endkonzentration	Eingesetzte Menge
2M Tris pH 6,8 [ml]	0,25 M	1,25
SDS [g]	8 %	0,8
Glycerin [ml]	40 %	4
β- Mercaptoethanol [ml]	10 %	1
Bromophenolblau [g]	0,05 %	0,005
ddH ₂ O [ml]		3,6

Tabelle 5: Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers.10 x SDS-Laufpuffer:

	Endkonzentration	Eingesetzte Menge
Tris-HCl pH 8,3 [g]	250 mM	120
SDS [g]	1%	40
Glyzin [g]	1,92 M	576
ddH ₂ O [ml]		auf 4000

5.2.2.2 Western Blot

Ziel der Western Blot Analyse ist es, Proteine, die zuvor mittels Gelelektrophorese entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt wurden, auf einer Membran zu fixieren, um später durch Antikörperinkubation einzelne Proteine spezifisch nachweisen zu können.

Die Vorbereitung des Gels erfolgte wie in 5.2.2.1 beschrieben. Für den Transfer wurde eine Nylonmembran der Firma Millipore verwendet, die kurz in 100 %igen Methanol und anschließend in kaltem 1 x Transferpuffer geschwenkt wurde. Nachdem das Gel kurzzeitig mit demselben Puffer benetzt wurde, konnte die vorgekühlte Blotapparatur entsprechend den Herstellerangaben zusammengebaut werden. Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer konstanten Spannung von 100 V und

einem Strom von 350 mA bei 4 °C. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran für 20 min bei RT in 5 % Magermilch inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem verdünnten, primären Antikörper (s. Tab. 16) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran für jeweils zehn Minuten dreimal mit 1x TNT Puffer gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit dem sekundären Antikörper (s. Tab. 17) erfolgte für 1 h bei RT auf der Wippe. Der anschließende Waschschritt erfolgte in 1 x TNT.

Für die Detektion der Banden wurden die in Tab. 4.8 angegebenen Lösungen im Verhältnis 1 : 1 gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen in dieser selbsthergestellten ECL Lösung für 1 min inkubiert und anschließend in einer Filmkassette durch auflegen eines Filmes bis zur gewünschten Intensität entwickelt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Transferpuffers für die Western Blot Analyse.

10 x Transferpuffer:

	Eingesetzte Menge
Tris [g]	60,6
Glyzin [g]	288
ddH ₂ O	auf 2000

Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers.

10 x TNT:

	Eingesetzte Menge
NaCl [ml]	1500
Tris pH 7,5 [ml]	625
Tween 20 [ml]	250
ddH ₂ O [ml]	2625

Tabelle 8: Zusammensetzung der ECL Gebrauchslösung.

Lösung I:

	Eingesetzte Menge
Luminol [ml]	0,5
p-Cumarsäure [ml]	0,22
1 M Tris pH 8,5 [ml]	5
ddH ₂ O [ml]	44

Lösung II:

	Eingesetzte Menge
30 % H ₂ O ₂ [ml]	0,0305
1 M Tris pH 8,5 [ml]	5
ddH ₂ O [ml]	44

5.2.2.3 Phos-tag™ Polyacrylamidgele

Die Polyacrylamidgele, für die spezifische Auftrennung phosphorylierter Proteine, wurden mit einigen Modifikationen analog zu Abschnitt 5.2.2.1 durchgeführt. Für ein 7,5 %iges Gel wurden 10 µM AAL-107 und 10 µM 1 M MnCl₂ verwendet. Die PAA Gele liefen bevorzugt ü.N. bei RT und 25 V. Vor dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde das Gel für 10 min in 1 x Transferpuffer mit 1 mmol/L EDTA bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Inkubationsschritt für 10 min nur mit 1 x Transferpuffer. Das nun folgende Elektroblothing wurde analog zu 5.2.2.2 durchgeführt.

5.2.3 Probenvorbereitung für die MASDAQ Analyse

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) und die anschließende Proteinbestimmung erfolgte wie in 5.2.1 beschrieben. Für die MASDAQ Analyse wurde der unter 5.2.4 beschriebene Versuch expandiert, und für jeden Ansatz wurden elf 10 cm² Zellkulturplatten verwendet. Nach der Co-Immunpräzipitation wurden die Sepharosekugeln parallel mit und ohne Phosphatase (CIAP) behandelt, um das

Vorhandensein phosphorylierter Proteine zu bestätigen. Bevor die Proben für die MASDAQ Analyse auf ein PAA-Gel aufgetragen werden konnten, wurden sie mit Acrylamid für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend für 20 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Auftrennung (s. 5.2.2.1) wurden die Proteine mittels kolloidalen Coomassiefärbung detektiert. Hierfür wurde das Gel für eine Stunde in 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure bei RT unter leichtem Schütteln fixiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe für jeweils zehn Minuten mit ddH₂O. Die Färbung des Gels wurde ü.N. bei RT auf dem Schüttler durchgeführt. Zum Entfärben wurde das Gel am nächsten Tag mit 1 % Essigsäure so lange inkubiert, bis alle überschüssigen Coomassie Partikel entfernt waren Bis zur Analyse konnte das Gel in dieser Lösung gelagert werden.

Herstellen der Vorratsfärbelösung

20 g Phosphorsäure und 100 g Ammoniumsulfat wurden vollständig in 800 ml ddH₂O gelöst. Anschließend erfolgte unter Rühren die Zugabe von 1 g Coomassie Brilliant Blue G250. Die Vorratsfärbelösung wurde auf 1 Liter aufgefüllt und sollte mindestens 24 h vor Gebrauch angesetzt werden. Die Lösung kann mehrere Wochen im Dunkeln bei RT gelagert werden. Mögliche abgesetzte Partikel dürfen nicht durch Filtern entfernt werden.

Herstellen der Gebrauchslösung

Für die Gebrauchsfärbelösung werden $\frac{3}{4}$ der Vorratslösung mit $\frac{1}{4}$ 100 %igen Ethanol durch Rühren vermischt. Die Gebrauchslösung muss grundsätzlich frisch direkt vor der Verwendung angesetzt werden.

5.2.4 Immunpräzipitation

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) und die anschließende Proteinbestimmung erfolgte wie in 5.2.1 beschrieben. Für die nun nachfolgende Immunpräzipitation wurden 500 µg Proteinlysate eingesetzt und auf ein Volumen von 500 µl mit NP40 Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte die zweistündige Antikörperinkubation bei 4 °C auf dem Rotierer. Danach wurden zu jeder Probe 30 µl Sepharoseträger

gegeben. Je nach Antikörper wurden entweder G-Sepharosekugeln (Maus) oder A-Sepharosekugeln (Kaninchen) verwendet, die vor der Zugabe dreimal mit NP40 Puffer gewaschen wurden. Die Proben wurden für eine weitere Stunde auf dem Rotierer inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit jeweils 1 ml NP40 Puffer. Zur Sedimentation der Sepharosekugeln wurden die Proben für 1 min bei 1 000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschriff wurde der komplette Überstand entfernt und die Proben in 30 µl 2 x Probenpuffer (s. 5.2.2.1) aufgenommen. Nach einer anschließenden zehnmünütigen Inkubation bei 95 °C konnten die Ansätze auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und analysiert werden (s. 5.2.2.1).

5.2.5 His-Ubiquitinilierung

Die HEK 293 Zellen wurden analog zu 5.1.2 in Zellkulturplatten vorkultiviert. Sobald eine entsprechende Zelldichte erreicht wurde, erfolgte die Aussaat von 1×10^6 Zellen/ 10 cm² Platte. Die Transfektion der Zellen am nächsten Tag erfolgte analog zu 5.1.5.2. Für diesen Versuch wurden jeweils gleiche Mengen der Interaktionspartner in An- bzw. Abwesenheit von 3 µg eines His Ubiquitin Plasmids transfiziert. Vor Ablauf der 48-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen für drei Stunden mit 25 µM des Proteasominhibitors MG132 inkubiert. Die anschließende Zellyse in 1 ml Harnstoffpuffer erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS. Damit ein möglichst vollständiges Lysieren der Proben erreicht wurde, wurden die Ansätze für eine Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x für jeweils 15 s auf Eis sonifiziert. Das Pelletieren der Zelltrümmer erfolgte bei 14 000 Upm und 4 °C in einer Tischzentrifuge. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 60 µl jeder Probe wurden mit 20 µl 4 x Probenpuffer vermischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 40 µl Ni²⁺ Talonkugeln, die vorher 1 x mit ddH₂O und 2 x mit Harnstoffpuffer gewaschen wurden. Die Inkubation der Proben erfolgte je nach Bedarf ü.N. oder für zwei Stunden bei RT auf dem Rotierer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben viermal mit jeweils 1 ml Harnstoffpuffer gewaschen. Zur besseren Sedimentation der Talonkugeln wurden die Ansätze zwischen den Waschschriffen für 1 min bei 1 000 Upm und 4 °C pelletiert.

Nach dem kompletten Entfernen des Überstandes wurden die Proben in 35 μ l 2 x Probenpuffer + 200 mM Imidiazol aufgenommen und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend konnten die Ansätze auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und analysiert werden (s. 5.2.2.1).

Tabelle 9: Zusammensetzung des Phosphatpuffers.

1M Phosphatpuffer pH 8.0:

	Eingesetzte Menge
1 M Na ₂ HPO ₄ [ml]	93.2 ml
1 M NaH ₂ PO ₄ [ml]	6.8 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung des Harnstoffpuffers für die His-Ubiquitinilierung.

Harnstoffpuffer:

	Endkonzentration
Harnstoff [ml]	8 M
Imidiazol [ml]	10 mM
Phosphatpuffer [ml]	0,1 M

5.2.6 Halbwertszeitbestimmung von Proteinen

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) erfolgte in 10 cm² Zellkulturschalen. Sobald eine entsprechende Zelldichte erreicht wurde, erfolgte die Aussaat von 5 x 10⁵ Zellen/ 6 cm² Platte. Wenn es für den Versuch erforderlich gewesen ist, dann wurden die Zellen am nächsten Tag mit der entsprechenden Plasmidkonzentration analog zu 5.1.5.2 transfiziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 10 μ g/ml Cycloheximid zum Wachstumsmedium. Je nach erwarteter Protein-halbwertszeit konnte dadurch die Proteinneusynthese bis zu zehn Stunden blockiert werden. Die Probenahme erfolgte nach 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach Zugabe von Cycloheximid. Die Proben wurden für diesen Versuch direkt in 200 μ l 2 x

Probenpuffer aufgenommen und anschließend für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Auftrennung und Analyse der Proben erfolgte analog zu 5.2.2.1.

5.2.7 RNS Isolierung

Die Vorkultivierung der Zellen (s. 5.1.2) erfolgte in 10 cm² Zellkulturschalen. Nach dem Abtrypsinieren der Zellen wurden die Zellpellets bei 800 Upm für 5 min zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte die erneute Sedimentation der Proben für 2 min bei 4 °C und 10 000 Upm. Anschließend wurde das so erhaltene Pellet in 500 µl Lösung D resuspendiert. Falls der Versuch zu einem anderen Zeitpunkt fortgesetzt werden sollte, konnten die Proben bis dahin bei –70 °C gelagert werden. Das in Lösung D resuspendierte Pellet wurde nach Zugabe von 50 µl Natriumacetat (pH 5.2) gut durchmischt. Anschließend erfolgte die Extraktion der RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierfür wurden zuerst 500 µl H₂O-gesättigtes Phenol zur Probe gegeben und anschließend gut vermischt. Nach Zugabe von weiteren 100 µl Chloroform und wiederholtem Mischen folgte eine 15 minütige Inkubationszeit der Ansätze auf Eis. Im Anschluss daran wurden die Proben zur Etablierung der einzelnen Phasen für 5 min bei 4 °C und 10 000 Upm zentrifugiert. Nach Überführung der oberen wässrigen Phase, in der sich die zu extrahierende RNA befindet, erfolgte die Präzipitation dieser mit dem gleichen Volumen 100 %igen Isopropanol für 90 min bei –20 °C. Zur Aufkonzentrierung wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 10 000 Upm zentrifugiert und anschließend mindestens einmal mit 80 %igen Ethanol und mindestens einmal mit 100 %igen Ethanol gewaschen. Nach einer kurzen Trocknung bei Raumtemperatur konnte das Pellet je nach Größe in 10 – 30 µl DEPC H₂O gelöst werden. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei –70 °C gelagert.

5.2.7.1 cDNS Synthese

Die cDNS Synthese dient der Umschreibung der RNS in cDNS, damit diese in der Polymerasekettenreaktion verwendet werden kann. Das hier benutzte Protokoll

entspricht den Vorgaben des Herstellers BioRAD, von dem das Testsystem erworben wurde. Für die Synthese wurden pro Probe jeweils 2 µg isolierte RNS eingesetzt.

5.2.7.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf einer Wiederholung dreier einfacher Schritte, die zur Vervielfältigung der DNS führen: Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung.

Die in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCRs können durch ein Programm wiedergegeben werden. Lediglich die Anlagerungstemperatur (engl. Annealing) und die Verlängerungszeit wurden an die verwendeten Primer und DNS Längen angepasst.

Tab. 11: PCR Mastermix.

MasterMix	Volumen [µl] pro Ansatz
MilliQ Wasser	17,5
Primer A	1
Primer B	1
ThermoPol Reaktionspuffer	2,5
dNTP's	1
Taq Polymerase	1
DNS	2

Tab. 12: Verwendetes PCR Programm.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min;s]
Denaturierung	94	3'
	94	30''
Hybridisierung	Primer spezifisch	1'
Verlängerung	72	1' pro 1000 bp
Verlängerung (final)	72	10'
Lagerung	4	∞

5.2.8 Klonierung

Die Klonierung der Fbxw5 Mutanten konnten nur mittels PCR erfolgen, da in den entsprechenden Bereichen keine geeigneten Enzymschnittstellen vorhanden waren. Die für die einzelnen Konstrukte verwendeten Primer sind unter 5.3.5 aufgelistet. An deren Enden wurden zusätzlich jeweils 5' eine EcoRI und 3' eine XhoI Schnittstelle eingefügt, um eine spätere Klonierung über „klebrige Enden“ (engl. sticky ends) in ein pCS2+ Plasmid zu ermöglichen. Zur besseren Detektion erhielten die Proteine dadurch sechs Myc Epitope. Die PCR erfolgte mit der kommerziell erhältlichen Pfu Polymerase von der Firma Stratagene und wurde analog zum Herstellerprotokoll durchgeführt.

5.2.8.1 DNS Fällung

Die DNS Fällung dient der Aufkonzentrierung in Lösung befindlicher Moleküle zur besseren Weiterverarbeitung. Hierfür wurde die Probe (z.B. PCR Produkt) mit 1/10 Volumen NaAc pH 5.2 versetzt und gut durchmischt. Zur Initiation der Fällungsreaktion erfolgte die Zugabe von 2,5 Volumen 100 %igen Ethanol. Je nach Menge der ausfällenden DNS wurden die Proben für 1 h bei 4 °C oder –20 °C inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationszeit erfolgte die Sedimentation der Ansätze für 20 min bei 4°C und 13 000 Upm. Das nun sichtbare Pellet wurde zweimal mit 70 %igen Ethanol gewaschen. Nach kurzer Trocknungszeit bei RT konnte die DNS je nach Menge in 10 – 30 µl ddH₂O gelöst werden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

5.2.8.2 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau nutzt man die Wirkungsweise der in der Natur vorkommenden Enzyme, die spezifisch eine palindromische Sequenz erkennen und schneiden. Hierdurch können DNS Moleküle an bestimmten Stellen geschnitten und später, nach Einbringen des gewünschten DNS Fragmentes, wieder miteinander

verbunden werden (s. 5.2.8.4). Für den Restriktionsverdau der Fbxw5 Konstrukte wurde folgender MasterMix verwendet:

Tab. 13: MasterMix für den Restriktionsverdau.

	Eingesetzte Menge [µl]
PCR Produkt oder Plasmid	5
Enzym 1 (hier EcoRI)	1
Enzym 2 (hier XhoI)	1
10 x Restriktionspuffer	2
ddH ₂ O	11

Die optimale Temperatur und Inkubationszeit für den doppelten Restriktionsverdau lässt sich anhand der Herstellerseiten im Internet oder im Katalog bestimmen.

5.2.8.3 DNS Elution aus Agarosegelen

Die unter 5.2.8.2 verdauten DNS Fragmenten wurden auf einem 2 %igen Agarosegel bei 100 Volt geelektrophoretisch aufgetrennt. Sobald die untere Lauffront des Ladepuffers eine genügend weite Auftrennung anzeigte, wurde das Gel fotografiert. Anschließend wurde die gewünschte Bande mit Hilfe eines UV – Tisches herausgeschnitten. Die Elution der DNS aus der Agarose erfolgte analog zum Herstellerprotokoll von OLS.

5.2.8.4 Ligation

Während der Ligation verbindet das Enzym, die DNS Ligase, die beiden DNS Stränge mittels einer Esterbindung zwischen dem Phosphatrest des 5' Endes des einen Fragmentes und dem Zucker Desoxyribose des 3' Endes des anderen Fragmentes.

Für die in dieser Doktorarbeit verwendeten Ligationen wurde die T4 Ligase und das Protokoll der Firma Fermentas verwendet. Durch die vorhandene Pufferzusammensetzung musste kein zusätzliches ATP hinzugegeben werden.

5.2.8.5 Transformation

Für die Transformation in chemisch kompetente Bakterien wurden 5 µl des Ligationsansatzes verwendet. Als erster Schritt erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die Aufnahme der DNS durch die Bakterien wurde forciert, indem die Proben einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt wurden. Anschließend kühlten die Ansätze für zwei Minuten auf Eis ab, um dann auf die entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen zu werden. Bei Bedarf, um die Effizienz zu erhöhen, konnte vor dem Ausstreichen eine halbstündige Inkubation bei 37 °C in 1 x LB ohne Antibiotikum erfolgen.

5.2.8.6 Plasmidaufreinigung - Mini

Die Plasmidminipräparation bietet eine gute Möglichkeit, ohne viel Aufwand schnell und günstig an Plasmid DNS zu gelangen. Dieses Material eignet sich zwar nicht für Plasmidtransfektionen, kann aber gut zur Überprüfung einer Klonierung oder für einen Restriktionsverdau eingesetzt werden. In Kombination mit einer RNase Behandlung sind die Proben sogar teilweise für die Sequenzierung geeignet.

Am Vortag wurde eine auf den Selektionsplatten gewachsene Kolonien (s. 5.2.8.5), in 5 ml 1 x LB mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Nach 16 h konnten 3 ml der ü.N Kultur durch zweimaliges Zentrifugieren bei RT und 13 000 Upm in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt werden. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Lösung I und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Zellen durch 200 µl Lösung II. Eine optimale Durchmischung wurde durch mehrmaliges Invertieren gewährleistet. Die nun anschließende fünfminütige Inkubation der Proben erfolgte auf Eis. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 200 µl Lösung III hinzugegeben, und die Ansätze wurden wiederum für 5 min auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 min bei RT und 13 000 Upm konnte die extrahierte DNS von den ausgefällten Proteinen abgetrennt werden. Die im Überstand befindliche DNS wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 2 min mit 1 ml 100 %igen Ethanol gefällt. Die gefällten Proben wurden für 5 min bei RT und 13 000

Upm zentrifugiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 70 %igen Ethanol. Nach einer kurzen Trocknung bei RT konnte das Pellet je nach Größe in 30 – 50 µl TE pH 8.0 resuspendiert werden.

Tab. 14: Gebrauchslösungen für die Plasmidaufreinigung.

Lösung I:

	Endkonzentration	Eingesetzte Menge
Tris-HCl pH 7,5 [ml]	25 mM	0,25
EDTA pH 8,0 [ml]	10 mM	0,2
Glukose [ml]	50 mM	0,5
ddH ₂ O [ml]		auf 10

Lösung II:

	Endkonzentration	Eingesetzte Menge
1 N NaOH [ml]	0,2 N	2
10 % SDS [ml]	1 %	1
ddH ₂ O [ml]		auf 10

Lösung III:

	Endkonzentration	Eingesetzte Menge
Kaliumacetat [g]	3 M	147
Essigsäure [ml]	11,5 %	57,5
ddH ₂ O [ml]		auf 500

5.2.8.7 Plasmidaufreinigung – CsCl₂

Die Plasmidaufreinigung mittels CsCl₂ bietet aufgrund ihrer mehrfachen Extraktionsschritte eine Möglichkeit, mit einfachen Mitteln an eine große Menge sehr reiner Plasmid DNS zu gelangen. Diese so erhaltenen Proben können für alle weitere Versuchsansätze verwendet werden.

Zu Beginn des Versuches wurde eine 200 ml 1 x LB Bakterienkultur mit entsprechendem Antibiotikum aus einer kleineren 5 ml Vorkultur angeimpft. Die Bakterien sollten mindestens 16 h unter Schütteln wachsen können. Am nächsten Tag wurde die Kultur in einen 400 ml Zentrifugenbecher überführt und für 20 min bei

4 °C und 4 000 Upm in einer Beckman Zentrifuge pelletiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wurde durch die Zugabe von 12 ml Lösung I (s. 5.2.8.6) mit einer Glaspipette resuspendiert. Durch die anschließende Zugabe 24 ml Lösung II (s. 5.2.8.6) erfolgte die alkalische Lyse der Zellen. Hierfür wurden die Proben vorsichtig durch Invertieren gemischt, bis die Lösung von trüb und flüssig auf klar und viskos wechselte. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden zum Abstoppen der Reaktion 18 ml Lösung III (s. 5.2.8.6) hinzupipettiert. Nach 20 min auf Eis erfolgte die Abtrennung der ausgefällten Proteine durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4 000 Upm. Der so erhaltene Überstand wurde filtriert und in einen neuen Zentrifugenbecher überführt. Anschließend erfolgte eine erneute Fällung der DNS durch die Zugabe von 40 ml 100 %igen Isopropanol pro Ansatz. Nach 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 4 000 Upm konnte das Pellet in 10 ml TE pH 8.0 gelöst werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml 10 M NH₄Ac und eine Inkubation von 15 min auf Eis. Die Proben wurden danach für 20 Minuten bei 4 °C und 4 000 Upm zentrifugiert. Die Präzipitation der im Überstand befindlichen DNS erfolgte durch die Zugabe von 32 ml 100 %igen Ethanols und einer anschließenden Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 4 000 Upm. Nach einer kurzen Trocknung bei RT wurde das Pellet in 3,5 ml TE pH 8.0 gelöst. Für die anschließende Dichtezentrifugation erfolgte die Zugabe von 4,71 g CsCl, 200 µl Ethidiumbromid und 51 µl Triton X100 pro Ansatz. Zur Abtrennung aller nicht gelösten Bestandteile wurden die Proben für 10 min bei RT und 4 000 Upm zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde luftblasenfrei in das Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Auftrennung der DNS mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden die Proben für mehr als 16 Stunden unter Vakuum in der Ultrazentrifuge (50 000 Upm; 21 °C) zentrifugiert. Am nächsten Tag waren in jedem Ansatz zwei EtBr Banden sichtbar, von denen die obere chromosomale DNS und die untere die gewünschte Plasmid DNS enthielt. Zur besseren Detektion wurden die Proben unter UV-Licht betrachtet. Damit bei der Probenentnahme kein Unterdruck im Zentrifugenröhrchen entsteht, wurde am oberen Ende mit einer Kanüle ein Loch in das Röhrchen gebohrt. Um ein mögliches Spritzen während dieses Vorgangs zu verhindern, wurde die Einstichstelle mit einem Papiertuch abgeschirmt.

Das Abziehen der unteren Bande erfolgte mittels einer 5 ml Spritze mit einer 0,8 x 40 mm Kanüle. Hierfür wurde die Spritze etwas unterhalb der Probe in einem

45° Winkel schräg nach oben zeigend angesetzt. Das Durchstechen des Zentrifugenröhrchens erfolge durch vorsichtiges Drehen der Spritze. Hierbei war darauf zu achten, dass das Röhrchen so fest gehalten wurde, dass bei einem eventuellen Durchstechen der gegenüberliegenden Wand keine Verletzungsgefahr besteht.

Damit die abgezogene DNS nicht unnötigen Scherkräften ausgesetzt war, wurde für die Überführung der Probe in ein 15 ml Polypropylenröhrchen die Kanüle entfernt.

Die Trennung der DNS vom EtBr erfolgte durch eine mehrmalige Extraktion mit 5 M NaCl gesättigten 100 %igen Isopropanol. Hierfür wurde die Probe mit dem gleichen Volumen des Extraktionsmittels versetzt und durch wiederholtes Invertieren extrahiert. Die sich daraus bildende obere Phase, in der sich das EtBr anreichert, wurde verworfen. Dieser Extraktionsschritt erfolgte mindestens sechsmal oder so lange, bis beide Phasen zweimal farblos erschienen. Für die anschließende Präzipitation der DNS wurde die Probe mit zwei Volumen Wasser und zweieinhalb Volumen 100 %igen Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte für eine Stunde bei -20 °C. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 4 000 Upm wurde die präzipitierte DNS pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit 70 %igen EtOH und einer kurzen Trocknung der Proben bei RT konnte die DNS je nach Menge in 300 – 500 µl TE pH 8.0 ü.N. gelöst werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am nächsten Tag photometrisch bei einer OD von 260/280 nm. Bis zum Gebrauch wurde die Plasmid DNS bei 4 °C gelagert.

5.2.9 Immunfluoreszenz

Die für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper und ihre eingesetzten Verdünnungen sowie das entsprechende Fixierungsmittels sind unter 5.3.1 und 5.3.2 nachzulesen.

Die fixierten und in 1 x PBS gelagerten Proben wurden zu Beginn der Färbung zur Reduktion unspezifische Antikörperbindungen für eine Stunde bei RT mit 2 % BSA in 1 x PBS blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte optional die Permeabilisierung der Zellen für zwei min mit 0,2 % Triton X 100 in x PBS auf Eis. Für die sich anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper wurde eine

feuchte Kammer vorbereitet. Hierfür wurde eine Plastikschaale mit feuchten Papiertüchern ausgelegt, und auf den darauf positionierten Parafilmstreifen wurden pro Ansatz 40 µl verdünnte, primäre Antikörper gegeben. Die Proben wurden nach einem erneuten Waschschrift mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (falls der primäre unkonjugiert gewesen ist) analog zum Primären inkubiert. Die Kernfärbung mittels DAPI erfolgte nach einem weiteren Waschschrift mit 1 x PBS. Der mit der DNS interkalierende Farbstoff wurde dafür 1 : 50 000 in ddH₂O gelöst und für fünf Minuten bei RT auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten die Proben direkt mit ProLong[®] Gold antifade von der Firma Invitrogen eingedeckelt werden und entweder sofort mikroskopisch analysiert oder bis zum Gebrauch im Dunkeln bei 4 °C gelagert werden.

5.2.9.1 TUNEL Färbung

Die Vorkultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 5.1.2 und 5.2.9 beschrieben. Die Färbung wurde analog zum Protokoll des Herstellers Roche durchgeführt.

5.2.10 Antikörperherstellung

5.2.10.1 Proteinexpression in Bakterien

Für die Expression in Bakterien wurde die Wildtyp (WT) Variante von Fbxw5 in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX kloniert (s. 5.2.8). Nach Bestätigung der fehlerfreien Sequenz konnte das Plasmid in chemisch kompetente BL21 Zellen transformiert werden (s. 5.2.8.5).

Zur Austestung der optimalen Induktionszeit und –konzentration des IPTGs wurden unterschiedliche Ansätze ausgetestet. Für dieses Konstrukt wurde eine optimale Induktionszeit von drei Stunden und eine Konzentration von 2 mM IPTG ermittelt.

5.2.10.2 Proteinaufreinigung mittels Elektroelution

Die induzierte Probe wurde mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese (s. 5.2.2.1) auf einem 20 cm x 16 cm x 0,5 cm Gel aufgetrennt. Für die Proteinfällung wurde das Gel mehrere Minuten in eiskaltem 3 M KCl geschwenkt. Die Bande, die dem induzierten Protein entspricht, wurde mittels Skalpell ausgeschnitten und in eine 10 ml Spritze überführt. In der Zwischenzeit wurde ein Dialyseschlauch auf die Breite einer Elektrophoresekammer zugeschnitten und mehrmals mit 1x TBE Puffer gespült. Der Dialyseschlauch wurde an einem Ende mit einer Klammer verschlossen und das ausgeschnittene Gelstück wurde mittels einer 10 ml Spritze ohne Kanüle eingefüllt. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 5 ml 1 x TBE Puffer zu den Gelstücken. Nach dem Verschließen des zweiten Endes wurde der Dialyseschlauch quer zur Laufrichtung in eine mit 1x TBE befüllte Agarosegelkammer gelegt. Die Elektroelution erfolgte bei 100 V für eineinhalb Stunden bei 4 °C. Im Anschluss daran wurde die Polarität geändert und die Probe für weitere 1,5 Minute elektroeluiert. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde nach dem Lauf in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach kurzer Absetzzeit erfolgte die Überführung des Überstandes in 1,5 ml Eppendorfgefäße. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine 1:10 Verdünnung der Probe mit einer bekannten BSA Konzentrationsreihe mittels SDS-Gelelektrophorese (s. 5.2.2.1) aufgetrennt. Zur Detektion der Proteinbande erfolgte im Anschluss an den Lauf eine Färbung mittels Coomassie.

5.2.10.3 Proteinaufkonzentrierung

Die Aufkonzentrierung der Proben erfolgte mittels einer kommerziell erhältlichen Membran von Millipore (Amicon Pure). Der Ausschlussgrad wurde entsprechend der zu erwartenden Proteingröße gewählt. Hierfür wurden 15 ml von der aufkonzentrierenden Lösung auf den Filter gegeben und für 15 min bei 4 °C und 4 000 Upm in einer Beckmann Zentrifuge zentrifugiert. Das hierbei übrig bleibende, eingeeengte Volumen wurde mittels einer 200 µl Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Zentrifugationsschritt wurde so lange wiederholt, bis das gewünschte Volumen bzw. die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde.

Für die Immunisierung wurden 4 ml der Probe mit einer Konzentration von 1 mg/ml zu Sigma geschickt. Nach fünf Immunisierungsschritten wurden die Kaninchen ausgeblutet, und das so erhaltene Serum konnte für die Affinitätsaufreinigung zur Optimierung des Antikörpers (s. 5.2.10.4) verwendet werden.

5.2.10.4 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Zu Beginn des Experiments wurde 1 g CNBr aktivierte Agarose in ein 50 ml Polypropylenröhrchen eingewogen und mit 50 ml 1 mM HCl gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4 000 Upm. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 ml Borsäure (pH 8,3) zum Pellet. Nach kurzer Durchmischung wurde die Probe für 5 min bei 4 000 Upm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 2,7 mg Protein in 1 ml 1x PBS gelöst und anschließend zusammen mit weiteren 10 ml 1x PBS zum Pellet gegeben. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 4 °C auf dem Rotierer. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 ml kaltem 0,1 M Natriumacetat pH 4,0/ 0,5 M NaCl. Nach dem nun folgenden Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 50 ml kaltem 0,1 M Tris pH 8,0/ 0,5 M NaCl gewaschen und erneut zentrifugiert. Der nächste Waschschrift erfolgte mit 50 ml kaltem 0,1 M Glyzin pH 2,3. Das Pellet wurde nach dem folgenden Zentrifugationsschritt in kaltem 1x PBS erneut gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml resuspendiert und dabei in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden 3 ml aufgetautes Antiserum auf das Sepharosepellet gegeben. Die Probe wurde anschließend über Nacht bei 4 °C auf dem Rotierer inkubiert. Am nächsten Tag wurde frisch Puffer A angesetzt. Nach dem Abzentrifugieren der Probe wurde der Überstand bei 4 °C gelagert und das Pellet mit 14 ml kaltem Puffer A gewaschen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Das Sepharosepellet wurde anschließend mittels 14 ml Puffer A auf eine Säule transferiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 1x PBS. In der Zwischenzeit wurden 10 Eppendorfgefäße mit jeweils 50 µl 1 M Tris pH 9,5 gefüllt und auf Eis zum Abkühlen gestellt. Nach dem die Säule verschlossen wurde, erfolgte die Elution mit

5 ml Glyzin pH 2,3. Es wurden jeweils 500 µl Fraktionen aufgefangen und nach sofortigem Mischen zu 4°C gestellt. Die Säule kann nach viermaligem Waschen mit 50 mM Tris pH 7,5 in 50 mM Tris pH 7,5/ 0,02 % Natriumazid bei 4 °C bis zum nächsten Gebrauch gelagert werden.

Die aufgefangenen Fraktionen 1 – 9 können auf einem 10 %igem SDS-Gel nach dem Elutionshöhepunkt hin überprüft werden.

Tab. 15: Zusammensetzung des Waschpuffers A.

Puffer A:

	Endkonzentration	Eingesetzte Menge
1 M Tris pH 7,5 [ml]	50 mM	5
5 M NaCl [ml]	500 mM	10
10 % NP 40 [ml]	0,1 %	1
ddH ₂ O [ml]		84

5.3 Material

5.3.1 Geräte

Absaugpumpe, Vacuumbrand GmbH und Co KG, Wertheim

Analysenwaage, AE 200, Mettler-Toledo, Gießen

Brutschrank, „Hera Cell“, Heraeus Instruments GmbH, Osterode

Clean Bench, Hera Safe, Kendro, Osterode

Flexcyclor, Analytik Jena, Jena

Fluoreszenzmikroskope, „Leica DM5000“, Leica, Wetzlar

„Leica DM6000“, Leica, Wetzlar

Gelelektrophorese, „Sub-cell Model 96 Cell“, BioRAD, München

„Mini-Sub Cell GT Cell“, BioRAD, München

Kamera, Nikon Digitalkamera CoolPix 950, Nikon GmbH, Düsseldorf

Kühl- und Gefrierkombination, Leifheit, Nassau/Lahn

Magnetrührer, HANNA, HLL, Hannover

Mikrotiterplatten-Lumiometer „SAFIRE“, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim

Mikrowelle, Bauknecht, Stuttgart

Multipette® plus, Eppendorf, Hamburg

pH-Meter, 763 Multi-Calimazik, Knick

Pipettierhilfe, Eppendorf, Hamburg

Proteinelektrophorese, „**Mini-Protean Electrophoresis System**“, BioRAD,
München

„**Mini-Protean Tetra Electrophoresis System**“, BioRAD,
München

Proteintransfer, „**Mini Trans-Blot Cell**“, BioRAD, München

Rotatoren SB 2, Roth, Karlsruhe

Spannungsgeräte, „**PowerPac Basic Power Supply**“, BioRAD, München

„**PowerPac HC Power Supply**“, BioRAD, München

Stereomikroskop „MZ 12“, Leica, Solms

Schüttler „Rocky“, Heidolph, Schwabach

Thermomixer compact für Eppendorfgefäße, Eppendorf, Hamburg

Vortex-Genie, Scientific Industries, Bohemia, USA

Vibrationsschüttler, Heidolph, Schwabach

Wasserbad, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Zentrifugen, Eppendorf Zentrifuge, **5415 D**, Hamburg

Tischzentrifuge MIKRO 220 R cooled, Roth Karlsruhe

Hettich Zentrifuge „Rotina 38R“, Tuttlingen

Beckman Zentrifuge „L8-55M“, Tuttlingen

Megafuge 1.0, Heraeus, Osterode

5.3.2 Verbrauchsmaterialien

6 Lochplatten, Greiner, Solingen

12 Lochplatten, Greiner, Solingen

96 Lochplatten, Greiner, Solingen

Cellulose Ester Dialyse Membran MWCO 25,000, Roth, Rancho Dominguez

Combitips plus 10 ml, Eppendorf, Hamburg

Deckgläser, d= 15 mm, Menzel, Braunschweig

Eppendorfgefäße, 0,2 ml, Greiner, Solingen

Filterspitzen 0,1 - 10 µl, Starlab, Nümbrecht
Filterspitzen 20 µl, Starlab, Nümbrecht
Filterspitzen 200 µl, Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht
Gelauftragsspitzen, Vitaris, Baar
Immobilon-P Transfer Membran, Millipore, Schwalbach
Kryoröhrchen, Vitaris, Baar
Küvetten, BioRad, München
Objektträger, Menzel, Braunschweig
Petrischalen, d=14,5 cm, Greiner, Solingen
Polypropylen Röhrchen, 15 ml, Greiner, Solingen
Polypropylen Röhrchen, 50 ml, Greiner, Solingen

5.3.3 Chemikalien

Aceton, Merck, Darmstadt
Acrylamid-Lösung (30%) Mix 37,5 : 1, AppliChem, Darmstadt
Agar, AppliChem, Darmstadt
Agarose-Multi-Purpose, Bioline, Luckenwalde
Albumin aus Rinderserum, BioChemika FractionV, Fluka, Steinheim
Ammoniumacetat, AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat, AppliChem, Darmstadt
Ammoniumsulfat, AppliChem, Darmstadt
Ampicillin, AppliChem, Darmstadt
Aphidicolin aus Nigrospora Sphaerica, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
A-Sepharosekugeln, GE Healthcare, München
Bacto™Peptone, Becton Dickinson, Heidelberg
Benzamidine, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
β- Glycerophosphat, AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol, AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau, AppliChem, Darmstadt
Borsäure, Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid 99%, AppliChem, Darmstadt

Calciumchlorid- Dihydrat, AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau, AppliChem, Darmstadt
Coomassie Colloidal, Serva, Heidelberg
DAPI, AppliChem, Darmstadt
DEPC, AppliChem, Darmstadt
di- Kaliumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
di- Kaliumhydrogenphosphat-Heptahydrat, Merck, Darmstadt
di- Kaliumhydrogenphosphat-Monohydrat, Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid, AppliChem, Darmstadt
DMEM, Invitrogen, Karlsruhe
DNase I, Roche, Mannheim
Dithiothreitol (DTT), AppliChem, Darmstadt
DOC, AppliChem, Darmstadt
EDTA, AppliChem, Darmstadt
EGTA, AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, Baker, Griesheim
Ethanol, Merck, Darmstadt
Ethanolamine, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethidiumbromid, AppliChem, Darmstadt
FKS, Biochrom, Berlin
Formaldehydlösung min 37 % säurefrei, Merck, Darmstadt
Gelatine, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glukose, AppliChem, Darmstadt
Glutamax, Invitrogen, Karlsruhe
Glutathione Agarose, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycerin wasserfrei, AppliChem, Darmstadt
Glyzin, AppliChem, Darmstadt
G-Sepharosekugeln, GE Healthcare, München
Harnstoff, AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt, AppliChem, Darmstadt
HEPES, AppliChem, Darmstadt
HiPerfect, Qiagen, Hilden
Hydroxyurea, Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Imidazol, AppliChem, Darmstadt
IPTG, AppliChem, Darmstadt
Isopropanol, Merck, Darmstadt
Kaliumacetat, AppliChem, Darmstadt
Kaliumchlorid, AppliChem, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat, AppliChem, Darmstadt
Kristallviolett, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
L-Leucin, AppliChem, Darmstadt
Luminol min 97%, HPLC, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Magermilchpulver, AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid, AppliChem, Darmstadt
Methanol, AppliChem, Darmstadt
Natriumazid, AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat wasserfrei, AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid, AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid, AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen, AppliChem, Darmstadt
Natriumpyrophosphat, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumthiosulfat-Pentahydrat, AppliChem, Darmstadt
Nikotinamid, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nocodazol, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nonidet P40, AppliChem, Darmstadt
Penicillin- Streptomycin Lösung, Invitrogen, Karlsruhe
ProLong®Gold Antifade reagent, Invitrogen, Karlsruhe
Roti-Phenol, Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/C/I, Roth, Karlsruhe
Salzsäure, Merck, Darmstadt
Sukrose, Fluka, Steinheim
Talon Metallaffinitätskugeln, Becton Dickinson, Heidelberg
TEMED, AppliChem, Darmstadt
Thymidine 99 – 100%, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trasyol® (Aprotinin), hausinterne Apotheke, Hannover

Tris ultrapure, AppliChem, Darmstadt
Triton X 100, AppliChem, Darmstadt
Trypsin/EDTA Lösung, Biochrom, Berlin
Trypton, AppliChem, Darmstadt
Tween 20, AppliChem, Darmstadt
o-Phosphorsäure, Merck- Schuchard, Darmstadt
p-Cumarsäure, Merck- Schuchard, Darmstadt
Pepstatin A, AppliChem, Darmstadt
PIPES, AppliChem, Darmstadt
PMSF, AppliChem, Darmstadt
Polyethylenglykol 6000, AppliChem, Darmstadt
Polyethylenimin, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Protein G Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences
Propidium Iodid, Fluka, Steinheim
SDS ultrapure, AppliChem, Darmstadt
Sukrose, Fluka, Steinheim
Vanadat, AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 Gew % Lösung in Wasser, Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Xylencyanol FF, AppliChem, Darmstadt

5.3.4 Antikörper

5.3.4.1 Primäre Antikörper

Tab. 16: Verwendete primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Fixiermittel	Temperatur	Fixierzeit [min]	Verdünnung
α -Tubulin	Methanol	- 20 °C	15	1 : 300
γ -Tubulin	Methanol	- 20 °C	10	1 : 400
9E10	Methanol	- 20 °C	5	1 : 200
9E10 Alexa	Methanol	- 20 °C	10	1 : 500

Tab. 17: Verwendete primäre Antikörper für die Western Blot Analyse.

Antikörper	Hersteller	Ausgangs- konzentration	Blockierung	Verdünnung
9E10	Sigma	1 mg/ml	5 % Magermilch	1 : 10 000
Aktin C2	Santa Cruz	200 µg/ml	für IP	1 : 5 000
Aktin C4	ICN Biomedicals	2 mg/ml	5 % Magermilch	1 : 5 000
AurA	Santa Cruz	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 1 000
Cul 1	Neolabs	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 1 000
Cdc20	Santa Cruz	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 1 000
Cdc27	Santa Cruz	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 1 000
Fbxw5	Eigenproduktion	nicht bestimmt	5 % Magermilch	1 : 1 000
Flag	Sigma	4.6 mg/ml	5 % Magermilch	1 : 5 000
GFP	Roche	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 5 000
HA	Sigma	5 mg/ml	5 % Magermilch	1 : 5 000
hSAS6	Santa Cruz	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 1 000
Plk4	Cell Signaling	0,5 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 1 000
Skp 1	Santa Cruz	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 500
Zyklin B	Santa Cruz	200 µg/ml	5 % Magermilch	1 : 1 000

5.3.4.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 18: Verdünnungen und Reaktivität der sekundären Antikörper für die Immunfluoreszenz.

Antikörper	Verdünnung	Reaktivität
Cy3	1 : 1000	Kaninchen
FITC	1 : 400	Kaninchen
FITC	1 : 400	Maus
Rhodamin	1 : 200	Maus

Tab. 19: Verdünnungen des sekundären Antikörpers für die Western Blot Analyse.

Antikörper	Hersteller	Ausgangs- konzentration	Verdünnung
Anti-Maus	Dianova	1,5 mg/ml	1 : 10 000
Anti-Kaninchen	Dianova	1.5 mg/ml	1 : 10 000

5.3.5 Primer

Für die Klonierung der Fbxw5 Konstrukte wurden folgende Primer verwendet:

Fbxw5 Wildtyp F1:

5`AAA AAA GAA TTC CAC GAT GGA CGA GGG C 3`

Fbxw5 Wildtyp B1:

5`TTT TTT CTC GAG GCA CCC AGC ACA CCT CA 3`

Fbxw5 deltaFbox F1:

5`AAA AAA GAA TTC CAT GTT CTA CCG CTA CTA CCA GG 3`

Fbxw5 deltaFBox B1:

5`TTT TTT CTC GAG GCA CCC AGC ACA CCT CA 3`

Fbxw5 deltaWD1 F1:

5`AAA AAA GAA TTC ATG CGG CCC TAC AAC T 3`

Fbxw5 deltaWD1 B1:

5` TTT TTT CTC GAG GCA CCC AGC ACA CCT CA 3`

Fbxw5 deltaWD2 F1:

5` AAA AAA GAA TTC CAC GAT GGA CGA GGG C 3`

Fbxw5 deltaWD2 B1:

5`TTT TTT CTC GAG CGT GTA GGC GCG GTG 3`

Fbxw5 deltaWD3 F1:

5` AAA AAA GAA TTC CAC GAT GGA CGA GGG C 3`

Fbxw5 deltaWD3 B1:

5`TTT TTT CTC GAG CAG CCT GGC CAG ACA GAT 3`

Für die Herstellung der Fbxw5 Phosphomutanten wurden folgende Primer verwendet:

Fbxw5 S151A 5`TCA ACA AGG ACG ACG CGC TAC TGC TGG CC 3`
Fbxw5 S200A 5`GCT CAC CGA GAC CGC CCT CAT CTC GGG 3`
Fbxw5 T344A 5`GAG CGC AGT GCC GCA AGG CGC CAA G 3`

5.3.6 Zellkulturmaterialien

5.3.6.1 Zellkulturen

HeLa: Diese Zelllinie wurde ursprünglich aus einer Patientin namens Henrietta Lacks, die an einem Cervix Carcinom erkrankt gewesen ist, isoliert. Die hier verwendeten Zellen haben über die Zeit eine zusätzliche Mutation im Tumorsuppressorgen p53 akkumuliert und sind somit p53 -/-.

U2OS: Diese Zelllinie stammt ursprünglich aus einem Patienten, der an einem Osteosarkom erkrankt gewesen ist.

HEK 293: Diese Zelllinie wurde ursprünglich Ende der 1970er Jahre aus menschlichen embryonalen Nierenzellen gewonnen. Ihre Inmortalität erhielten diese Zellen durch die Transformation mit Teilen eines menschlichen Adenovirus 5.

5.3.6.2 Zellkulturmedien

Alle Zelllinien wurden im nachfolgenden Medium kultiviert:

<u>Wachstumsmedium:</u>	DMEM (Invitrogen, Karlsruhe)	
	Zusätze	C _{final}
	<hr/>	
	L-Glutamine (100x)	2 mM
	FKS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	100 µg/ ml
<u>Einfriermedium :</u>	FKS	10 %
	DMSO	10 %
	Wachstumsmedium	80 %

Tab. 20: Gebrauchslösung für den Proteinlysispuffer.

<u>RIPA:</u>	Stammlösung	C _{final}
	<hr/>	
	NP40	10 %
	DOC	10 %
	SDS	20 %
	TRIS pH 8,0	1 M
	NaF	0,5 M
	NaCl	5 M
	Na ₄ P ₂ O ₇	1 M
	EDTA	0,5 M
	EGTA	0,5 M
		1 %
		0,5 %
		0,1 %
		50 mM
		50 mM
		8 mM
		20 mM
		1 mM
		1 mM

<u>Hinzuzufügende Proteinaseinhibitoren:</u>	Benzamidin
	Leupeptin
	Pepstatin
	PMSF
	Trasylol® (Aprotinin)

5.3.7 Verwendete Software

Für die Erstellung dieser Arbeit und die Akquirierung der Ergebnisse wurde folgende Software verwendet.

Tabellenkalkulation:	<i>Excel 2007</i> (Microsoft)
Textverarbeitung:	<i>Word v. X 2001</i> (Microsoft); <i>Reader 6.0</i> (Adobe)
Bildverarbeitung:	<i>Photoshop 7.0 und CS</i> (Adobe), <i>Illustrator CS</i> (Adobe) und <i>ImageJ</i>
Bilderstellung:	<i>Leica FireCam Version 1.7.1</i> (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd UK); <i>FUJIFILM Photograb-300Z</i> (FUJI Photo Film Co, Ltd.); <i>FUJIFILM Image Reader Version 1.8E</i> (FUJI PhotoFilm Co, Ltd.);
Sequenzauswertung:	<i>MacVector™ 7.2</i> (Accelrys Inc.)
FACS:	<i>BD Cell Quest Pro™</i> (BD Biosciences), <i>FlowJo Version 7.3</i> (Tree Star Inc.)
Internetrecherche:	<i>Netscape Communicator 7.1</i> (Netscape Communications Corporation); <i>Safari Version 2.0.4</i> (Apple Computer, Inc.)

Auf folgende Datenbanken wurde im Rahmen dieser Arbeit zugegriffen:

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),
Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>),

6 Ergebnisse

6.1 Funktion

6.1.1 Mikroskopische Untersuchung Fbxw5 siRNA behandelter Zellen

6.1.1.1 Der Verlust von Fbxw5 führt zur Bildung multipolarer Spindeln

Für die Darstellung atypischer Spindelkonformationen wurden immunfluoreszenztechnische Methoden verwendet. Neben anderen Motorproteinen ist α -Tubulin ein Hauptbestandteil der eukaryotischen Spindel. In diesem Versuch wurden HeLa Zellen in Methanol fixiert und mit einem fluoreszenzgekoppelten α -Tubulin Antikörper angefärbt. Als Gegenfärbung wurde der Kernfarbstoff DAPI verwendet. In Abb. 10 a-d sind unterschiedliche Spindelphänotypen nach Transfektion mit Fbxw5 siRNA dargestellt. Zu erkennen sind sowohl dreipolige (b, d), als auch vier- (c) oder mehrpolige (a) Spindeln. Abb. 10 e) zeigt eine normale binäre Spindel, wie sie in der Kontrolle mehrheitlich zu sehen gewesen ist.

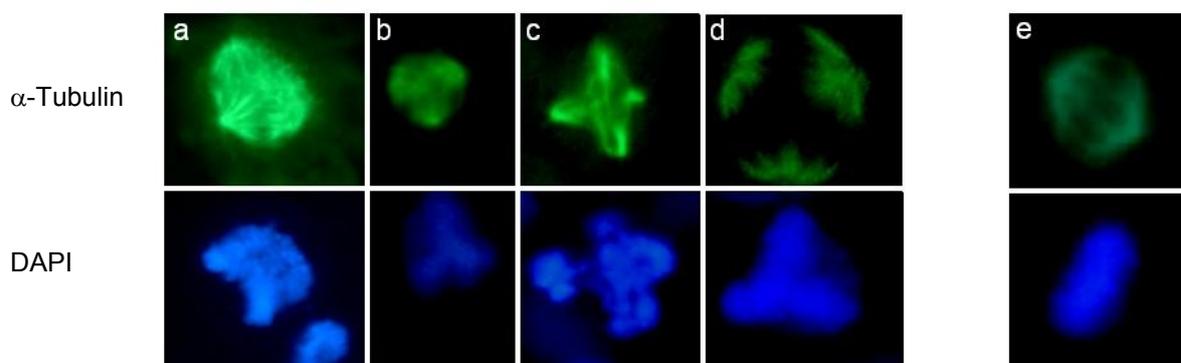


Abb. 10: Spindelphänotypen nach Transfektion mit Fbxw5 siRNA.

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (e) oder siRNA gegen Fbxw5 (a-d) transfiziert, und mitotische Spindeln wurden mittels α -Tubulin (grün) Antikörper angefärbt. Die DNS wurde mittels DAPI (blau) gefärbt. Die Zellen wurden in folgende Kategorien eingeordnet: a-d) multipolare Spindeln, e) bipolare Spindel. Die Bilder sind Beispiele repräsentativ für den jeweiligen Ansatz.

SiRNA Interferenz ist ein molekularbiologisch bedeutendes Werkzeug, welches ermöglicht, spezifisch die Translation eines Gens herunterzuregulieren, um anschließend die biologischen Folgen der reduzierten Expression des

entsprechenden Proteins untersuchen zu können. Nachteile dieser Methode sind unspezifische Reaktionen, die zu sogenannten „off-target“ Effekten führen können. Um diese unerwünschten Nebeneffekte auf ein Minimum zu begrenzen, wurden Kombinationen verschiedener gegen Fbxw5 gerichteter siRNAs miteinander verglichen (s. Abb. 11). Der größtmögliche Effekt von ca. 20 % multipolarer Spindeln bei minimal eingesetzter Menge pro siRNA wurde durch eine Kombination aus vier verschiedenen, gegen Fbxw5 gerichteten siRNAs erzielt. Für alle weiteren Versuche wurde diese Kombination von siRNAs verwendet.

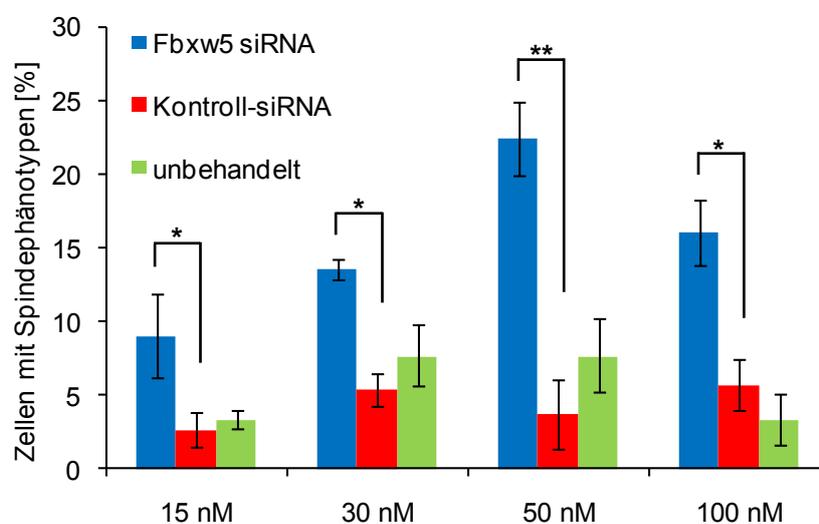


Abb. 11: Spindelphänotypen nach Transfektion mit Fbxw5 siRNA.

Hela wurden mit Kontroll-siRNA (e) oder siRNA gegen Fbxw5 (a-d) transfektiert, und mitotische Spindeln wurden mittels α -Tubulin (grün) Antikörper angefärbt. Die DNS wurde mittels DAPI (blau) gefärbt. Die Zellen wurden in folgende Kategorien eingeordnet: a-d) multipolare Spindeln, e) bipolare Spindel. Die Bilder sind Beispiele repräsentativ für den jeweiligen Ansatz.

Damit mögliche signifikante Unterschiede in den verschiedenen Ansätzen deutlicher hervorgehoben werden können, wurde die Färbung der mitotischen Spindeln quantifiziert. Hierfür wurden mitotische Zellen gezählt, die mehrpolige Spindeln ausbildeten (s. Abb. 12). Während zwischen der Kontroll-siRNA und den unbehandelten Zellen kaum ein Unterschied bestand, konnte für die Zellen, die mit Fbxw5 siRNA transfektiert wurden, eine signifikante Zunahme von 5 % auf bis zu 20 % an mehrpoligen Spindeln gezeigt werden. Der Transfer des Testsystems in

eine andere Zelllinie (U2OS) zeigte den gleichen Effekt in einer etwas schwächeren Ausprägung. Bei diesem Versuchsansatz konnte ein Anstieg von 5 % auf ca. 15 % an mehrpoligen Spindeln ermittelt werden.

Zusammenfassend kann ein Zelltyp unabhängiger Anstieg an Zellen mit mehrpoligen Spindeln nach Fbxw5 siRNA Transfektion festgestellt werden.

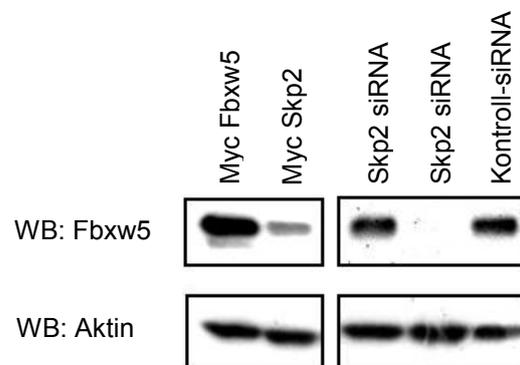
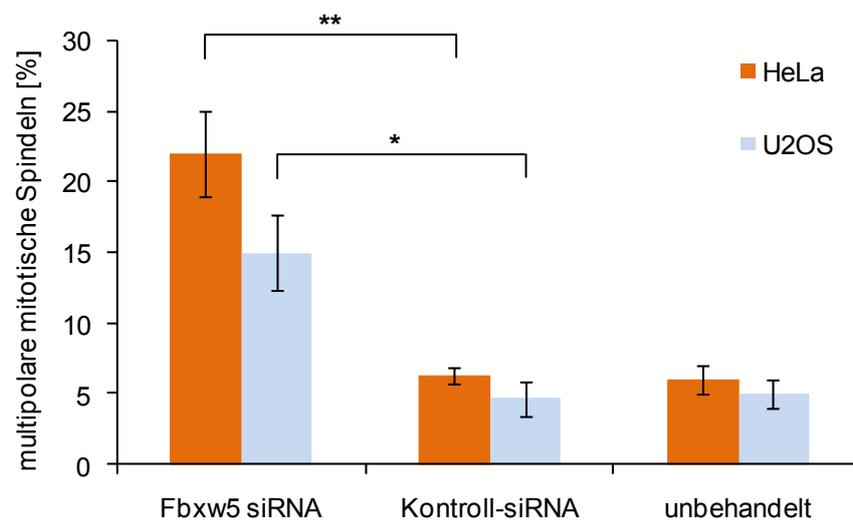


Abb. 12: Quantifizierung der Spindelphänotypen nach siRNA Transfektion.

Quantifizierung von HeLa und U2OS Zellen anhand der unter Abb. 5.1 beschriebenen Kategorien. Die dargestellten Mittelwerte sind das Ergebnis dreier unabhängiger Versuche, in denen jeweils mindestens 200 Zellen pro Ansatz gezählt wurden. Die Zellen wurden entweder mit Kontroll-siRNA oder siRNA gerichtet gegen Fbxw5 transfiziert. Die Spindeln wurden mittels α -Tubulin angefärbt.

6.1.1.2 Der Verlust von Fbxw5 führt zum Anstieg der Zentrosomenzahl

Zentrosomen sind für die Ausbildung der eukaryotischen, mitotischen Spindel unabkömmlich. Überzähliges Auftreten führt im Allgemeinen zu mehrpoligen Spindeln, die in der anschließenden Zytokinese das Erbgut ungleichmäßig auf die sich bildenden Tochterzellen verteilen. Durch Gruppierungsmechanismen kann die Zentrosomenanzahl ungleich größer sein als die entstehenden Spindelpole. Damit der Fbxw5 Spindelphänotyp zugeordnet werden kann (s. Abschnitt 6.1.1.1), wurden zusätzlich zu den Spindelmikrotubuli auch die Zentrosomen mit dem spezifischen Marker γ -Tubulin angefärbt. Für jeden Spindelpol konnte ein überlappendes zentrosomales Signal detektiert werden, wobei für diesen Versuchsansatz keine Aussage über die Anzahl der Zentrosomen pro Pol gemacht werden konnte (s. Abb. 13).

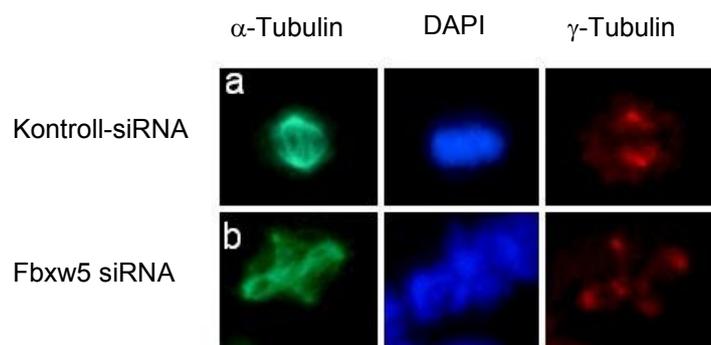


Abb. 13: Überzählige Zentrosomen nach siRNA Transfektion.

HeLa Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (a) oder Fbxw5 siRNA (b) in Kombination mit Cy3 markierter siRNA transfiziert. Die Zentrosomen wurden mit γ -Tubulin (rot) und die Spindeln mit α -Tubulin (grün) gefärbt. Die DNS ist hier in blau dargestellt.

Abb. 5.5 zeigt die Quantifizierung der vorangegangenen Fluoreszenzfärbung. Durch die Co-Transfektion mit Cy3 markierter siRNA konnten direkt die Zellen analysiert werden, die stark durch die siRNA Interferenz betroffen sind. Sowohl HeLa als auch U2OS Zellen wurden wie angegeben mit siRNA behandelt, und anschließend die Zentrosomen mit einem γ -Tubulin Antikörper angefärbt. Die Quantifizierung zeigte entsprechend der Zunahme an mehrpoligen Spindeln einen signifikanten Anstieg auf

bis zu 50 % für HeLa und ca. 60 % für U2OS Zellen, die zwei oder mehr Zentrosomen besaßen. Es gab keinen Unterschied zwischen den beiden getesteten Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen.

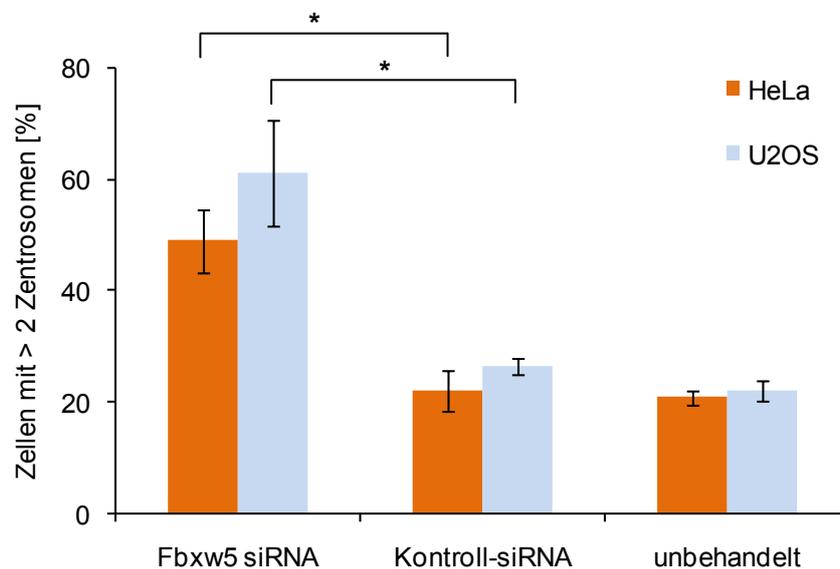


Abb. 14: Zentrosomenanzahl nach siRNA Transfektion.

Quantifizierung von HeLa und U2OS Zellen. Die dargestellten Mittelwerte sind das Ergebnis dreier unabhängiger Versuche, in denen jeweils mindestens 200 Zellen pro Ansatz gezählt wurden. Die Zellen wurden entweder mit Kontroll-siRNA oder siRNA gerichtet gegen Fbxw5 transfektiert. Die Spindeln wurden mittels α -Tubulin angefärbt und die Zentrosomen mit γ -Tubulin.

6.1.1.3 Effekte der Überexpression von Myc Fbxw5 auf die Zentrosomenzahl

Um unerwünschte Nebenwirkungen durch „off-target“ Effekte zu verringern, wurde bereits für vorherigen Experimente eine Kombination aus vier verschiedenen siRNAs gegen Fbxw5 eingesetzt und die Konzentration bis auf ein Minimum herabgesetzt. Eine einfache Möglichkeit, die Spezifität des beobachteten Ergebnisses zu überprüfen ist, das Zielprotein überexprimieren. Da dieser Ansatz eine Anhäufung von Fbxw5 anstatt einer Reduktion wie bei dem siRNA Ansatz in der Zelle zur Folge hat, kann ein gegenteiliger Effekt erwartet werden. Ist dieses Ergebnis spezifisch, sollte zudem eine konzentrationsabhängige Auswirkung sichtbar werden. Wie in

Abb. 15 zu erkennen ist, wurden jeweils 5 μg oder 10 μg Myc markiertes (kurz: MT) Fbxw5 Plasmid oder dsRED Kontrollplasmid transfektiert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die HeLa Zellen fixiert und mit γ -Tubulin und 9E10 anti-Myc Antikörper inkubiert. Es wurden jeweils mindestens 200 Zellen pro Experiment ausgewertet. Betrachtete man die Fraktion der Zellen, die nur ein Zentrosom besitzen, zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied von 10 % für die Überexpression von Fbxw5 im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Anstieg konnte durch die Konzentrationszunahme um weitere 10 % verstärkt werden.

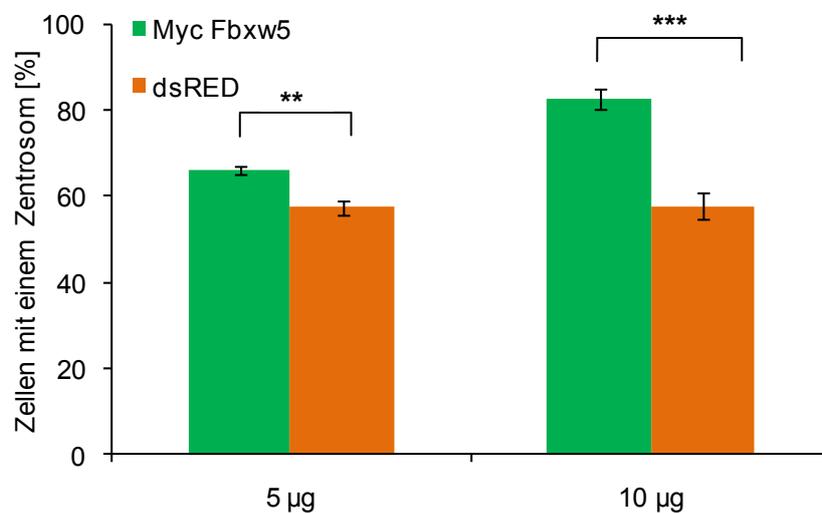


Abb. 15: Zentrosomenanzahl nach Proteinüberexpression.

Quantifizierung von HeLa Zellen mit nur einem Zentrosom nach Plasmidtransfektion mit Myc Fbxw5. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Die dargestellten Mittelwerte sind das Ergebnis dreier unabhängiger Versuche, von denen pro Ansatz mindestens 200 Zellen ausgezählt wurden.

6.1.1.4 Effekte der Fbxw5 siRNA Behandlung auf die Zellzahl

Optische Kontrollen nach siRNA Transfektion zeigten unter dem Lichtmikroskop eine Verringerung der Zellzahl nach Fbxw5 siRNA Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen. Abb. 16 zeigt die aufgrund der Beobachtungen durchgeführte Zellzahlbestimmung mittels Trypanblaufärbung. Während die siRNA Interferenz im Vergleich zu unbehandelten Zellen kaum einen Einfluss auf die Zellzahl hatte, konnte eine signifikante, 50 %ige Verringerung der Fbxw5 behandelten Proben festgestellt werden.

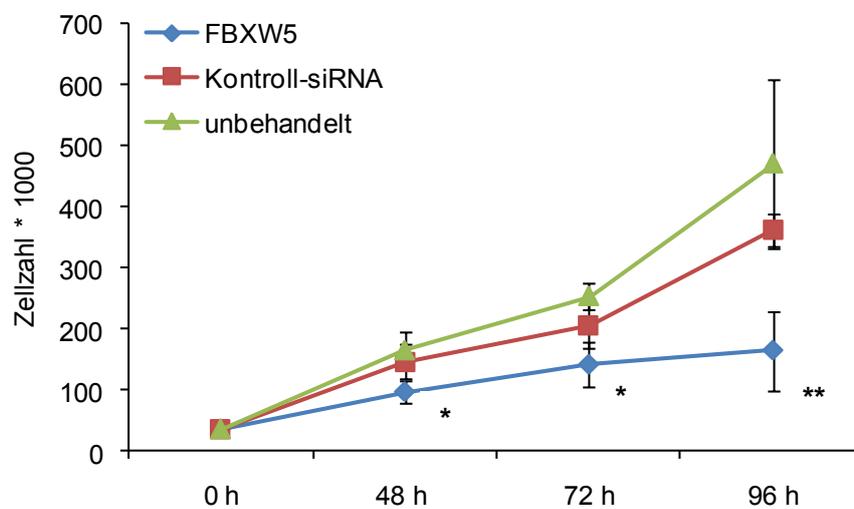


Abb. 16: Zellzahl nach siRNA Transfektion.

HeLa Zellen wurden mit Kontroll- oder Fbxw5 siRNA transfektiert. Apoptotische Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, und die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte aus drei unterschiedlichen Versuchen.

Diese Zellzahlverringerng konnte durch verschiedene Mechanismen verursacht werden:

1. Apoptose
2. Zellzyklusarrest
3. Seneszenz

Apoptose kann mit Hilfe der TUNEL Färbung getestet werden. Hierfür wird das Prinzip der freiwerdenden Hydroxylgruppen nach DNS Strangbrüchen ausgenutzt. Die Terminale Desoxynukleotidyltransferase kann diese Bruchenden mit markierten Nucleotiden versehen, welche dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden. Abb. 17 zeigt einen Anstieg der apoptotischen Zellen um ca. 10 % in Fbxw5 behandelten Proben. Zwischen der Kontroll-siRNA und den unbehandelten Ansätzen gab es keinen nennenswerten Unterschied.

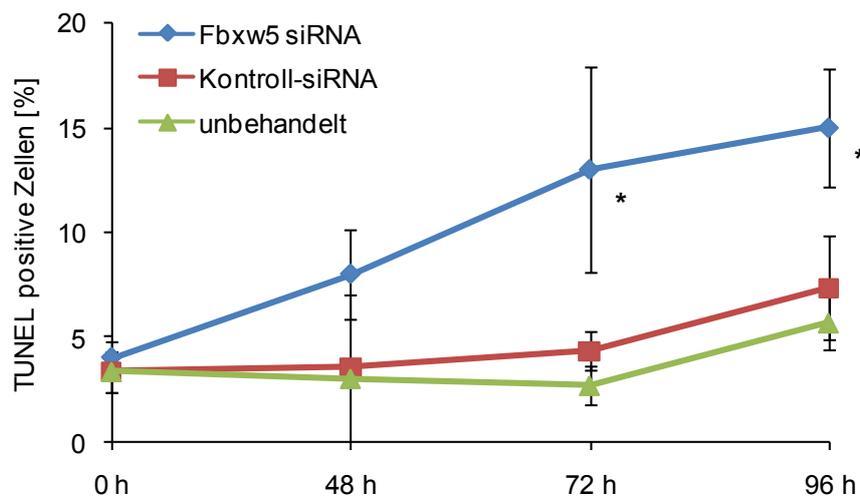


Abb. 17: Anzahl apoptotischer Zellen nach siRNA Transfektion.

HeLa Zellen wurden mit Kontroll- oder Fbxw5 siRNA transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, und apoptotische Zellen wurden mittels TUNEL Färbung sichtbar gemacht. Die Quantifizierung zeigt die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche. Für jeden Ansatz wurden mindestens 200 Zellen gezählt.

6.1.1.5 Zelluläre Lokalisation von Myc Fbxw5 nach Überexpression

Wenn die Funktion von Fbxw5 einen Einfluss auf die Anzahl der Zentrosomen hat, würde man eine Co-Lokalisation dieses Proteins mit zentrosomalen Markern erwarten. Hierfür wurden HeLa Zellen mit 2 μ g Myc Fbxw5 oder dsRED Kontrollplasmid transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und mit 9E10 anti-Myc in Kombination mit γ -Tubulin Antikörper angefärbt. Abb. 18 zeigt exemplarisch die Lokalisation von Fbxw5 innerhalb der Zelle. Es konnte grundsätzlich eine zytoplasmatische Färbung beobachtet werden. In einigen wenigen

Zellen konnte eine Colokalisation von Fbxw5 mit dem zentrosomalen Marker γ -Tubulin gezeigt werden.

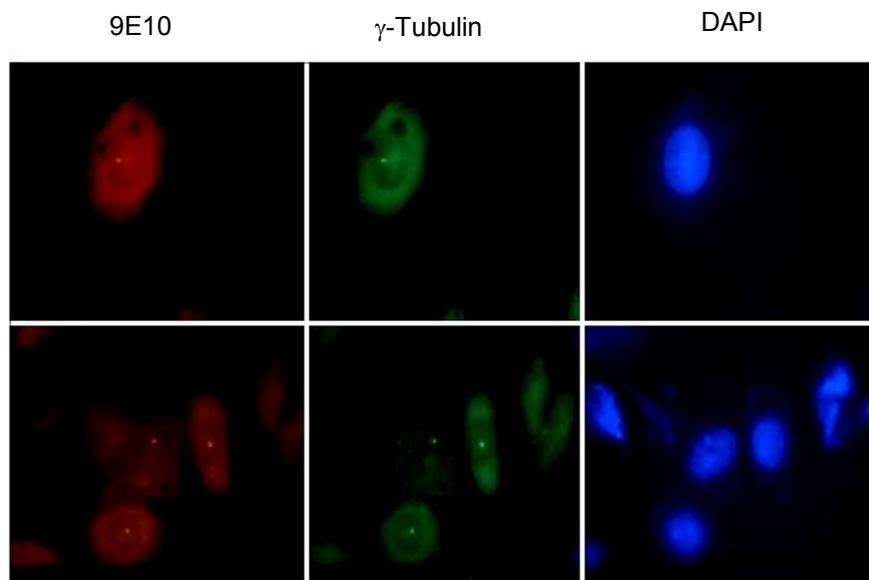


Abb. 18: Colokalisation von Fbxw5 mit dem zentrosomalen Marker γ -Tubulin.

HeLa Zellen wurden mit Myc Fbxw5 transfektiert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit Methanol fixiert und die Zentrosomen mit γ -Tubulin angefärbt (grün). Fbxw5 konnte mit Hilfe des 9E10 Antikörpers (rot) dargestellt werden. Die DNS wurde blau angefärbt.

6.1.2 Identifizierung von Fbxw5 als eine Komponente eines SCF-Komplexes

6.1.2.1 Assoziation von Fbxw5 mit den Komponenten des SCF Komplexes

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden sehr viele zentrosomale Funktionen durch Ubiquitin-Ligase-Abbaukomplexe reguliert. Hierzu gehört auch der SCF-Komplex, der durch die Verbindung mit F-box Proteinen seinen Namen erhalten hat. Da Fbxw5 zu dieser Proteinfamilie gehört, sollte im nächsten Versuch geklärt werden, ob es in der Lage ist, als Teil eines SCF-Komplexes zu wirken. Hierfür wurden HeLa Zellen zusätzlich mit einer nicht-funktionellen Version von Fbxw5 transfektiert. Bei dieser deltaFbox Variante wurde die komplette F-box (Aminosäuren 1 – 147), die als Bindemotiv für den SCF – Komplex benötigt wird, deletiert (s. Abb. 19).

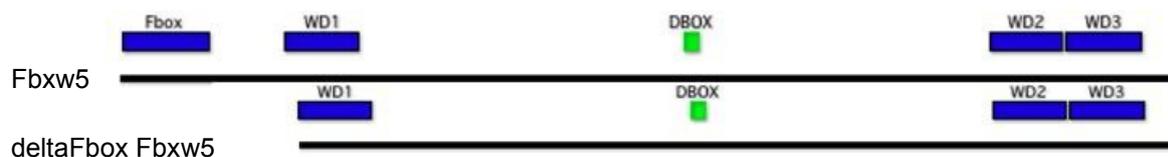


Abb. 19: Schematische Darstellung der deltaFbox Fbxw5 Deletionsmutante.

Durch die N-terminale Lage der F-box in diesem Protein konnte mittels PCR dieser komplette Bereich deletiert werden. Zur besseren Detektion dieses Konstrukts wurden ähnlich wie beim WT Protein zusätzlich sechs Myc-Epitope N-Terminal angefügt. Detailliertere Informationen bezüglich der Klonierungsstrategie befinden sich im Material- und Methoden-Teil.

Nachdem die Lysate mit 9E10 anti-Myc immunpräzipitiert wurden, erfolgte die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nylonmembran transferiert und mit 9E10 anti-Myc-, anti-Cul1- und anti-Skp1- Antikörper inkubiert. Während überexprimiertes Myc Fbxw5 in der Lage ist, die SCF Untereinheiten Cul1 und Skp1 zu präzipitieren, konnten diese in der Negativkontrolle (Leerplasmid) und der deltaFbox Mutante nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 20).

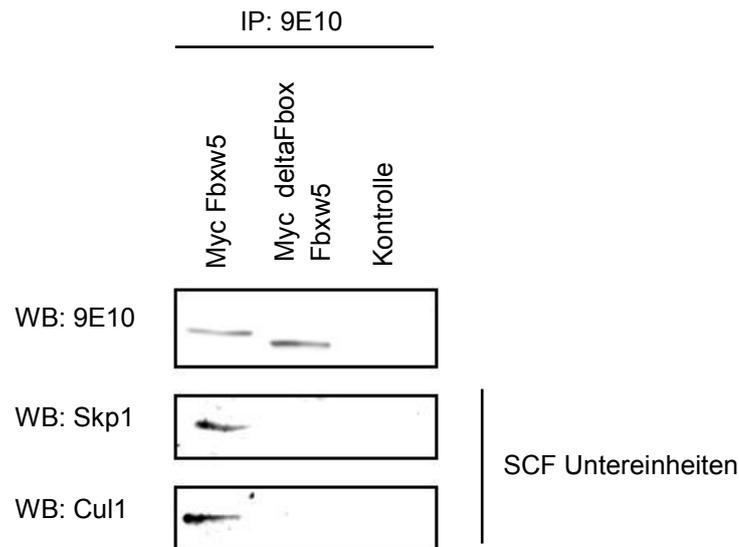


Abb. 20: Identifizierung von Fbxw5 als Teil einer SCF Komplexes.

Lysate aus HeLa Zellen, die Myc Fbxw5, Myc deltaFbox Fbxw5 oder Myc Kontrollplasmid exprimieren, wurden mit 9E10 anti-Myc Antikörper immunpräzipitiert. Präzipitierte Proteine wurden mittels Natriumdodexylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend nach einem Western Blot mit 9E10 anti-Myc, anti-Cul1 und anti-Skp1 Antikörper inkubiert.

6.1.2.2 Assoziation des endogenen Fbxw5 Proteins mit Komponenten des SCF Komplexes

Die Überexpression von Proteinen vergrößert das Risiko, Artefakte, wie beispielsweise unspezifische Bindungen, zu erhalten, da das natürliche Gleichgewicht der Zelle beeinflusst wird. Optimalerweise sollten deshalb Bindungspartner nicht nach Überexpression immunpräzipitiert werden, sondern aus Zellen ohne zusätzliche Plasmidtransfektion. Hierfür wurden unbehandelte HeLa Zellen lysiert und Fbxw5 mittels eines in Zusammenarbeit mit der Firma Sigma selbsthergestellten Antikörpers immunpräzipitiert (s. Abschnitt 5.2.4). Die Proben wurden nach einer anschließenden Auftrennung in der SDS-PAGE auf eine Nylonmembran transferiert und gegen anti-Fbxw5, anti-Cul1 und anti-Skp1 geprobt. Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, konnte auch endogenes Fbxw5 die SCF-Untereinheiten präzipitieren. Zur Kontrolle wurde anstelle des spezifischen Antikörpers ein sekundärer IgG Antikörper aus dem Kaninchen verwendet. Wie zu

erkennen ist, war die Bindung zwischen Cul1 bzw. Skp1 und Fbxw5 spezifisch. In der Kontrolle konnten diese Proteine nicht immunpräzipitiert werden.

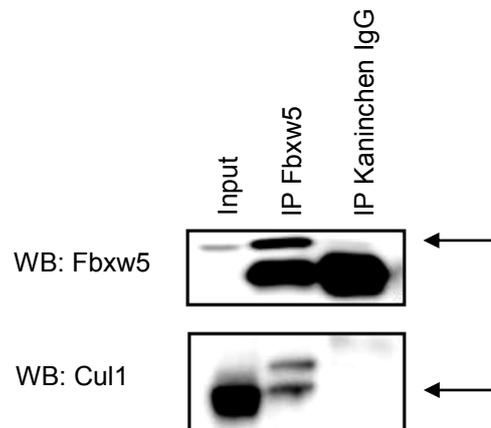


Abb. 21: Endogenes Fbxw5 ist Teil eines SCF Komplexes.

Lysate aus unbehandelten HeLa Zellen wurden mit anti-Fbxw5 Antikörper immunpräzipitiert. Präzipitierte Proteine wurden mittels Natriumdodexylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend nach einem Western Blot mit anti-Fbxw5, anti-Cul1 und anti-Skp1 Antikörper inkubiert.

6.1.2.3 Effekte der Überexpression von Myc deltaFbox Fbxw5 auf die Zentrosomenzahl

Zur Bestätigung der Inaktivität der deltaFbox Deletionsmutante wurde dieses Plasmid oder ein Kontrollplasmid in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5 μ g und 10 μ g) in HeLa Zellen exprimiert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Proben mit Methanol fixiert und anschließend mit γ -Tubulin angefärbt. Es wurde die Anzahl der Zentrosomen pro transfektierter Zelle, wie in Abb. 22 dargestellt, ausgewertet und quantifiziert. Analog zur Überexpression des Wildtypproteins zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Phänotyps. Im Vergleich zur Kontrolle konnte für beide Ansätze von deltaFbox Fbxw5 eine hoch signifikante Zunahme an Zellen, die mehr als zwei Zentrosomen besitzen, festgestellt werden. Für 5 μ g transfektiertes Plasmid waren es 6 % und für die doppelte Konzentration konnte eine Differenz von ca. 10 % ermittelt werden.

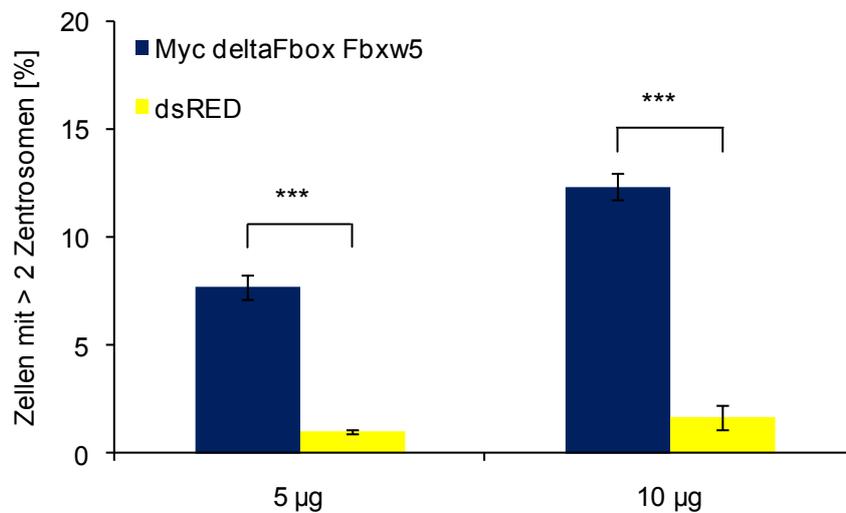
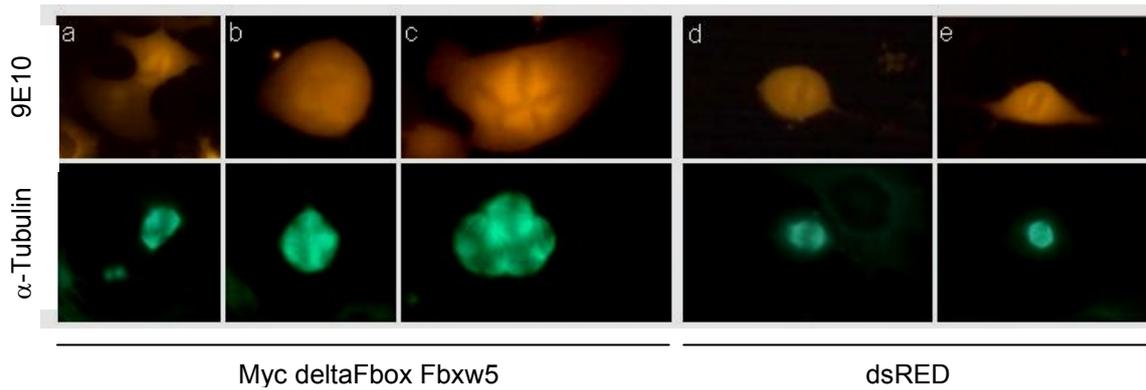


Abb. 22: Zentrosomenanzahl nach Überexpression der deltaFbox Mutante.

Quantifizierung von HeLa Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen nach Plasmidtransfektion mit Myc deltaFbox Fbxw5 und dsRED als Kontrolle. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Die dargestellten Mittelwerte sind das Ergebnis dreier unabhängiger Versuche, von denen pro Ansatz mindestens 200 Zellen ausgezählt wurden.

6.1.3 Zellzyklusunabhängiger Einfluss von Fbxw5 auf die Zentrosomenduplikation

6.1.3.1 Zentrosomenüberduplikation in Hydroxyurea und Aphidicolin behandelten U2OS Zellen

Eine Zentrosomenüberduplikation kann durch unterschiedliche Mechanismen verursacht werden. Die wichtigste Unterscheidung besteht darin, ob diese durch einen Zytokinesedefekt hervorgerufen werden, oder ob es sich um einen direkt den Zentrosomenzyklus betreffenden Effekt handelt. Für die nachfolgenden Experimente wurden U2OS Zellen anstelle von HeLa Zellen verwendet. Der Vorteil dieser Zelllinie besteht in ihrer Besonderheit, dass sie ihren Zentrosomenduplikationszyklus vom Zellzyklus trennen kann. Dieses führt dazu, dass ein durch bestimmte Chemikalien hervorgerufener Zellzyklusarrest keinen Einfluss mehr auf die Zentrosomenduplikation hat. Diese Zellen können sich nicht mehr teilen, verdoppeln ihre Zentrosomen aber weiterhin im normalen Zeitintervall. Wenn die Überexpression eines Proteins zu einer Überduplikation des Zentrosoms führt, müsste es unter diesen Bedingungen auch mehr Zentrosomen im Vergleich zur Kontrolle zeigen. Für Abb. 23 wurden U2OS Zellen nach der Plasmidtransfektion mit dem Ribonukleotidreduktase-Inhibitor Hydroxyurea oder mit Aphidicolin für 48 h behandelt. Während Hydroxyurea spezifisch das Enzym Ribonukleotid-Reduktase hemmt, inhibiert Aphidicolin, im Gegensatz dazu die DNS Polymerase α . Beide Mechanismen führen gezielt zu einer Blockade der DNS-Synthese und arretieren die Zellen am G1/S Übergang. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und die Zentrosomen mittels γ -Tubulin angefärbt.

Die Verwendung zweier unterschiedlicher Blockierungsarten sollte zeigen, dass die vorhandene Zentrosomenüberduplikation unabhängig vom Mechanismus der Zellzyklussynchronisation ist. Wie in Abb. 23 zu erkennen ist, konnte in allen Ansätzen eine signifikante Zunahme zwischen der Kontrolle und der deltaFbox Mutante detektiert werden. Für den Arrest mittels Hydroxyurea zeigte sich für dieses Plasmid ein Anstieg auf 40 % und für Aphidicolin eine Zunahme auf 50 % im Vergleich zu unsynchronisierten Zellen, während in nur 25 % des Kontrollansatzes Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen gezählt wurden.

Zwischen den Kontrollansätzen und den mit WT Fbxw5 transfektierten Proben konnte eine signifikante Verringerung der Zentrosomenanzahl pro Zelle für das WT Protein, von 25 % auf 18 % für die Hydroxyurea behandelten Zellen, bzw. von 20 % auf 18 % für die Aphidicolin synchronisierten Proben ermittelt werden.

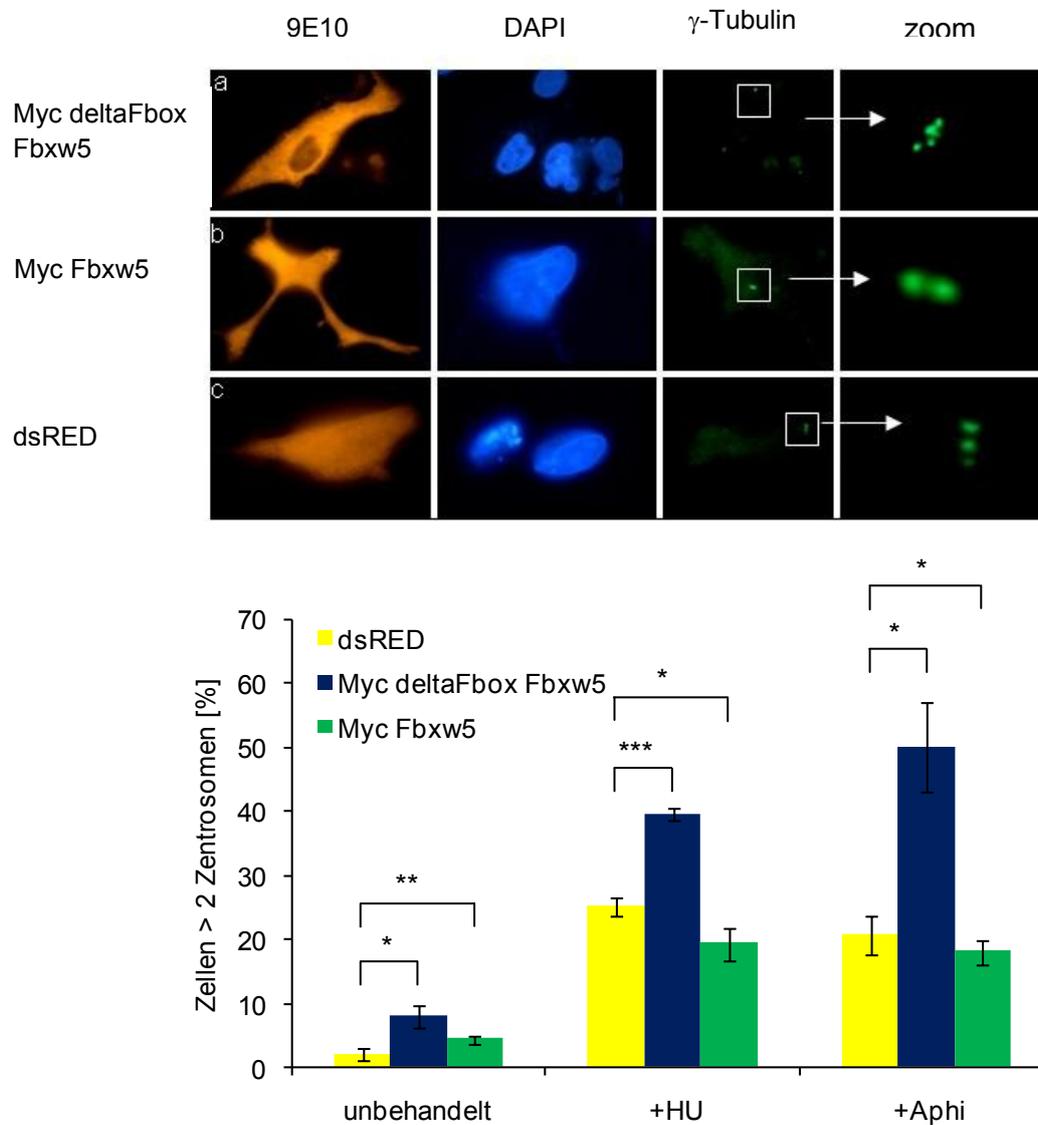


Abb. 23: Zentrosomenanzahl Hydroxyurea Behandlung.

Quantifizierung von U2OS Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen nach Plasmidtransfektion mit Myc deltaFbox Fbxw5, Myc Fbxw5 und dsRED als Kontrolle. Für die Versuche wurden jeweils 5 µg Plasmid eingesetzt. 12 Stunden nach der Plasmidtransfektion wurde für weitere 48 Stunden 5 mM Hydroxyurea oder 2mM Aphidicolin zu den Proben gegeben. Die dargestellten Mittelwerte sind das Ergebnis dreier unabhängiger Versuche, von denen pro Ansatz mindestens 200 Zellen ausgezählt wurden.

Zur Bestätigung der Überexpressionsversuche wurden die Versuche aus Abb. 23 mit Hilfe der siRNA Technologie wiederholt. Für die unbehandelten Zellen zeigte sich ein deutlich größerer Unterschied zwischen der Kontroll- und Fbxw5 siRNA behandelten Proben als nach Plasmidtransfektion (s. Abb. 24). Dieser Anstieg blieb auch nach Hydroxyurea und Aphidicolin Zugabe erhalten. Für unbehandelte U2OS Zellen konnte ein signifikanter Unterschied von ca. 25 % zwischen dem Kontrollansatz und Fbxw5 siRNA behandelten Zellen ermittelt werden. Diese Differenz verringerte sich in den synchronisierten Proben auf jeweils 20 %, die jedoch weiterhin im signifikanten Bereich lagen.

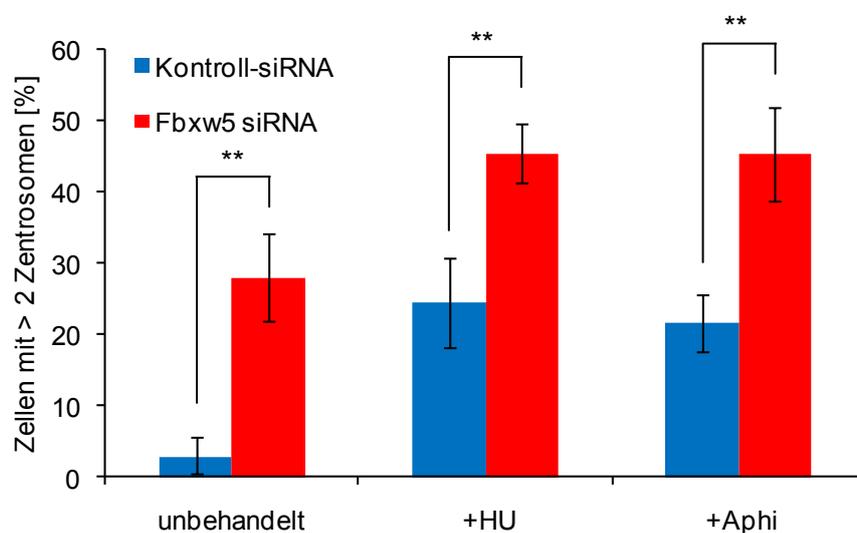


Abb. 24: Zentrosomenanzahl nach siRNA Transfektion in Hydroxyurea und Aphidicolin behandelten und unbehandelten U2OS Zellen.

Quantifizierung von U2OS Zellen mit mehr als zwei Zentrosomen nach siRNA Transfektion mit Kontroll-siRNA oder siRNA gerichtet gegen Fbxw5. 12 Stunden nach der Transfektion wurde für weitere 48 Stunden 5 mM Hydroxyurea oder 2 mM Aphidicolin zu den Proben gegeben. Die dargestellten Mittelwerte sind das Ergebnis dreier unabhängiger Versuche, von denen pro Ansatz mindestens 200 Zellen ausgezählt wurden.

6.2 Regulation

6.2.1 Modifikation der Fbxw5 Proteinmenge in Abhängigkeit der Zellzyklusphase

Wichtige Zellzyklusregulatoren, wie z.B. Zyklone und Zyklin Abhängige Kinasen (cyclin dependent kinase, cdk), unterliegen oftmals selbst einem streng, an den Zellzyklus gekoppelten Aktivitätsprofil. Durch diese zyklische Tätigkeit wird sichergestellt, dass das gewünschte Protein nur zu bestimmten Zeiten, wenn seine Funktion benötigt wird, agiert. Störungen dieses sensiblen Ablaufs führen deswegen zu Zellzyklusblockaden oder Zelltod.

Für zellzyklusregulierte Proteine gibt es in der Zelle zwei verschiedene Regulationsebenen: Transkription und Translation. Im nächsten Versuch sollte überprüft werden, ob die oben beschriebene Regulation von Fbxw5 nur auf der Proteinebene stattfindet oder dieses Protein bereits auf RNS Ebene reguliert wird.

6.2.1.1 Veränderung der Fbxw5 Proteinmenge zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Fbxw5 eine wichtige Funktion in der Zentrosomenduplikation übernimmt. Damit dieser zyklische Prozess immer wieder von Neuem beginnen kann, ergibt sich die Notwendigkeit einer zellzyklusabhängigen Aktivität von Fbxw5.

In ersten Versuchen konnte nach einem doppelten Thymidinblock eine Regulation von Fbxw5 auf Proteinebene beobachtet werden. Das so erhaltene Aktivitätsprofil deutete auf einen Abbau dieses Proteins am Übergang der G2- zur M-Phase hin, der während der gesamten M-Phase und zu Beginn der nächsten G1-Phase anhielt. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden HeLa Zellen mittels Nocodazol am G2/M Übergang (adhärente Zellen) bzw. in der Metaphase (Zellen im Überstand) nach Protokoll 5.1.6.1 blockiert und geerntet. Als Probe für den G1/S Übergang wurden HeLa Zellen mittels doppelten Thymidinblock blockiert und direkt nach Ablauf der Inkubationszeit verarbeitet. Zur Bestätigung der richtigen Laufhöhe wurden parallel Fbxw5 siRNA behandelt und Myc Fbxw5 überexprimierende Zellen geladen. Die Western Blot Analyse (Abb. 25) zeigte für die beiden beschriebenen Kontrollen die

erwartete Zu- (Überexpression) bzw. Abnahme (siRNA) der Proteinbande. Für den Nullstunden Thymidin Zeitpunkt ist eine deutliche Bande auf der entsprechenden Höhe sichtbar, die für die beiden Nocodazol behandelten Proben abnimmt. Die mit dem Aktin Antikörper inkubierte Membran zeigt für alle Proben gleiche Proteinmengen. Die anderen Kontrollantikörper, wie z.B. Zyklin B, Cdc27 und Cdc20, zeigten die erwartete zellzyklusabhängige Regulation. Die Expression von Zyklin B und Cdc20 wird am Übergang zur M-Phase induziert, während Cdc27 phosphoryliert wird (s. Abb. 25).

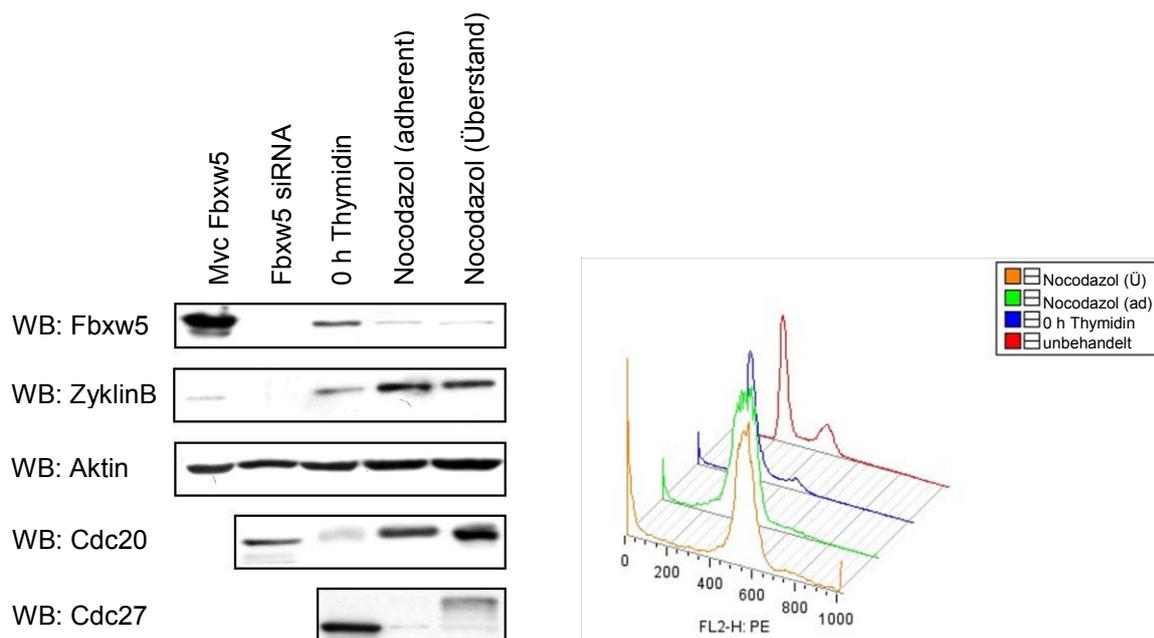


Abb. 25: Fbxw5 Proteinmenge im Zeitkurvenexperiment.

HeLa Zellen wurden mittels Nocodazol am G2/M Übergang (adhärente Zellen) bzw. in der Metaphase (Zellen im Überstand) blockiert. Für die Arretierung in der G1/S Phase wurde ein doppelter Thymidinblock (2 mM) verwendet. Für diesen Versuch wurde die jeweilige Blockade nicht aufgehoben, sondern die Proben wurden direkt nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten in Lysispuffer gearntet. Die Analyse der Proteinmengen erfolgte mittels Western Blot Analyse. Zur Kontrolle der Funktionalität der beiden Blockierungen wurden zusätzlich zu den Proteinpellets auch noch Proben für FACS genommen. Diese Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.2.1.2 Veränderung der Fbxw5 Proteinmenge nach Nocodazolblock

Der APC/C kann mit zwei unterschiedlichen Adaptoren assoziieren, um unterschiedliche Substrate abzubauen. Cdc20 ist am Übergang von der G2- zur M-Phase und in der M-Phase aktiv. In der anschließenden G1-Phase wird dessen Funktion von Cdh1 übernommen, das zusätzlich Cdc20 als Substrat erkennt. Damit der genaue Zeitpunkt der Re-Akkumulation der Fbxw5 Proteinspiegel bestimmt werden kann, wurde ein weiteres Zeitkurvenexperiment angefertigt. Für die Betrachtung mitotischer Zellen, wurde das Spindelgift Nocodazol verwendet. Nach Aufhebung dieser Blockade durchlaufen die Zellen die restliche Mitose, um dann für die nächsten acht Stunden in der sich anschließenden G1-Phase zu verweilen. Dieser Versuch wurde ähnlich der anderen Zeitkurvenexperimente durchgeführt. Es wurden alle vier Stunden parallel Proben für FACS und Western Blot genommen und anschließend analysiert. Wie in Abb. 26 zu erkennen ist, konnte mittels FACS und dem Kontrollantikörper Zyklin B die Funktionalität dieses Zeitkurvenexperiments bestätigt werden. Das Zielprotein Fbxw5 wird in der Mitose nicht exprimiert. Die Akkumulation beginnt in der Zytokinese und erreicht am Ende der G1-Phase ihr Maximum.

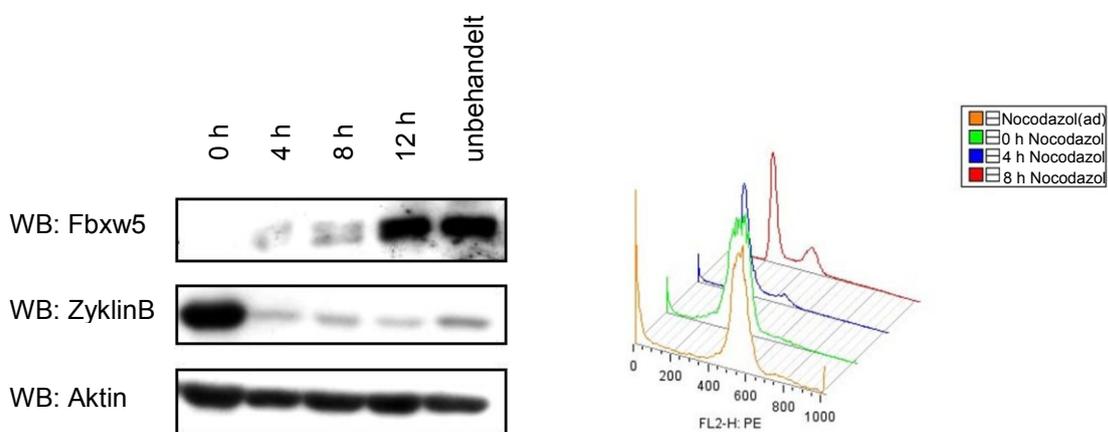


Abb. 26: Fbxw5 Proteinmenge nach Nocodazolbehandlung.

HeLa Zellen wurden mittels Nocodazol in der Metaphase blockiert und durch leichtes Abklopfen geerntet und anschließend im frischen Medium für das Zeitexperiment wieder ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die RNS Bestimmung genommen. Diese Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.2.1.3 Veränderung der Fbxw5 RNS Konzentration nach Thymidinblock

Parallel zur vorangegangenen Western Blot Analyse wurden Proben für die RNS Extraktion genommen. Hierbei sollte überprüft werden, ob das Protein Fbxw5 nur auf Translations- oder auch auf Transkriptionsebene reguliert wird. Die Durchführung erfolgte analog zu 5.1.6.2. Wie in Abb. 27 zu sehen ist, konnte nach Normierung und Quantifizierung kein signifikanter Unterschied in den RNS Mengen der einzelnen Zeitpunkte festgestellt werden.

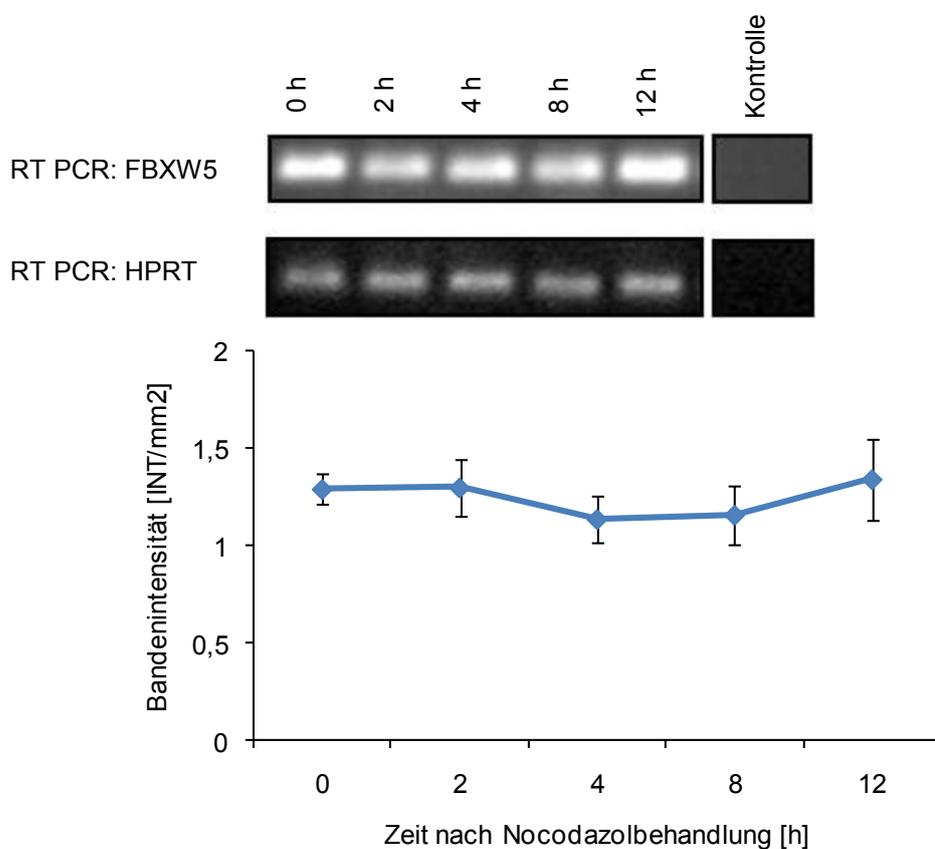


Abb. 27: Fbxw5 RNS Konzentration nach Nocodazolbehandlung.

HeLa Zellen wurden mittels Nocodazol in der Metaphase blockiert und durch leichtes Abklopfen geerntet und anschließend im frischen Medium für das Zeitexperiment wieder ausgesät. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die RNS Bestimmung genommen. Diese Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.2.2 Fbxw5 Proteinabbau durch den APC/C

Alle bisher gesammelten Daten weisen auf einen Einfluss des APC/C in Zusammenhang mit dem Proteinabbau von Fbxw5 hin. Ähnlich wie beim SCF-Komplex werden die Substrate nach erfolgter Polyubiquitinierung durch das 26S Proteasom abgebaut. Dieses bedeutet, wenn Fbxw5 tatsächlich ein Substrat des APC/C ist, dass der Proteinspiegel nach erfolgter Inhibition des Proteasoms ansteigen müsste. Für diesen Versuch wurden HeLa Zellen mit dem spezifischen Proteasominhibitor MG132 für drei Stunden kultiviert und anschließend die Proteinlysate in Bezug auf Fbxw5 Proteinspiegel hin untersucht. Wie in Abb. 28 zu erkennen ist, verursachte die Zugabe von MG132 einen deutlichen Anstieg der Fbxw5 Spiegel. Dieses bestätigt die bereits aufgestellte Hypothese, dass das Protein über einen proteasomabhängigen Stoffwechselweg abgebaut wird.

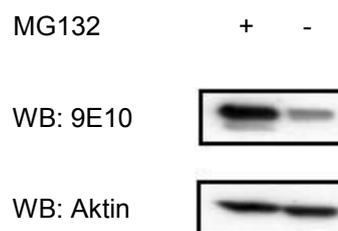


Abb. 28: Fbxw5 Proteinspiegel nach Zugabe des Proteasominhibitors MG132.

HeLa Zellen wurden mit 5 µg Myc Fbxw5 transfektiert und nach einer 48-stündigen Inkubation für weitere drei Stunden mit oder ohne 25 µM MG132 kultiviert. Die daraus erhaltenen Proteinlysate wurden nach Quantifizierung mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion des Proteins wurde ein 9E10 anti-Myc Antikörper verwendet. Zur Bestätigung der gleichen Auftragsmenge wurde ein Aktin Antikörper verwendet. Der hier dargestellte Western Blot ist ein repräsentatives Beispiel für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

6.2.2.1 Identifizierung von Cdc20 als Interaktionspartner von Fbxw5

Wie bereits unter 6.1.1 erwähnt, kann der APC/C mit zwei unterschiedlichen Adaptoren assoziieren, um verschiedene Substrate abzubauen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Fbxw5 nicht nur ein zellzyklusreguliertes, sondern auch ein durch das 26S Proteasom degradiertes Protein ist, sollte als nächstes der vermittelnde Co-Faktor des APC/Cs in diesem Prozess ermittelt werden. Durch das gezeigte Aktivitätsprofil von Fbxw5 deutet vieles auf Cdc20 als den gesuchten Adapter. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente in 293 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden gleichen Mengen von Myc Fbxw5 und HA Cdc20 transfektiert. Nach dem die Lysate mit 9E10 anti-Myc oder anti-HA Antikörper immunpräzipitiert wurden, erfolgte die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nylonmembran transferiert und mit 9E10 anti-Myc Antikörper inkubiert. Wie in Abb. 29 zu erkennen ist, konnte Fbxw5 spezifisch durch Cdc20 immunpräzipitiert werden.

Myc Fbxw5	[µg]	5	5	5	5	5	5
HA Cdc20	[µg]				5	5	5
Input		+			+		
IP 9E10			+			+	
IP HA				+			+
WB: 9E10							

Abb. 29: Co-Immunpräzipitation von HA Cdc20 und Myc Fbxw5.

293 Zellen wurden mit jeweils 5 µg Myc Fbxw5 in Kombination mit und ohne 5 µg HA Cdc20 transfektiert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit 9E10 anti-Myc oder anti-HA Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc Antikörper nachgewiesen.

6.2.2.2 Cdc20 abhängiger Proteinabbau von Fbxw5

Wenn die im vorherigen Abschnitt dargestellte Interaktion zwischen Cdc20 und Fbxw5 nicht nur aufgrund der Überexpression beider Proteine erfolgte, dann sollte man in einem *in vivo* His-Ubiquitinilierungsexperiment nur aufgrund der Zugabe von Cdc20 einen Anstieg des Proteinabbaus von Fbxw5 erkennen können. Hierfür wurden 293 Zellen mit Myc Fbxw5 in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cdc20 transfektiert. Durch die Zugabe des Proteasominhibitors MG132 konnten der Proteinabbau spezifisch inhibiert und mögliche Abbauprodukte akkumuliert werden. Die so erhaltenen mono- bis polyubiquitinierten Proteine konnten nach erfolgter Ni²⁺ Aufreinigung auf eine Nylonmembran transferiert und mittels 9E10 anti-Myc Antikörper dargestellt werden. Zur Bestätigung gleicher eingesetzter Proteinmengen wurden die Proteinspiegel vor der Aufreinigung verglichen. Die ermittelten Spiegel entsprachen den transfektierten Konzentrationen der einzelnen, transfektierten Proteine. Wie in Abb. 30 zu erkennen ist, zeigte sich ein spezifischer, konzentrationsabhängiger Anstieg der Fbxw5 Ubiquitinilierung nach Zugabe von Cdc20.

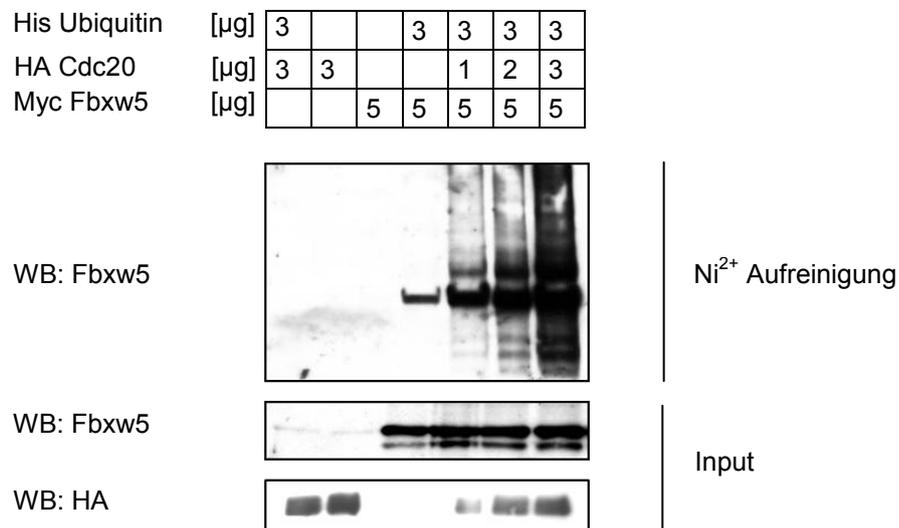


Abb. 30: Proteindegradation von Fbxw5 durch den Ubiquitinabbauweg.

293 Zellen wurden mit 5 µg Myc Fbxw5 in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen von HA Cdc20 transfektiert. Im Anschluss an die 48-stündige Kultivierung erfolgte eine dreistündige Inkubation der Zellen mit dem Proteasominhibitor mM MG132. Nach erfolgter Ni²⁺ Aufreinigung wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mittels 9E10 anti-Myc Antikörper detektiert. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.2.2.3 Inhibition des Proteinabbaus von Fbxw5 durch Emi1

Der APC/C und seine Adapter werden nicht nur durch aktivierende Faktoren beeinflusst, sondern auch durch inhibierende. Eines dieser inhibitorischen Proteine ist Emi1. Es agiert als Pseudosubstrat, indem es die Bindungsstelle potentieller Abbauproteine blockiert. Mit Hilfe dieses Mechanismus kann für einige Substrate des APC/C der durch die Adapter verursachte Anstieg der Ubiquitinilierung teilweise blockiert werden. Wie in Abb. 31 zu erkennen ist, konnte durch eine Erhöhung der eingesetzten Emi1 Proteinkonzentration auf 5 μg der Proteinabbau von Fbxw5 fast vollständig inhibiert werden.

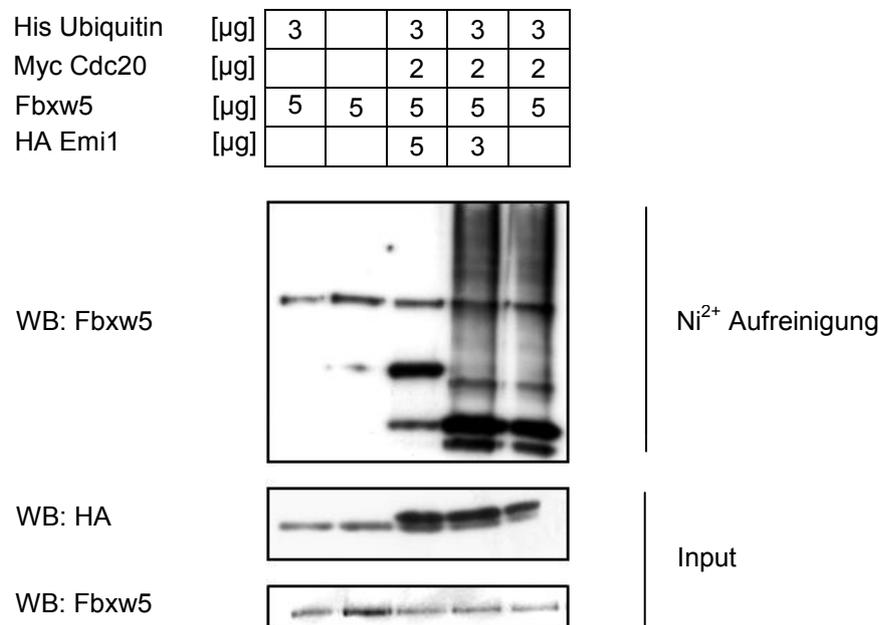


Abb. 31: Proteindegradation von Fbxw5 durch den Ubiquitinabbauweg.

293 Zellen wurden mit 5 μg Fbxw5 und 2 μg Myc Cdc20 transfektiert. Zur Überprüfung der inhibitorischen Fähigkeit von Emi1 auf dieses System wurden zusätzlich zwei unterschiedliche Konzentrationen dieses Proteins zum vorherigen Ansatz pipettiert. Im Anschluss an die 48-stündige Kultivierung erfolgte eine dreistündige Inkubation der Zellen mit dem Proteasominhibitor 25 μM MG132. Nach erfolgter Ni²⁺ Aufreinigung wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mittels 9E10 anti-Myc Antikörper detektiert. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.3 Interaktionspartner

6.3.1 hSAS6 als Interaktionspartner von Fbxw5

6.3.1.1 Veränderung der hSAS6 Proteinspiegel in Abhängigkeit von Fbxw5

Aufgrund des in dieser Arbeit gezeigten Phänotyps, wurden mögliche Interaktionspartner aus dem Bereich der Zentrosomeninitiation auf mögliche Wechselwirkungen mit Fbxw5 untersucht. Neben Zyklin E, Aurora A und den Polo-like Kinasen (Plk) gehört hSAS6 zu den wichtigsten Proteinen.

Für das Protein hSAS6 konnten verschiedene Funktionen in der Zentrosomenduplikation und – elongation gezeigt werden. Aufgrund des inversen Phänotyps nach Überexpression bzw. Verlust, wurde hSAS6 in die Gruppe möglicher Interaktionspartner eingeteilt. Zuerst wurde überprüft, ob sich die Proteinspiegel des Proteins nach Überexpression bzw. Verlust von Fbxw5 gegenteilig verändern. Wie in Abb. 32 zu erkennen ist, zeigte sich ein Anstieg der hSAS6 Spiegel nach Fbxw5 siRNA Behandlung und passend dazu ein fast vollständiger Verlust der Expression bei Überexpression des Fbxw5 Proteins.

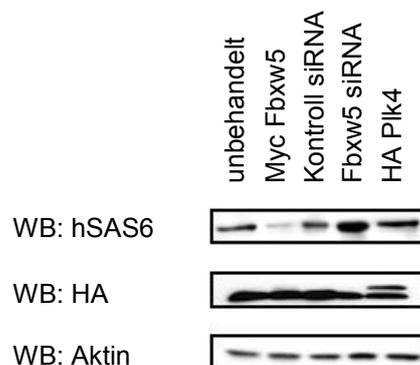


Abb. 32: hSAS6 Proteinspiegel nach Verlust bzw. Überexpression von Fbxw5.

HeLa Zellen wurden mit 20 nM Kontroll-siRNA bzw. siRNA gerichtet gegen Fbxw5 transfektiert. Für die Überexpression verschiedener Proteine wurden jeweils 5 µg Myc Fbxw5 oder HA Plk4 eingesetzt. Nach erfolgter Proteinquantifikation wurden gleiche Mengen der oben beschriebenen Ansätze mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels anti-hSAS6, anti-HA, anti-Aktin und anti-Fbxw5 Antikörper detektiert.

6.3.1.2 Identifizierung von Fbxw5 als Interaktionspartner von hSAS6

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Fbxw5 die Proteinspiegel von hSAS6 je nach An- bzw. Abwesenheit moduliert, war der nächste Schritt, die Interaktion dieser beiden Proteine in Co-Immunopräzipitationsexperimenten zu untersuchen. Hierfür wurden 293 Zellen mit 5 µg Myc deltaFbox Fbxw5 in Kombination mit und ohne hSAS6 transfektiert. Nach dem die Lysate mit 9E10 anti-Myc oder anti-hSAS6 Antikörper immunpräzipitiert wurden, erfolgte die Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nylonmembran transferiert und mit 9E10 anti-Myc oder anti-hSAS6 Antikörper inkubiert. Wie in Abb. 33 zu erkennen ist, konnte sowohl deltaFbox Fbxw5 spezifisch durch hSAS6 immunpräzipitiert werden, als auch hSAS6 durch Fbxw5. Hierbei erzeugte die Zugabe des Proteasominhibitors MG132 keinen Unterschied in der präzipitierten Proteinmenge. Das schwache Signal für deltaFbox Fbxw5 in Abwesenheit von transfektiertem hSAS6 nach Immunpräzipitation mit hSAS6 könnte an einer Interaktion zwischen überexprimierten Fbxw5 und endogenem hSAS6 liegen, da die Immunpräzipitation gegen hSAS6 für das endogene Protein durchgeführt wurde. Die endogenen Proteinspiegel sind in diesem Versuch nicht dargestellt.

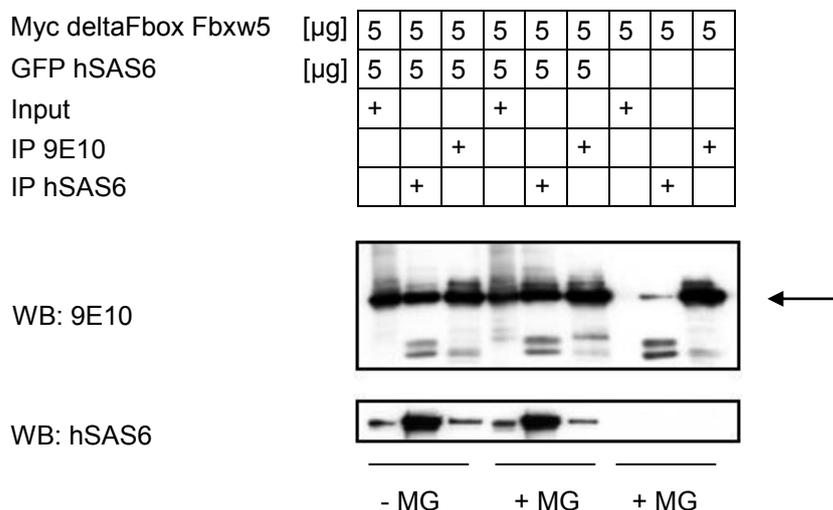


Abb. 33: Co-Immunopräzipitation von deltaFbox myc-Fbxw5 und GFP-hSAS6

293 Zellen wurden mit jeweils 5 µg Myc deltaFbox Fbxw5 in Kombination mit und ohne 5 µg GFP-hSAS6 transfektiert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit 9E10 anti-Myc oder anti-hSAS6 Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc oder anti-hSAS6 Antikörper nachgewiesen.

Zur Überprüfung, ob es sich bei der oben gezeigten Interaktion nur um eine durch die Überexpression beider Partner hervorgerufene unspezifische Bindung handelt, wurden im nächsten Versuch nur die WT und deltaFbox Mutante von Fbxw5 oder ein Kontrollvektor in 293 Zellen transfektiert. Die Co-Immunpräzipitation der Proteinlysate wurde mittels anti-hSAS6 Antikörper durchgeführt. Die Detektion der Proben erfolgte durch die 9E10 anti-Myc und anti-hSAS6 Antikörper. Wie in Abb. 34 zu erkennen ist, konnte deltaFbox Fbxw5 spezifisch mit dem endogenen hSAS6 Protein immunpräzipitiert werden. Für die WT Version dieses Proteins konnte keine Interaktion detektiert werden.

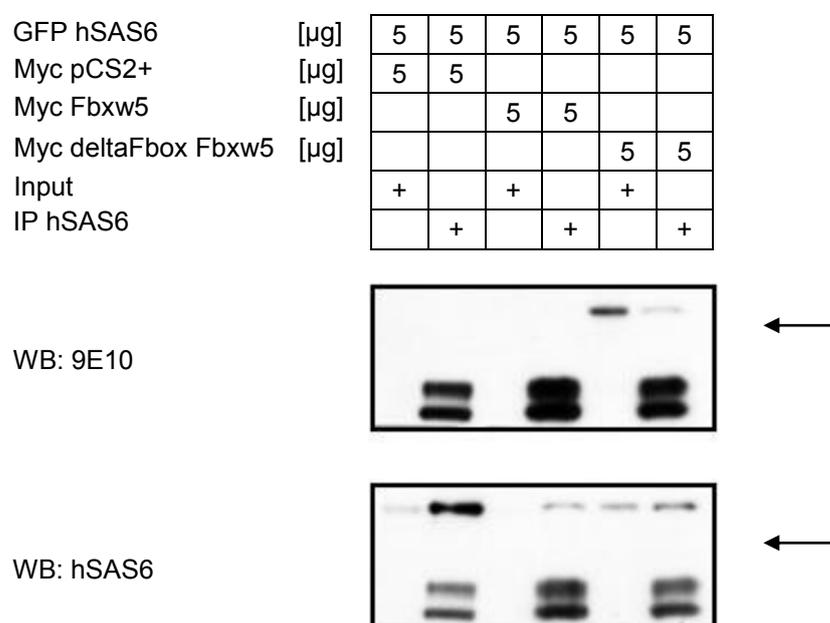


Abb. 34: Co-Immunopräzipitation Fbxw5 mit endogenem hSAS6.

293 Zellen wurden mit jeweils 5 µg Myc Fbxw5, Myc deltaFbox Fbxw5 oder Kontrollvektor transfektiert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit anti-hSAS6 Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc oder anti-hSAS6 Antikörper nachgewiesen.

Wie bereits oben erwähnt, kann die Überexpression von Proteinen das Risiko, Artefakte zu erhalten, vergrößern, da das natürliche Gleichgewicht der Zelle beeinflusst wird. Optimalerweise sollten deshalb Bindungspartner nicht nach Überexpression immunpräzipitiert werden, sondern ohne zusätzliche Plasmidtransfektion. Hierfür wurden unbehandelte bzw. für drei Stunden mit MG132

behandelte 293 Zellen lysiert und mittels Fbxw5 oder hSAS6 Antikörper immunpräzipitiert. Die Proben wurden nach einer anschließenden Auftrennung mit SDS-PAGE auf eine Nylonmembran transferiert und mit anti-Fbxw5 und anti-hSAS6 Antikörper inkubiert. Wie in Abb. 35 zu erkennen ist, konnte endogenes hSAS6 erst nach Zugabe von MG132 Fbxw5 präzipitieren, während endogenes Fbxw5 in beiden Versuchsansätzen trotz funktionierender Immunpräzipitation keine detektierbare Bindung zu hSAS6 zeigte.

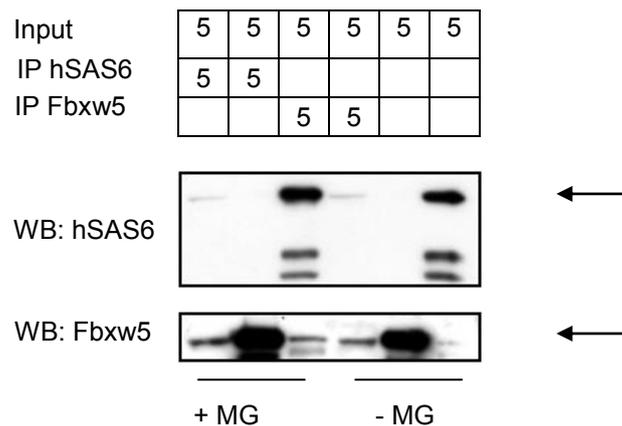


Abb. 35: Endogenes hSAS6 immunpräzipitiert Fbxw5.

Lysate aus unbehandelten bzw. für drei Stunden mit MG132 behandelten 293 Zellen wurden mit anti-Fbxw5 und anti-hSAS6 Antikörper immunpräzipitiert. Präzipitierte Proteine wurden mittels Natriumdodexylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend nach einem Western Blot mit anti-Fbxw5 und anti-hSAS6 Antikörper inkubiert.

6.3.1.3 Verlängerung der hSAS6 Halbwertszeit durch Verlust von Fbxw5

Die Stabilität einzelner Proteine kann durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Eine Möglichkeit besteht in der Verringerung des Proteinabbaus, durch den die Halbwertszeit des Proteins verlängert wird. Wenn Fbxw5 nicht nur irgendein Interaktionspartner von hSAS6 ist, sondern es zusätzlich Einfluss auf den Abbau bzw. die Stabilität dieses Proteins hat, dann sollte nach Transfektion der inaktiven deltaFbox Mutante eine Veränderung in der Halbwertszeit von hSAS6 zu erkennen sein. Um diese Theorie zu beweisen, wurden HeLa Zellen mit einem Kontrollplasmid oder der deltaFbox Version von Fbxw5 transfektiert. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Proteinneusynthese durch die Zugabe von 10 µg/ml Cycloheximid

blockiert. Zu den in Abb. 36 indizierten Zeitpunkten wurden Proben genommen, und die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die einzelnen Proteine wurden mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Zusätzlich wurde Aktin als Ladekontrolle verwendet. Es zeigte sich, dass das endogene hSAS6 nach Transfektion mit dem Kontrollplasmid eine Halbwertszeit von ca. vier Stunden hat. Im Gegensatz dazu, stabilisierte die Expression der deltaFbox Mutante hSAS6 und verhinderte fast vollständig dessen Abbau.

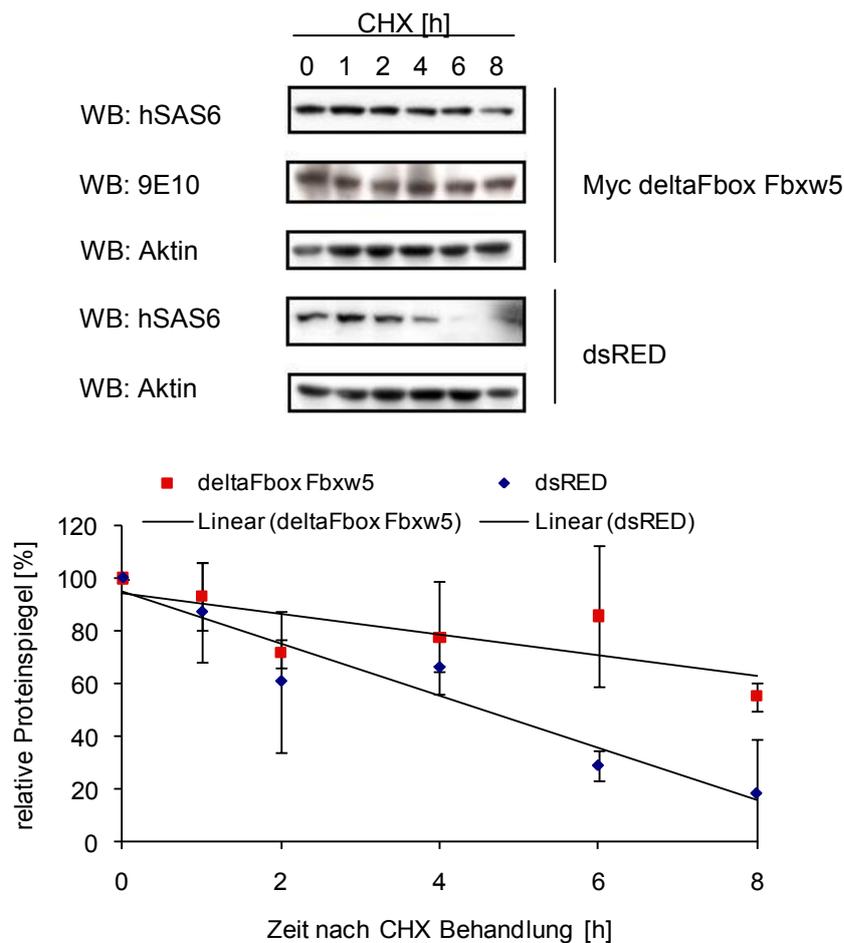


Abb. 36: Bestimmung der Proteinhalbwertszeit von hSAS6.

293 Zellen wurden mit 5 µg Myc deltaFbox Fbxw5 oder dsRED Kontrollplasmid transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Proteinneusynthese durch die Zugabe von 10 µg/ml Cycloheximid inhibiert. Zur Bestimmung der hSAS6 Proteinlevel wurden nach 0h, 1h, 2h, 4h, 6h und 8h Proben genommen und mittels Western Blot Analyse untersucht. Für die Detektion der einzelnen Proteine wurden 9E10 anti-Myc, anti-hSAS6 und anti-Aktin Antikörper verwendet.

6.3.1.4 Fbxw5 abhängiger Proteinabbau von hSAS6

Nachdem nicht nur Veränderungen der Fbxw5 Proteinspiegel zu einer Modulation von hSAS6 führten, sondern auch die Halbwertszeit des Proteins nach Transfektion mit der deltaFbox Mutante verlängert wurde, war die Konsequenz aus diesen Beobachtungen, einen möglichen Proteinabbau von hSAS6 durch Fbxw5 zu überprüfen. Hierfür wurden 293 Zellen, wie bereits für Fbxw5 und Cdc20 beschrieben, mit beiden Proteinen transfektiert. Als zusätzliche Kontrollen wurden die deltaFbox Mutante und Skp2 als Negativ- sowie Cdh1 als Positivkontrolle verwendet. Nach erfolgter Ni²⁺ Aufreinigung und Transfer auf eine Nylonmembran wurde GFP-hSAS6 mittels anti-hSAS6 Antikörper detektiert. Zur Bestätigung gleicher eingesetzter Proteinmengen wurden die Proteinspiegel der Proteine vor der Aufreinigung verglichen. Die ermittelten Spiegel entsprachen den transfektierten Konzentrationen der einzelnen, transfektierten Proteine. Wie in Abb. 37 zu erkennen ist, konnte ein spezifischer, konzentrationsabhängiger Anstieg in der Ubiquitinierung von hSAS6 durch Cdh1 (Positivkontrolle) und Fbxw5 gezeigt werden, wobei der Abbau durch Cdh1 bei gleicher Menge Plasmid effektiver ist als durch Fbxw5. Für die beiden Negativkontrollen konnte kein Anstieg von Mono- bzw. Polyubiquitinierten hSAS6 detektiert werden.

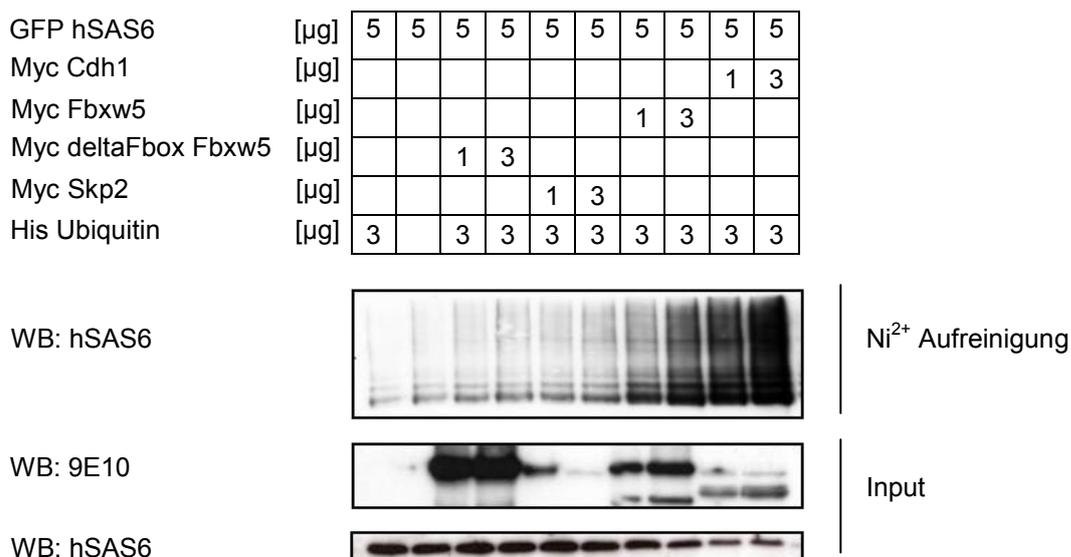


Abb. 37: hSAS6 spezifischer Proteinabbau durch Cdh1 und Fbxw5.

293 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Myc Fbxw5 oder Myc deltaFbox Fbxw5, Myc Skp2 oder Myc Cdh1 transfektiert. Im Anschluss an die 48-stündige Kultivierung erfolgte eine drei-stündige Inkubation der Zellen mit 25 μM des Proteasominhibitors MG132. Nach erfolgter Ni^{2+} Aufreinigung wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mittels anti-hSAS6 Antikörper detektiert. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.3.1.5 hSAS6 Interaktion mit verschiedenen WD40 Deletionsmutanten

Protein-Protein Interaktionen beruhen auf sterischen und sequenzspezifischen Faktoren. Eine konkrete Vorhersage, wo sich die genaue Bindungsstelle zwischen zwei Partnern befindet, ist jedoch oftmals schwierig vorherzusagen. Für die Eingrenzung der Bindung zwischen hSAS6 und Fbxw5 wurden deltaWD40 Fbxw5 Mutanten erstellt, in denen alle möglichen bekannten Interaktionsmotive deletiert sind. Für Fbxw5 konnten drei potentielle Bereiche (WD40 Wiederholungen) ermittelt werden, die bereits in der Literatur in anderen Proteinen als Vermittler für Protein-Protein Interaktionen identifiziert wurden (s. Abb. 38).

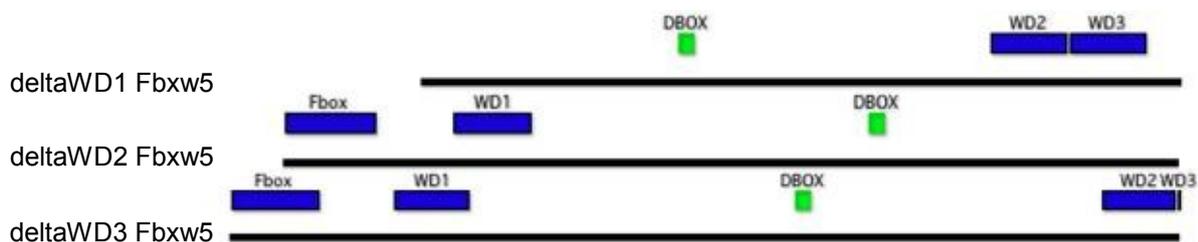


Abb. 38: Schematische Darstellung der deltaWD40 Fbxw5 Deletionsmutanten.

Für die Deletion der einzelnen WD40 Wiederholungen in Fbxw5 wurde eine Klonierungsstrategie mittels PCR angewendet. Zur besseren Detektion dieser Konstrukte wurden ähnlich wie beim WT und deltaFbox Protein zusätzlich sechs Myc-Epitope N-terminal angefügt. Detailliertere Informationen bezüglich der Klonierungsstrategie befinden sich im Material- und Methoden-Teil.

Befindet sich nun die gesuchte Bindungsstelle in einem der deletierten Bereiche, so würde man einen Verlust der Interaktion zwischen hSAS6 und Fbxw5 erwarten. Um dieses zu untersuchen, wurden erneut Co-Immünpräzipitationens wie bereits oben

beschrieben mit hSAS6 und den einzelnen deltaWD40 Mutanten durchgeführt. Wie in Abb. 39 zu erkennen ist, führte die Deletion der letzten beiden WD40 Wiederholungen zu einem kompletten Verlust der Interaktion zwischen den Proteinen. Die Spezifität dieser durchgeführten Immunpräzipitation konnte durch die parallele Durchführung einer unspezifischen Immunpräzipitation gegen Aktin bestätigt werden. Zudem zeigte sich kein Unterschied in den eingesetzten Proteinspiegeln.

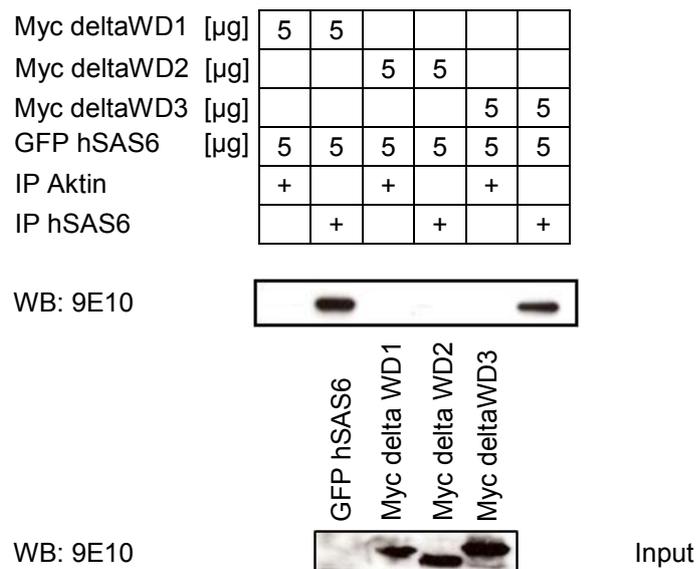


Abb. 39: Co-Immunopräzipitation von hSAS6 und verschiedenen deltaWD40 Mutanten.

293 Zellen wurden mit jeweils 5 µg der verschiedenen Myc deltaWD40 Fbxw5 Deletionsmutanten in Kombination mit 5 µg GFP hSAS6 transfiziert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit anti-hSAS6 oder anti-Aktin Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc nachgewiesen.

6.3.1.6 Fbxw5 spezifischer Proteinabbau von hSAS6 in Abhängigkeit der WD40 Deletionsmutanten

Zur Überprüfung der in 6.3.1.5 festgestellten Abnahme der Interaktion zwischen hSAS6 und Fbxw5 für die deltaWD2 Mutante wurde zusätzlich untersucht, ob dieser Verlust zu einer Verringerung des Proteinabbaus von hSAS6 führt. Hierfür wurde wie bereits oben beschrieben ein *in vivo* Ubiquitinilierungsversuch durchgeführt. Analog zum vorherigen Abschnitt konnte auch in diesem Experiment gezeigt werden, dass

die Deletion der beiden letzten WD40 Wiederholungen nicht nur zu einer Verringerung der Interaktion, sondern auch zu einem kompletten Verlust der Ubiquitinilierung von hSAS6 führt (s. Abb. 40).

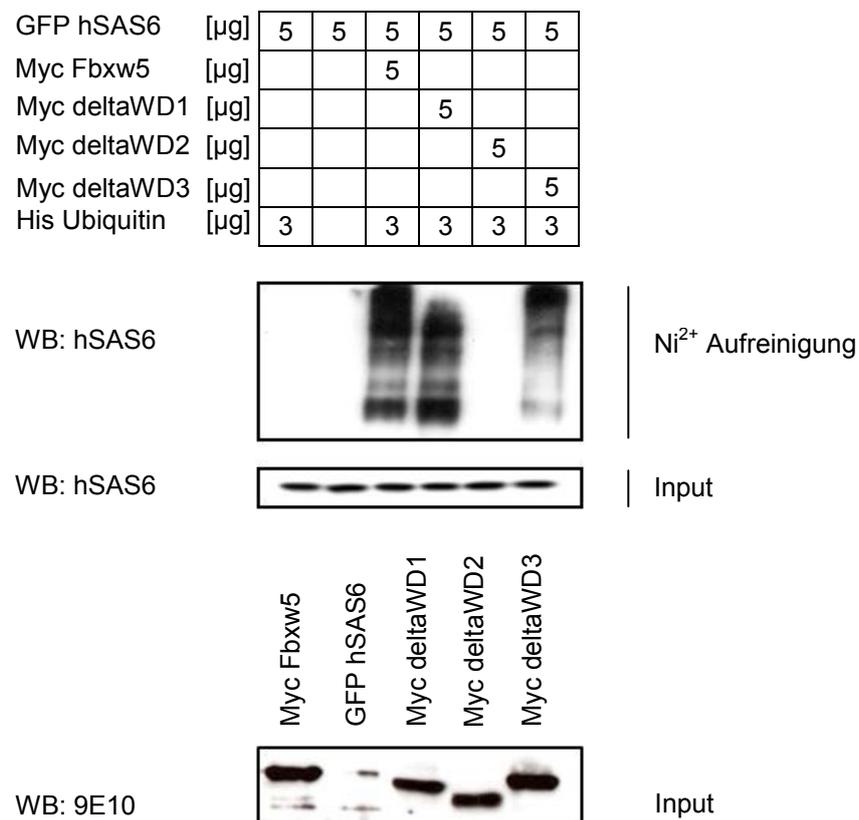


Abb. 40: hSAS6 spezifischer Proteinabbau in Abhängigkeit der deltaWD40 Deletions-mutanten.

293 Zellen wurden mit jeweils 5 μ g verschiedener deltaWD40 Deletionsmutanten transfiziert. Im Anschluss an die 48-stündige Kultivierung erfolgte eine dreistündige Inkubation der Zellen mit 25 μ M des Proteasominhibitors MG132. Nach erfolgter Ni²⁺ Aufreinigung wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mittels anti-hSAS6 Antikörper detektiert. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.4 Regulation der hSAS6/Fbxw5 Interaktion

Nachdem sehr viele experimentelle Ergebnisse daraufhin deuten, dass hSAS6 das Substrat von Fbxw5 ist, war die nächste Frage, die beantwortet werden sollte, ob diese Interaktion möglicherweise durch ein drittes Protein reguliert bzw. vermittelt wird. Als mögliche Regulatoren sind Proteinkinasen aufgrund ihrer Funktion besonders interessant. Zu den in dieser Arbeit auf ihren Einfluss getesteten Kinasen gehören eine Aurora Kinase (AurA) und drei Polo-like-Kinasen (Plk1, Plk3 und Plk4).

6.4.1 Aurora Kinasen

Aurora Kinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin Kinasen, die wichtige Funktionen während der Zellproliferation übernehmen. Hierzu gehört vor allem die Kontrolle der richtigen Verteilung der DNS während der Mitose, da Fehlregulationen in Zusammenhang mit Tumorentstehung gebracht werden.

Bis zum heutigen Tag wurden drei Familienmitglieder identifiziert: AurA, AurB und AurC. Während AurC nur in der Keimbahn exprimiert wird, steht die Funktion der beiden anderen Mitglieder im direkten Zusammenhang mit dem Zentrosom. Hierbei übernimmt AurB Aufgaben in der Verknüpfung der mitotische Spindel mit den Zentrosomen, und AurA ist für das korrekte Funktionieren des MOZ verantwortlich.

6.4.1.1 Aurora A ist ein möglicher Interaktionspartner von Fbxw5

Aufgrund der Aufgabenverteilung innerhalb der Familie der Aurora Kinasen wurde Aurora A beispielhaft als möglicher Interaktionspartner von Fbxw5 ausgewählt.

Zur Überprüfung einer möglichen Bindung zwischen Aurora A und Fbxw5 wurden Co-Immünpräzipitationsexperimente (s. Abschnitt 5.2.4) nach Überexpression beider Proteine durchgeführt. Wie in Abb. 42 zu sehen ist, konnte Fbxw5 spezifisch mit dem Aurora A Antikörper präzipitiert werden, da für die Leervektor Kontrolle kein Signal detektiert werden konnte.

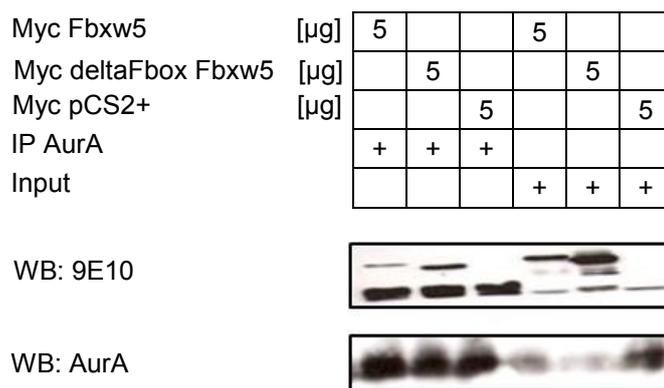


Abb. 42: Co-Immunopräzipitation von GFP Aurora A und Fbxw5.

293 Zellen wurden mit 5 µg WT Myc Fbxw5, Myc deltaFbox Fbxw5 oder pCS2+ Leervektor in Kombination mit 5 µg GFP Aurora A transfektiert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit anti-Aurora A Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc und anti-Aurora A Antikörper nachgewiesen. Dieser Versuch ist das repräsentative Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

6.4.1.2 Aurora ist kein Substrat von Fbxw5

Da Aurora A aufgrund seiner bisher bekannten Funktionen und seines Expressionsprofils im Zellzyklus als Regulator des Komplexes hSAS6 und Fbxw5 nicht relevant ist, sollte im nachfolgenden Versuch überprüft werden, ob AurA vielleicht ein weiteres Substrat von Fbxw5 ist. Hierfür wurde ein His-Ubiquitinierungsexperiment durchgeführt (s. Abschnitt 5.2.5). Wie in Abb. 43 zu erkennen ist, konnte durch die Zugabe von WT Fbxw5 bzw. deltaFbox Fbxw5 kein überzeugender Anstieg im Proteinabbau von AurA detektiert werden. Zudem ließ sich auch keine konzentrationsabhängige Veränderung in der Ubiquitinierung darstellen. Der im Hintergrund erkennbare Schmier nach oben scheint somit ein Artefakt des Testsystems zu sein.

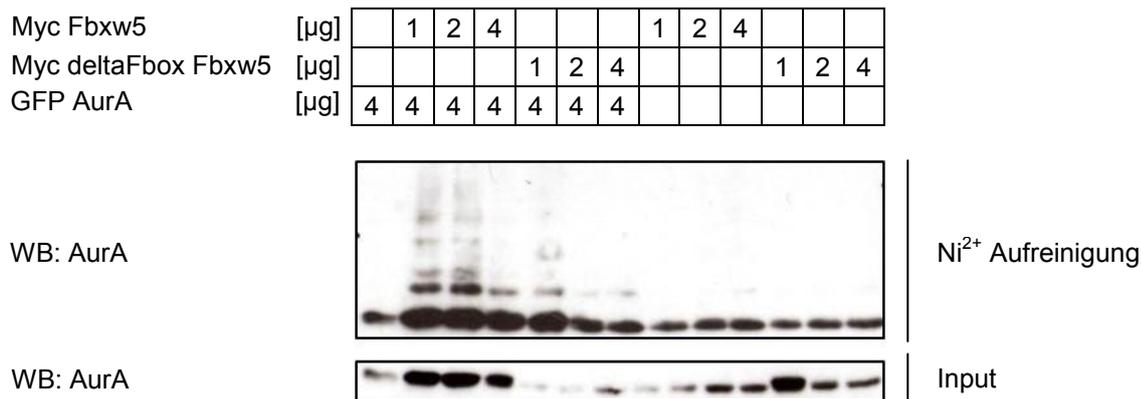


Abb. 43: hSAS6 spezifischer Proteinabbau in Abhängigkeit von Fbxw5.

293 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von WT und Myc deltaFbox Fbxw5 in Kombination mit und ohne Aurora A transfektiert. Im Anschluss an die 48-stündige Kultivierung erfolgte eine dreistündige Inkubation der Zellen mit 25 μM des Proteasominhibitors MG132. Nach erfolgter Ni²⁺ Aufreinigung wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mittels anti-AurA Antikörper detektiert. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.4.2 Polo-like-Kinasen

Die Polo Kinasen gehören zu einer homogenen Proteinfamilie von Serin/Threonin Kinasen, die wichtige Funktionen im Zellzyklus übernehmen. Hierzu gehört die Bildung und Veränderung der mitotischen Spindel sowie die Aktivierung von Cdk/Zyklus Komplexen während der Mitose.

6.4.2.1 Polo-like-Kinase 1 (Plk1) ist kein Interaktionspartner von Fbxw5

Plk1 ist ein von der Hefe bis zum Menschen hochkonserviertes Protein. Diese Serin/Threonin-Kinase erfüllt wichtige Funktionen am G2/M-Übergang, beim Aufbau der Metaphasenplatte und der bipolaren Spindel sowie der Zytokinese. Plk1 übernimmt zudem eine wichtige Aufgabe in der Zentrosomenreifung.

Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen Plk1 und Fbxw5 wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente (s. Abschnitt 5.2.4) nach Überexpression beider Bindungspartner durchgeführt. Wie in Abb. 44 zu sehen ist, konnte Fbxw5 nur mit dem dazugehörigen Antikörper präzipitiert werden. Die schwach sichtbaren Banden

waren Hintergrundbanden, da sie selbst bei Abwesenheit von transfektierten Fbxw5 auftreten.

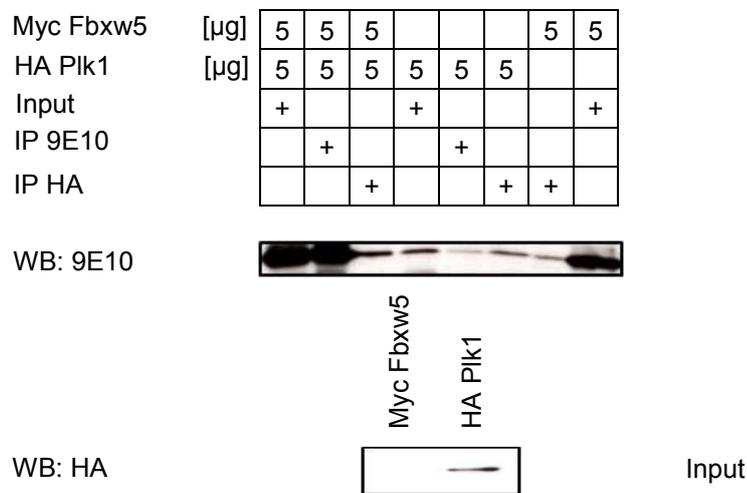


Abb. 44: Co-Immunopräzipitation von HA Plk1 und Myc Fbxw5.

293 Zellen wurden mit 5 µg Myc Fbxw5 in Kombination mit und ohne 5 µg HA Plk1 transfektiert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit 9E10 anti-Myc oder anti-HA Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc nachgewiesen. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.4.2.2 Polo-like-Kinase 3 (Plk3) ist kein Interaktionspartner von Fbxw5

Über Plk3 ist bisher noch sehr wenig bekannt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass seine Polo Box Domäne als Zentrosomenlokalisierungssignal dient (Jiang et al. 2006) und es teilweise die Funktion von Plk1 und Plk4 übernehmen könnte.

Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion zwischen Plk3 und Fbxw5 wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente (s. Abschnitt 5.2.4) nach Überexpression beider Bindungspartner durchgeführt. Wie in Abb. 45 zu sehen ist, konnte Fbxw5 nur mit dem dazugehörigen Antikörper präzipitiert werden.

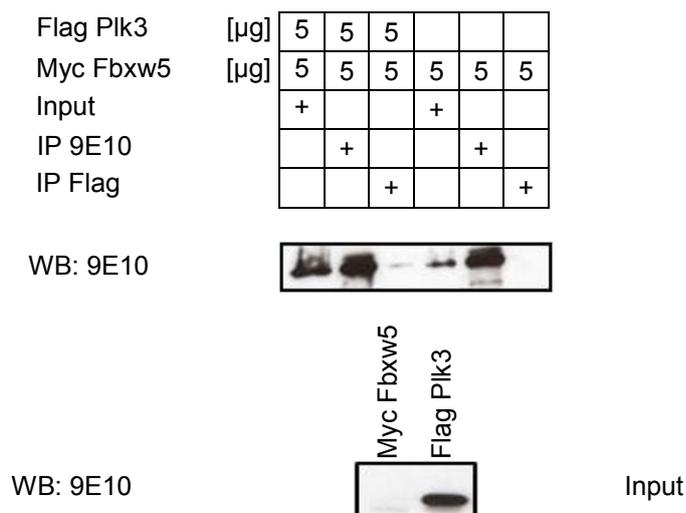


Abb. 45: Co-Immunopräzipitation von Flag Plk3 und Myc Fbxw5.

293 Zellen wurden mit 5 µg Myc Fbxw5 in Kombination mit und ohne 5 µg Flag Plk3 transfektiert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit 9E10 anti-Myc oder anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc nachgewiesen. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.4.2.3 Polo-like-Kinase 4 (Plk4) interagiert mit Fbxw5 nach Überexpression

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es bereits einige Veröffentlichungen über die Interaktion zwischen Plk4 und hSAS6 (Kleylein-Sohn et al. 2007; Strnad et al. 2007). Da auch das Aktivitätsfenster von Plk4 in dieser Phase mit dem von Fbxw5 überlappt, könnte dieses Protein den Komplex aus hSAS6 und Fbxw5 regulieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Co-Immunpräzipitationsversuche (s. Abschnitt 5.2.4) nach Überexpression von Plk4 und Fbxw5 durchgeführt. Wie in Abb. 46 zu sehen ist, konnte Fbxw5 nicht nur mit dem 9E10 anti-Myc, sondern auch mit dem anti-HA Antikörper immunpräzipitiert werden. Als Kontrolle der Spezifität dieser Interaktion wurden jeweils die einzelnen Proteine mit beiden Antikörpern getestet. Hierbei konnte keine unspezifische Bindung festgestellt werden.

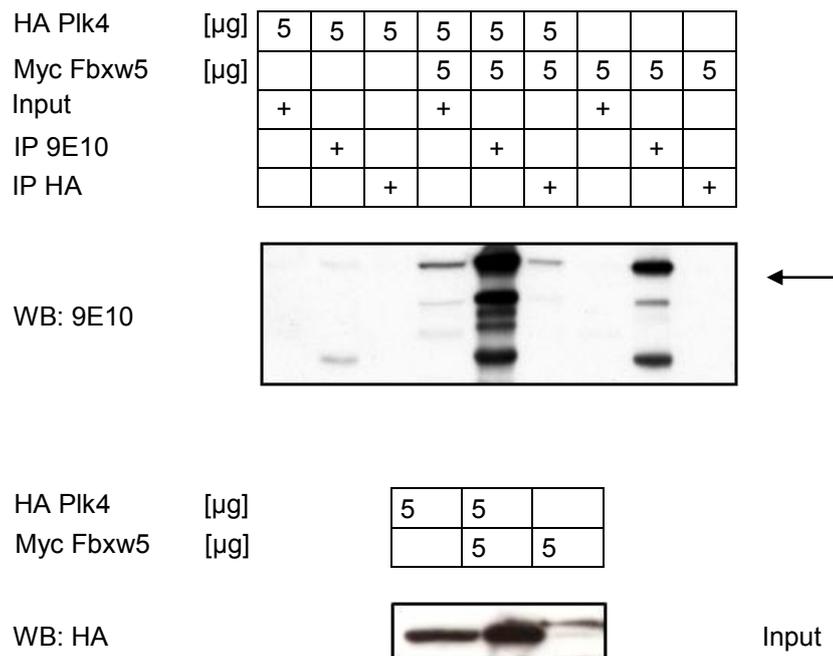


Abb. 46: Co-Immunopräzipitation von HA Plk4 und Myc Fbxw5.

293 Zellen wurden mit 5 µg Myc Fbxw5 in Kombination mit und ohne 5 µg HA Plk4 transfektiert. Nach erfolgter Proteinlyse wurden die Proben mit 9E10 anti-Myc oder anti-HA Antikörper immunpräzipitiert. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc nachgewiesen. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.4.2.3.1 Plk4 ist kein Substrat von Fbxw5

Zur Überprüfung des Interaktionsverhältnisses zwischen Plk4 und Fbxw5 wurden *in vivo* Ubiquitinilierungsversuche durchgeführt. Es konnte jedoch trotz funktionierender Positivkontrollen, keine Ubiquitinilierung von Plk4 festgestellt werden konnte (Daten hier nicht dargestellt). Somit scheint Plk4 kein Substrat von Fbxw5 zu sein. Diese Annahme konnte zusätzlich durch eine nicht vorhandene Modulation der Plk4 Proteinspiegel nach Überexpression von verschiedenen Fbxw5 Varianten (WT und deltaFbox Mutante) bestätigt werden (s. Abb. 47).

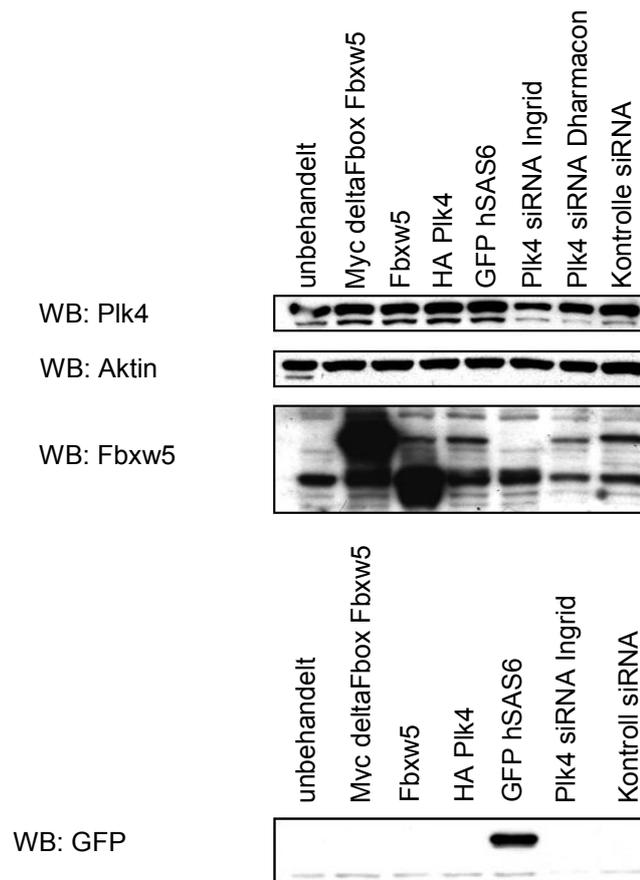


Abb. 47: Plk4 Proteinspiegel nach Überexpression von Fbxw5.

HeLa Zellen wurden mit 20 nM Kontroll-siRNA bzw. siRNA gerichtet gegen Plk4 zur Überprüfung der Laufhöhe des Proteins transfektiert. Für die Überexpression verschiedener Proteine wurden jeweils 5 µg WT Fbxw5, Myc deltaFbox Fbxw5, hSAS6 GFP oder HA-Plk4 eingesetzt. Nach erfolgter Proteinquantifikation wurden gleiche Mengen der oben beschriebenen Ansätze mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels anti-GFP, anti-Plk4, anti-Aktin und anti-Fbxw5 Antikörper detektiert.

6.4.2.3.2 Plk4 reguliert den Abbau von hSAS6 durch Fbxw5

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Plk4 zwar mit Fbxw5 interagiert, aber nicht zur Gruppe potentieller Substrate gehört, sollte überprüft werden, ob Plk4 vielleicht der gesuchte Regulator der Interaktion zwischen hSAS6 und Fbxw5 ist. Trifft diese Theorie zu, dann sollte die Überexpression von Plk4 in Anwesenheit der beiden anderen Proteine zu einer Veränderung des Proteinabbaus von hSAS6 führen. Für den nachfolgenden His-Ubiquitinilierungsversuch (s. Abschnitt 5.2.5) wurden gleiche

Mengen hSAS6 und Fbxw5 in Kombination mit WT Plk4 oder einer in funktionellen Version der Kinase (abgekürzt: KD) transfektiert. Wie in Abb. 48 zu erkennen ist, konnte eine Reduktion in der Ubiquitinilierung von hSAS6 durch Fbxw5 detektiert werden. Diese Verminderung war abhängig von der Kinaseaktivität von Plk4.

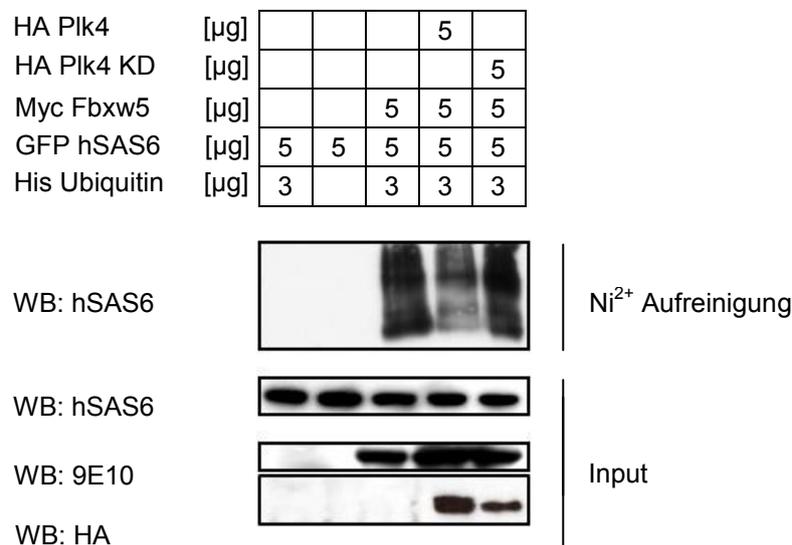


Abb. 48: Regulation des Fbxw5 abhängigen Proteinabbaus von hSAS6 durch Plk4.

293 Zellen wurden mit jeweils 5 µg Myc Fbxw5 und GFP hSAS6 in Kombination mit 5 µg WT oder KD Plk4 transfektiert. Im Anschluss an die 48-stündige Kultivierung erfolgte eine dreistündige Inkubation der Zellen mit 25 µM des Proteasominhibitors MG132. Nach erfolgter Ni²⁺ Aufreinigung wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und mittels anti-hSAS6 Antikörper detektiert. Der hier dargestellte Versuch zeigt beispielhaft das Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

6.4.2.3.3 Plk4 verlängert die Halbwertszeit von hSAS6 in Anwesenheit von Fbxw5

Die bereits gezeigte Auswirkung von Plk4 auf den Proteinabbau von hSAS6 führt zur Vermutung, dass durch die Überexpression der WT Variante der degradierende Einfluss von Fbxw5 auf hSAS6 verringert werden kann. Stimmt diese Theorie, dann sollte nicht nur der Abbau von hSAS6, sondern auch die Halbwertszeit davon betroffen sein. Hierfür wurde analog zu Abschnitt 5.2.6 ein Halbwertszeitexperiment durchgeführt. Wie in Abb. 49 zu erkennen ist, konnte eine Verlängerung der hSAS6 Halbwertszeit nach Transfektion von WT Plk4 im Vergleich zur KD Variante dieses Proteins festgestellt werden.

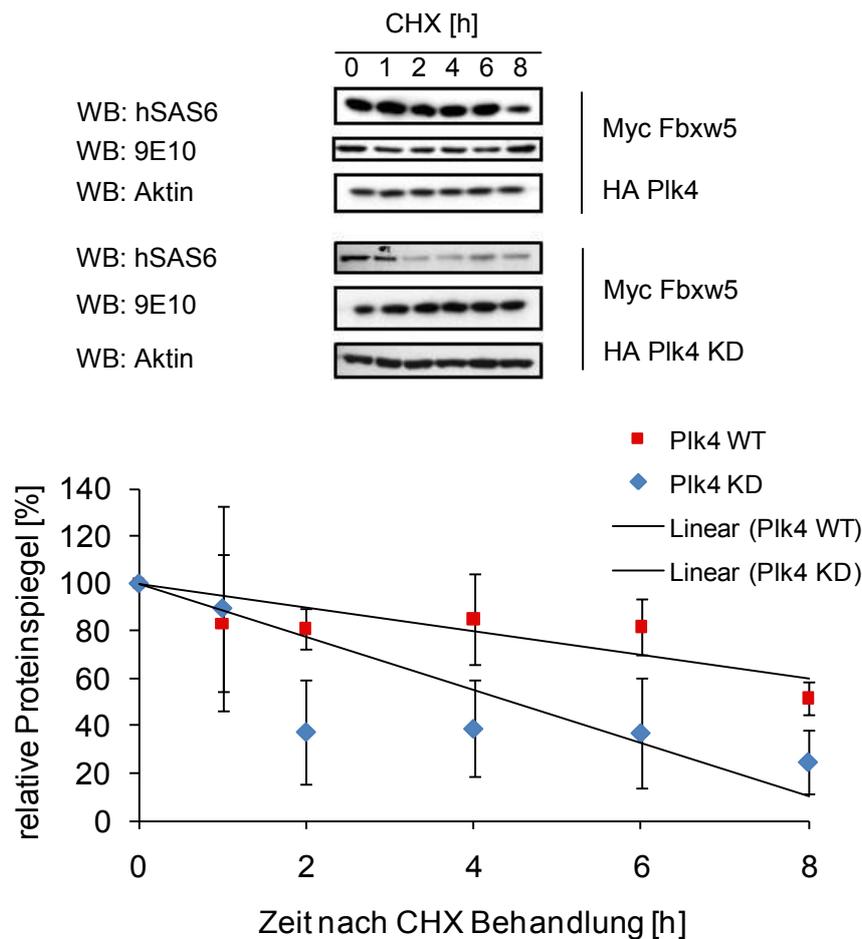


Abb. 49: Bestimmung der Protein-Halbwertszeit von hSAS6 nach Transfektion von WT Plk4 oder KD Plk4.

293 Zellen wurden jeweils mit 5 μg Myc Fbxw5 und 5 μg GFP hSAS6 in Kombination mit WT oder KD Plk4 transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die Proteinneusynthese durch die Zugabe von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid inhibiert. Zur Bestimmung der hSAS6 Proteinlevel wurden nach 0h, 1h, 2h, 4h, 6h und 8h Proben genommen und mittels Western Blot Analyse untersucht. Für die Detektion der einzelnen Proteine wurden 9E10 anti-Myc, anti-hSAS6 und anti-Aktin Antikörper verwendet.

6.4.2.3.4 Plk4 führt zum Anstieg von hSAS6 Proteinspiegeln

Die Verlängerung der Halbwertszeit von hSAS6 in Kombination mit der Überexpression von WT Plk4 in Kombination mit transfiziertem Fbxw5 sowie die Beeinflussung des Proteinabbaus weisen auf eine mögliche regulatorische Funktion vermittelt durch Plk4 hin. Zur näheren Untersuchung der Auswirkung der Überexpression von Plk4 in Anwesenheit von Fbxw5 wurden hSAS6 Proteinspiegel nach Transfektion betrachtet. Dabei zeigte sich, dass nach gleichzeitiger

Überexpression von WT Plk4 und WT oder Myc deltaFbox Fbxw5 ein starker Anstieg der GFP hSAS6 Proteinspiegel detektiert werden konnte (s. Abb. 50). Diese Veränderung war so stark, dass eine so kurze Exposition der Proben gewählt werden musste, wodurch das Signal für die restlichen transfektierten Proben für GFP hSAS6 noch nicht detektiert werden konnte. Erst bei längerer Exposition (hier nicht dargestellt) konnte auch für die anderen Versuchsansätze das überexprimierte Protein dargestellt werden, so dass sicher gestellt werden konnte, dass das Ergebnis nicht aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen zustande gekommen ist. Der starke Anstieg der hSAS6 Proteinspiegel nach Transfektion von WT Plk4 und Fbxw5 konnte durch die Überexpression der KD Plk4 Mutante teilweise rückgängig gemacht werden.

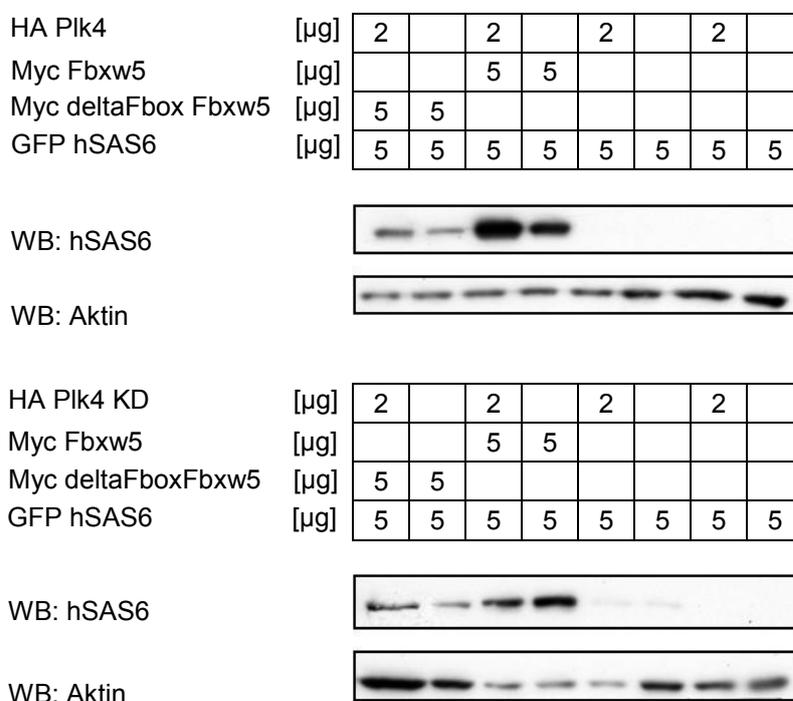


Abb. 50: hSAS6 Proteinspiegel nach Überexpression von Fbxw5 und WT oder KD Plk4.

HeLa Zellen wurden mit jeweils 5 µg WT Fbxw5 oder Myc deltaFbox Fbxw5 in Kombination mit 5 µg GFP hSAS6 transfektiert. Zur Überprüfung der Proteinspiegel wurden zusätzlich in einigen Ansätzen WT oder KD Plk4 hinzupipettiert. Nach erfolgter Proteinquantifikation wurden gleiche Mengen der oben beschriebenen Ansätze mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels anti-hSAS6 und anti-Aktin Antikörper detektiert.

6.4.2.3.5 Plk4 abhängige Phosphorylierung von Fbxw5

Plk4 wird nicht nur für die Beladung von hSAS6 auf das Zentriol, sondern auch für seine Stabilität benötigt (Kleylein-Sohn et al. 2007; Strnad et al. 2007). Da bereits in vorherigen Arbeiten ein phosphorylierungsabhängiger Mechanismus ausgeschlossen wurde (Strnad et al. 2007), stellte sich die Frage, ob Plk4 nicht Fbxw5 anstelle von hSAS6 phosphoryliert und somit zur Stabilisierung bzw. zur Verringerung des Proteinabbaus führt. Für diese Fragestellung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sangeeta Chauhan die Plk4 abhängige Phosphorylierung von Fbxw5 untersucht. Hierfür wurden spezielle Phos-tagTM Gele (s. Abschnitt 5.2.2.3) verwendet. Diese führen zu einer starken Veränderung der Mobilität von phosphorylierten Proteinen, so dass phosphorylierte Proteine besser aufgetrennt und dargestellt werden können. Für diesen Versuch wurden HeLa Zellen mit Myc deltaFbox Fbxw5 in An- bzw. Abwesenheit von WT Plk4 transfektiert und anschließend einer Immunpräzipitation mit 9E10 anti-Myc oder anti-Aktin Antikörper unterzogen. Bevor die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte die Phosphatasebehandlung mittels alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (kurz: CIAP). Wie in Abb. 51 zu erkennen ist, zeigte sich ein spezifischer Anstieg in der Phosphorylierung von deltaFbox Fbxw5 nach Zugabe von Plk4. Durch die Phosphatasebehandlung konnte dieser Schmier fast vollständig unterdrückt werden.

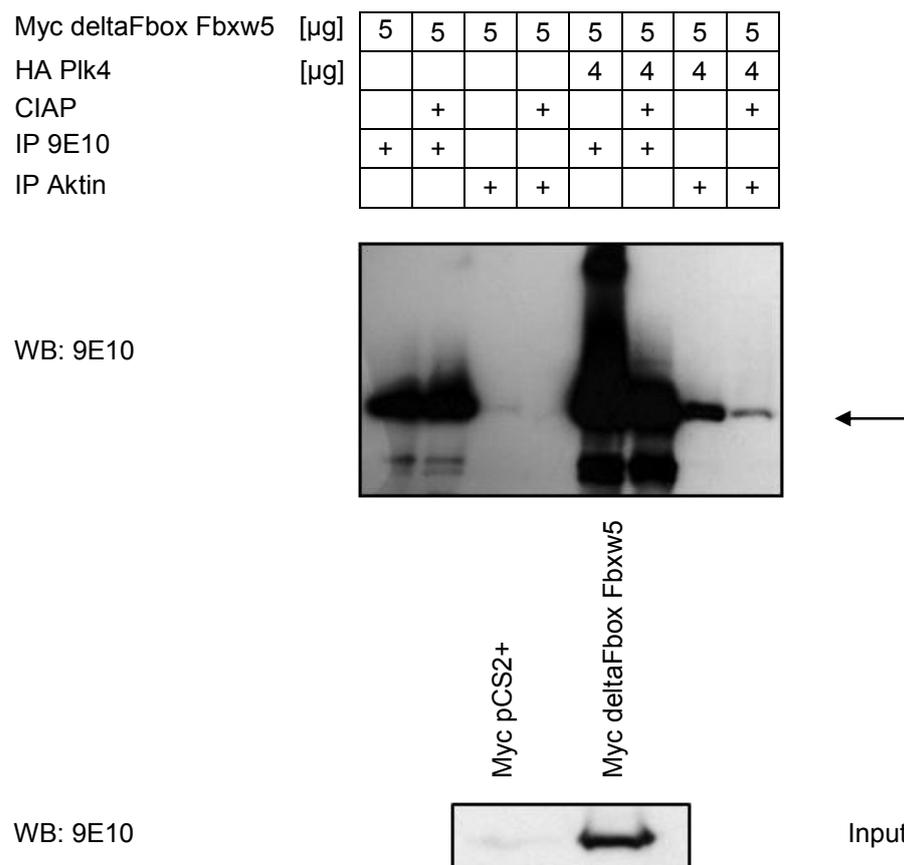


Abb. 51: Plk4 abhängige Phosphorylierung von Fbxw5.

HeLa Zellen wurden mit jeweils 5 µg Myc deltaFbox Fbxw5 in Kombination mit oder ohne 4 µg WT Plk4 transfektiert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Proben für drei Stunden mit 25 µM MG132 behandelt. Anschließend erfolgte die Immunpräzipitation von Fbxw5 mittels 9E10 anti-Myc oder als Kontrolle mittels anti-Aktin Antikörper. Die auf eine Nylonmembran transferierten Proteine wurden mittels 9E10 anti-Myc Antikörper detektiert.

7 Diskussion

Der fehlerfreie Ablauf des Zentrosomenzyklus ist notwendig für die Verteilung der DNS auf die sich bildenden Tochterzellen während der Mitose. Die Fehlregulation dieses Prozesses führt zur genetischen Instabilität und trägt somit zur Tumorentstehung bei.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Zentrosomen- und der Zellzyklus durch eine E3-Ligase, mit Fbxw5 als Untereinheit, gekoppelt sind. Zudem konnte das zentrosomale Protein hSAS6 als ein wichtiges Zielprotein dieses SCF-Komplexes identifiziert werden. Fbxw5 bindet an hSAS6 und fördert seinen Abbau *in vivo*. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Fbxw5 ein Zellzyklus reguliertes Protein ist, mit einem Aktivitätsmaximum am G1/S-Übergang. Der anschließende Abbau durch den Anaphase Promoting Komplex (APC/C) am Übergang zur Mitose ermöglicht ein Zurücksetzen des Zentrosomenzyklus für die nächste Zellteilung. Zudem konnte bewiesen werden, dass der Abbau von hSAS6 durch Fbxw5 negativ von Plk4 beeinflusst wird.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass ein durch den Zellzyklus regulierter SCF-Komplex die Zentrosomenduplikation durch den Abbau des zentrosomalen Proteins hSAS6 reguliert.

7.1 Aufklärung der biologischen Funktion des humanen F-box Proteins Fbxw5

7.1.1 Verlust von Fbxw5 mittels siRNA Technologie

Im ersten Teil der hier vorgelegten Arbeit wurde die biologische Funktion des humanen F-box Proteins mittels siRNA Interferenz untersucht. Die siRNA Technologie ist ein weitverbreitetes Instrument um den Verlust einzelner Gene systematisch zu untersuchen (Mizuno et al. 1984). Zu beachten ist dennoch, dass die Technik der siRNA Interferenz einige mögliche Fehlerquellen birgt, die bei der Beurteilung der Versuche berücksichtigt werden müssen. Es kann nicht

ausgeschlossen werden, dass sogenannte „off-target“ Effekte (z.D. = unspezifische Nebeneffekte) die beobachteten Ergebnisse verursachen (Birmingham et al. 2006; Tian et al. 2004; Sontheimer 2005). Damit diese Fehlerquelle möglichst vernachlässigt werden kann, wurden unterschiedliche Herangehensweisen gewählt. Je niedriger die Konzentration der eingesetzten siRNA ist, desto geringer ist der zu erwartende „off-target“ Effekt. Daher wurde für die Versuche grundsätzlich eine Kombination aus vier unterschiedlichen siRNAs verwendet. Dieses hatte den Vorteil, dass bei gleicher Endkonzentration der individuelle Anteil jeder einzelnen siRNA reduziert werden konnte. Für die ersten Versuche wurde das Protein Fbxw5 mittels siRNA Interferenz ausgeschaltet und die so entstandenen Spindelphänotypen in mitotischen Zellen quantifiziert. Es zeigte sich eine spezifische, signifikante Zunahme der Zentrosomenzahl pro Zelle in Fbxw5 behandelten Proben. Wie bereits in mehreren anderen Veröffentlichungen gezeigt werden konnte, gibt es häufig einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der sich bildenden Spindelpole und der Anzahl der Zentrosomen pro Zelle (Ma et al. 2007; Pelletier 2007; Bettencourt-Dias und Glover 2007, Balczon 2001; Yun et al. 2004). Dieses ergibt sich durch die zentrale Funktion des Zentrosoms als Mikrotubuliorganisationszentrum (MOZ). Ein Bestandteil ist der γ -Tubulin Ring Komplex, der für die Rekrutierung der Mikrotubulibausteine verantwortlich ist. Hieraus ergibt sich ein dynamisches Gleichgewicht aus Polymerisation und Depolymerisation, die zum Aufbau der mitotischen Spindel mit einem Ursprung am Zentrosom führen. Aus diesem Grund wurde der siRNA Versuch wiederholt und die Anzahl der Zentrosomen pro Zelle gezählt. Analog zum beobachteten Spindelphänotyp konnte eine Zunahme an Zentrosomen in Fbxw5 siRNA behandelten Zellen festgestellt werden. Der Effekt fällt womöglich deswegen etwas geringer aus, da nicht unterschieden werden kann, ob eine Zelle mit zwei Zentrosomen tatsächlich in der G2/M-Phase ist, oder ob es sich hierbei um eine G1-Phase Zelle handelt, die eigentlich nur ein Zentrosom besitzen dürfte. Zur Überprüfung dieser Theorie könnte man synchronisierte Zellen in einem Zeitkurvenversuch untersuchen, da aufgrund des experimentellen Ansatzes die Zellzyklusphase und somit auch die Zentrosomenzahl bekannt sind.

Nach lichtmikroskopischer Kontrolle zeigte sich eine Abnahme der Zellzahl in Fbxw5 siRNA behandelten Proben. Dieser Eindruck konnte durch einen entsprechenden Versuch bestätigt werden. Eine Verringerung der Zellzahl kann auf verschiedene

Mechanismen, wie beispielsweise Apoptose, Nekrose, Zellzyklusarrest, Autophagie und Seneszenz zurückgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zahl apoptotischer Zellen mit der s.g. TUNEL Färbung (s. Abschnitt 5.2.9.1) bestimmt. Es zeigte sich im gleichen Zeitrahmen zur Abnahme der Zellzahl eine 10 %ige Zunahme apoptotischer Zellen in Fbxw5 behandelten Zellen. Somit ist anzunehmen, dass weitere Mechanismen zur beobachteten Verringerung der Zellzahl beitragen. Hierzu könnten FACS Analysen für den Zellzyklusarrest, sowie weitere spezifische Färbungen zur Detektion von Nekrose und Seneszenz verwendet werden.

Die Kopplung des Zell- und Zentrosomenzyklus während der Duplikationsinitiation durch gemeinsame Regulatoren, wie beispielsweise Cdk2 und Zyklin E (Hinchcliffe et al. 1999; Lacey et al. 1999; Matsumoto et al. 1999; Meraldi et al 1999; Stearns 2001) sorgt für einen unidirektionalen und kontrollierten Verlauf beider Zyklen. Diese Verbindung ist im Hinblick auf die Tumorentstehung besonders wichtig, da Krebs die Folge mehrerer genetischer Veränderungen der Zelle ist. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob Fehler in der Zentrosomenamplifikation oder Zellzyklusregulation der Ursprung hierfür sind (Srsen und Merdes et al. 2006, Parvin et al. 2006). Es konnte zwar bisher kein Kontrollpunkt identifiziert werden, der die Überduplikation von Zentrosomen kontrolliert (Uetake und Sluder 2004; Wong und Stearns 2003), doch konnten in diesem Zusammenhang Mikule et al. bereits 2007 zeigen, dass der Verlust zentrosomaler Proteine zu einem p53 induzierten G1/S Arrest führt.

In ersten FACS Analysen konnte bei Verlust von Fbxw5 kein Zellzyklusarrest nachgewiesen werden, während nach Überexpression des Gens ein G1/S-Arrest detektiert werden konnte. Dieses zur Literatur inverse Verhalten kann durch die Funktion von Fbxw5 erklärt werden. Im Gegensatz zu den untersuchten Proteinen, die beispielsweise für die Initiation und Duplikation verantwortlich sind, inhibiert Fbxw5 durch seine Aktivität die Überduplikation der Zentrosomen. Nach erfolgter Zentrosomenduplikation in der S-Phase baut das F-box Protein sein Substrat ab und verhindert damit eine weitere Amplifikation der Zentriolen. Ist nun durch Überexpression zu viel Protein vorhanden, blockiert dieses bereits zu einem viel zu frühen Zeitpunkt den Zentrosomenzyklus. Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben führt diese Infunktionalität des Zentrosoms dann zum G1/S-Phase Arrest (Mikule et al. 2006).

7.1.2 Überexpression des humanen F-box Proteins Fbxw5

Die Identifizierung zentrosomaler Proteine erfolgt in der Literatur mittels unterschiedlicher Methoden. Zum Einen werden Proteinanalysen isolierter Zentrosomen durchgeführt, um bisher unbekannte Regulatoren zu identifizieren (Andersen et al. 2003). Zum Anderen wird die Technik der RNS Interferenz verwendet, um gezielt jedes Gen auszuschalten, wie beispielsweise in *D. Melanogaster* (Dobbelaere et al. 2008) oder in *C. Elegans* (Sonnichsen et al. 2005). Die Detektion zentrosomaler Phänotypen erfolgte dann mittels mikroskopischer Analysen.

In dieser Arbeit wurde die Technik der siRNA Interferenz verwendet, um Proteine der F-box- und Cullin-Familien auszuschalten. Hierbei wurde Fbxw5 anhand mikroskopischer Analysen als möglicher Regulator des Zentrosomenzyklus identifiziert. Nachdem der Verlust des F-box Proteins Fbxw5 zu einem Anstieg der Zentrosomenzahl und einer Zunahme von Spindelphänotypen führte, sollte die Auswirkung der Überexpression dieses Proteins auf die Zelle überprüft werden. Es konnte bereits mehrfach in der Literatur gezeigt werden, dass die Überexpression des entsprechenden Proteins das gegenteilige Ergebnis zur RNS Interferenz liefert (Habedanck et al. 2005; Leidel et al. 2005; Prigent et al. 2005; Bettencourt-Dias et al. 2006; Azimzadeh und Bornens, 2007). Entsprechend konnte für Fbxw5 eine Verringerung der Zentrosomenzahl nach Überexpression detektiert werden. Durch die Transfektion dieses Proteins ist zu viel aktives Fbxw5 vorhanden, das bereits zu einem zu frühen Zeitpunkt wichtige Komponenten der Zentrosomenduplikation inhibiert. Daher kann zwar die Initiation am G1/S Übergang erfolgen, jedoch keine Zentriolduplikation, da Fbxw5 die Beladung der notwendigen Proteine behindert. Als Folge dieses infunktionellen Zentrosoms wird die Zelle in der G1/S Phase arretiert (Mikule et al. 2007).

F-box Proteine gehören zu einer inhomogenen Proteinfamilie, die durch das gemeinsame Motiv, der F-box, charakterisiert sind (Kipreos und Pagano 2000; Cenciarelli et al. 1999). Dieses Proteinmotiv ermöglicht die Assoziation mit einer E3-Ligase, dem SCF-Komplex, der seinen Namen aufgrund seiner Komponenten erhalten hat. Für viele F-box Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass sie

Bestandteil eines SCF-Komplexes sind (Pagano und Benmaamar 2003; Yamasaki und Pagano 2004; Freed et al. 2000; Skowyra et al. 1997; del Pozo und Estelle 2000). Bei Verlust des F-box Motives kann keine funktionierende E3-Ligase mehr gebildet werden und der sich hieraus ergebene Phänotyp ähnelt dem Verlust des Proteins.

Die Transfektion einer deltaFbox defizienten Version von Fbxw5 führte zu einer signifikanten Zunahme der Zentrosomenzahl pro Zelle. Die Überexpression lieferte hierbei vergleichbare Ergebnisse, wie der Verlust des Proteins.

Die Deletion der F-box verhindert die Bildung eines funktionellen SCF-Komplexes und den Abbau seiner Zielproteine (Hermand 2006). Durch die nun fehlende Regulation des Substrates ist die mehrfache Bildung von Tochterzentriolen nicht mehr blockiert und somit können sich überzählige Zentrosomen während einer Zellteilung bilden. Es konnte bereits mehrfach in der Literatur gezeigt werden, dass bei Überexpression für die Duplikation wichtiger zentrosomaler Proteine, wie beispielsweise Plk4, eine Zentriolüberduplikation stattfindet (Bettencourt-Dias et al. 2005; Duensing et al. 2007; Loncarek et al. 2008). Dass diese Zellen mit überschüssigen Zentrosomen teilweise trotzdem die Zellteilung erfolgreich abschließen können, liegt an der Zentrosomengruppierung. Dieser Mechanismus ermöglicht der Zelle bei überzähligen Zentrosomen den Aufbau einer binären Spindel und somit eine normale Zellteilung (Jaspersen und Stearns 2008).

7.2 Die Zentrosomenüberduplikation nach Verlust von Fbxw5 ist Zellzyklus unabhängig

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass das Vorhandensein überzähliger Zentrosomen pro Zelle auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden kann (Nigg 2002; Duensing 2005). Neben einer direkten Störung der Zentrosomen-duplikation, ist es auch möglich, dass Fehler in der Zellzykluskontrolle indirekt die Zahl der Zentrosomen beeinflussen. Daher war ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit herauszufinden, ob die beobachteten Zentrosomenabnormalitäten abhängig oder unabhängig von der Zellteilung auftreten. Ein gut etabliertes System, welches sich für

diese Untersuchung anbietet, sind U2OS- oder CHO-Zellen. In diesen beiden Zelltypen kann der Zellzyklus vom Zentrosomenzyklus losgekoppelt werden. (Balczon et al. 1995; Kuriyama et al. 2007; Liu und Erikson 2002; Mikule et al. 2006). Dieses führt zur wiederholten Verdopplung der Zentrosomen, ohne dass sich die Zellen teilen. Wenn der beobachtete Phänotyp Zellzyklus abhängig ist, dann sollte es keinen Unterschied zwischen der Kontrolle und den Fbxw5 behandelten Proben geben. Nur wenn Fbxw5 direkt die Zentrosomenduplikation beeinflusst, ist in diesem System ein deutlicher Unterschied der Zahl der Zentrosomen (Anstieg oder Abfall) in Abhängigkeit von der Aktivität des Fbxw5 zu erwarten. Es zeigte sich für die deltaFbox Mutante in unbehandelten U2OS-Zellen ein signifikanter Anstieg in der Zentrosomenzahl, der nach der Hydroxyurea Behandlung weiterhin erkennbar ist (s. Abb. 23). Der nicht proportionale Anstieg in behandelten und unbehandelten Zellen könnte an einer oberen Toleranzgrenze der Zellen liegen. Möglicherweise überschreiten einige dieser Zellen diese Grenze und werden apoptotisch. Betrachtet man nun zusätzlich die Überexpression des Wildtyp Gens, dann erkennt man sowohl für die behandelten, als auch die unbehandelten Proben eine signifikante Reduzierung der Zentrosomenzahl pro Zelle. Fbxw5 transfektierte Proben wurden durch die Hydroxyurea Behandlung weniger beeinflusst als die Kontrolle. Damit ausgeschlossen werden kann, dass dieser Effekt nicht abhängig vom Mechanismus der Zellzyklusblockade ist, wurde zusätzlich Aphidicolin verwendet. Aphidicolin, im Gegensatz zu Hydroxyurea, inhibiert nicht das Enzym Ribonukleotidreduktase, sondern hemmt direkt die DNS Polymerasen α und δ .

Es konnte auch in diesem Versuch ein signifikanter Unterschied zwischen der deltaFbox Mutante und der Kontrolle bezüglich der Zentrosomenzahl detektiert werden. Die hier teilweise großen Standardabweichungen resultieren wahrscheinlich daraus, dass transient transfektierte Zellen verwendet wurden, die teilweise große Unterschiede im Expressionsniveau der verschiedenen Konstrukte aufwiesen. Für eine gleichmäßige Auswertung wurde kein Unterschied zwischen stärker und schwächer exprimierenden Zellen gemacht. Es wurden alle transfektierten Zellen pro Deckglas ausgezählt. Deshalb war nicht auszuschließen, dass nicht nur der optimale Expressionsbereich betrachtet wurde, sondern auch die weniger effektiven Grenzbereiche. Dieses Problem könnte man durch die Etablierung induzierbarer Zellen umgehen. Die Herstellung einer stabilen Zelllinie, war aufgrund der wichtigen

regulatorischen Funktion von Fbxw5 und dem damit verbundenen Zellzyklusarrest nicht möglich.

Zur Bestätigung der Überexpressionsversuche und um die normale Physiologie der Zelle nicht unnötig zu stören, wurde der vorangegangene Versuch mit Hilfe der siRNA Technologie wiederholt. Auch für diesen experimentellen Ansatz konnte nach Zugabe von Hydroxyurea oder Aphidicolin immer noch eine signifikante Zunahme der Zentrosomenzahl festgestellt werden.

7.3 Fbxw5 bildet einen SCF-Komplex

F-box Proteine gehören zu einer sehr inhomogenen Proteinfamilie, die die F-box als gemeinsames Motiv haben. Diese Proteindomäne wird für die Assoziation mit dem Proteinabbaukomplex SCF benötigt, dessen Name stellvertretend für seine Komponenten Skp1, Cullin 1 und einem F-box Protein steht (Bai et al. 1996; Patton et al. 1998; Deshaies 1999). Da F-box Proteine sehr unterschiedliche Funktionen übernehmen, war ein besonders wichtiger Aspekt dieser Arbeit die molekulare Aufgabe von Fbxw5 zu entschlüsseln. Aufgrund der Familienzugehörigkeit musste zunächst überprüft werden, ob das Fbxw5 Protein in der Lage ist einen Abbaukomplex zu bilden. Hierfür wurden unterschiedliche Fbxw5 Konstrukte in HeLa-Zellen überexprimiert und mit Hilfe des Myc Epitops immunpräzipitiert. Wie bereits in der Literatur mehrfach beschrieben, konnte eine F-box abhängige Assoziation mit dem Abbaukomplex nachgewiesen werden (Schulman et al. 2000; Freed et al. 2000; Skowrya et al. 1997; del Pozo und Estelle 2000). Während mit dem Wildtyp Protein die SCF Untereinheiten Skp1 und Cul1 co-immunpräzipitiert werden konnten, wurden weder im Kontrollansatz noch mit einem Fbxw5 Protein, dem die F-box fehlt, SCF Untereinheiten im Immunpräzipitat identifiziert. Bei der Überexpression von Proteinen in Zellsystemen muss das Ergebnis in Hinblick auf Artefakte kritisch bewertet werden. Die Abweichung zur natürlich vorliegenden Konzentration des Proteins kann zu falschen Interaktionen führen, die dann irrtümlich als reale Bindungspartner interpretiert werden könnten. Wenn möglich wird endogenes Protein immunpräzipitiert, um dann anschließend seine möglichen Interaktionspartner mittels Western Blot Analyse zu detektieren. Da für Fbxw5 zu Beginn der Arbeit noch kein kommerzieller Antikörper erhältlich gewesen ist, wurden die ersten Untersuchungen nach Überexpression dieses Proteins durchgeführt. Zur

Bestätigung der Ergebnisse und für weiterführende Experimente wurde ein polyklonaler Fbxw5 Antikörper in Zusammenarbeit mit der Firma Sigma in Kaninchen hergestellt und validiert (s. Abschnitt 5.2.10). Immunpräzipitationsexperimente mit diesem Antikörper und endogenem Fbxw5 bestätigten die Ergebnisse nach Überexpression.

Fasst man alle bisherigen Daten zusammen, dann erhält man folgende Hypothese: Das F-box Protein Fbxw5 bildet einen SCF-Komplex, der möglicherweise zellzyklusphasenspezifisch am Zentrosom lokalisiert ist. Dieser Abbaukomplex degradiert ein oder mehrere Zielproteine, die für die Zentrosomenduplikation essentiell sind. Diese Hypothese würde sich sehr gut in die vorhandene Literatur einfügen, die für die Regulation der Zentrosomenduplikation bzw. als Kontrollmechanismus gegen Zentrosomenüberduplikation einen noch nicht näher beschriebenen Abbaukomplex fordert (Freed et al. 1999; Hinchcliffe et al. 1999). Wie in der Einleitung beschrieben, konnten mehrere Arbeitsgruppen in verschiedenen Organismen bereits Proteinabbaukomplexe mit wichtigen Aufgaben in der Zentrosomenduplikation verknüpfen (Blow und Dutta 2005; Vidwans et al. 2003; Tachibana et al. 2005; Wojcik et al. 2000; Murphy 2003), so dass die Idee eines SCF Komplexes, der die Initiation der Zentrosomen reguliert, schon durch experimentelle Daten gestützt wird. Hierfür würde man erwarten, dass dieser Abbaukomplex direkt nach dem Initiationssignal auf das Mutterzentriol geladen wird, um dort alle weitere Signale, die zu einer wiederholten Verdopplung führen, zu blockieren. Dieser Komplex würde erwartungsgemäß bis zur G2- bzw. M-Phase aktiv bleiben und müsste dann, um im nächsten Zellzyklus die Zentrosomenduplikation zu ermöglichen, inaktiviert werden. Diese Theorie kann nicht nur den Kontrollmechanismus der Zelle gegen Überduplikation erklären, sondern auch das Phänomen, dass G2-Phase Zentrosomen nach Fusion mit S-Phase Zellen nicht mehr in der Lage sind erneut zu duplizieren (Wong und Stearns 2003). Trifft diese Theorie zu, dann sollte Fbxw5 am Zentrosom lokalisiert oder durch die Assoziation mit dem SCF-Komplex dorthin transferiert werden. Zur Überprüfung dieser Überlegung wurden Co-Lokalisationsexperimente mit Fbxw5 und dem zentrosomalen Marker γ -Tubulin durchgeführt. Hierfür konnte durchgängig zytoplasmatische und vereinzelt auch eine zentrosomale Lokalisation nachgewiesen werden. Zum Einen könnte die starke zytoplasmatische Färbung ein Signal am Zentrosomen überlagern

und zum Anderen ist eine zellzyklusphasenspezifische Lokalisation von Fbxw5 am Zentrosom möglich bzw. sogar erforderlich, damit es sich in die aufgestellte Hypothese einfügt. Analog zur Co-Immunpräzipitation muss auch hier das Ergebnis kritisch diskutiert werden, da eine Lokalisation am Zentrosom nach Überexpression eines bestimmten Proteins keine zuverlässige Aussage über dessen tatsächliche zelluläre Lokalisation zulässt. Häufig werden überexprimierte Proteine zum Zentrosom transportiert und dort konzentriert, ohne dass dieses einen Zusammenhang zur tatsächlichen Funktion darstellt. Aus diesem Grund wäre der Nachweis des endogenen Proteins am Zentrosom ein besseres Argument in Bezug auf die Lokalisation von Fbxw5. Dieser Versuchsansatz war jedoch nicht durchführbar, da der selbst hergestellte Antikörper das endogene Protein nicht spezifisch detektieren konnte.

Zur Überprüfung, ob Fbxw5 nur in Verbindung mit einer funktionellen E3-Ligase am Zentrosomen lokalisiert ist, könnten Co-Immunpräzipitationsversuche mit Cul1 oder Skp1 aus zentrosomalen Fraktionen durchgeführt werden und auf ihre Assoziation mit Fbxw5 hin untersucht werden. Dass die Untereinheiten des SCF-Komplexes zellzyklusphasenweise am Zentrosom lokalisiert sind, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Freed et al. 1999).

7.4 Fbxw5 ist im Zellzyklus reguliert und wird durch den APC/C^{Cdc20} abgebaut

Proteine, die für den fehlerfreien Ablauf des Zellzyklus bzw. Zentrosomenzyklus verantwortlich sind, werden in ihrer Aktivität streng reguliert. Eine Möglichkeit die Aktivität eines Proteins zu kontrollieren ist sein spezifischer Abbau. Diese zyklische Degradation von Proteinen im Zellzyklus ermöglicht es der Zelle nur für die aktuelle Zellzyklusphase wichtige Prozesse zu aktivieren und gleichzeitig nicht mehr benötigte Proteine abzubauen. Beispiele hierfür sind Zyklin E (Brotz et al. 1996) und Plk4 (Habedanck et al. 2005). Ist Fbxw5 ein an der Zentrosomenduplikation beteiligtes Protein, dann könnte seine Aktivität durch mehrere Mechanismen moduliert werden. Zum Einen könnte es eine zellzyklusabhängige Regulation auf Transkriptions- bzw. Translationsebene geben. Die Expression sollte zwischen der

Zentrosomeninitiation (G1) und – separation (M) liegen, da in der G1-Phase das Startsignal für die Duplikation der Zentrosomen gegeben wird und in der M-Phase die Zentrosomen für die nächste Verdopplung vorbereitet werden. Zum Anderen könnte die Funktion oder die Lokalisation dieses Proteins zyklisch reguliert sein.

Zur Bestimmung ob die Proteinmenge von Fbxw5 im Zellzyklus reguliert wird, wurden unterschiedliche Blockierungsmechanismen verwendet (s. Abschnitt 5.1.6). Die durchgeführten Versuche zeigten eine Akkumulation des Proteins am Ende der G1-Phase, die bis zum Übergang von der G2 zur M-Phase anhielt. Parallel durchgeführte RT-PCRs konnten zu keinem Zeitpunkt während des Zellzyklus eine Regulation auf RNS Ebene bestätigen. FACS Analysen und die parallele Betrachtung bereits bekannter, im Zellzyklus regulierter, Proteine bestätigten die Synchronität der Zellen der hier durchgeführten Zeitkurvenexperimente.

Während der Zellteilung regulieren verschiedene E3-Ligasen die Expression Zellzyklus relevanter Proteine. Neben dem SCF-Komplex gehört der APC/C zu den wichtigsten Multikomponenten Ubiquitinligasen, die bisher identifiziert wurden (Hansen et al. 2002). Zu seinen Aufgaben gehören der Abbau von Zielproteinen, die den Metaphase-Anaphase Übergang kontrollieren (Ge et al. 2009) und das Ende der Mitose einleiten (Nilsson et al. 2008), sowie die Replikation der DNS während der S-Phase (Di Fiore et al. 2008). Je nach Zellzyklusphase ist der APC/C mit einem von zwei Co-Aktivatoren assoziiert Cdh1 oder Cdc20 (Burton und Solomon, 2000; Hilioti et al. 2001; Pflieger et al. 2001; Schwab et al. 2001). Im Gegensatz zum SCF-Komplex benötigt der APC/C zusätzlich diese zwei Co-Aktivatoren. Durch das Vorhandensein von WD40 Motiven, die für die Interaktion mit den Zielproteinen notwendig sind, übernehmen Cdh1 und Cdc20, ähnlich wie bei einigen F-box Proteinen, die Funktion der Substraterkennung und –bindung. Die Zielproteine des APC/C werden anhand von zwei Abbaumotiven, der Destruktionsbox (D-Box) und der KEN Box (Pflieger und Kirschner, 2000) erkannt. Der Co-Akturator Cdc20, der hauptsächlich während der Mitose aktiv ist, erkennt seine Zielproteine grundsätzlich anhand der D-Box, während Cdh1 sowohl diese als auch die KEN-Box erkennt. Aufgrund des Vorhandenseins einer D-Box und dem Abbau von Fbxw5 am Übergang von der G2- zur M-Phase wurde untersucht, ob der APC/C mit Cdc20 als Co-Akturator möglicherweise an der Degradation dieses Proteins beteiligt ist.

In Zusammenarbeit mit Sangeeta Chauhan konnte in Co-Immünpräzipitationsexperimenten gezeigt werden, dass Cdc20 und Fbxw5 nach Überexpression spezifisch interagieren. Zudem zeigte sich ein spezifischer Anstieg in der Ubiquitinierung von Fbxw5 nach Titration von Cdc20. Wie bereits mehrfach in der Literatur für andere Substrate des APC/C (Machida und Dutta, 2007; Seki und Fang 2007) beschrieben, konnte nach Zugabe von Emi1 der Abbau von Fbxw5 blockiert werden.

Fbxw5 verhindert in der S-Phase die wiederholte Neubildung der Tochterzentriolen. Damit im nächsten Zellzyklus die Zentrosomenduplikation erfolgen kann, muss dieser Regulator rechtzeitig abgebaut werden. Dieses wird am Übergang von der G2- zur M-Phase durch den APC/C^{Cdc20} erreicht und passt zur Hypothese, dass sich der Zentrosomenzyklus bereits am Ende der Mitose auf die nächste Zellteilung vorbereitet. Für andere wichtige, zentrosomale Proteine, wie beispielsweise CEP170 (Tachibana et al. 2005) und Nek2 (Fry et al. 1998) konnte bereits ein Abbau während der Mitose nachgewiesen werden.

7.5 Fbxw5 reguliert die Zentrosomenduplikation durch den Abbau von hSAS6

Um Substrate von F-box Proteinen zu identifizieren, kann man nach interagierenden Proteinen mit diversen Methoden, wie z.B. Hefe-Zwei-Hybrid-System, Co-Immünpräzipitationsversuchen in Zusammenarbeit mit MASDAQ und TAP TAG, suchen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Herangehensweisen ausprobiert, die aber aufgrund der meist phosphorilierungsabhängigen Bindung zwischen F-box-Proteinen und deren Substraten nicht erfolgreich gewesen sind (Galan und Peter 1999). Ein weiterer Ansatz ist es, spezielle Proteine, die eine wichtige Funktion in der Zentrosomenduplikation übernehmen, auf ihre Interaktion mit Fbxw5 hin zu untersuchen. In diesen Co-Immünpräzipitationsexperimenten konnte Zyklin E, das zusammen mit Cdk2 an der Initiation der Zentrosomenduplikation beteiligt ist (Okuda et al. 2008), als Bindungspartner ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis stimmt überein mit einer Veröffentlichung, in der u.a. Fbxw5 als Negativkontrolle von F-box

Proteinen mit WD40 Wiederholungen verwendet wurde, um die spezifische Interaktion von Fbxw7 und Zyklin E zu bestätigen (Koepp et al. 2001).

Ein weiterer interessanter Kandidat auf dem Gebiet der Zentrosomenduplikation ist das von Pierre Gönczy in *C. elegans* zuerst beschriebene Protein SAS6 (Dammermann et al. 2004; Leidel et al. 2005; Strnad et al. 2007; Peel et al. 2007). Strnad et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass HsSAS6 bereits sehr früh während der Prozentriolformation rekrutiert wird und dass dieses Plk4 unabhängig zu sein scheint. Die Plk4 Kinaseaktivität scheint eher bei der Aufrechterhaltung der zentriolären Lokalisation von hSAS6 eine wichtige Rolle zu spielen.

In der Literatur wurden zwar bereits mehrere Abbauwege dieses Proteins beschrieben, sie beziehen sich aber auf Zellzyklusphasen, die, für die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese keinen Einfluss haben (Leidel et al. 2005). Beispielsweise wird hSAS6 zu Beginn der G1-Phase durch den APC/C^{Cdh1} abgebaut. Ein weiteres Argument, das für hSAS6 als mögliches Substrat spricht, ist, dass der durch Fehlregulation verursachte Phänotyp dieses Proteins (Leidel et al. 2005) invers dem der Überexpression bzw. Minderung von Fbxw5 Proteinspiegeln ist. In dieser Arbeit konnte in verschiedenen Versuchen nicht nur die Interaktion beider Proteine bewiesen werden, sondern auch der spezifische Abbau von hSAS6 durch Fbxw5 *in vivo*. In der Literatur wurde bereits für die G1-Phase der APC/C^{Cdh1} als Abbaukomplex beschrieben (Tang et al. 2009). Dieses konnte auch in dieser Arbeit reproduziert werden. Zudem konnte der Bereich, der für die Bindung verantwortlich ist für Fbxw5 auf die vorletzte WD40 Wiederholung eingegrenzt werden. Dieses korreliert mit der Literatur, in der dieses Proteinmotiv bereits als Substratinteraktionsdomäne charakterisiert wurde (He et al. 2006).

Die in diesem Teil der Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen sich sehr gut in den bereits bekannten Ablauf der Zentrosomenduplikation einfügen. Nach erfolgter Zentrosomeninitiation wird die Mutterzentriole mit verschiedenen, für die Duplikation notwendigen, Proteinen beladen. Hierzu zählt neben Plk4, CPAP und CEP135 auch hSAS6 (Kleylein-Sohn et al. 2007; Habedanck et al. 2005; Salisbury et al. 2002). Während dieser Zeit wird Fbxw5 bereits exprimiert, kann aber durch Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung, fehlende Lokalisation am Zentrosom oder zu

niedriger Proteinspiegel, nicht in die Zentrosomenduplikation eingreifen. Dieses ist notwendig, damit eine einmalige Verdopplung der Zentriolen stattfinden kann. Nachdem sich die Tochterzentriolen ausgebildet haben, erfolgt der Abbau der beteiligten Proteine am Zentrosom. Zu diesem Zeitpunkt bildet Fbxw5 einen aktiven SCF-Komplex und inhibiert die Bildung multipler Tochterzentriolen durch die Degradation von hSAS6.

Wie in der Literatur beschrieben, konnten bereits zwei Interaktionspartner von Fbxw5 identifiziert werden (Hu et al. 2008; Minoda et al. 2009). Hu et al. konnten das tuberöse Sklerose Protein TSC2 als Substrat von Fbxw5 identifizieren, das in Verbindung mit der DDB1-Cul4 E3-Ligase abgebaut wird. Komponenten dieses Abbaukomplexes, im Gegensatz zum SCF (Freed et al. 1999), wurden bisher in der Literatur noch nicht am Zentrosomen identifiziert. Zusätzlich zeigt TSC2 eine hohe Expression in G0- und G1- Phase Zellen (Soucek et al. 1997), zu einem Zeitpunkt im Zellzyklus, der mit der Zentrosomenduplikation nicht übereinstimmt. Der Verlust dieses Proteins verhindert den Übergang in die G0-Phase und lässt Zellen den G1/S Kontrollpunkt inaktivieren (Soucek et al. 1997). Im Gegensatz dazu führt die Überexpression zu einem Anstieg von p27 Proteinspiegeln und als Konsequenz daraus zu einer Verringerung der Zellproliferation (Soucek et al. 2001). Aufgrund dieser bereits sehr detailliert beschriebenen Funktionen von TSC2 kann keine Verbindung zum Zentrosomenzyklus hergestellt werden.

Als weiteren Interaktionspartner von Fbxw5 konnten Minoda et al. 2009 TAK1 MAP3K identifizieren. Die in dieser Veröffentlichung gezeigte Regulation konnte auf keine bekannte E3-Ligase zurückgeführt werden. Hoffmann et al. konnten TAK1 als einen wichtigen Faktor während der Zelldifferenzierung identifizieren. Zusätzlich ist dieses Protein an der Stressantwort der Zelle auf äußere Faktoren beteiligt, sowie an der Transkription des nukleären Faktors Kappa B. Die Möglichkeit, dass einer dieser beiden Interaktionspartner den beobachteten zentrosomalen Phänotyp auslöst, ist eher unwahrscheinlich.

7.6 Plk4 abhängige Phosphorylierung reguliert Fbxw5 Interaktion mit hSAS6

Die Polo-like-Kinasen gehören, wie bereits oben erwähnt, zur Gruppe der Serin/Threonin Kinasen, die wichtige Funktionen im Zellzyklus übernehmen. Neben der Aktivierung von Cdk/Zyclin Komplexen während der Mitose gehört auch die Bildung und Veränderung der mitotischen Spindel zu ihren Aufgaben.

Insbesondere der Tumorsuppressor Polo-like-Kinase 4 (Plk4) übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Zentriolduplikation. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Überexpression dieses Proteins zur Bildung überzähliger Zentrosomen führt (Bettencourt-Dias et al. 2005; Habedanck et al. 2005; Kleylein-Sohn et al. 2007; Peel et al. 2007; Rodrigues-Martins et al. 2007). Plk4 ist ein Zellzyklus reguliertes Protein, mit einem Expressionsmaximum in der Mitose und einem -minimum während der S-Phase (Cunha-Ferreira et al. 2009; Rogers et al. 2009; Korzeniewski et al. 2009). Diese Regulation ist notwendig, um die Ausbildung multipler Tochterzentriolen zu verhindern. Die genaue Funktion, die Plk4 während der Zentriolduplikation übernimmt, konnte noch nicht im Detail geklärt werden. Nach erfolgter Initiation durch den Cdk2/Zyclin E Komplex rekrutiert Plk4 sequentiell eine ganze Gruppe von konservierten Proteinen, die für die Duplikation notwendig sind (Kleylein-Sohn et al. 2007; Habedanck et al. 2005; Salisbury et al. 2002). Hierzu gehören nach bisherigen Erkenntnissen hSAS6, CEP135 und CPAP, welche eine Art Startplattform für die Bildung der Zentriolen schaffen (Kleylein-Sohn et al. 2007; Strnad et al. 2007). Nachdem die Prozentriolformation abgeschlossen ist, wird Plk4 durch Slimb (*Drosophila*), dem Homolog zu β -TRCP, abgebaut, wodurch die Bildung multipler Tochterzentriolen verhindert wird (Cunha-Ferreira et al. 2009; Rogers et al. 2009). Für den Menschen konnte bisher eine SCF abhängige Degradation von Plk4 während der S-Phase gezeigt werden (Korzeniewski et al. 2009).

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weisen auf eine negative Regulation der hSAS6 Interaktion mit Fbxw5 durch Plk4 hin, da nur für diese Kinase spezifisch eine Interaktion und ein Einfluss auf hSAS6 nachgewiesen werden konnte.

Die Akkumulation der Fbxw5 Proteinspiegel erfolgt am Ende der G1-Phase, wenn Plk4 und hSAS6 bereits exprimiert sind. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt das Start Signal für die Phosphorylierung von Nucleophosmin durch Cdk2/ Zyklin E (Okuda, 2002). Durch die anschließende Translokation dieses Proteins vom Zentrosom beginnt Plk4 mit der Beladung von hSAS6 und weiterer zentrosomaler Proteine, die für die Prozentriolformation wichtig sind. In dieser Hypothese würde die Kinase Fbxw5 inaktivieren, damit kein zu früher Abbau von hSAS6 und damit eine Blockierung der Zentriolduplikation, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Kleylein-Sohn et al. 2007), stattfindet. Die bereits in der Literatur beschriebene transiente Assoziation von hSAS6 mit der Prozentriole (Kleylein-Sohn et al. 2007) lässt sich durch den Abbau von Fbxw5 erklären. Sobald die Prozentriolformation begonnen hat und alle nachfolgenden Faktoren, wie beispielsweise CEP135, CPAP und γ -Tubulin auf die nun wachsende Tochterzentriole geladen wurden (Kleylein-Sohn et al. 2007), wird hSAS6 nicht mehr benötigt und kann abgebaut werden. Dieses ist notwendig, da hSAS6 als „Saatkorn“ für die sich neubildende Prozentriole angesehen wird (Kleylein-Sohn et al. 2007) und bei Fehlregulation für die Bildung multipler Tochterzentriolen verantwortlich ist. Dieser Abbau von hSAS6 wird durch die in der Literatur bereits beschriebene Degradation von Plk4 in der S-Phase (Korzeniewski et al. 2009) hervorgerufen. Das F-box Protein Fbxw5 wird nicht mehr durch die Kinase inaktiviert und kann somit einen funktionellen SCF-Komplex bilden, der wiederum die Aktivität von hSAS6 reguliert. Wird nun Plk4 überexprimiert, hat dieses einen Anstieg der hSAS6 Proteinspiegel zur Folge (Le Clech, 2008), da Fbxw5 keine funktionelle E3-Ligase mehr bilden kann. Die hier vorliegende Arbeit konnte entsprechen zu dieser Veröffentlichung die Stabilisierung der hSAS6 Proteinspiegel nach Plk4 Überexpression bestätigen, sowie zusätzlich einen Anstieg der Spiegel nach Fbxw5 siRNA Transfektion zeigen. In dieser Arbeit konnte zudem bewiesen werden, dass bei Überexpression von Plk4 der Abbau von hSAS6 inhibiert wird und dass diese Reduzierung abhängig von der Kinaseaktivität ist. Betrachtet man die oben beschriebenen Ergebnisse, dann unterstützen sie die Hypothese, dass Plk4 die Interaktion von hSAS6 und Fbxw5 reguliert. Eine der wenigen offenen Fragen, die jedoch bleibt, ist, wie genau diese Regulation funktioniert. Da es sich bei Plk4 um eine Kinase handelt, liegt die Vermutung nahe, dass eines der beiden Proteine durch diese phosphoryliert wird. In Veröffentlichungen über die Interaktion von Plk4 und hSAS6 ist beschrieben, dass die Kinase zwar für die Stabilität dieses Proteins

notwendig ist (Kleylein-Sohn et al. 2007; Strnad et al. 2007), dass diese Stabilisierung aber phosphorylierungs-unabhängig erfolgt (Strnad et al. 2007). Um dieses zu überprüfen wurden von Gunnar Wenninger aus unserer Arbeitsgruppe Sequenzanalysen von Fbxw5 im Hinblick auf mögliche konservierte Bereiche, die von Plk4 als Phosphorylierungsstellen verwendet werden könnten, durchgeführt. Es konnten hierbei acht mögliche Bereiche ermittelt werden, von denen drei Sequenzen (AA 147 – 155; AA 196 – 204 und AA 340 – 348) eine fast 100 %ige Übereinstimmung mit der Konsensus-Substrat Sequenz von Plk4 aufwiesen. Weitere Analysen bezüglich der Lage dieser Bereiche ergaben, dass AA 340 – 348 mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche liegen und somit für eine mögliche Interaktion zugänglich wären. Um die bereits in ersten Vorversuchen auftretende verminderte Mobilität in der Elektrophorese nach Plk4 Zugabe definieren zu können, wurden die präzipitierten Proteine aufgeteilt und einmal mit und einmal ohne Phosphatase behandelt. Phosphatasen sind die molekularen Antagonisten der Kinasen. Sie sind in der Lage die von Kinasen verursachten Phosphorylierungen rückgängig zu machen. Somit ist zu erwarten, dass, wenn die durch Plk4 Zugabe induzierte Retardation im Gel von Fbxw5 phosphorylierungsabhängig ist, durch die Phosphatasebehandlung verringert werden kann. Dieses konnte in Zusammenhang mit der Phosphatasebehandlung bestätigt werden, da ein spezifischer Rückgang dieses Effektes detektiert werden konnte.

Zur Identifizierung möglicher Phosphorylierungsstellen wurden zum Schluss dieser Arbeit noch zwei unterschiedliche Versuchsansätze gestartet. Für die MASDAQ-Analyse wurde der Ansatz für die Co-Immünpräzipitationsexperimente vergrößert, damit genug Material für die sich anschließenden Schritte zur Verfügung gestellt werden kann. Die Banden wurden mittels Coomassiefärbung detektiert und anschließend zu Dr. Andreas Pich zur Analyse in die Massenspektrometrie gegeben, um tatsächlich phosphorylierte Bereiche von Fbxw5 zu identifizieren. Bei Fertigstellung dieser Arbeit lagen noch keine verwertbaren Ergebnisse vor, da die Analysen noch andauerten. Die zweite Möglichkeit zur Identifizierung möglicher Phosphorylierungsstellen in Fbxw5 wäre, die in der Sequenzanalyse ermittelten Phosphorylierungs-Konsensusstellen so zu verändern, dass keine Phosphorylierung erfolgen kann.

7.7 Modell zur Funktion und Regulation von Fbxw5 im Zentrosomen- duplikationszyklus

Anhand der in dieser Arbeit zusammengetragenen Ergebnisse kann für die Funktion und Regulation von Fbxw5 das unter Abb. 52 dargestellte Modell erstellt werden.

Das humane F-box Protein Fbxw5 bildet zusammen mit Cul1 und Skp1 einen SCF-Komplex, der die Bildung multipler Tochterzentriolen durch den Abbau eines oder mehrerer Substrate verhindert. Der SCF^{Fbxw5} bleibt bis zum Übergang der G2/M Phase aktiv, wo er dann durch den Abbau des F-box Proteins durch den APC/C^{Cdc20} auseinanderfällt. Hierdurch sind die beiden vollkommen funktionsfähigen Zentrosomen vom Duplikationsblock befreit und können während der Mitose auf die nächste Runde des Zentrosomenzyklus vorbereitet werden.

Bisher konnte durch diese Arbeit noch nicht geklärt werden, ab wann und wie lange der SCF-Komplex auf der sich neubildenden Tochterzentriole verweilt. Hierfür sind weiterführende Versuche nötig.

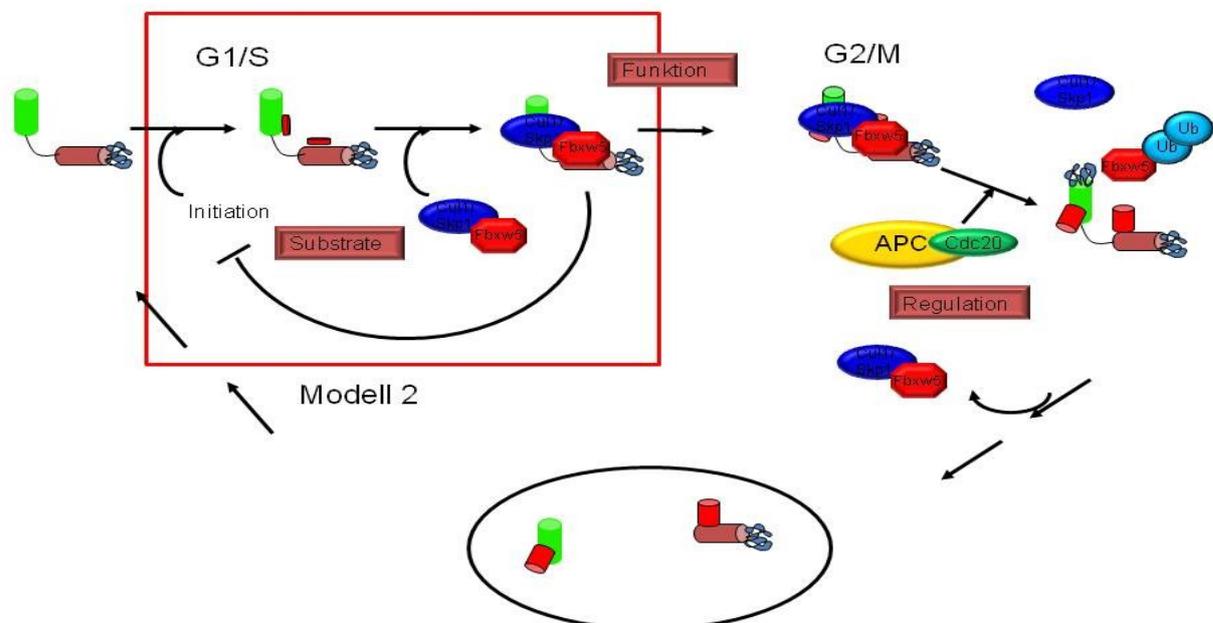


Abb.52: Modell zur Funktion und Regulation des humanen F-box Proteins Fbxw5 im Zellzyklus.

Mit dem zentrosomalen Protein hSAS6 wurde ein zentrosomales Substrat von Fbxw5 identifiziert. Es konnte nicht nur eine Interaktion beider Proteine gezeigt werden, sondern zusätzlich eine Fbxw5 abhängiger Abbau *in vivo*. Dabei konnte für Fbxw5 der Bereich der Interaktion mit hSAS6 auf die vorletzte WD40 Wiederholung eingegrenzt werden. In weitergehenden Versuchen zeigte sich ein deutlicher Einfluss von Plk4 auf die Stabilität bzw. die Ubiquitinilierung von hSAS6. Da in der Sequenz von Fbxw5 Plk4 Konsensus-Phosphorylierungsstellen zu finden sind, und aufgrund erster Experimente kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Aktivität von Fbxw5 gegenüber hSAS6 möglicherweise durch Plk4 abhängige Phosphorylierung reguliert wird.

Fasst man alle in dieser Doktorarbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich Fbxw5, seinem Substrat und dessen Regulierung zusammen, kann man, wie in Abb. 53 dargestellt, folgendes Modell erstellen:

Das Startsignal für die Initiation der Zentrosomenduplikation erfolgt durch die Phosphorylierung von Nucleophosmin durch Cdk2/ Zyklin E (Okuda, 2002). Plk4 beginnt daraufhin mit der sequentiellen Beladung von hSAS6, CPAP, CEP135 und γ -Tubulin (Kleylein-Sohn et al. 2007). Gleichzeitig inaktiviert die Kinase das F-box Protein Fbxw5, damit kein zu früher Abbau von hSAS6 und als Folge eine Blockierung der Duplikation der Tochterzentriolen (Kleylein-Sohn et al. 2007) stattfindet. Nach erfolgter Prozentriolformation wird Plk4 durch einen SCF-Komplex abgebaut (Korzeniewski et al. 2009). Das F-box Protein Fbxw5 wird daraufhin nicht mehr durch die Kinase inaktiviert und kann somit einen funktionellen SCF-Komplex bilden. Dieser Abbaukomplex reguliert die hSAS6 Proteinspiegel direkt an der Prozentriole und verhindert dadurch die Bildung multipler Tochterzentriolen. Dieser Kontrollmechanismus wird bis zum Übergang der G2/M-Phase aufrechterhalten, bis Fbxw5 durch den APC/C^{Cdc20} abgebaut wird. Während der nun folgenden Mitose kann die Zelle sich auf die nächste Zentrosomenduplikation vorbereiten.

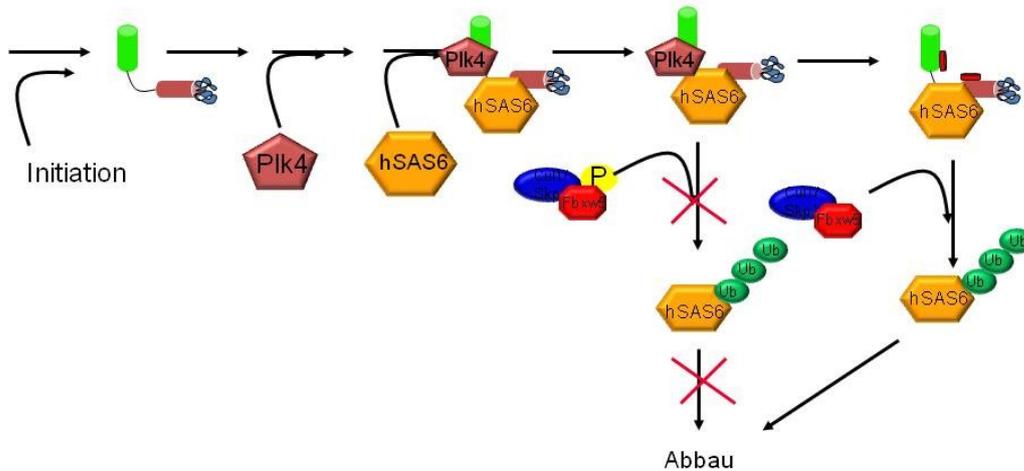


Abb. 53: Modell der Interaktion von hSAS6 und Fbxw5 durch Plk4.

Zur weiteren Abrundung des Modells wäre es von Interesse zu analysieren wann und wo diese Wechselwirkungen zwischen Plk4 und Fbxw5 stattfinden könnte durch die bisher durchgeführten Versuche noch nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit, den Ort der Interaktion zu ermitteln, bestünde in der Verwendung einer Kinase, bei der das Zentrosomenlokalisierungssignal mutiert ist. Auch könnten Zeitkurvenexperimente, bei denen durch siRNA Fbxw5 und/oder Plk4 ausgeschaltet ist, Aufschluss auf die hSAS6 Proteinlevel geben.

Zur weiteren Aufklärung der Funktion von Fbxw5 wäre der nächste Schritt in diesem Projekt die Etablierung einer induzierbaren Fbxw5 knockout Maus. Durch diesen Versuchsansatz besteht die Möglichkeit direkt den Verlust des F-box Proteins im lebenden Organismus zu untersuchen.

Es konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden, ob die Fehlregulation im Zentrosomenzyklus Ursache oder Folge der Tumorentstehung ist (Srsen und Merdes et al. 2006, Parvin et al. 2006). Jedoch konnte für viele zentrosomale Proteine eine Veränderung ihrer Proteinspiegel in Tumoren festgestellt werden (Wang und Zhan, 2007). Zur Beantwortung dieser Fragestellung könnte die Fbxw5 knockout mit

anderen bereits etablierten knockout Mäusen wichtiger Zellzyklusregulatoren, wie beispielsweise p53 verpaart werden, um einen möglichen Zentrosomenduplikationskontrollpunkt zu identifizieren.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

Adams IR, Kilmartin JV. (1999). Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145, 809 – 823.

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570 – 574.

Azimzadeh J, Bornens M. (2007). Structure and duplication of the centrosome. *J. of Cell Science* 120, Issue 13, 2139 – 2142.

Baie C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW. (1996). SKP1 connects Cell Cycle Regulators to the Ubiquitin Proteolysis Machinery through a Novel Motif, the F-Box. *Chromosoma* 110, 381 – 392.

Balczon RC. (2001). Overexpression of cyclin A in human HeLa cells induces detachment of kinetochores and spindle pole/centrosome overduplication. *Chromosoma* 110, 381 – 392.

Balczon R., Bao L, Zimmer WE, Brown K, Zinkowski RP, Brinkley BR. (1995). Dissociation of centrosome replication events from cycles of DNA synthesis and mitotic division in hydroxyurea-arrested Chinese hamster ovary cell. *Journal of Cell Biology* 130, 105 – 115.

Basel D, DePaepe A, Kilpatrick MW, Tsipouras P. (2003). Split hand foot malformation is associated with a reduced level of Dax1 gene expression. *Clin. Genet.* 64, 350 – 354.

Bettencourt-Dias M, Rodrigues-Martins A, Carpenter L, Riparbelli M, Lehmann L, Gatt MK, Carmo N, Balloux F, Callaini G, Glover DM. (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Current Biology* 15, Issue 24, 2199 – 2207.

Bettencourt-Dias M, Glover DM. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 451 - 463.

Birmingham A., Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville E, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS, Khovorova A. (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nature Methods* 3, 199 – 204.

Blow JJ, Dutta A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* 6, 476 – 485.

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Marajan K. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704 – 1708.

Bornens M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Current opinion in cell biology* 14, Issue 1, 25 – 34.

Brotz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Durr P. (1996). Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol. Cell Biol.* 16, No. 7, 3401 - 3409.

Burton JL, Solomon MJ. (2000). Hsl1p, a Swe1p Inhibitor, Is Degraded via the Anaphase-Promoting Complex. *Mol. Cell Biol.* 20, 4614 – 4625.

Byers B, Goetsch L. (1974). Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 38, 123 – 131.

Cardozo T, Pagano M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nature Reviews: Mol. Cell Biol.* 5, 739 – 751.

Carrano AC, Eytan E. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biol* 1, 193 – 199.

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

Chretien D, Buendia B, Fuller SD, Karsenti E. (1997). Reconstruction of the centrosome cycle from cryoelectron micrographs. *J. Struc. Biol.* 120, 117 – 133.

Cunha-Ferreira I, Rodrigues-Martins A, Bento I, Riparbelli M, Zhang W, Laue E, Callaini G, Glover D, Bettencourt-Dias M. (2009). The SCF/Slimb Ubiquitin Ligase Limits Centrosome Amplification through Degradation of SAK/Plk4. *Current Biology* 19, 1 – 7.

Le Clech M. (2008). Role of CAP350 in Centriolar Tubule Stability and Centriole Assembly. *PLoS ONE* 3, 1 – 8.

Dammermann A, Muller-Reichert T, Pelletier L, Habermann B, Desai A, Oegema K. (2004). Centriole assembly requires both centriolar and pericentriolar material proteins. *Dev. Cell* 7, 815 – 829.

D'Assoro AB, Lingle WL, Salisbury JL. (2002). Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21, Number 40, 6146 - 6153.

Del Pozo JC, Estelle M. (2000). F-box proteins and protein degradation: An emerging theme in cellular regulation. *Plant Molecular Biology* 44, 123 – 128.

Deshaies RJ. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15, 435 – 467.

Dicthenberg JB, Zimmerman W, Sparks CA, Young A, Vidair C, Zheng Y, Carrington W, Fay FS, Doxsey SJ. (1998). Pericentrin and γ -tubulin Form a Protein Complex and Are Organized into a Novel Lattice at the Centrosome. *J. Cell Biol.* 141, No 1, 163 – 174.

Doxsey S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nature reviews Molecular Cell Biology* 2, Issue 9, 688 – 698.

Doxsey SJ, Stein P, Evans L, Calarco PD, Kirschner M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 76, Issue 4, 639 – 650.

Duensing A, Liu Y, Perdreau SA, Kleylein-Sohn J, Nigg EA, Duensing S. (2007). Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* 26, Issue 43, 6280 – 6288.

Di Fiore B, Pines J. (2008). Defining the role of Emi1 in the DNA replication-segregation cycle. *Chromosoma* 117, 333 – 338.

Fisk HA, Mattison CP, Winey M. (2003). Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci* 100, 14875 – 14880.

Freed E., Lacey KR, Huie P, Lyapina SA, Deshaies RJ, Stearns T, Jackson PK. (1999). Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle. *Genes & Development* 13, Issue 17, 2242 – 2257.

Fry AM, Merladi P, Nigg EA. (1998). A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle. *Embo J.* 17, 470 – 481.

Galan JM, Peter M. (1999). Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96, 9124 – 9129.

Ge S, Skaar JR, Pagano M. (2009). APC/C and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation. *Cell Cycle* 8, 167 – 171.

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

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. (2001). Atrogin—1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 14440 – 14445.

Guardavaccaro D, Pagano M. (2003). Oncogenic aberrations of cullin-dependent ubiquitin ligases. *Oncogene* 23, 2037 – 2049.

Habedanck R, Stierhof YD, Wilkinson CJ, Nigg EA. (2005). The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nature Cell Biology* 7, Issue 11, 1140 – 1146.

Hansen DV, Hsu JY, Kaiser BK, Jackson PK, Eldridge AG. (2002). Control of centriole and centrosome cycles by ubiquitination enzymes. *Oncogene* 21, Issue 40, 6209 – 6221.

He YJ, McCall CM, Hu J, Zeng Y, Xiong Y. (2006). DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to Cul4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes & Dev.* 20, 2949 – 2954

Hermans D. (2006). F-box proteins: more than baits for the SCF?. *Cell. Div.* 1, 1 – 30.

Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, Hershko A. (2001). *Cancer.* Issue 91, 1745 – 1751.

Hinchcliffe EH, Li C, Thompson EA, Maller JL, Sluder G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg. *Science* 283, 851 – 854.

Hinchcliffe EH und Sluder G. (2001). Centrosome duplication: Three kinases come up a winner! *Current Biology*, Volume 11, Issue 17, R698 - R701.

Hinchcliffe EH, Miller FJ, Cham M, Khodjakov A, Sluder G. (2001). Requirement of a Centrosomal Activity for Cell Cycle Progression Through G1 into S Phase. *Science* 23, Vol. 291, Number 5508, 1547 – 1550.

Hinchcliffe EH und Sluder G. (2001). „It takes two to tango“: understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes & Development* 15, Issue 10, 1167 – 1181.

Hoffmann A, Preobrazhenska O, Wodarczyk C, Medler Y, Winkel A, Shahab S, Huylebroek D, Gross G, Verschueren K. (2005). Transforming Growth Factor- β -activated Kinase-1 (TAK1), a MSAP3K, Interacts with Smad Proteins and Interferes with Osteogenesis in Murine Mesenchymal Progenitors. *JBC* 23, 27271 – 27283.

Huang J, Raff JW. (1999). The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in *Drosophila* cells. *The EMBO journal* 18, Issue 8, 2184 – 2195.

Hubbard EJ, Wu G, Kitajewski J, Greenwald I. (1997). Sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes & Dev.* 11, 3182 – 3193.

Hsu JY, Reimann JD, sorenson CS, Lukas J, Jackson PK. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nat. Cell Biol.* 4, 358 – 366.

Hu J, Zacharek S, He YJ, Lee H, Shumway S, Duronio RJ, Xiong Y. (2008). WD40 protein Fbw5 promotes ubiquitination of tumor suppressor TSC2 by DDB1-Cul4-ROC1 ligase. *Genes & Development.* Vol. 22, 866 – 871.

Jaspersen SL und Stearns T. (2008). Exploring the pole: an EMBO conference on centrosomes and spindle pole bodies. *Nature Cell Biology* 10, 1375 – 1378.

Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes and Development* 18, 2573 – 2580.

Khodjakov A, Rieder CL. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *The Journal of cell biology* 153, Issue 1, 237 – 242.

Kipreos ET, Pagano M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology* 1, 3002.1 – 3002.7.

Kleylein-Sohn J, Westendorf J, Le Clech M, Habedanck R, Stierhof YD, Nigg EA. (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Developmental Cell* 13, Issue 2, 190 – 202.

Ko MA, Rosario CO, Hudson JW, Kulkarni S, Pollet A, Dennis JW, Swallow CJ. (2005). Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis. *Nature Genetics* 37, Issue 8, 883 – 888.

Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, Keyomarsi K, Chu C, Harper JW, Elledge S. (2001). Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Cyclin E by the SCFFbw7 Ubiquitin Ligase. *Science*. 294, No. 5540, 173 – 177.

Korzeniewski N, Zheng L, Cuevas R, Parry J, Chatterjee P, Anderton B, Duensing A, Münger K, Duensing S. (2009). Cullin1 Functions as a centrosomal suppressor of Centriole Multiplication by Regulating Polo-like Kinase 4 protein levels. *Cancer Research* 69,

Kudo Y., Guardavaccaro D, Santamaria PG, Koyama-Nasu R, Latres E, Bronson R, Yamasaki L, Pagano M. (2004). Role of F-box protein β Trcp1 in mammary gland development and tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8184 – 8194.

Kuntziger T, Bornens M. (2000). The centrosome and parthenogenesis. *Current topics in developmental biology* 49, 1 – 25.

Kuriyama R, Borisy GG. (1981). Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J. Cell Biol.* 91, 814 – 821.

Kuriyama R, Terada Y, Lee KS, Wang CLC. (2007). Centrosome replication in hydroxyurea-arrested CHO cells expressing GFP-tagged centrin2. *Journal of Cell Science* 120, 2444 – 2453.

Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. (1999). Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 2817 – 2822.

Landen CN, Lin YG, Immaneni A, Deavers MT, Merritt WM, Spannuth WA, Bodurka DC, Gershenson DM, Brinkley WR, Sood AK. (2007). Overexpression of the Centrosomal Protein Aurora-A Kinase is Associated with Poor Prognosis in epithelial Ovarian Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 13, 4098 – 4104.

Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P. (2006). F-box proteins everywhere. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 631 – 638.

Lee DH und Goldberg AL. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for biologists. *Trends Cell Biol.* 8, 397 – 403.

Leidel S, Delattre M, Cerutti L, Baumer K, Gönczy P. (2005). SAS-6 defines a protein family required for centrosome duplication in *C.elegans* and in human cells. *Nat. Cell Biol.* 7, 115 – 125.

Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL. (1998). Centrosome hypertrophy in human breast tumors: Implications for genomic stability and cell polarity. *PNAS* 95, Number 6, 2950 - 2955.

Liu X, Erikson RL. (2002). Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc. Natl Acad Sci USA* 99, 8672 – 8676.

Lloyd C, Chan J. (2006). Not so divided: the common basis of plant and animal cell division. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 7, Issue 2, 147 – 152.

Loncarek J, Hergert P, Magidson V, Khodjakov A. (2008). Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. *Nature Cell Biology* 10, Issue 3, 322 – 328.

Luders J, Stearns T. (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 8, Issue 2, 161 – 167.

Ma N., Matsunaya S, Takata H, Ono-Maniwa R, Uchiyana S, Fukui K. (2007). Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *Journal of Cell Science* 120, 2091 – 2105.

Machida YJ, Dutta A. (2007). The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes & Dev.* 21, 184 – 194.

Maniatis T. (1999). A ubiquitin ligase complex essential for the NF- κ B, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. *Genes & Dev.* 13, 505 – 510.

Masuda K, Masuda R, Neidhart M, Simmen BR, Michel BA, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. (2002). Molecular profile of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis depends on the stage of proliferation. *Arthritis Re.* 4, R8.

Matsumoto Y, Hayashi K, Nishida E. (1999). Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Current Biology* 9, No 8, 429 - 432.

McDonald HB, Byers B. (1997). A Proteasome Cap Subunit Required for Spindle Pole Body Duplication in Yeast. *J. Cell Biol.* 137, Issue 3, 539 – 553.

Meraldi P, Lukas J, Fry AM, Bartek J, Nigg EA. (1999). Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-Cyclin A. *Nat. Cell Biol.* 1, 88 – 93.

Mikule K, Delaval B, Kaldis P, Jurczyk A, Hergert P, Doxsey S. (2006). Loss of centrosome integrity induces p38—p53—p21-dependent G1—S arrest. *Nat. Cell Biol.* 9, 160 - 170.

Minoda Y, Sakurai H, Kobayashi T, Yoshimura A, Takaesu G. (2009). An F-box protein, FBXW5, negatively regulates TAK1 MAP3K in the IL-1 β signaling pathway. *Biochem. And Biophys. Research Communications* Vol. 381, Issue 3, 412 – 417.

Mizuno T, Chou MY, Inouye M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81, 1966 – 1970.

Moritz M, Braunfeld MB, Sedat JW, Alberts B, Agard DA. (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378, 638 – 640.

Murray AW. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221 – 234.

Murphy T. (2003). *Drosophila* skpA, a component of SCF ubiquitin ligases, regulates centrosome duplication independently of cyclin E. *Journal of Cell Science* 116, 2321 – 2332.

Nigg EA. (2002). Centrosome aberration: cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer* 2, 1 – 10.

Nilsson J, Yekezare M, Minshull J, Pines J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat. Cell Biol.* 10, 1411 – 1420.

Okuda M. (2002). The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 21, 6170 – 6174.

Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K. (2008). Nucleophosmin/B23 Is a Target of CDK2/Cyclin E in Centrosome Duplication. *Cell* 103, Issue 1, 127 – 140.

Pagano M. (1997). Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB Journal* 11, 1067 – 1075.

Paintrand M, Moudjou M, Delacroix H, Bornens M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: their sensitivity to divalent cations. *J. Struc. Biol.* 108, 107 – 128.

Patton EE, Willems AR, Tyers M. (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genetics* 14, Issue 6, 236 – 243.

Pause A, Peterson B. (1999). Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCul-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/Fbox protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 9533 – 9538.

Peel N, Stevens NR, Basto R, Raff JW. (2007). Overexpressing centriole-replication proteins in vivo induces centriole overduplication and de novo formation. *Curr. Biol.* 17, 834 – 843.

Pelletier L, O'Toole E, Schwager A, Hyman AA, Muller-Reichert T. (2006). Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 444, 619 – 623.

Pelletier L. (2007). Centrioles: duplicating precariously. *Current Biology* 17, Issue 17, R770 – R773.

Peters JM. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol.* 10, Issue 6, 759 – 768.

Pfleger CM, Kirschner MW. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14, 655 – 665.

Piel M, Nordberg J, Euteneuer U, Bornens M. (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* 291, Issue 5508, 1550 – 1553.

Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. (1998). Centrosome Defects and Genetic Instability in Malignant Tumors. *Cancer Research* 58, 3974-3985

Pihan GA, Wallace J, Zhou Y, Doxsey S. (2003). Centrosome Abnormalities and Chromosome Instability Occur Together in Pre-invasive Carcinomas. *Cancer Research* 63, 1398 – 1404.

Prigent C, Glover DM, Giet R. (2005). *Drosophila* Nek2 protein kinase knockdown leads to centrosome maturation defects while overexpression causes centrosome fragmentation and cytokinesis failure. *Exp. Cell Research* 303, Issue 1, 1 – 13.

Rodrigues-Martins A, Bettencourt-Dias M, Riparbelli M, Ferreira C, Ferreira I, Callaini G, Glover DM. (2007). DSAS-6 Organizes a Tube-like Centriole Precursor, and Its Absence Suggests Modularity in Centriole Assembly. *Current Biol.* 17, 1465 – 1472.

Rogers GC, Rusan NM, Roberts DM, Peifer M, Rogers SL. (2006). The SCF^{Slimb} ubiquitin ligase regulates Plk4/Sak levels to block centriole reduplication. *JCB* 184, 225 – 239.

Sankaran S, Parvin JD. (2006). Centrosome Function in Normal and Tumor Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 99, 1240–1250.

Schnackenberg BJ, Khodjakov A, Rieder CL, Palazzo RE. (1998). The disassembly and reassembly of functional centrosomes in vitro. *PNAS* 95, Number 16, 9295 – 9300.

Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan Z, Finnin MS, Elledge SJ, Harper JW, Pagano M, Pavletich NP. (2000). Insights into SCF Ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*: Issue 408, 381 – 386.

Secko D. (2009). Protein Phosphorylation: A Global Regulator of Cellular Activity. *The Science Creative Quarterly*. Issue:4, 1.

Seki A, Fang G. (2007). CKAP2 Is a Spindle-associated Protein Degraded by APC/C-Cdh1 during Mitotic Exit. *JBC* 282, 15103 – 15113.

Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge S, Harper JW. (1997). F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell* 91, 209 – 219.

Sluder G, Hinchcliffe EH. (1999). Control of centrosome reproduction: the right number at the right time. *Biology of the cell* 91, Issue 6, 413 – 427.

Sonnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume AM, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E. (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434, 462 – 469.

Sontheimer EJ. (2005). Assembly and Function of RNA silencing complexes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 127 – 138.

Soucek T, Pusch O, Wienecke R, DeClue JE, Hengstschläger M. (1997). Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. Loss of the tuberous sclerosis gene-2 induces quiescent cells to enter S phase. *J Biol. Chem.* 1997 46, 29301 – 29308.

Soucek T, Rosner M, Miloloza A, Kubista M, Cheadle JP, Sampson JR, Hengstschläger M. (2001). Tuberous sclerosis causing mutants of the TSC2 gene product affect proliferation and p27 expression. *Oncogene* 20, 4904 – 4909.

Srsen V und Merdes A. (2006). The centrosome and cell proliferation. *Cell Division* 2006, Issue 26,

Srsen V, Gnadt N, Dammermann A, Merdes A. (2006). Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. *J Cell Biol.*, 174 (5), 625 – 630.

Stearns T, Kirschner M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* 76, Issue 4, 623 – 637.

Stearns T, Evans L, Kirschner M. (1999). γ -Tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65, Issue 5, 825- 836.

Stearns T. (2001). Centrosome Duplication: A Centriolar Pas de Deux. *Cell* 105, Issue 4, 417 – 420.

Strnad P, Leidel S, Vinogradova T, Euteneuer U, Khodjakov A, Gönczy P. (2007). Regulated HsSAS-6 Levels Ensure formation of a Single Procentriole per Centriole during the Centrosome Duplication Cycle *Dev. Cell* 13, 203 – 213.

Tachibana KE, Gonzalez MA, Guarguaglini G, Nigg EA, Laskey RA. (2005). Depletion of licensing inhibitor geminin causes centrosome overduplication and mitotic defects. *EMBO Reports* 6, 1052 – 1057.

Tang CJ, Fu RH, Wu KS, Hsu WB, Tang TK. (2009). CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length. *Nat. Cell. Biol.* 11, Vol: 7, 825 – 831.

Tian B, Bevilacqua PC, Diegelman-Parente A, Mathews MB. (2004). The double-stranded-RNA-binding motif: Interference and much more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 1013 – 1023.

Tomari Y, Zamore PD. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes and Development* 19: 517 – 529.

Tsou MF, Stearns T. (2006). Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* 442, Issue 7105, 947 – 951.

Uetake Y und Sluder G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a "tetraploidy checkpoint". *JCB* 165, Number 5, 609 - 615.

van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530 – 536.

Vidwans SJ, Wong ML, O'Farrell P. (1999). Mitotic Regulators Govern Progress through Steps in the Centrosome Duplication Cycle. *J. Cell Biology* 147, Issue 7, 1371 – 1378.

Vidwans SJ, Wong ML, o'Farrell PH. (2003). Anomalous centriole configurations are detected in *Drosophila* wing disc cells upon Cdk1 inactivation. *Journal of Cell Science* 116, 137 – 143.

Vorobjev IA, Chentsov YS. (1982). Centrioles in the cell cycle. in Epithelial cells. *J. Cell Biol.* 98, 938 – 949.

Wakefield JG, Huang JY, Raff JW. (2000). Centrosomes have a role in regulating the destruction of cyclin B in early *Drosophila* embryos. *Current biology* 10, Issue 21, 1367 – 1370.

Wang Y, Zhan Q. (2007). Cell Cycle-dependent Expression of Centrosomal Ninein-like Protein in Human Cells Is Regulated by the Anaphase-promoting Complex. *JBC* 282, 17712 – 17719.

Willems AR, Goh T, Taylor L, Chernushevich I, Shevchenko A, Tyers M. (1999). SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 354, 1533 – 1550.

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

Wojcik EJ, Glover DM, Hays TS. (2000). The SCF ubiquitin ligase protein slimb regulates centrosome duplication in *Drosophila*. *Current Biology* 10, Issue 18, 1131 – 1134.

Wong C und Stearns T. (2003). Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication. *Nat. Cell Biology* 5, Number 6, 539 – 544.

Wu G, Lyapina S, Das I, Li J, Gurney M, Pauley A, Chui I, Deshaies RJ, Kitajewski J. (2001). SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol.Cell.Biol.* 21, 7403 – 7415.

Xiaoqing Liu JY, Yue G, Adamian M, Bulgakov O, Li T. (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J.Cell Biol.* 159, 431 – 440.

Yiang MY, Zheng Y. (2005) Aurora A Kinase-Coated Beads Function as Microtubule-Organizing Centers and Enhance RanGTP-Induced Spindle Assembly. *Current Biology* 15, Issue: 23, 2156 – 2163.

Yiuchi J, Machida J, Hamlina L, Dutta A. (2005). Right Place, Right Time, and Only Once: Replication Initiation in Metazoans. *Cell* 123, Issue 1, 13-24.

Yun C, Cho H, Kim S-J, Lee J-H, Park SY, Chan GK, Cho H. (2004). Mitotic Aberration coupled With Centrosome Amplification Is Induced by Hepatitis B Virus X Oncoprotein via the Ras-Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Pathway. *Molecular Cancer Research* 2, 159 – 169.

Zheng Y, Jung MK, Oakley BR. (1991). Gamma-Tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65, Issue 5, 817 – 823.

Zheng Y, Wong ML, Alberts B, Mitchison T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ -Tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578 – 583.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anja Puklowski, geb. Golly
Geburtsdatum: 08. Januar 1981
Geburtsort: Wolfenbüttel
Familienstand: verheiratet

Bildungsgang

1987 – 1991 Grundschule Weddel, Landkreis Wolfenbüttel
1991 – 1993 Orientierungsstufe Volkmarode, Braunschweig
1993 – 1997 Ricarda – Huch – Gymnasium
Braunschweig

1997 – 1998 Austauschschülerin in den USA
Paradise – High – School, Kalifornien
Abschluss: 12. Klasse

1998 – 2000 Ricarda – Huch – Gymnasium
Braunschweig
Abschluss: Abitur

Okt. 2000 – 17.06.2005 Immatrikulation an der TU Braunschweig
Studiengang: Biotechnologie
Anfang 2004 Studienarbeit im Bereich Mikrobiologie
in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Kornelia
Smalla an der Biologischen Bundesanstalt in
Braunschweig mit dem Thema „Charakterisierung
von Streptomyceten aus kubanischen Böden“

Oktober 2004 – März 2005

Diplomarbeit im Labor Haar und Kopfhaut bei der Firma Beiersdorf AG in Hamburg mit dem Thema „Vergleichende Untersuchung der Zytotoxizitätseffekte von Wirkstoffen auf Haut- und Haarzellen und Klärung der Funktionalität des nukleären Rezeptors PPARgamma“

September 2005 – Juli 2009

Leibniz Universität Hannover
Eingeschrieben im Promotionsstudiengang Biologie
Doktorandin bei Herrn Prof. Dr. med. Nisar Malek am Institut für Molekularbiologie der Medizinischen; Anfertigung dieser Doktorarbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. med. Nisar Malek.

Praktikum

05. Juni – 07. Juli 2000

Freiwilliges Praktikum an der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig bei Frau Dr. Smalla im Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit

Berufliche Erfahrungen

August 2000 – September 2000

Institutshelferin im Bereich Mikrobiologie an der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig

Juli 2001 – November 2004

Institutshelferin im Bereich Mikrobiologie an der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig