

Die Funktion von Cyclin E in der Entstehung der chromosomalen Instabilität und Endoreduplikation

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

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Diplom-Ingenieurin (FH) Olga Weikum

geboren am 03.09.1978, in Pawlodar

2011

Referent: Prof. Dr. med. Nisar P. Malek

Korreferent: Prof. Dr. med. Lars Zender

Tag der Promotion: 29.07.2011

Zusammenfassung

Cyclin E ist ein evolutionär stark konserviertes Protein, das eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation hat. Seine Expression ist zyklisch und erreicht sein Maximum am G1/S-Übergang. Durch die Bindung und die Aktivierung seines Kinasepartners Cdk2 ist Cyclin E an der Phosphorylierung seiner Substrate und damit an der Aktivierung der S-Phase ausführenden Gene beteiligt. Eine Dysregulation von Cyclin E fördert die Tumorigenität in vielen humanen Geweben. In verschiedenen experimentellen Studien sind die onkogenen Eigenschaften von Cyclin E nachgewiesen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Endoreplikation und die genetische Instabilität als Folge der Cyclin E-Überexpression in Abhängigkeit der Cdk2-Bindung und -Aktivierung zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletion von Cdk2 zusammen mit der Cyclin E-Überexpression zur verstärkten Endoreplikation in Mausleber führten. Weiterhin begünstigte die Cyclin E-Überexpression die Entstehung der genetischen Instabilität, die sich in Mausleber u. a. durch die Bildung der multinukleären Zellen auszeichnete. Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen wurde eine Reihe von Cyclin E-Mutanten in diversen Zell-Systemen überexprimiert und die Auswirkungen auf den Zellzyklus beurteilt. Auch hier wurde festgestellt, dass die Kinase-aktivierende Funktion von Cyclin E nicht für die Endoreduplikation notwendig war. Die Analyse der Cyclin E Mutanten hinsichtlich der Binukleibildung bekräftigte die Kinase-unabhängige Funktion von Cyclin E bei der Entstehung der genetischen Instabilität. Einer der möglichen Mechanismen, der zur Re-Replikation führt, könnte die Stabilisierung des Präreplikationskomplexes sein. Alternativ könnte die Cyclin E –Überexpression zur Aktivierung des DNS-Schaden-Kontrollpunkts und damit zur Erhöhung der inhibierenden Cdk1-Phosphorylierung und zur Endoreplikation führen. Die Überexpression von Cyclin E könnte auch einen G2/M-Arrest als Folge der Inhibierung des APC/Cdh1-Ligase-Komplexes induzieren, der wahrscheinlich einen Zellzykluswiedereintritt ohne einer abgeschlossenen Zellteilung erlaubt. Bi- und Multinukleibildung ist eine Folge der inkorrekten Chromosomenverteilung. Daher wurde eine Funktion von Cyclin E in der Regulation

des mitotischen Kontrollpunktes oder der Zytokinese vermutet. Die Rolle von Cdk2 bei der Inhibierung der Endoreplikation und Multinukleibildung ist noch unklar, möglicherweise ist ihre Beteiligung an den DNS-Reparaturmechanismen der Grund für die schützende Funktion.

Summary

Cyclin E is a highly conserved protein and part of the basic cell cycle machinery. The oscillating expression of cyclin E achieves its maximum at the G1/S-transition. At this point in the cell cycle cyclin E binds and activates Cdk2. This protein complex phosphorylates several substrates and activates gene expression required for the initiation of S-phase. It has been reported that deregulation of cyclin E promotes tumorigenesis in several human tissues.

The aim of this work was to determine whether the endoreplication and genetic instability caused by cyclin E overexpression depend on its binding to and activation of Cdk2. An increase of endoreduplicating and multinucleated cells were observed in Cdk2-wildtype and -knockout mouse liver after cyclin E overexpression. To understand the molecular mechanisms several cyclin E mutants were overexpressed in diverse celllines and the observed phenotypes were analyzed. The results of this analysis confirmed that cyclin E overexpression leads to endoreplication and genetic instability independently of its binding to Cdk2. To explain how cyclin E can cause endoreplication several hypotheses were suggested. The cyclin E overexpression could support the stabilisation of the pre-replication-complex and as consequence re-initiate the DNA-synthesis and endoreplication cycles. Alternatively, the cyclin E overexpression could activate the DNA-damage checkpoint, which would lead to an increased inhibitory phosphorylation of Cdk1 and thereby promote endoreplication. The cyclin E overexpression could also arrest cells in G2/M-phase by an inhibition of APC/Cdh1 and might allow cells to enter the next cell cycle without a completed cell division. Genetic instability, observed in mouse liver and cell lines, was characterized by the accumulation of bi- and multinucleated cells. The polynucleated cells could arise from chromosome segregation defects. So we assume a disruptive function of cyclin E in the spindle assembly checkpoint or cytokinesis. The protecting property of Cdk2 in endoreplication and genetic instability is not clear, probably it has some function in a DNA-repair mechanism.

Cyclin E

Chromosomale Instabilität

Endoreduplikation

Cyclin E

Chromosomal instability

Endoreduplication

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Eukaryotischer Zellzyklus	1
1.2. Regulation des Zellzyklus	1
1.2.1. Das Grundprinzip der Zellzyklusregulation	1
1.2.2. Die Modelle und Kontrollmechanismen der Zellzyklusregulation.....	2
1.3. Cyclin E: Balance zwischen Funktion und Dysfunktion	7
1.3.1. Cyclin E-Funktionen am G1/S-Übergang.....	7
1.3.2. Cyclin E-Funktion in der Initiierung der DNS-Replikation	8
1.3.3. Regulation von Cyclin E durch Degradation	10
1.3.4. Funktion von Cyclin E in der Endoreplikation	13
1.3.5. Zellzykluskontrollpunkte dienen der Erhaltung der Genomintegrität.....	14
1.3.6. Cyclin E in der Tumorentwicklung.....	18
1.4. Ziel der Arbeit	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1. Puffer und Lösungen für die DNS-Extraktion, -Aufreinigung und Genotypisierung der Mausstämme	22
2.2. Puffer und Lösungen für die Virusamplifikation	23
2.3. Puffer und Lösungen für Immunhistochemie und Zellkernfärbung	24
2.4. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Analysen	25
2.5. Lösungen für Luziferase-Assay	27
2.6. Medien und Antibiotika	28
2.6.1. Antibiotika	28
2.6.2. Medien und Lösungen für Bakterien.....	28
2.6.3. Medien und Lösungen für Zellkulturen.....	28
2.7. Mausexperimente	29
2.7.1. Genotypisierung der Cdk2-Knockout Mäuse	29
2.7.2. DNS-Extraktion aus Schwanzbiopsie zur Genotypisierung der Mäuse ..	29
2.7.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	30

2.8. Virusarbeiten.....	31
2.8.1. Adenovirusamplifikation	31
2.8.2. Adenoviruspräparation	32
2.8.3. Titerbestimmung	32
2.8.4. Virusaufreinigung vor der Injektion – Dialyse.....	33
2.9. Arbeiten mit Zellen.....	34
2.9.1. Kultivierung und Passagieren von Zellen.....	34
2.9.2. Kryokonservierung von Zellen	35
2.9.3. Transiente Transfektion	35
2.9.4. Generation stabiler Zelllinien	36
2.9.4.1. Generation der stabilen Cyclin E-überexprimierenden HePa1-6 Zelllinie	36
2.9.4.2. Generation der stabilen induzierbaren HePa1-6 und NIH3T3 Zelllinien mit dem T-REx-System (Invitrogen).....	37
2.9.4.3. Durchführung des Luziferase-Assays.....	39
2.9.5. Synchronisierung der Zellen in der Metaphase	39
2.10. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse	39
2.10.1. Anti-Myc-AlexaFluor555-Färbung der Zellen für die FACS-Analyse	40
2.11. Proteinnachweis mit Westernblot und Immunpräzipitation	41
2.11.1. Vorbereitung Gesamtproteinlysate zur Analyse.....	41
2.11.1.1. Vorbereitung Gesamtproteinlysate aus Zellen	41
2.11.1.2. Vorbereitung Gesamtproteinlysate aus Mausleber	41
2.11.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem DC Protein Assay von BioRad nach Lowry.....	42
2.11.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)43	
2.11.4. Herstellung der Polyacrylamidgele und Elektrophorese	43
2.11.5. Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran	44
2.11.6. Ko-Immunpräzipitation von Proteinkomplexen	45
2.11.7. Histon-Kinaseassay	46
2.12. Färbungen	46
2.12.1. Immunfluoreszenzfärbungen	46

2.12.1.1. Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen	47
2.12.1.2. Immunfluoreszenzfärbungen der Parafinschnitte	47
2.12.1.2.1. β -Catenin-Färbung	48
2.12.1.2.2. BrdU-Färbung.....	48
2.12.2. Feulgen Färbung.....	49
2.13. Arbeiten mit Bakterien	50
2.13.1. Kultivierung von Bakterien	50
2.13.2. Transformation von Bakterien.....	50
2.13.2.1. <i>E.coli</i> -Transformation durch Hitzeschock	50
2.13.2.2. <i>E.coli</i> -Transformation durch Elektroporation	51
2.14. Arbeiten mit DNS	51
2.14.1. Klonierung.....	51
2.14.1.1. Restriktionsendonukleaseverdau von DNS	52
2.14.1.2. Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten an den 5'-Enden.....	53
2.14.1.3. Auffüllen von 3'-Enden mit Klenow	53
2.14.1.4. DNS-Präzipitation	54
2.14.1.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS.....	54
2.14.1.6. Ligation der DNS-Fragmente.....	55
2.14.2. Isolierung von Plasmid-DNS	56
2.14.2.1. Isolierung von Plasmid-DNS in kleinen Mengen (Minipräp)	56
2.14.2.2. Aufreinigung von Plasmid-DNA in großen Mengen mit CsCl ₂ - Methode (Maxipräp).....	56
3. Ergebnisse	58
3.1. Genotypisierung der Tiere	58
3.2. Cyclin E Überexpression in der Cdk2-Knockout und –Wildtyp-Maus nach der Virusinjektion	59
3.2.1. Cyclin E-Überexpression in Leberlysaten nach der Virusinjektion (Westernblot-Analyse)	61
3.2.2. Leberanalyse nach 4-tägiger Cyclin E-Überexpression.....	62
3.2.3. Leberanalyse nach 6-tägiger Cyclin E-Überexpression.....	65

3.3.	Charakterisierung der wt Cyclin E-Mutanten im transienten System.....	70
3.3.1.	Die ausgewählten Cyclin E Mutanten	74
3.4.	Charakterisierung der Cyclin E-Mutanten im stabilen System.....	77
3.4.1.	Nocodazolarrest in stabilen Hepa1-6 Zelllinien.....	77
3.5.	Charakterisierung der Cyclin E-Mutanten im stabilen induzierbaren System	80
3.5.1.	Cyclin E-Überexpression führt zur Akkumulation der polyploiden Zellen nach dem Nocodazolarrest.....	80
3.5.2.	Überexpression von Cyclin E und C8-Mutante in NIH3T3-Zelllinien induziert Polyploidisierung der Zellen	82
3.5.2.1.	Längerfristige Überexpression von Cyclin E und C8-Mutante führt zum Anstieg der polyploiden und multinukleären Zellen in NIH3T3-Zelllinien .	83
3.5.2.2.	Untersuchungen der Gründe der Entstehung multinukleären Zellen und Polyploidy	89
4.	Diskussion	93
4.1.	Endoreplikation und genetische Instabilität durch die Cyclin E-Überexpression sind unabhängig von der Cdk2-Bindung und -Aktivität	93
4.1.1.	Stabilisierung von PRK-Proteinen kann die Endoreplikation fördern.....	95
4.1.2.	Die Inhibierung der Cdk1-Kinaseaktivität kann zur Endoreplikation führen	96
4.1.3.	Endoreplikation als Folge des G2/M-Arrests	98
4.2.	Die Entstehung multinukleärer Zellen durch Cyclin E ist unabhängig von der Cdk2-Bindung und Aktivität	100
4.3.	Cdk2 und seine schützende Funktion während Endoreplikationszyklen und genetischen Instabilität.....	101
5.	Anhang	103
5.1.	Verbrauchsmaterialien	103
5.2.	Laborgeräte	103
5.3.	Verwendete Computerprogramme	104
5.4.	Organismen	105
5.4.1.	Zelllinien.....	105
5.4.2.	Bakteriensämme	105
5.4.3.	Mausstämme	105

5.5. Verwendete Antikörper	105
5.6. Verwendete Chemikalien	106
5.7. Abbildungsverzeichnis	109
5.8. Tabellenverzeichnis	110
6. Literaturverzeichnis	111
7. Danksagung	126
8. Lebenslauf.....	127

Abkürzungen

A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
dd	doppelt destiliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Dinatriumsalz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
et al.	und andere
FACS	Durchflusszytometer (englisch: fluorescence activated cell sorting)
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
m	milli

M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MOI	zahlenmäßiges Verhältnis infektiöser Partikel zu deren Zielzellen (englisch: multiplicity of infection)
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
n	nano
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
W	Watt

1. Einleitung

1.1. Eukaryotischer Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein hoch regulierter und konservierter Prozess, der das Zellwachstum und die Zellteilung einschließt. Der Zellzyklus ist morphologisch in zwei Phasen unterteilt: die Interphase und die Mitose. Die Interphase besteht aus der G1-, S- und G2-Phase. Die Mitose schließt die Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase ein. Am Ende der Mitose wird die Zelle in einem als Zytokinese bezeichneten Prozess getrennt. G steht für „Gaps“ oder Lücken und repräsentiert zwei Ruhephasen, von denen die eine zwischen dem Ende der Mitose und dem Anfang der DNS-Synthese (G1-Phase) und die andere zwischen dem Ende der DNS-Synthese und dem Anfang der Mitose (G2-Phase) liegt. In der G1-Phase überprüft die Zelle die Umgebungsbedingungen und die eigene Größe, in dieser Phase wird auch die Entscheidung über die DNS-Replikation und die Zellteilung getroffen. Bevor die Zelle in die Mitose eintritt, kontrolliert sie in der G2-Phase, ob die DNS-Synthese fehlerfrei abgeschlossen ist (Alberts 1994). Die Mitose beginnt mit der Prophase. Hier werden die Chromosomen kondensiert und die Zentrosomen bilden bipolare mitotische Spindel. Die Mikrotubuli der Spindel binden mit Hilfe von Kinetochoren an die Schwesterchromosomen, die Zellkernmembran wird zu diesem Zeitpunkt abgebaut. In der Anaphase werden die Schwesterchromosomen getrennt. In der Telophase wird Chromatin decondensiert und die Zellkernmembran bildet sich wieder aus. Die Zellteilung wird durch die Zytokinese abgeschlossen (McGowan 2003).

1.2. Regulation des Zellzyklus

1.2.1. Das Grundprinzip der Zellzyklusregulation

Das Prinzip der Zellzyklusregulation basiert auf einer sequentiellen Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk). Der Expressionsspiegel der Kinasen bleibt

während des gesamten Zellzyklus konstant, die Aktivierung der Kinasen hängt aber von den zyklisch exprimierten Cyclinen ab (Pines 1991). Die Progression durch die Zellzyklusphasen wird durch den Abbau der regulierenden Cycline gewährleistet (Abschnitt 1.3.3), womit sichergestellt wird, dass der Zellzyklus unidirektional verläuft. Die Bindung der Cycline an die Kinasen ist nicht nur für deren Aktivierung notwendig, sondern auch für die Substratspezifität bestimmend. Die Cycline werden unterschieden nach G1-Phase-assoziierten Cyclinen (Cyclin D und Cyclin E), S-Phase-Cyclinen (Cyclin E und A) und mitotischen Cyclinen (Cyclin B und A) (Murray 2004). Cycline weisen eine hochkonservierte, etwa 100 Aminosäuren große Sequenz, genannt Cyclin-Box, auf. Die Cyclin-Box ist notwendig, um die Cyclin-abhängigen-Kinasen (Cdk) zu binden und zu aktivieren. Cycline besitzen außerdem spezifische Aminosäuremotive, die als Substraterkennungssequenzen dienen. In den S-Phase-Cyclinen ist hierfür das MRAIL-Motiv verantwortlich (Schulman et al. 1998), das Substrate mit einer hydrophobischen Sequenz, die als RXL-Motiv bezeichnet wird (Adams et al. 1996). Die Bindungspartner der Cycline, die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk, cyclin dependent kinase) gehören zu der Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen. Ihre tertiäre Proteinstruktur weist eine kleine β -Faltblatt-reiche Amino-terminale Domäne und eine große hauptsächlich α -helikale Carboxy-terminale Domäne auf. Zwischen den beiden Domänen liegt das aktive Zentrum, zusammengesetzt aus dem „T-loop“ und der ATP-Bindungsstelle (Russo et al. 1996). Die Aktivierung der Kinasen erfolgt durch die Bindung der Cycline an die hochkonservierte PSTAIRE-Helix (Amino-terminale Domäne), was zur Konformationsänderungen in der Kinasestruktur (Verschiebung des „T-loop“ zum Carboxy-terminalen Ende) führt und dadurch den ATP-Transfer auf die Substratproteine erlaubt (Jeffrey et al, 1995).

1.2.2. Die Modelle und Kontrollmechanismen der Zellzyklusregulation

In der Abbildung 1.1 ist der schematische Ablauf des Zellzyklus mit den abwechselnden Cyclin /Kinase –Komplexen, welche die jeweilige Zellzyklusphase regulieren, dargestellt. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Zellzyklusphasen mit den regulierenden Cyclinen beschrieben. Die meisten Zellen eines höheren Organismus befinden sich in der G₀-Phase. Das ist eine Ruhephase,

Cyclin B-Cdk1-Komplex ist für die Chromosomenkondensation, die Auflösung der Kernmembran und den Aufbau des mitotischen Spindelapparates verantwortlich (Jackman & Pines 1997; Draetta & Beach 1988; Draetta et al. 1989; Yu 2008). Dabei aktiviert er auch einen großen Ubiquitin-Ligase-Komplex APC (Anaphase promoting complex), der durch die Ubiquitinierung und den anschließenden Proteasomabbau von Securin eine Cysteinprotease (Separase) freisetzt. Die Separase spaltet Cohesin, das zur Trennung der Schwesterchromosomen führt (Zachariae 1999; Peters 2002). Die Zellteilung wird in der Zytokinese abgeschlossen. Dabei wird ein so genannter kontraktiver Ring, bestehend aus Aktin- und Myosin-Proteinen gebildet, der sich schrittweise zusammenzieht und die Zellmembran nach innen drückt, so dass am Ende zwei Tochterzellen entstehen (Morgan 2007).

Das klassische Modell der Zellzyklusregulation (wie oben beschrieben) besagt, dass die Kinasen Komplexe mit Phasen-spezifischen Cyclinen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen bilden und dadurch die Koordination, Initiierung und Progression des Zellzyklus regulieren. Studien mit Knockout Mäusen liefern aber neue Einsichten und Aspekte der Zellzyklusregulation und Kompensierungsmechanismen. Cdk4/6-Kinasen haben, wie aus Studien mit Knockout-Mäusen bekannt ist, ähnliche Funktionen und können sich gegenseitig kompensieren (Satyanarayana & Kaldis 2009). Die Kinasen unterscheiden sich in der Gewebespezifität: so ist die Cdk4-Aktivität für die Proliferation von β -Zellen notwendig (Franklin et al. 2000), während Cdk6 für die Differenzierung von Blutzellen erforderlich ist (Malumbres et al. 2004). Die Aktivität der Cdk2-Kinase ist für die Zellzyklusprogression nicht absolut erforderlich. Wie in zwei Studien gezeigt wurde, ist der Cdk2-Knockout nicht letal, aber für die Entwicklung männlicher und weiblicher Keimzellen notwendig und damit auch essentiell für die Meiose (Ortega et al. 2003; Berthet et al. 2003). Die fehlende Cdk2-Aktivität wird durch Cyclin-Cdk1-Komplexe kompensiert (Aleem et al. 2005). Es gibt darüber hinaus Hinweise auf eine zellzyklusunabhängige Funktion von Cdk2 in den DNS-Reparaturmechanismen (Satyanarayana et al. 2008). Die einzige essentielle Kinase ist Cdk1, deren Deletion zur Letalität im sehr frühen Stadium der Embryogenese führt. Durch die Zellzyklusdefekte konnten die Embryonen kein Morula- oder Blastozyststadium erreichen. Cdk1 ist aber in der Lage als einzige Kinase den Zellzyklus in Abwesenheit der anderen Kinasen (Cdk2, Cdk4, Cdk6 und Cdk3) zu regulieren

(Santamaria et al. 2007). Somit können drei Modelle der Zellzyklusregulation aufgestellt werden: In einem „klassischen Modell“ werden die Zellzyklusereignisse durch die abwechselnde Aktivität der Cyclin-Kinase-Komplexe gesteuert. In einem „essentiellen Modell“ wird der Zellzyklus durch die Aktivität der Cdk1-Kinase vorangetrieben und in einem „spezialisierten Modell“ nehmen neben Cdk1 zusätzliche Kinasen je nach Zelltyp an der Zellzyklusregulation teil (Malumbres & Barbacid 2009).

In der Abbildung 1.2 sind die grundlegenden Mechanismen der Regulation der Kinaseaktivität während des Zellzyklus dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wird das Maximum der Kinaseaktivität durch die Bindung des jeweiligen Cyclins erreicht. Durch inhibierende Phosphorylierungen oder Expression von Kinaseinhibitorproteinen hat die Zelle in jeder Zellzyklusphase die Möglichkeit in das Zellzyklusgeschehen einzugreifen.

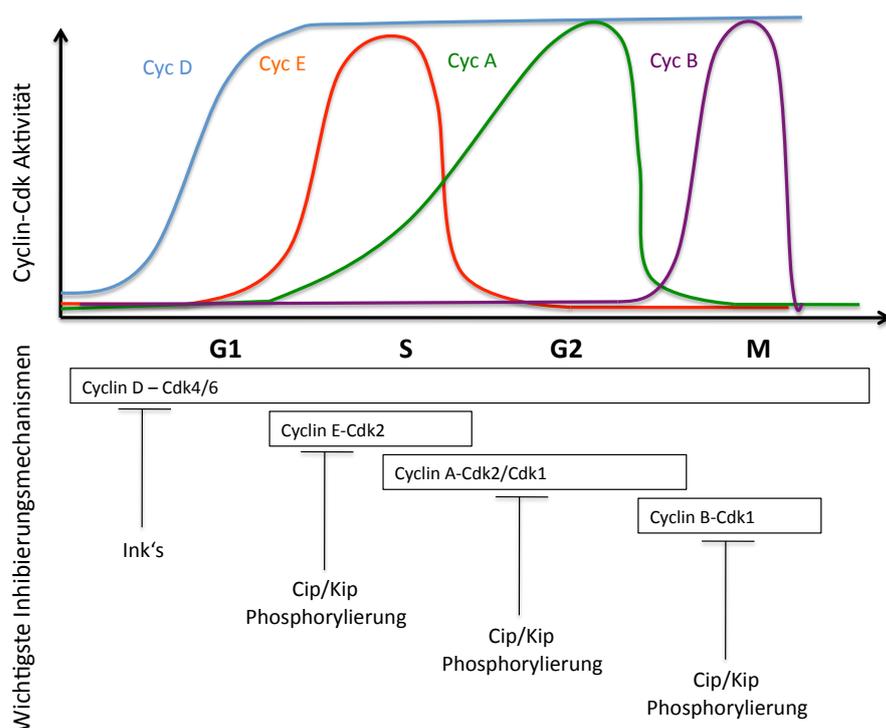


Abbildung 1.2: **Aktivitätsmuster der Cyclin-abhängigen Kinasen während des Zellzyklus.** Im oberen Teil sind die Aktivitätspaeks der jeweiligen Die Cyclin-Kinase-Komplexe dargestellt. Cyclin D-Expression ist von mitogenen Faktoren abhängig. Der untere Teil des Diagramms zeigt die Inhibierungsmechanismen der Kinasen (modifiziert nach McGowan 2003).

Es sind zwei inhibitorische Phosphorylierungsmotive und ein aktivierendes Phosphorylierungsmotiv der Cdk bekannt. Die vollständige Aktivierung der Kinasen wird durch die Phosphorylierung bestimmter Threonin-Reste (z.B. Thr-160 in Cdk2) innerhalb des „T-loops“ durch den Enzymkomplex der Cdk-aktivierenden Kinasen (CAK) erreicht. In eukaryotischen Zellen besteht der Cdk-aktivierende Enzymkomplex aus einer katalytischen Einheit (genannt p40^{MO15} oder Cdk7), einer regulatorischen Einheit (Cyclin H) und einem Assoziationsfaktor (MAT1). Die basale Aktivität der CAK bleibt während des gesamten Zellzyklus konstant (Kaldis 1999). In tierischen Zellen wird die Cdk-Aktivität durch die inhibitorische Phosphorylierung an Tyrosin- und Threoninreste (Tyr15 und Thr14) geblockt. Für die Phosphorylierungen sind die Enzyme Wee1 (Tyr15) und Myt1 (Tyr15 und Thr14) verantwortlich. Gegenspieler dazu sind die Phosphatasen der Familie Cdc25 (Morgan 2007). Neben den Cyclinen, welche die Aktivität und Substratspezifität der Kinasen definieren, kann die Kinaseaktivität auch durch verschiedene Zellzyklusinhibitoren reguliert werden. Die Inhibitoren binden an die Cyclin-Kinase-Komplexe und hindern sie damit an der Regulation des Zellzyklus. Es wurden zwei Familien der Inhibitor-Proteine identifiziert: Ink4 (Inhibitor of Kinase) und Cip/Kip (Cdk interacting protein/ Kinase inhibitory protein). Ink4 und Cip/Kip-Inhibitoren werden zu einer Gruppe von Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren (CKI) zusammengefasst. Vier Proteine der Ink4-Familie sind beschrieben worden: p16Ink4a (Serrano et al. 1993), p15Ink4b (Hannon & Beach 1994), p18Ink4c (Guan et al. 1994) und p19Ink4d (Chan et al. 1995). Diese Proteine zeichnen sich durch strukturelle Homologie, insbesondere dem Auftreten von Ankyrin-Wiederholungen aus. Jedes dieser Proteine kann die Cyclin D-assoziierte Kinase-Aktivität inhibieren (Vidal & Koff 2000). Drei Proteine zählen zu der Cip/Kip-Familie: p21Cip1, p27Kip1 und p57Kip2. Diese Proteine enthalten eine homologe inhibitorische Domäne. CKI dieser Familie binden an Cyclin-Cdk-Untereinheiten und modulieren damit die Aktivität von Cyclin D-, E-, A- und B-Cdk-Komplexen (Dulic et al. 1998; Sherr & Roberts 1999). Die Inhibition des Zellzyklus kann allerdings auch Cdk-unabhängig geschehen: p21 und p57 können die DNS-Synthese unterbrechen, indem sie PCNA (proliferating cell nuclear antigen) binden und inhibieren (Luo et al. 1995; Watanabe et al. 1998). p27 kann die DNS-Synthese auch durch Interaktion und Inhibierung von Mcm7 (minichromosome maintenance-7) verhindern (Nallamshetty et al. 2005).

1.3. Cyclin E: Balance zwischen Funktion und Dysfunktion

1.3.1. Cyclin E-Funktionen am G1/S-Übergang

Cyclin E ist in mehrere Prozesse am G1/S-Übergang involviert. Wie die Abbildung 1.1 zeigt, ist Cyclin E eine Komponente des Retinoblastoma-Wegs und setzt im Komplex mit Cdk2 die Phosphorylierung von Rb fort. Diese führt zur Dissoziation von E2F-Transkriptionsfaktoren und zur Aktivierung von Genstranskriptionen, die zur S-Phase-Regulation und -Ausführung benötigt werden. Cyclin E ist selbst ein Zielgen von E2F und sein Promotor enthält E2F-Bindestellen (Ohtani et al. 1995). Durch diesen positiven Rückkopplungsmechanismus wird seine Akkumulierung am G1/S-Übergang schnell erreicht. Durch die Phosphorylierung des Cdk2-Inhibitors p27 (Toyoshima & Hunter 1994) kann Cyclin E die Kinaseaktivität in der S-Phase regulieren und damit die S-Phase-Progression fördern. Die Initiierung der S-Phase kann aber auch Cdk2-unabhängig erfolgen. Wie von Matsumoto & Maller 2004 gezeigt wurde, besitzt Cyclin E eine 20 Aminosäuren große Zentrosomenlokalisationssequenz. Diese Sequenz ist wichtig für die Bindung von Cyclin E an Zentrosome, wodurch die Initiierung der DNS-Synthese ermöglicht wird. Das Cyclin E/Cdk2-Holoenzym reguliert die Histonbiosynthese durch eine Phosphorylierung der beiden Proteine NPAT (nuclear protein mapped to the AT locus) und CTB (CREB binding protein). CTB spielt eine Rolle bei der E2F-Aktivierung und ist genau wie NPAT für die Histonexpression notwendig (Zhao et al. 1998; Wie et al. 2003; Ait-Si-Ali et al. 1998; Ait-Si-Ali et al. 2000). Ein anderes Protein, NPM/B23 (Nucleophosmin), das an der Regulation der Zentrosomenduplikation beteiligt ist, gehört zu den Substraten von Cyclin E-Cdk2-Komplexen. NPM/B23 assoziiert zunächst mit den unduplizierten Zentrosomen. Durch die Cyclin E/Cdk2-abhängige Phosphorylierung von NPM/B23 in der G1-Phase dissoziiert NPM/B23 von den Zentrosomen und initiiert damit die Zentriolen- bzw. Zentrosomen-Duplikation (Okuda et al. 2000). Cyclin E interagiert und kolo-kalisiert an den Zentrosomen mit dem DNS-Replikationsfaktor Mcm5 (minichromosome maintenance). Der genaue Mechanismus ist noch unklar, aber durch diese Bindung wird die Zentrosomen-Überduplikation verhindert (Ferguson & Maller 2008). Die beschriebenen Cyclin E-Funktionen sind nochmals in der Abbildung 1.6 zusammengefasst.

1.3.2. Cyclin E-Funktion in der Initiierung der DNS-Replikation

Im folgenden Abschnitt wird genauer auf die Funktion von Cyclin E in der Initiierung der DNS-Synthese eingegangen. Wie in der Abbildung 1.3 gezeigt wird, kann Cyclin E die Bildung des Präreplikationskomplexes (PRK) sowohl beim G0/S- als auch beim G1/S-Übergang fördern. Im mitotischen Zellzyklus fängt der Prozess der DNS-Replikation mit dem Lizenzieren der Replikationsorigins an, was die Bildung des PRK am Replikationsorigin erfordert. Dieser Vorgang beginnt schon in der späten M-Phase mit der sequentiellen Bindung der ORC-Proteine (origin recognition complex), der beiden Lizenzierungsfaktoren Cdc6 (cell division cycle 6) und Cdt1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1) sowie des Helikase-Komplexes Mcm2-7 an die Replikationsursprünge. Mcm2-7 wird als letzter Proteinkomplex an das Chromatin gebunden und erfordert unbedingt die Anwesenheit von Cdc6 und Cdt1. Unter der Kontrolle der Cdk2- und Cdc7-Aktivität werden zusätzliche Faktoren an die Replikationsursprünge gebunden und PRK konvertiert zu einem Präinitiierungskomplex. Die Helikase wird aktiviert und separiert die DNS-Helix. An die entwundene Stelle kann die DNS-Synthesemaschinerie geladen werden und die DNS-Synthese kann beginnen (Abb. 3.3) (Bell & Dutta 2002; Machida et al. 2005; Morgan 2007). Bei der Bildung des PRK führen Cyclin E/Cdk2-Komplexe wichtige Funktionen aus: Die steigende Kinaseaktivität der Cyclin E/Cdk2-Komplexe in der G1-Phase führt zur Stabilisierung von Cdc6 durch die Phosphorylierung am Serin 54, zusätzlich wird die Transkription von Cdc6 und Mcm durch die E2F-Aktivierung angeregt. Die Phosphorylierung von Cdc6 verhindert seine Degradation durch den APC-Komplex, dies wiederum begünstigt die Bildung des PRKs und die Bindung von Mcm2-7 an Cdt1 (Mailand & Diffley 2005).

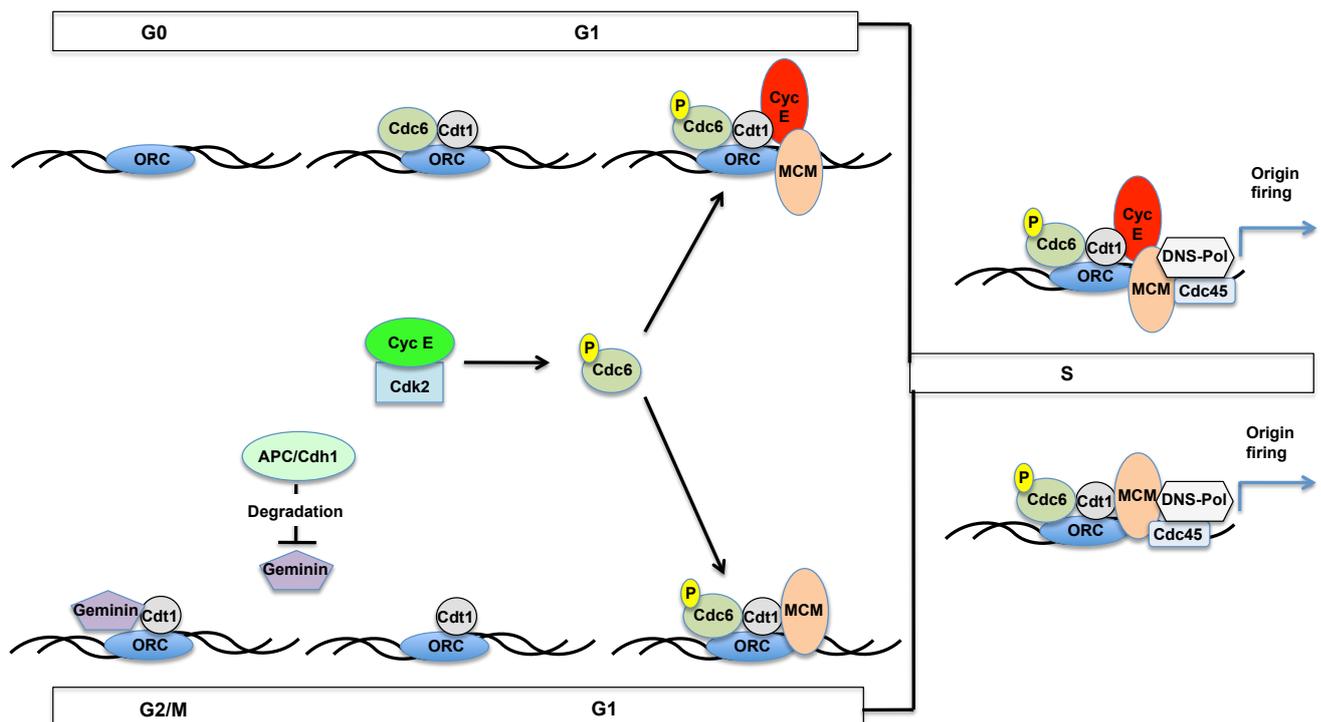


Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der Bildung des Präreplikationskomplexes und Initiierung der DNS-Synthese. Im oberen Teil ist die Bildung des PRK (Präreplikationskomplexes) am G0-S-Übergang dargestellt. Dabei wird die Bindung von Cyclin E an PRK benötigt, um den Helikasekomplex Mcm2-7 an das Origin zu laden. Im unteren Teil ist die Formation des PRK im kontinuierlichen Zellzyklus dargestellt. Die Degradation von Geminin durch den APC-Komplex erlaubt das Laden von Mcm an das Origin. Die Cyclin E/Cdk2-Aktivität wird in beiden Fällen für die Phosphorylierung von Cdc6 und die Initiierung der DNS-Synthese erforderlich (modifiziert nach Geng et al, 2007 und Duursuma & Agami, 2005).

Nachdem die DNS-Synthese initiiert wurde, wird der PRK aufgelöst. Dies dient vor allem der Inhibierung der DNS-Rereplikation und kann über mehrere Wege kontrolliert werden: Wie es in der Abbildung 1.3 gezeigt ist, wird die Reinitiation der Replikation durch die Bindung von Geminin an Cdt1 verhindert. Dadurch kann keine Interaktion zwischen Cdt1 und Mcm stattfinden (Wohlschlegel et al. 2000). Geminin akkumuliert während der S-, G2- und M-Phase. Am Übergang von Meta- zu Anaphase wird Geminin durch den APC-Ligase-Komplex ubiquitiniert und anschließend abgebaut (McGarry & Kirschner 1998). Die Phosphorylierung des zweiten lizenzierenden Faktors Cdc6 durch Cyclin A/Cdk2 bewirkt seinen nukleären Export (Petersen et al. 1999) und eine Degradation über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (APC/Cdh1) (Coverlay et al. 2000). Während der G2- und M-Phase verhindert

die Cdk-Aktivität die PRK-Bildung durch inhibitorische Phosphorylierungen an Orc1 (Li et al. 2004), Cdt1 (Sugimoto et al. 2004), Cdc6 (Petersen et al. 1999) und Mcm (Ishimi et al. 2000).

Lange Zeit wurde angenommen, dass Cyclin E ein essentielles Cyclin ist und sein Verlust zum Zellzyklusarrest führen würde. Mit der Generation der Cyclin E-Knockout-Maus wurde gezeigt, dass Cyclin E für den kontinuierlichen Zellzyklus überflüssig ist. Zwar starben die Mausembryonen nach dem embryonalen Tag 11,5 aufgrund einer Dysfunktion der Plazenta, doch konnten sie durch die tetraploide Komplementationstechnik bis zur Geburt am Leben erhalten werden. Die isolierten Cyclin E-Knockout-MEF (embryonale Mausfibroblasten) zeigten keine Proliferationsdefekte und unterschieden sich kaum vom Wildtyp (Geng et al. 2003). So stellte sich die Frage, warum Zellen Cyclin E exprimieren und welche der bekannten Cyclin E-Funktionen wirklich unerlässlich sind. Wie schon im Abschnitt 1.3.1 erwähnt wurde, gehören die Initiierung der S-Phase und der DNS-Replikation zu den primären Funktionen der Cyclin E/Cdk2-Komplexe. Allerdings wurden bei der Analyse der Cyclin E-Knockout MEF keine Defizite beobachtet: Das Rb-Protein war phosphoryliert, Zentrosomenduplikation, Histonbiosynthese sowie DNS-Replikation erfolgten normal. Somit wurde bestätigt, dass einige Cyclin E-Funktionen auch von anderen Proteinkomplexen z.B. Cyclin A-Cdk2 übernommen werden können. Die Cyclin E Expression war aber kritisch für den Wiedereintritt in den Zellzyklus, also für den G0/S-Übergang (Geng et al. 2003). Wie in der Abbildung 1.3 dargestellt ist, agiert Cyclin E während der G0-S-Progression am Chromatin. Durch die Interaktion von Cyclin E mit den Mcm2- und Mcm7-Proteinen konnte die Helikase an die Replikationsorigins geladen werden. In einer späteren Studie wurde gezeigt, dass das Laden der Origins unabhängig von der Cdk2-Aktivität erfolgte (Geng et al. 2007).

1.3.3. Regulation von Cyclin E durch Degradation

Wie es schon im Abschnitt 1.2.1 erklärt wurde, sind Cycline regulatorische Einheiten der Cyclin-abhängigen-Kinasen. Die Cyclin-Kinase-Komplexe kontrollieren den Zellzyklusverlauf durch Phosphorylierung und Aktivierung bzw. Inaktivierung ihrer Substrate. Damit die Zelle in die nächste Zellzyklusphase eintreten kann, ist die

Degradation von Cyclinen unbedingt erforderlich. Diese erfolgt über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Glotzer et al. 1991). Die Ubiquitinierung der Cycline wird von zwei E3-Ligase-Komplexen ausgeführt: SCF (Skip, Cullin, F-box) für G1/S-Cycline und APC/C (Anaphase-promoting complex / cyclosome) für die M-Phase-Cycline. Während die G1/S-Cycline für den Abbau durch Phosphorylierung markiert werden, besitzen die M-Phase-Cycline ein 9 Aminosäuren großes Motiv, genannt „Destruction-Box“ (RxxLxxlxN), das für die Erkennung durch die E3-Ligase verantwortlich ist (Pagano 1997; Glotzer et al. 1991). Es wird im Folgenden die Ubiquitinierung von Cyclin E genauer besprochen, da sie für diese Arbeit relevant ist.

Der proteolytische Abbau vieler Proteine lässt sich in zwei Schritte unterteilen: Zunächst wird das Protein durch eine Polyubiquitinkette markiert und anschließend proteolysiert. Das Ubiquitinierungssystem besteht aus drei Komponenten. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 bildet unter ATP-Spaltung eine energiereiche Thioesterbindung mit dem C-terminalen Gly-Rest des Ubiquitinproteins. Anschließend wird das Ubiquitin auf das Ubiquitin-verknüpfende Enzym E2 übertragen. Für die Substraterkennung ist ein weiteres Enzym notwendig, das als Ubiquitin-Protein-Ligase oder E3-Ligase bezeichnet wird. In einer weiteren Reaktion wird das aktivierte Ubiquitin vom E2 auf das Substrat übertragen, das an E3 gebunden ist. Durch die mehrmalige Wiederholung dieser Reaktion entsteht eine Polyubiquitinkette, die vom 26S-Proteasom erkannt wird und zur Degradation des Substrats führt (Lewin 2002). Die E3-Ubiquitin-Ligasen werden in drei Gruppen eingeteilt: Monomere mit der Ring-Finger-Domäne, Multiproteinkomplexe mit der Ring-Finger-Domäne und Ligasen mit HECT-Domänen (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus). Die meisten der Multiproteinkomplex-Ligasen mit einem Ring-Finger-Motiv, zu denen auch SCF- und APC-Ligasen gehören, enthalten ein Cullin-Protein (Cardozo & Pagano 2004), das zusammen mit der Ring-Finger-Domäne (Rbx1) das Rückgrat der Proteinligase bildet. Die Ring-Finger-Domäne ist für die Bindung der E2-Ubiquitin-Konjugate erforderlich. Acht Cullin-Proteine (Cul1-4a, -4b, -5, -7 und -9) wurden in humanen Zellen identifiziert. Für die Bindung an den Substratrezeptor benötigen einige Culline (Cul1, Cul2, Cul5 und Cul7) ein Adaptorprotein (Skp1 oder Elongin BC). Die Spezifität der Ligase wird durch eine große Vielfalt an F-Box-Proteinen (69 F-Box-Proteine in humanen Zellen) gewährleistet (Skaar & Pagano 2009).

Der Abbau von Cyclin E wird über zwei unterschiedliche E3-Ligase-Komplexe SCF/Fbw7 und Cullin 3 eingeleitet, die in der Abbildung 1.4 erläutert sind. Der Name SCF kommt von den drei Hauptkomponenten der Ligase: Skp1, Cullin, und F-Box. Die zwei Proteine Cullin 1 (Cul1) und Skp1 bilden eine Plattform, die das Substrat und das E2-Ubiquitin-Konjugat in räumliche Nähe zueinander bringen. Das F-Box Protein Fbw7 (F-box and WD repeat domain-containing 7) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der SCF-abhängigen Ubiquitinierung, indem es die Substrate spezifisch erkennt und bindet. Neben Cyclin E gehören auch Notch (Transmembranrezeptor) und die beiden Transkriptionsfaktoren Myc und Jun zu den Substraten von SCF/Fbw7 (Koep et al. 2001; Ye et al. 2004; van Drogen et al. 2006; Welcker & Clurman 2008). Wie in der Abbildung 1.4 gezeigt ist, wird das an Cdk2 gebundene Cyclin E vom F-Box-Protein Fbw7 erkannt und gebunden. Die Bindung zwischen Cyclin E und Fbw7 wird außerdem durch die Phosphorylierungen von Cyclin E am Threonin 380 (Thr 380) und Threonin 62 (Thr 62) reguliert (Won & Reed 1996; Clurman et al. 1996).

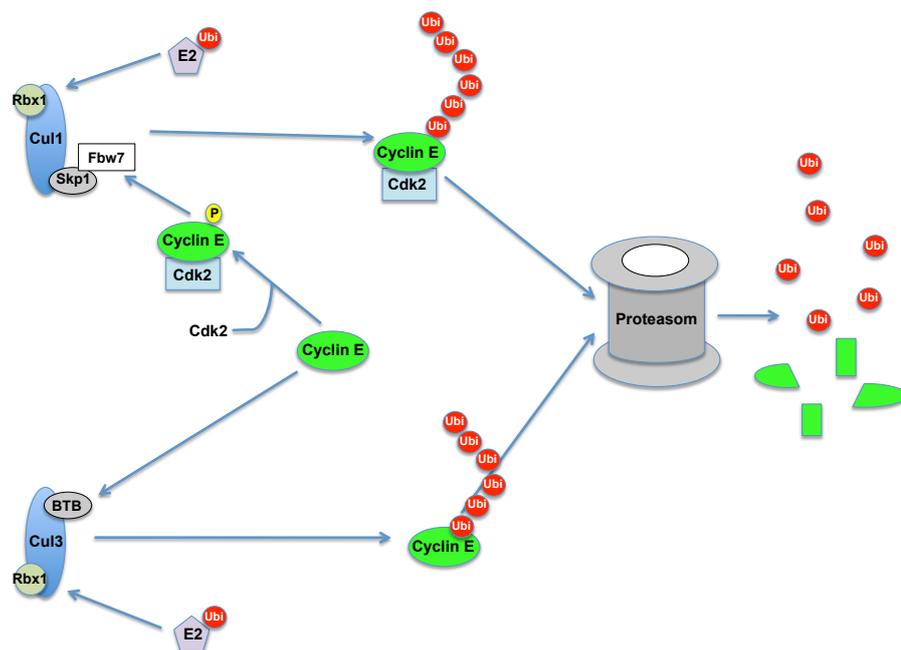


Abbildung 1.4: **Zwei Wege der Cyclin E-Degradation.** Die Cul1 und Cul3 –Ubiquitin-Ligasen sind an der Cyclin E-Degradation beteiligt. Das monomere Cyclin E wird durch die Cul3-Ligase und das an Cdk2 gebundene Cyclin E durch die Cul1-Ligase ubiquitiniert (modifiziert nach McEvoy 2007).

Das monomere Cyclin E wird vom Cul3-Ligase-Komplex erkannt und ubiquitiniert (Abb. 3.4). Diese Art der Ubiquitinierung benötigt keine Modifikationen an Thr380

oder Thr62 von Cyclin E (Singer et al. 1999). Die Cul3-Proteinligase bedient sich der großen Familie der BTB-Proteine als Substratadaptoruntereinheiten (Furukawa et al. 2003; Pintard et al. 2003; Xu et al. 2003). Der Abbau von Cyclin E ist nicht nur für die Zellzyklusprogression essentiell, seine Akkumulation, z.B. durch Mutationen in Cdc4 (Fbw7-Protein) oder Verlust von Cul3 fördert die Tumorentstehung. Solche Tumoren weisen Aneuploidie und genetische Instabilität auf, die durch verschiedene Funktionen von Cyclin E verursacht werden können (Kossatz et al. 2010). Als Gründe für die Aneuploidie und genetischen Instabilität können Endoreplikationszyklen und Defekte in den DNS-Schäden-Kontrollpunkten, die in den folgenden Abschnitten genauer besprochen werden, in Betracht gezogen werden.

1.3.4. Funktion von Cyclin E in der Endoreplikation

Wie schon im Abschnitt 1.3.2 beschrieben wurde, ist die Initiierung der DNS-Synthese eine der wichtigsten Cyclin E-Funktionen. Der Prozess der DNS-Replikation mit anschließender Zellteilung entspricht dem kanonischen Zellzyklus, der aus einer Abfolge der G1-, S-, G2-, und M-Phase besteht, wobei das Ergebnis diploide Zellen sind. Es gibt jedoch abweichende Zellzyklen, die zur Entstehung polyploiden Zellen führen. Endoploidie ist ein essentieller Prozess für die normale Entwicklung und Physiologie vieler Organismen (Lee et al. 2009). Unter dem Begriff der Endoreplikation werden verschiedene Mechanismen zusammengefasst (Endozyklen, Rereplikation, Endomitose), die zur Polyploidisierung von Zellen führen. Als Endozyklen werden Zellzyklen definiert, die nur aus S- und G-Phase bestehen. Endozyklische Zellen initiieren keine Mitose und zeigen keine mitotischen Merkmale wie z.B. kondensierte Chromosomen oder eine Auflösung der Kernmembran. Die Rereplikation kommt zustande, wenn während einer S-Phase die DNS von einem Replikationsursprung mehrmals synthetisiert wird. Während der Endomitose beginnen die Zellen zwar mit der Chromosomenkondensation, segregieren sie aber nicht. Stattdessen treten sie in einen G1-ähnlichen Zustand über und reinitiiieren die S-Phase. Die endomitotischen Zellen zeigen alle molekularen Merkmale einer frühen Mitose, wie z.B. Phosphorylierung von Histon H3 (Lee et al. 2009). Im folgenden Abschnitt wird auf die Funktion von Cyclin E bei der Endoreplikation eingegangen.

Cyclin E ist ein wichtiger Regulator der Endoreplikation in tierischen Zellen und Insekten. Während der Endozyklen der Drosophila-Larven oszilliert die Cdk-Aktivität und somit der Cyclin E-Spiegel mit einem Expressionsmaximum in der späten G- und der S-Phase. Die geringe Kinase-Aktivität erlaubt die Bildung des PRK in der G-Phase. In der S-Phase besteht die Funktion von Cyclin E/Cdk2 einerseits in der Initiierung der DNS-Replikation, andererseits verhindert der Komplex die Bildung des PRK und damit die Rereplikation (Sauer et al. 1995). In tierischen Zellen sind es Megakaryozyten, die während der terminalen Differenzierung durch Endomitose polyploid werden. Dabei wurde eine positive Korrelation zwischen der Cyclin E-Expression und der Cdc6-Stabilisierung beobachtet (Bermejo et al. 2002). Der gleiche Effekt wurde in einem transgenen Mausmodell für primäre Megakaryozyten beschrieben. Hier führte die Cyclin E-Überexpression u. a. zu einer Akkumulierung der PRK-Proteine Cdc6 und Mcm2 (Eliades et al. 2010). Weitere Hinweise für die essentielle Rolle von Cyclin E in der Endoreplikation lieferten zwei weitere Studien in denen die Cyclin E1/E2-Knockout-Maus verwendet wurde. Die beiden Gruppen zeigten, dass Cyclin E-Knockout Trophoblasten unfähig waren, die endoreplikativen Zyklen zu durchlaufen und damit die Ursache der frühen Letalität der Cyclin E-Knockout-Embryonen waren (Parisi et al. 2003; Geng et al. 2003).

Die Endoreplikation wurde auch in vielen Tumoren beobachtet. Polyploidie bietet einer Zelle mit chromosomalen Instabilität (CIN, Abschnitt 1.3.5) erhöhte Überlebenschancen, während eine diploide Zelle nach dem Verlust einiger Chromosomen höchstwahrscheinlich sterben würde (Storchova & Kuffer 2008). Im weiteren Verlauf konnten die Zellen in einem Deploidisierung genannten Prozess, wieder in den mitotischen Zellzyklus zurückkehren und die Aneuploidie und damit auch z.B. Verlust von Tumorsuppressorgene im Genom stabilisieren.

1.3.5. Zellzykluskontrollpunkte dienen der Erhaltung der Genomintegrität

Während des Zellzyklus oder der Wachstumsphasen werden Zellen vielen Faktoren ausgesetzt, die die DNS schädigen können. Dazu gehören u.a. Replikationsstress, DNS-Doppelstrangbrüche, aber auch freie Radikale, die während des zellulären Metabolismus entstehen und die DNS angreifen. Um die Genomintegrität zu erhalten

haben Zellen Kontrollmechanismen entwickelt, die die Struktur der Chromosomen überwachen, sowie die Zellzyklusprogression und Reparaturen koordinieren. Im Falle eines Schadens wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zum Zellzyklusarrest führt (Zhou & Elledge 2000). Die Cyclin E-assoziierten Zellzyklusdysregulationen zeigen einige Merkmale (wie Aneuploidie, Zentrosomenamplifikation und Tetraploidie) der Kontrollpunktdefekte. Es ist jedoch unklar, ob und welche der Kontrollpunkte betroffen sind und um welche Mechanismen es sich dabei handelt. Es wurden zwei Hypothesen aufgestellt, die die Entstehung der genetischen Instabilität und Aneuploidie durch den Überschuss an Cyclin E erklären sollen:

1. Die Cyclin E-Überexpression führt zur Beeinträchtigung der Mcm-Bindung an das Chromatin (Ekholm-Reed et al. 2004), was eine Verlängerung der S-Phase und Reduktion der DNS-Syntheserate zur Folge hat. Im weiteren Verlauf kann das z. B. zu Abbrüchen der Replikationsgabeln und damit zu DNS-Schäden führen. Alternativ können die Zellen in die Mitose eintreten, ohne die Chromosomenreplikation abzuschließen (Spruck et al. 1999; Hwang & Clurman 2005).
2. Durch die Cyclin E-induzierte Zentrosomenamplifikation können Fehler bei der Chromosomensegregation entstehen und in einer Aneuploidie resultieren (Hwang & Clurman 2005).

Die Kontrollpunkte und ihre Regulation werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Im Wesentlichen läuft die Signalkaskade wie folgt ab: DNS-Schäden werden von den beiden Sensor-Kinasen ATM (ataxia-telangiectasia mutated) und ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related) registriert. Dies aktiviert die beiden Serin/Threonin-Kinasen Chk1 und Chk2, die durch Phosphorylierung oder Aktivierung der Effektorproteine (z.B. Cdc25, p53) zum Zellzyklusarrest führen (Sancar et al. 2004). Auch das p53-Protein ist ein wichtiger Bestandteil der DNS-Schaden-Signaltransduktion. Seine Induktion leitet die Transkription von Proteinen ein, die an der Apoptose, Seneszenz und DNS-Reparatur beteiligt sind. Wie andere Proteine der DNS-Schaden-Signalkaskade, gehört p53 zu den Tumorsuppressoren, da seine mutierte, inaktive Form in vielen humanen Tumoren identifiziert wurde (Lowe et al. 2004). Die Abbildung 1.5 gibt eine vereinfachte Übersicht der DNS-Schaden-Kontrollkaskaden, die im folgenden Abschnitt besprochen werden. Das

Voranschreiten der G1- und S-Phase kann über zwei Signaltransduktionswege geblockt werden. Die aktivierte Chk2-Kinase phosphoryliert die Cdc25-Phosphatase, was zu ihrer Inaktivierung bzw. Degradation führt. Die Degradation der Cdc25A-Phosphatase stabilisiert die inhibitorische Phosphorylierung von Cdk2 (T15, Y14) und verhindert damit die Zellzyklusprogression (Donzelli & Draetta 2003). P53-Protein gehört auch zu der Kontrollpunktkaskade und wird durch DNS-Schäden stabilisiert. Seine Expression führt zur Transkription des p21-Proteins, das wiederum die Cdk2- bzw. Cdk4-Kinaseaktivität inhibiert (Bartek & Lukas 2001). Der G2/M-Kontrollpunkt verhindert die Initiierung der Mitose, wenn die DNS nicht vollständig repliziert ist oder Schäden aufweist. Die ausgelöste Signalkaskade führt über Chk1- und Chk2-Kinasen zur Inhibierung der Cyclin B/Cdk1-Kinaseaktivität. Die Aufrechterhaltung der inhibitorischen Phosphorylierung von Cdk1 an T15 und Y14 wird durch Inhibierung der Cdc25-Phosphatase und Aktivierung der Wee1-Kinase ausgeführt (Nurse 1997; Morgan 1995; Donzelli & Draetta 2003; Sancar et al. 2004). Zusätzlich sind auch andere Regulatoren von CyclinB/Cdk1 und Cdc25, wie PLK1 und PLK3 (Polo-like-kinasen), von der Kontrollpunkt-Kaskade betroffen (Xie et al. 2005).

Der mitotische Kontrollpunkt oder SAC (spindle assembly checkpoint) ist eine Signalkaskade, die den Zellzyklus in der Mitose anhält, wenn auch nur ein einziges Chromosom nicht an die mitotische Spindel angeheftet ist. Der Zellzyklusarrest wird durch die Inhibierung der APC/C-Aktivität erreicht (Abb. 1.5). Um die mitotischen Substrate erkennen zu können, benötigt APC/C die Bindung an einen spezifischen Faktor, Cdc20 (cell-division cycle protein 20). Nicht gebundene Kinetochore senden ein Signal aus, wodurch aktivierte Kontrollpunktproteine wie Mad2 (mitotic arrest deficient 2) und BubR1 (Bub1 related kinase) an Cdc20 binden. Damit verhindern sie die Ubiquitinierung von Cyclin B und Securin womit das Fortschreiten der Anaphase geblockt wird (Kops et al. 2005).

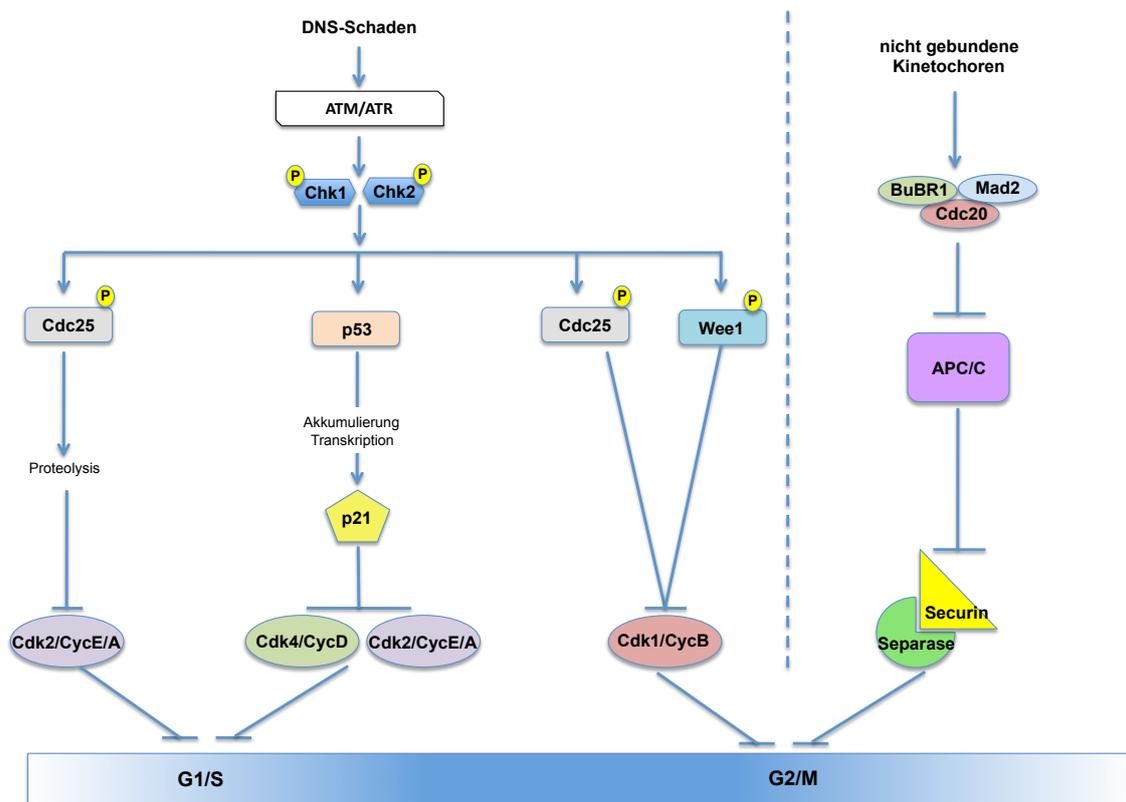


Abbildung 1.5: **Kontrollpunkte des eukaryotischen Zellzyklus.** Ein DNS-Schaden kann zum Zellzyklusarrest führen, indem er eine Signalkaskade induziert, die zur Inhibierung der Zellzyklus-regulierenden Kinasen führt. Der SAC (spindle assembly checkpoint) stoppt die Zellen in der Mitose, solange Chromosomen nicht an die mitotische Spindel gebunden sind. Die Inhibierung wird durch die Stabilisierung der APC/C-Substrate Cyclin B und Securin erreicht. Securin inhibiert die Separase (eine Protease) in der Degradation von Coesin, das die Schwesterchromosomen zusammen hält.

Wenn der DNS-Schaden irreparabel ist, können die Zellen entweder die Seneszenz oder Apoptose einleiten. Wenn die Zellen den Zellzyklusarrest überwinden, durch Kontrollpunktfehler oder -defekte, führt dies zur Akkumulation von Mutationen (GIN = genetic instability) und auch zur Zelltransformation und Onkogenese. Defekte im SAC verursachen eine ungleiche Verteilung des genetischen Materials (CIN = chromosomal instability) und fördern damit die Tumorprogression. Zentrosomale Unregelmäßigkeiten werden auch oft in Tumoren beobachtet. Die Zentrosome spielen eine zentrale Rolle in der Formation der bipolaren mitotischen Spindel, die für die fehlerfreie Chromosomensegregation essentiell ist. Die Zentrosomenamplifikation kann zur Bildung einer multipolaren Spindel führen und in einer anormalen Mitose und Aneuploidie resultieren (Malumbres & Barbacid 2009). Somit ist festzuhalten,

dass eine Inaktivierung der Kontrollpunkte die genetische Instabilität und damit auch die Tumorentstehung fördert.

1.3.6. Cyclin E in der Tumorentwicklung

Viele humane Tumoren überexprimieren entweder das Cyclin E-Protein oder seine mRNA. Dazu gehören Brustkarzinome, Karzinome des gastrointestinalen Trakts, Lungenkrebs, Hautkrebs und Sarkome (rev. in Donnellan & Chetty 1999). Die meisten dieser Tumore sind durch Aneuploidie und chromosomale Instabilität charakterisiert (Gewinn oder Verlust von Chromosomen), was für die Patienten oft einen aggressiven Krankheitsverlauf und eine schlechte Diagnose bedeutet (Rajagopalan & Lengauer 2004). Die Akkumulation von Cyclin E in diesen Tumoren kann entweder durch die Amplifikation der CCNE-Gene (Cyclin E-Proteine) oder die gestörte Cyclin E-Proteolyse durch Mutationen in hCDC4-Genen (Fbw7-Protein) verursacht werden (Courjal et al. 1996; Yan et al. 2006; Lee et al. 2006; Spruck et al. 2002). Mehrere Arbeitsgruppen haben Studien zu den molekularen Mechanismen der Aneuploidie und der Rolle von Cyclin E bei diesem Prozess durchgeführt. 1999 gelang es der Arbeitsgruppe von S.I. Reed zu zeigen, dass eine konstitutive Überexpression von Cyclin E in immortalisierten embryonalen Rattenfibroblasten und humanen Brustepithelzellen zur chromosomalen Instabilität (CIN) führt. Mit Hilfe der karyotypischen Analyse und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde sowohl ein Chromosomenverlust als auch –gewinn beobachtet. Eine Zentrosomenamplifikation, die häufig eine Ursache der CIN ist, wurde nicht detektiert (Spruck et al. 1999). Die Arbeitsgruppe von C. Lengauer konnte feststellen, dass hCdc4-Gene häufig in den kolorektalen Tumoren mutiert sind. Ein hCdc4-Knockout in kolorektalen Karzinomzelllinien (HCT116 und DLD1) führte zur chromosomalen Instabilität und Bildung von Multinuklei (Rajagopalan et al. 2004). In einer weiteren Studie wurde eine Korrelation zwischen Tetraploidy, Aneuploidy und CIN in den endoterminalen Tumoren beobachtet, wobei es allerdings einer gleichzeitigen Mutation der hCDC4-Gene und einer Hyperphosphorylierung von Cyclin E bedarf (Hubalek et al. 2004).

Um diese Phänotypen *in vivo* analysieren zu können, wurden mehrere Mausmodelle etabliert. In einer Studie von Bortner und Rosenberg wurde mit Hilfe einer transgenen Maus Cyclin E in den Brustdrüsen überexprimiert. Dies führte zur Entstehung von hyperplastischen Bereichen und in einigen Mäusen auch zur Tumorausbildung, die eine frühe Letalität zur Folge hatte. Es wurde eine erhöhte Cyclin E-assoziierte Kinaseaktivität in den Tumoren und Lymphomen der Mäuse festgestellt (Bortner & Rosenberg 1997). Wie schon im oberen Abschnitt erwähnt wurde, ist hCdc4 (Fbw7) ein Tumorsuppressor. Die Auswirkungen seiner Deletion sollten in einem Mausmodell untersucht werden. Allerdings konnte dieses Modell nicht zur Aufklärung der Tumorentstehung genutzt werden, da die Mausembryonen in einem frühen Entwicklungsstadium starben. Die frühe Letalität, die durch Defekte in der vaskulären und hämatopoetischen Entwicklung verursacht wurde, ließ sich auf eine Dysregulation von Notch zurückführen, eines Transmembran-Rezeptors, dessen Abbau auch durch Fbw7 eingeleitet wird (Tetzlaff et al. 2004). In einem weiteren Mausmodell wurde die Stabilisierung von Cyclin E durch die Mutation an Threonin 393 zu Alanin (Homolog zu humanem Threonin 380) erreicht, womit die Cyclin E-Degradation durch den SCF/Fbw7-Komplex verhindert werden konnte (Abschnitt 3.3.3). Cyclin E-Knockin-Mäuse entwickelten keine Anomalien und keine Tumore. Nur in Kombination mit dem Verlust von p53 zeigte sich eine beschleunigte Tumorbildung. Auch in den Cyclin E überexprimierenden embryonalen Fibroblasten wurde eine genetische Instabilität und Aneuploidie erst nach der Zerstörung des p53-p21-Signalwegs quantifiziert (Loeb et al. 2005). Der Verlust von p53 zusammen mit der Überexpression von Cyclin E induzierte ebenfalls eine Zentrosomenamplifikation und eine CIN in humanen Blasenkrebszellen (Kawamura et al. 2004). In der Abbildung 1.6 sind die bekannten Cyclin E-Funktionen und -Dysfunktionen zusammengefasst, dabei wurden zwischen Cdk2-abhängigen und unabhängigen Funktionen unterschieden.

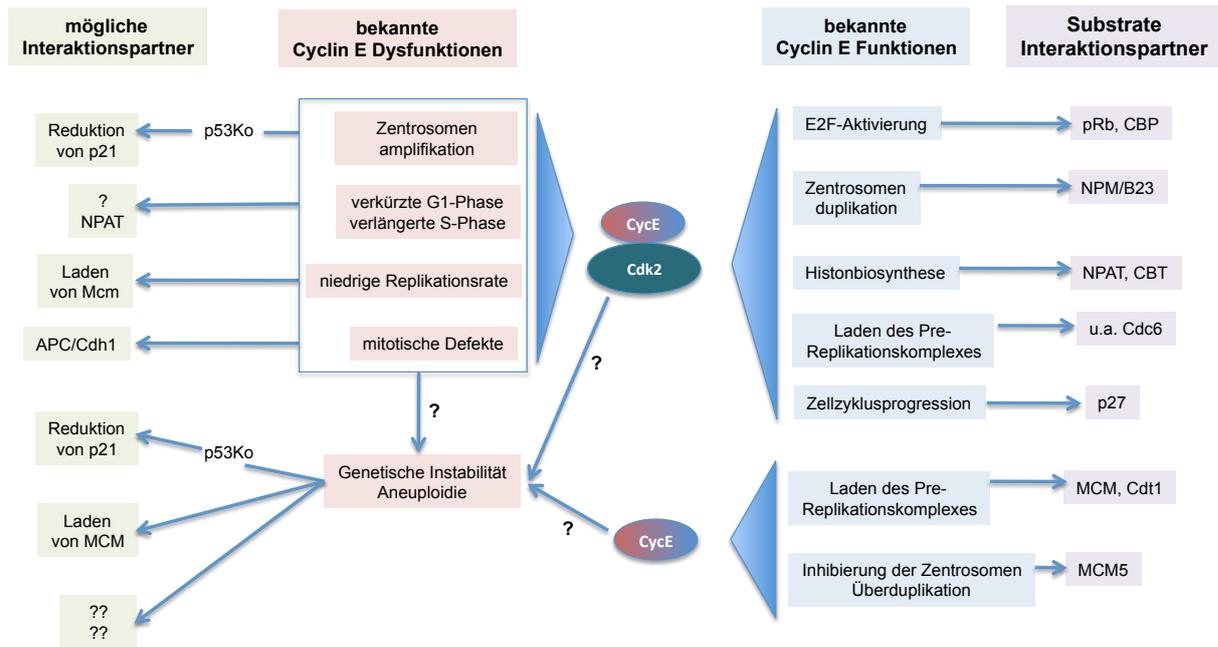


Abbildung 1.6: **Zusammenfassung der bekannten Funktionen und Dysfunktionen von Cyclin E.**

Es gibt noch keine ausreichende Erklärung für die Funktionen von Cyclin E in der Tumorentwicklung. In der Abbildung 1.6 sind die Ergebnisse der aufgeführten Studien zur Folgen der Cyclin E-Überexpression zusammengefasst. Sie zeigen, sowohl durch *in vivo*- als auch *in vitro*-Modelle, zahlreiche Zellzyklusdefekte, welche die Tumorentstehung fördern können. Die Fragen nach den möglichen Cyclin E/Cdk2-Substraten bzw. Cyclin E-Interaktionspartnern bleiben aber nach wie vor offen

1.4. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin die Abhängigkeit der chromosomalen Instabilität und Endoreduplikationszyklen von der Bindung von Cyclin E an Cdk2 (Cyclin-Abhängige-Kinase)-Komplexe sowie ihrer Aktivität zu untersuchen. Weiterhin sollte die Funktion von Cyclin E in der Entstehung der chromosomalen Instabilität und Endoreduplikationszyklen überprüft werden.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass die Cyclin E Überexpression eine Endoreplikation und Multinukleibildung in der Mausleber verursacht (McEvoy J.D., Kossatz U., Malek N., Singer J. D. 2007). Die Akkumulation von Cyclin E wurde hier durch Deletion von Cullin 3, einer E3-Ligase, erreicht. Wie im Abschnitt 3.3.3 beschrieben, ist Cullin 3 für den Abbau von monomerem Cyclin E notwendig. Die Ausbildung der Phänotypen in der Mausleber führte zu der Frage, ob das monomere Cyclin E für die Phänotypbildung verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese durch verschiedene Modelle untersucht. Zunächst wurde die Cdk2-Abhängigkeit des Phänotyps in einem *in vivo* Modell untersucht. Dafür wurden die Lebern von Cdk2-Knockout und Cdk2-Wildtyp Mäusen nach der Cyclin E Überexpression analysiert. Die Überexpression von Cyclin E wurde durch die Injektion des Cyclin E-exprimierenden Adenovirus erreicht. Die Phänotypbeschreibung erfolgte nach folgenden Parametern: Quantifizierung der Multinukleibildung, Proliferation und Ploidie der Kerne sowie die Untersuchungen der Regulation verschiedener Zellzyklusproteine. Es wurde auch die Abhängigkeit des Phänotyps von der Cyclin E-assozierten Kinaseaktivität untersucht. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten sollten molekularen Mechanismen identifiziert werden. Es wurden unterschiedliche Cyclin E-Mutanten bezüglich der Phänotypbildung und Kinaseaktivität untersucht. Im nächsten Schritt wurden stabile Zelllinien mit den geeigneten Mutanten generiert. Die Analyse der Mutanten schloss die Bewertung induzierter Phänotypen sowie die Auswirkung auf den Zellzyklus mit ein.

2. Material und Methoden

2.1. Puffer und Lösungen für die DNS-Extraktion, -Aufreinigung und Genotypisierung der Mausstämme

Proteinase K Puffer	10mM Tris pH 8,0 5mM EDTA pH 8,0 0,2% SDS 200mM NaCl
10xPCR-Puffer Invitrogen	200mM Tris-HCl, pH 8,4 500mM KCl
Lösung 1 (Maxi-und Minipräp)	25mM Tris, pH 7,5 10mM EDTA pH 8,0 50mM Glucose
Lösung 2 (Maxi- und Minipräp)	0,2 N NaOH 1% SDS
Lösung 3 (Maxipräp)	147g KAc 57,5ml Essigsäure auf 500 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Lösung 3 (Minipräp)	3M NaAc 11,5% Essigsäure
TE (Tris- EDTA-Puffer)	10 mM Tris 1 mM EDTA in H ₂ O, pH 7,5

10xTBE (Tris-Borat-EDTA)	890mM Tris 890mM Borsäure 20mM EDTA
10xDNS-Ladepuffer	50mM Tris, pH 8,0 50mM EDTA, pH 8,0 50% Glycerol 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol

2.2. Puffer und Lösungen für die Virusamplifikation

2x Lagerpuffer	80mM Tris pH8,0 100mM NaCl 1mM MgCl 5%Glycerol Frisch zusetzen 10% BSA; steril filtrieren
Dialysepuffer	100mM Tris pH 8,0 10mM MgCl 280mM NaCl
Gradientlösung I	13,25 g CsCl 20mM Tris, pH 7,5 auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Gradientlösung II	26,75 g CsCl 20mM Tris, pH 7,5

	auf 50 ml mit ddH ₂ O auffüllen
2 x HEPES-Puffer	274mM NaCl 42mM HEPES 1,5mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0
250 mM CaCl ₂	
10xPBS (Phosphate-buffered saline)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ auf 1l mit ddH ₂ O auffüllen

2.3. Puffer und Lösungen für Immunhistochemie und Zellkernfärbung

Sulfitwasser	0,5% Kaliumdisulfit 0,05M HCL
3,7 % Paraformaldehyd	14,8 g Paraformaldehyd 200 ml ddH ₂ O
DAPI-Stammlösung	1mg/ml in ddH ₂ O
DAPI-Lösung	1:9000 Verdünnung der DAPI-Stammlösung in PBS

DAPI-Puffer	5% FCS 0.5% Tween 3µg/ml DAPI 0.25 mg/ml RNase A in PBS
Propidiumiodid-Färbelösung	10µg/ml Propidiumiodid 0.25mg/ml RNase A in PBS
10xPBS (Phosphate-buffered saline)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 2,4 g KH ₂ P0 ₄ auf 1l mit ddH ₂ O auffüllen

2.4. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Analysen

RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl, pH 8,0 80mM NaCl 50mM NaF 20mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1mM EDTA 1mM EGTA 1% (w/v) NP-40 1% (w/v) DOC 0,1% (w/v) SDS
-------------	--

Proteaseinhibitoren	<p>2,5 U/ml Pepstatin A</p> <p>2,5 U/ml Leupeptin</p> <p>2,5U/ml Vanadat</p> <p>0,15 mM Benzamidin</p> <p>0,5% (w/v) Aprotinin</p>
4x-SDS-Probenpuffer	<p>2 % (w/v) SDS</p> <p>5 % (v/v) -Merkaptoethanol</p> <p>10 % (v/v) Glyzerol</p> <p>62 mM Tris</p> <p>0,00125 % (w/v) Bromphenolblau in H₂O, pH 6,8</p>
SDS-Gellaufpuffer	<p>250 mM Tris-HCl, pH 8,3-8,6</p> <p>1,92M Glycin</p> <p>1% (w/v) SDS</p>
Blotwasch-Puffer (TNT)	<p>150mM NaCl</p> <p>25mM Tris-HCl, pH7,5</p> <p>0,05%Tween 20</p>
Blocking-Lösung	<p>5% w/v Magermilchpulver in 1xTNT</p>
Transferpuffer	<p>25mM Tris</p> <p>190mM Glycin</p>

ECL Lösung 1	25mM Luminol 0,4mM p- Cumarsäure 100mM Tris- HCl, pH 8,5
ECL Lösung 2	100mM Tris- HCl 0,02% H ₂ O ₂
Histon-Waschpuffer	25mM Tris- HCl, pH 7,5 70mM NaCl 10mM MgCl ₂ 1mM DTT
Histon-Kinasepuffer	32µl Histon-Waschpuffer 0,1µg/µl Hintone H1 3µM ATP 3µM [32]P-ATP

2.5. Lösungen für Luziferase-Assay

Extraktionspuffer	25mM Tris pH 7,8 2mM EDTA 2mM DTT 10% Glycerol 1% Triton X-100
Messpuffer	25mM Glycylglycin 15mM MgSO ₄ x7H ₂ O 5mM ATP

2.6. Medien und Antibiotika

2.6.1. Antibiotika

Ampicillin	1000x	80mg/ml
Kanamycin	1000x	25mg/ml
Puromycin		10mg/ml
Blasticidin		1mg/ml
Zeocin		100mg/ml

2.6.2. Medien und Lösungen für Bakterien

LB (Laura-Bertani)-Medium	10 g NaCl 10 g Casein-Hydrolysat 5 g Hefe-Extrakt auf 1l mit ddH ₂ O auffüllen, pH 7,2
LB-Agar	15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium

2.6.3. Medien und Lösungen für Zellkulturen

Vollmedium	DMEM 10 % FKS 1% Glutamax 100 U/ml Penicillin 0,1 g/ml Streptomycin
Trypsin/EDTA	0,5 % Trypsin 0,02 % EDTA in ddH ₂ O

PEI (Polyethylenimin) -Transfektionreagenz	10 μ M, pH 6,4
10xPBS (Phosphate-buffered saline)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 2,4 g KH ₂ P0 ₄ auf 1l mit ddH ₂ O auffüllen

2.7. Mausearbeiten

2.7.1. Genotypisierung der Cdk2-Knockout Mäuse

Die Generation der Cdk2-Knockout Mäuse geschah durch die Inaktivierung der Cdk2-Gene. Dabei wurden die Exons 4 und 5, die die Kinasedomäne kodieren durch eine Neomycin-Kassette ersetzt (Berthet et al. 2003). Der Nachweis des Knockout-Allels erfolgte mit Hilfe der PCR (Abschnitt 2.1.3) durch den Nachweis der Neokassette. Das PCR-Produkt des Knockout-Allels zeigte eine 500bp große Bande, des WT Allels 150bp. Die Auftrennung des PCR Produktes erfolgte auf einem 2%-igen Agarose Gel (Abschnitt 2.8.1.5).

2.7.2. DNS-Extraktion aus Schwanzbiopsie zur Genotypisierung der Mäuse

Die abgeschnittenen Schwanzspitzen der Mäuse wurden in 500 μ l Proteinase K-Puffer aufgenommen und ÜN bei 56°C durch die zugefügte Proteinase K (0,2 mg) verdaut. Die unverdauten Reste wurden durch eine Zentrifugation (13000 Upm, 15 min, RT) pelletiert und der Überstand zu 500 μ l Isopropanol gegeben, um die DNS zu präzipitieren. Das Mischen erfolgte durch das mehrmalige Invertieren der Eppendorfgefäße. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation (13000 Upm, RT) wurde das DNS-Pellet mit 500 μ l 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert

(2 min, 13000 Upm, RT). Das DNS-Pellet wurde kurz getrocknet und in 50 µl TE-Puffer oder ddH₂O aufgenommen, davon wurden 2 µl für die PCR-Reaktion eingesetzt.

2.7.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion dient der selektiven Amplifizierung des genau definierten DNS-Bereiches. Der DNS-Abschnitt wird durch zwei flankierende, sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) definiert und durch thermoresistente DNS-Polymerasen in mehreren aufeinanderfolgenden PCR-Zyklen vervielfältigt. Für die Genotypisierung der Cdk2-Knockout Mäuse wurde folgendes Programm und PCR-Ansatz (Tabellen 2.1 und 2.2) verwendet:

Tabelle 2.1: PCR-Ansatz

10xPCR-Puffer-Invitrogen	2,5µl
10xBSA	2,5µl
MgCl ₂ 25mM	4,0µl
dNTPs (je 25mM)	0,5µl
Primer PKO 0292	0,5µl
Primer PKO 0293	0,5 µl
Primer PKO 0294	0,5 µl
DNSO	1,25 µl
<u>DNS-Polymerase</u>	<u>1,0 µl</u>
ddH ₂ O	auffüllen auf 25 µl

Tabelle 2.2: PCR Programm

94°C	5 min	}	30 Zyklen
94°C	0,5 min		
62°C	1 min		
72°C	1,5 min		
72°C	5 min		
4°C	Lagerung		

Die verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen:

PKO 0292: 5` GTGAAACTGTGGTACCGAGCACCTG 3`

PKO 0293: 5` CCC GTG ATA TTG CTG AAG AGC TTG GCG G 3`

PKO 0294: 5` CCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG 3`

2.8. Virusarbeiten

Der verwendete Adenovirus-Typ ist der Sicherheitsstufe 2 (S2) zugeordnet, da er keine E1- und E2-Proteine exprimiert und damit die Replikation des Virus verhindert ist. Eine Replikation des Virus war nur in den Zellen mit intaktem E1-protein möglich, zu denen 293HEK-Zellen gehören. Es wurden folgende Adenoviren für diese Arbeit amplifiziert: Cyclin E (CycE) und Kontrollvirus (EV). Die Klonierung der Viren erfolgte mit dem AdEasy™ Adenoviral Vector System von Stratagene.

2.8.1. Adenovirusamplifikation

HEK293-Zellen wurden mit linearisierten, adenoviralen Plasmid transfiziert (Plasmid-Linearisierung mit PacI). Vor der Transfektion wurde die linearisierte Plasmid-DNS aufgereinigt (Abschnitte 2.14.1.1 und 2.14.1.4). Fünf bis sechs Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und bei 800 Upm (Umdrehungen pro Minute) 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen, erneut pelletiert und in 100 µl PBS resuspendiert. Durch wiederholtes Einfrieren im flüssigen Stickstoff und Auftauen wurde die Zellmembran zerstört und Viruspartikel freigesetzt. Die Zelldebris wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 2000 Upm pelletiert. Der Überstand enthielt Viruspartikel und wurde zur Infektion mehrerer Platten von HEK293-Zellen verwendet. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, so dass nach drei bis vier Wochen ausreichend Virus amplifiziert wurde.

Die Prozedur konnte durch die Infektion einer großen Zellmenge (40-80 Flaschen, 75cm²) mit Virusstock beschleunigt werden. Dafür wurde das Medium mit 2% FKS

und Virussuspension (5 - 10 MOI) vorbereitet und das alte Medium damit ersetzt. Ca. 48h nach der Infektion konnten die Zellen geerntet werden. Die Zellen wurden durch das Spülen von Flaschenböden gelöst und in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 800 Upm) wurde das Pellet mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert (5 min, 800 Upm). Das Pellet wurde bis zur Präparation bei -20°C aufbewahrt.

2.8.2. Adenoviruspräparation

Das eingefrorene Pellet wurde in 3 - 4 ml PBS aufgetaut und bei 2000 Upm, 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Die Zentrifugeröhrchen wurden mit 3,5 ml Gradientlösung I und 3,5 ml Gradientlösung II befüllt. Die Gradientlösung II wurde sehr langsam zugeführt, um den Gradienten nicht zu stören. Anschließend wurde vorsichtig der virushaltige Überstand zugegeben. Die Röhrchen wurden ausbalanciert und 4 h in einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) bei 4°C und 25000 Upm zentrifugiert. Nach der Auftrennung befand sich die virale Bande zwischen den beiden Gradientlösungen und konnte mit Hilfe einer Injektionsspritze abgenommen werden. Die Virussuspension wurde mit dem gleichen Volumen von 2x Virus-Lagerungspuffer gemischt und in Polypropylen-Einfrierröhrchen (Cryotube, Nunc, Wiesbaden) bei -20°C aufbewahrt.

2.8.3. Titerbestimmung

Die Titerbestimmung des Virus erfolgte mit dem Abeno-X Rapid Titer Kit von Clontech.

293HEK-Zellen wurden mit einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ / ml / Loch in eine 24-Loch-Platte ausgesät (Abschnitt 2.9.1). Am nächsten Tag wurde eine Virus-Verdünnungsreihe erstellt (10^{-2} - 10^{-7} , in 10^{-1} Schritten), von der 100 µl für die Zellinfektion verwendet wurden. Nach 48 h erfolgte die Fixierung der Zellen mit eiskaltem 100%-igen Methanol (10 min, -20°C). Die fixierten Zellen wurden dreimal mit 1% BSA in PBS gewaschen und anschließend einer Färbung mit Maus-Anti-

Hexon Antikörper (Verdünnung 1:1000 in 1% BSA + PBS) für 1 h bei 37°C unterzogen. Nach dem dreimaligen Waschen (1% BSA in PBS) wurden die Zellen mit dem sekundären, peroxidase-konjugierten Ratte-Anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1:500 in 1% BSA + PBS) eine Stunde lang bei 37°C gefärbt. Die Zellen wurden wiederholt dreimal mit 1% BSA + PBS gewaschen. Als Peroxidase-Substrat wurde eine 1xDAB-Lösung eingesetzt, die aus einer 10xDAB-Stocklösung mit Peroxidase-Puffer hergestellt wurde. 500 µl 1xDAB-Lösung wurden in jedes Loch der 24-Loch-Platte gegeben und ca. 10 min zur Farbentwicklung bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Entfernen der DAB-Lösung gestoppt und die Zellen bis zur Auswertung in PBS aufgenommen. Die Anzahl der positiven Zellen (schwarzbraun) wurde mit Hilfe des Mikroskops und 20x-Objektiv bestimmt. Aus verschiedenen Virus-Verdünnungen wurde eine mit ca. 5-50 positiven Zellen pro Blickfeld zum Auszählen ausgewählt. Der Anteil infektiöser Partikel pro ml Virussuspension wurde nach folgender Formel ausgerechnet.

$$\frac{(\text{positive Zellen/Blickfeld}) \times (\text{Blickfelder/Loch})}{\text{Virusvolumen (ml)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}$$

Für eine 24-Loch-Platte wurde ein Wert von 256 Blickfeldern pro Loch mit dem 20x-Objektiv bestimmt. Wie schon oben erwähnt betrug das Virusvolumen zur Zellinfektion 100 µl. Es wurden Virustiter von 10^{10} bis 10^{11} infektiöse Partikeln pro ml erreicht.

2.8.4. Virusaufreinigung vor der Injektion – Dialyse

Vor der Injektion mussten die CsCl₂-Reste aus der Virussuspension entfernt werden, da es toxisch für die Maus ist. Die Virussuspension wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und bei 4°C im Dialysepuffer gerührt, der alle 45 min gewechselt wurde. Nach 2 h wurde die Virussuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und die optische Dichte bei 260 nm bestimmt. Als Referenzwert wurde folgende Lösung zusammengesetzt: Gradientenlösung 1 und 2 1:1 mischen

gleiches Volumen an 2x Virus-Lagerungspuffer dazugeben

Mischung 1:20 in 0,1% SDS verdünnen

Der OD-Wert von 1 entsprach 1×10^{12} Viruspartikeln / ml, daraus wurde die Gesamtzahl der Viruspartikel / ml berechnet. Zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen Partikel wurde die Gesamtzahl der Viruspartikel durch den Virustiter geteilt. Für die Injektion wurde 1×10^8 infektiöse Viruspartikel / g Mausgewicht als Richtwert verwendet.

2.9. Arbeiten mit Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden in einer Sicherheitswerkbank unter keimfreien Bedingungen und Verwendung von sterilen Plastik Kulturschalen (verschiedene Hersteller) und sterilisierten, mit Watte gestopften Glaspipetten durchgeführt.

2.9.1. Kultivierung und Passagieren von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Vollmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in Sanyo Brutschränken (Heraeus Instruments, Hanau) kultiviert. Das regelmäßige Passagieren versorgte die Zellen mit ausreichend Nährstoffen und Platz. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellmonolayer mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin 1-3 min lang inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 5-10 ml Vollmedium gestoppt und die Zellsuspension auf mehrere neue 10 cm-Zellkulturschalen verteilt. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage. Um die genaue Zellzahl auszusäen, wurde die Zellsuspension in ein steriles Polypropylenröhrchen überführt, ein 20 µl Aliquot abgenommen und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl nach der unten aufgeführten Formel bestimmt.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Quadratanzahl}} \times \text{Verdünnung} \times 10000$$

Die gewünschte Zellzahl wurde durch Zugabe von frischem Vollmedium eingestellt und die Zellsuspension auf neue Zellkulturschalen verteilt.

2.9.2. Kryokonservierung von Zellen

Das Einfrieren sorgte für die langfristige Erhaltung der Zellen. Die Zellen wurden zunächst mit Hilfe von Trypsin gelöst und abzentrifugiert (5 min, 800 Upm, RT). Das Zellpellet wurde in 90% FKS und 10% DMSO resuspendiert. Je 1 ml (mit ca. 1×10^6 Zellen) der Zellsuspension wurde in ein Polypropylen-Einfrierröhrchen (Cryotube, Nunc, Wiesbaden) überführt und bei -80°C eingefroren. Das Auftauen der Zelllinien erfolgte nach Bedarf, dazu wurde ein Einfrierröhrchen in 37°C warmes Wasserbad gegeben bis sich die Zellsuspension verflüssigt hat, dann wurde die Zellsuspension sofort in 10 ml frisches warmes Vollmedium überführt und abzentrifugiert (5 min, 800 Upm, RT), um die DMSO-Reste zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 8 ml Vollmedium resuspendiert und in eine 10cm-Zellkulturschale gegeben.

2.9.3. Transiente Transfektion

Eine transiente Transfektion von Zellen diente einer kurzfristigen Überexpression gewünschter Proteine durch das Einbringen von Fremd-DNS (Plasmiden) in die Zelle. Die Transfektionseffizienz wurde durch die Überexpression vom Reporter gen DsRed (rot-fluoreszierendes Protein) kontrolliert. Die Effizienz der Transfektion wurde mikroskopisch aus der Anzahl der rot-fluoreszierenden Zellen und der Gesamtzellzahl ermittelt. Mit Hilfe der unten aufgeführten Methoden konnten ca. 90% von 293HEK-Zellen und ca. 30% von NIH3T3-Zellen transient transfiziert werden.

Transfektion von NIH3T3-Zellen mit PolyFect

Die NIH3T3-Zellen wurden mit PolyFect (Qiagen), nach den Angaben des Herstellers transfiziert.

Zellen wurden am Vortag mit einer Konzentration von 1×10^6 /10-cm Zellkulturschale ausgesät. Zur Transfektion wurden 10 μg Plasmid mit 300 μl serumfreien Medium gemischt und abzentrifugiert. Nach Zugabe von 25 μl PolyFect-Transfektionsreagenz wurde die Lösung 10 s durch Vortexen gemischt, abzentrifugiert und 5-10 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel an den zu transfizierenden Zellen vorgenommen. Das Transfektionsgemisch wurde in das Medium gegeben und durch vorsichtiges Schwänken auf der Schale verteilt. Die Zellernte für die weiteren Analysen erfolgte nach 48 h.

Transfektion von 293HEK-Zellen mit PEI (Polyethylenimine)

293HEK-Zellen wurden mit PEI (Polyethylenimin)-Methode transfiziert. Das kationische Polymer (PEI) bildet mit DNS Komplexe, die dann von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden können.

Die Zellen wurden am Vortag mit einer Konzentration von $0,5-1 \times 10^6$ /10-cm-Zellkulturschale ausgesät. Zur Transfektion wurden 12 μg Plasmid in 800 μl serumfreien Medium vorgelegt. Nach Zugabe von 20 μl PEI wurde der Transfektionsansatz 10 min bei RT inkubiert, anschließend wurde er direkt auf Schalen mit Zellen verteilt. Die Zellernte erfolgte nach 48h.

2.9.4. Generation stabiler Zelllinien

2.9.4.1. Generation der stabilen Cyclin E-überexprimierenden HePa1-6 Zelllinie

Generation stabiler Zelllinien diente der dauerhaften DNS-Integration in das Zellgenom. Durch die gemeinsame Transfektion des gewünschten Plasmids mit einem Antibiotikumresistenz-kodierenden Plasmids konnte die Selektion der Klone mit stabiler DNS-Integration erleichtert und beschleunigt werden. Die Effizienz der stabilen DNS-Integration erhöhte sich durch das Transfizieren von linearisierten Plasmiden.

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden HePa1-6-Zellen verwendet. Vor der Transfektion wurden pBabePuro (Puromycinresistenz-kodierendes Plasmid) mit der Endonuklease Not1 und pCS2+MT-Cyclin E Plasmids mit Xba1 linearisiert (Abschnitt 2.14.1.1) und wie im Abschnitt 2.14.1.4 beschrieben präzipitiert. Anschließend wurden die HePa1-6 Zellen mit 0,2 µg pBabePuro und 3 µg pCS2+MT-Cyclin E Plasmiden ko-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen sehr dünn ausgesät (1×10^4 - 1×10^5 Zellen / 10cm-Zellkulturschale) und das Antibiotikum Puromycin mit einer Endkonzentration von 2 µg/ml in das Medium zugegeben. Die Zellen wurden nicht mehr passagiert. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt und das Antibiotikum frisch zugefügt. Nach ca. 2,5 Wochen waren die Zellen ohne einen stabilen Einbau von pBabePuro gestorben. Aus den Zellen mit integrierter Puromycin-Resistenz bildeten sich Klone, die gepickt und weiter expandiert wurden. Mit Hilfe von Westernblotanalysen (Abschnitt 2.11) wurden Klone selektiert, die auch pCS2+-MT-Cyclin E stabil integrierten. Als Kontrolle wurde ein Klon ausgewählt, der nur mit pBabePuro transfiziert wurde und das Plasmid auch in das Genom aufgenommen hatte.

2.9.4.2. Generation der stabilen induzierbaren HePa1-6 und NIH3T3 Zelllinien mit dem T-REx-System (Invitrogen)

Für die Herstellung stabiler induzierbarer Zelllinien wurde das T-REx-System von Invitrogen verwendet. Das T-REx-System ist ein tetracyclin-reguliertes eukaryotisches Expressionssystem, das die Regulationselemente von *E.coli* Tetracyclin-Resistenz-Operons verwendet. Das System basiert auf der Bindung von Tetracyclin bzw. Doxycyclin an einen Tet-Repressor und verursacht dadurch eine Induktion der promotorregulierten Expression der gewünschten Gene. Bei der Generation der Zelllinien wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

Zunächst wurde die minimale Antibiotikumkonzentration ermittelt, die ausreichend war, nicht transfizierte Zellen zu töten. Durch eine Verdünnungsreihe wurden letale Konzentrationen von Blasticidin und Zeocin für HePa1-6- und NIH3T3-Zellen ermittelt. Dabei ergaben sich folgende Werte, die sowohl für die Selektion als auch für die Kultivierung der Klone verwendet wurden (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: verwendete Antibiotikumkonzentrationen

	<u>Blasticidin</u>	<u>Zeocin</u>
HePa1-6	10 $\mu\text{g/ml}$ Medium	800 $\mu\text{g/ml}$ Medium
NIH3T3	1 $\mu\text{g/ml}$ Medium	50 $\mu\text{g/ml}$ Medium

Die Generation der induzierbaren Zelllinien erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde eine Repressor-Zelllinie generiert. Dafür wurden die Zellen mit dem Tet-Repressor-Plasmid (pcDNA6/TR) nach der Linearisierung mit Sap1 Endonuklease (Abschnitt 2.14.1.1) transfiziert. Zur Selektion der Klone mit stabiler pcDNA6/TR-Integration wurden die Zellen mit Blasticidin behandelt. Die Repressionseffizienz der ausgewählten Klone wurde mit Hilfe eines Luziferase-Assays getestet (Abschnitt 2.9.4.3). Dafür wurden die Klone transient mit einem Luziferase-Plasmid (pcDNA/TO-Luz) transfiziert. Durch die Doxycyclin-Zugabe (1 $\mu\text{g/ml}$) erfolgte die Induktion der Expression des Luziferaseenzym, dessen Aktivität gemessen wurde. Aus dem Vergleich der Luziferase-Aktivität der induzierten und nicht-induzierten Probe des jeweiligen Klons wurde die Repressionseffizienz ermittelt. Die Klone mit der höchsten Repressionseffizienz wurden weiter verwendet. Im zweiten Schritt wurden die Klone generiert, die wt-Cyclin E und seine Mutanten unter der Kontrolle von Tet-Operator überexprimieren. Dazu wurden zunächst wt-Cyclin E- und Mutanten-DNS in das pcDNA4/TO-Plasmid kloniert (Abschnitt 2.14.1). Die generierten Plasmide wurden vor der Transfektion mit Pvu1 Endonuklease linearisiert (Abschnitt 2.14.1.1). Die Selektion der Klone erfolgte bei diesem Schritt mit der oben angegebenen Zeocin-konzentration. Die induzierbare Expression von wt-Cyclin E und seinen Mutanten wurde mit Hilfe von anti-myc Immunoblot ermittelt (Abschnitt 2.11). Die mit Doxycyclin-behandelte und nicht behandelte Probe des jeweiligen Klons wurden in benachbarte Taschen eines Polyacrylamidgels aufgetragen. Die Auswahl der Klone basierte auf der Intensität der Hintergrundexpression und Proteinexpressionsstärke.

2.9.4.3. Durchführung des Luziferase-Assays

Am Tag der Ernte wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und im Extraktionspuffer aufgenommen. Für die 12-Lochplatte waren 200 μ l Extraktionspuffer ausreichend. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurden die Zellen abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zelldebris wurden durch die Zentrifugation (2 min, 13000 Upm) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Messung auf Eis aufbewahrt oder bei -80°C eingefroren. Für die Messung wurden 300 μ l Messpuffer in ein Sarstedtröhrchen vorgelegt. Unmittelbar vor der Messung wurden 100 μ l Probe dazu gegeben. Die Zugabe von 50 μ l Luziferin mit anschließender Messung der Lichteinheiten erfolgte durch Biolumat (Berthold).

2.9.5. Synchronisierung der Zellen in der Metaphase

Der Zellzyklusarrest in der Metaphase wurde durch die Zugabe der Mikrotubuli depolymerisierenden Chemikalie Nocodazol erreicht. Nocodazol wurde zu den asynchronwachsenden Zellen mit einer Endkonzentration von 400 ng/ml zugefügt. Nach 10 Stunden wurden die abgerundeten, in der Meta-Phase arretierten Zellen durch Abklopfen isoliert. Durch diese Methode konnte die Kontamination mit Zellen in anderen Zellzyklusphasen ausgeschlossen werden. Die geernteten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in ein Nocodazol-freies Vollmedium entlassen. Um den Mitose-Austritt genau verfolgen zu können, wurden die Proben für die Westernblot- und durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse (Abschnitte 2.11 und 2.10) in kurzen Zeitabständen genommen (alle 15 min).

2.10. Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Um Zellen auf ihren Zellzyklusstatus zu untersuchen wurde ein Durchflusszytometer (FACS) verwendet. Durch die Messung der Fluoreszenz des in die DNS aufgenommenen und dadurch fluoreszierenden Farbstoffes Propidiumiodid bzw.

DAPI kann der DNS-Gehalt in einer Zelle gemessen werden. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen (Abschnitt 2.10.1) kann die gezielte Analyse unterschiedlicher Zellpopulationen erfolgen. Außerdem können über die Streuung und Beugung des Lichts durch die zu analysierenden Zellen Aussagen über die Größe und Granularität gemacht werden.

Zur Analyse der verschiedenen Zellzyklusphasen wurden die Zellen durch die Trypsinierung vom Boden der Kulturschale gelöst und vereinzelt. Zum Verdünnen des Trypsins wurden 10 ml PBS zugegeben und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 800 Upm und RT wurde der Überstand verworfen und dem Zellpellet langsam 1 ml Ethanol (70%) als Fixant zugegeben. Die Zellsuspension wurde im 70%-igen Alkohol für mindestens 12 h bei 4 °C gelagert. Für die Färbung wurden die Zellen nochmals pelletiert, in 300-500 µl Propidiumiodid-Färbelösung bzw. DAPI-Puffer aufgenommen und 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Untersuchung im Durchflusszytometer.

Die Analysen erfolgten unter der Verwendung eines FACScan Calibur oder eines BD LSRII und des Computerprogramms CellQuest bzw. BD FACSDiva. Dabei wurden zunächst über die Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (Größen- und Granularitätsmaße), lebende intakte Zellen elektronisch ausgewählt und mindestens 10.000 Signale (= Einzelzellen) aufgenommen. Der DNS-Gehalt der Zellen konnte dann über die Stärke der Fluoreszenz bestimmt, graphisch dargestellt und statistisch analysiert werden.

2.10.1. Anti-Myc-AlexaFluor555-Färbung der Zellen für die FACS-Analyse

Die Zellen wurden trypsinisiert und einmal mit 1xPBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch eine langsame Zugabe von 2%-igem PFA mit einer 15-minütigen Inkubation. Durch einmaliges Waschen der Zellen mit PBS wurden die Reste von PFA entfernt. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 4°C, 1500 Upm) wurden die Zellen in 0,1% Triton100 für 5 min zum Permeabilisieren aufgenommen. Nach dem Waschen mit 1xPBS und einer 10-minütigen Zentrifugation (1500 Upm, 4°C)

wurden die unspezifischen Bindungen durch eine 15-minütige Inkubation in 1% BSA gesättigt. Dem Waschschrift mit 1xPBS folgte die Antikörperfärbung für 1 h bei 37°C. Dafür wurde das Zellpellet ($1-2 \cdot 10^6$ Zellen) in 100 μ l 1xPBS resuspendiert und 0,5 μ g myc-AlexaFluor555-Antikörper dazugefügt. Die Färbung erfolgte unter Ausschluss von Licht. Durch das Waschen mit 1xPBS (1500 Upm, 10 min, 4°C) wurden die ungebundenen Antikörperreste entfernt. Das Zellpellet wurde in 500 μ l DAPI-Puffer aufgenommen und 30 min bei RT unter Lichtausschluss gefärbt. Anschließend erfolgte Messung im Durchflusszytometer.

2.11. Proteinnachweis mit Westernblot und Immunpräzipitation

2.11.1. Vorbereitung Gesamtproteinlysate zur Analyse

2.11.1.1. Vorbereitung Gesamtproteinlysate aus Zellen

Die Zellen wurden durch Trypsinierung oder Abkratzen von Böden der Platten gelöst und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Nach anschließender Zentrifugation (800 Upm, 5 min) wurde das Pellet mit 10 ml 1xPBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Ripa-Puffer resuspendiert und zur Lyse 15-20 min auf Eis inkubiert. Durch das Sonifizieren (15 sec, Amplitude 40) wurden die noch intakten Zellwände zerstört. Das Zentrifugieren (15 min, 1300 Upm, 4°C) sorgte für das Entfernen der Zelltrümmer. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt mit Hilfe von DC Protein Assay von BioRad bestimmt (Abschnitt 2.5.2).

2.11.1.2. Vorbereitung Gesamtproteinlysate aus Mausleber

Die Mausleberstückchen wurden zunächst im flüssigen Stickstoff eingefroren. Danach wurde Mausleber zu einem feinen Puder zermörsert und in 500 ml Ripa-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden 15 sec bei einer Amplitude von 40 sonifiziert und abzentrifugiert (15 min, 13000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde

vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem DC Protein Assay von BioRad (Abschnitt 2.11.2), dafür wurden die Proben 1:50 verdünnt.

2.11.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem DC Protein Assay von BioRad nach Lowry

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung liegt in der Reaktion der Proteine mit der alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und Folin-Reagenz. Die Reaktion führt zu Farbstoffbildung mit Absorptionmaximum bei 750 nm und einem Minimum bei 405 nm. Das Assay wurde nach Angaben des Herstellers in einer Mikrotiterplatte (96-Lochplatte) durchgeführt. Die Absorption wurde bei 650 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers (Titertek Multiskan Plus MKII) gemessen. Für jede Messung wurde eine Reihe von Standardwerten mit BSA gemessen, das Pipetierschema der BSA-Standardreihe ist in der Tabelle 2.4 angegeben.

Tabelle 2.4: Pipetierschema zur Herstellung der BSA-Standardreihe (1,24 mg/ml BSA-Stammlösung)

<u>BSA-Endkonzentration (µg)</u>	<u>BSA-Stammlösung (µl)</u>	<u>Ripa-Puffer (µl)</u>
0,2	4	25,8
0,5	10,3	19,6
1,0	20,7	9,3
1,24	30	-

Die Messung der Standardkurve und der Proben erfolgte als eine Dreifachbestimmung, der daraus ermittelte Mittelwert wurde zur Konzentrationsberechnung verwendet. Aus der Standardkurve und mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden. Danach wurde die gewünschte Proteinkonzentration in den Proben mit Ripa-Puffer eingestellt und mit 4x-SDS-Probenpuffer versetzt.

2.11.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht wurde diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli eingesetzt. Die denaturierten und negativ geladenen Proteine werden im angelegten elektrischen Feld bewegt und dabei nach ihrem relativen Molekulargewicht aufgetrennt.

2.11.4. Herstellung der Polyacrylamidgele und Elektrophorese

Die Gele wurden zwischen zwei abgedichteten Glasplatten gegossen und in die entsprechende Elektrophoresekammer (BioRad) eingesetzt. Es wurden Minigele verwendet, bestehend aus einem 4%-igen Sammelgel und einem 10-12%-igen Trenngel, wie es in der Tabelle 2.5 aufgeführt ist, je nach Größe des zu analysierenden Proteins.

Tabelle 2.5: Protokoll zur Herstellung eines 10 und 12%-igen Polyacrylamidgels

	Sammelgel	Trenngel 10%	Trenngel 12%
ddH ₂ O / ml	3,92	4,1	3,4
Acrylamid / ml	1,13	3,3	4,0
1,5M Tris, pH 8,8 / ml	-	2,5	2,5
0,5M Tris, pH 6,8 / ml	1,75	-	-
10% SDS / μ l	70	100	100
10% APS / μ l	70	105	105
TEMED / μ l	7	15	15

Vor dem Auftragen wurden die Proben 5 min bei 97°C aufgekocht und kurz abzentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte im 1xSDS-Gellaufpuffer bei konstanter Spannung von 70 V bis die Lauffront mit dem Bromphenolblau das Trenngel erreichte. Danach wurde die Spannung auf 100 V erhöht, bis die Proteine mit dem

gewünschten Molekulargewicht gut aufgetrennt waren. Als Molekulargewichts-Standard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (Prestained Protein Marker, Broad Range, 6-175 kDa, NEB, Frankfurt) aufgetragen. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele nach 2.3.2 weiterverwendet.

2.11.5. Transfer von Proteinen auf eine Nylonmembran

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran übertragen. Auf dieser kann mit spezifischen Antikörpern das gesuchte Protein nachgewiesen werden. Zur Immobilisierung von Proteinen auf einer Nylonmembran wurde das so genannte Tank-Transfer-System von BioRad angewendet. Der Aufbau erfolgte nach Vorgaben des Herstellers. Vor der Anwendung wurde die Nylonmembran (Millipore) kurz im 100%-igen Methanol und anschließend im 1xTransferpuffer geschwenkt. Die restlichen Bestandteile wurden ebenfalls im Transferpuffer äquilibriert und unter Vermeidung von Luftblasen gestapelt. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nylonmembran geschah im elektrischen Feld bei 0,35 mA und konstanten 100 V für 60 min.

Nach dem Transfer wurde die Membran in Blocking-Lösung 30 min inkubiert, um die unspezifischen Bindungen abzusättigen. Die Membran wurde mit dem spezifischen Antikörper (verdünnt im 1xTNT-Puffer) unter ständiger Bewegung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1xTNT gewaschen und mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (verdünnt in Blocking-Lösung) für 1h bei RT auf der Wippe geschwenkt. Die Antikörperverdünnungen sind in der Tabelle 2.6 angegeben. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit 1xTNT-Puffer gewaschen und in einer Peroxidase-Substratlösung getränkt. Die Umsetzung des Substrats und die davon ausgehende Lichtemission konnten durch Exposition von Röntgenfilmen detektiert werden. Als Substrat dienten die ECL-Lösungen. Kurz vor der Detektion wurden gleiche Volumina von ECL-Lösungen 1 und 2 gemischt und 5 min inkubiert. Das Substrat wurde zu der Membran gegeben und 1min lang inkubiert, dann wurde ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt, nach 3-10-minütiger Exposition konnte der Film entwickelt werden.

Tabelle 2.6: Antikörperverdünnungen für Westernblots

Antikörper	Verdünnung	Reaktivität
Cdk2	1:1000	Kaninchen
Cdk1	1:1000	Kaninchen
pCdk1	1:1000	Kaninchen
Cyclin E	1:2500	Kaninchen
Cyclin B	1:1000	Maus
pHiston 3	1:1000	Kaninchen
Myc-9E10	1:10000	Maus
p27	1:1000	Maus
α -Aktin	1:2500	Maus
Kaninchen-peroxidase gekoppelt	1:10000	Kaninchen
Maus-peroxidase gekoppelt	1:10000	Maus

2.11.6. Ko-Immünpräzipitation von Proteinkomplexen

Um *in vivo* Komplexe von Proteinen zu untersuchen, fällt man diese aus Zellextrakten mit spezifischen Antikörpern gegen ein Protein und detektiert die gebundenen Partnerproteine. Dazu bereitet man die Proteinlysate, wie im Abschnitt 2.11.1 beschrieben vor und bestimmt die Proteinkonzentration nach 2.11.2. Üblicherweise wurden 500 μg - 1 mg von Gesamtproteinextrakt in 500 μl Ripa-Puffer zu Immunpräzipitation angesetzt. Durch die 30-minütige Präinkubation von Proteinlysaten mit 25 μl Protein-A (oder G)-Sephrose wurden unspezifische Bindungen entfernt. Nach Sedimentation der Sephrose wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem Antikörper für das gesuchte Protein (3 μg Antikörper / 500 μg Gesamtproteinextrakt) bei 4 °C rotierend 3-4h inkubiert. Danach wurde erneut 30 μl prääquilibrierte Protein-A (oder G)-Sephrose zugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Sephrose

mit den an sie gebundenen Antikörper-Protein-Komplexen pelletiert (1 min, 4°C, 1000 Upm) und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde dann dreimal mit Ripa-Puffer gewaschen (1 min, 4°C, 1000 Upm) und in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die gefällten Proteinkomplexe wurden mittels Westernblot analysiert.

2.11.7. Histon-Kinaseassay

Um die Aktivität von Kinasen, die enzymatisch einen Phosphatrest von ATP auf ihr Substrat übertragen, zu bestimmen, werden diese mit einem aufgereinigten Substrat sowie ATP inkubiert. Durch Zugabe eines Anteils ATP mit radioaktivem γ -Phosphatrest kann die Phosphorylierungsfunktion der Kinase autoradiographisch analysiert werden. Dazu wurden die Kinasekomplexe mit spezifischen Antikörpern Ko-Immünpräzipitiert (Abschnitt 2.11.6). Das präzipitierte Gemisch aus Sepharose und gebundenen Proteinen wurde zweimal mit Ripa- und einmal mit Histon-Waschpuffer gewaschen (1 min, 4°C, 1000 Upm). Nach dem letzten Waschschrift wurden Sepharose-Kugelchen in 30 μ l Histon-Kinase-Puffer resuspendiert. Als Substrat wurde das gereinigte Protein Histon 1 (Upstate) zugegeben. Die Kinasereaktion wurde bei 37 °C für 30 min durchgeführt, zum Abstoppen der Reaktion wurden 15 μ l 4xSDS-Probenpuffer zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.11.3 und 2.11.4). Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

2.12. Färbungen

2.12.1. Immunfluoreszenzfärbungen

Die Expression von Proteinen kann durch Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Dabei können sowohl stabil oder transient exprimierte als auch endogene Proteine untersucht werden.

2.12.1.1. Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen

Nach einer Transfektion mit Plasmiden oder einer Induktion der Proteinexpression wurden Zellen, die auf Deckgläsern (d=15 mm) in 10 cm-Kulturschalen bzw. 12-Lochplatten wuchsen, dreimal mit 1xPBS gewaschen und dann für 5 min mit eiskaltem 100%-igem Methanol fixiert. Durch erneutes Waschen mit 1xPBS wurden die Reste von Methanol entfernt. Die Zellmembran wurde durch eine 0,3%-ige Triton100-Lösung drei Minuten lang permeabilisiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit 1xPBS wurden unspezifische Bindungen durch eine 15-minütige Inkubation in 1% (w/v) BSA in PBS gesättigt. Nun wurde der spezifische Antikörper gegen das zu analysierende Protein in geeigneter Verdünnung (Tabelle 2.7) in 1% (w/v) BSA in PBS zugegeben und für 1 h bei 37°C im Dunklen inkubiert. Die Färbung mit sekundärem, fluorophor-konjugiertem Antikörper (falls erforderlich) erfolgte ebenfalls 1 h bei 37°C unter Ausschluss von Licht. Nach dem dreimaligen Waschen wurden die Zellkerne durch eine 5-minütige Inkubation in der DAPI-Lösung gefärbt. Daraufhin wurde dreimal mit 1xPBS gewaschen und das Gläschen mit Eindeckmedium (ProLong Gold Antifade Reagent, Invitrogen) auf einen Objektträger aufgebracht und unter Lichtausschluss getrocknet.

Tabelle 2.7: Antikörperverdünnungen für die Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper	Verdünnung	Reaktivität
Myc-AlexaFluor 555	1:500	-
γ -Tubulin	1:400	Maus
Anit-Maus-FITS (sekundäres)	1:800	Maus

2.12.1.2. Immunfluoreszenzfärbungen der Parafinschnitte

Die Schnitte aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden auf einem Mikrotom mit einer Dicke von 3-5 μ m unter standardisierten Bedingungen hergestellt. Die einzelnen Schnitte wurden danach mit einem Pinsel vom Messer abgenommen und in ein Wasserbad gegeben, wodurch die Schnitte geglättet wurden. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen und über Nacht bei 40°C getrocknet.

Beschichtung von Objektträger

Vor der Verwendung wurden die Objektträger mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dafür wurden sie zunächst 15 min in Seife eingeweicht und anschließend 30 min unter fließenden dH₂O gewaschen. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte 30 min lang in Poly-L-Lysin-Lösung (1:10 verdünnt in ddH₂O). Die beschichteten Objektträger wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag verwendet oder unter Ausschluss von Licht gelagert.

2.12.1.2.1. β -Catenin-Färbung

Bevor die zu analysierenden Proteine im Mausgewebe nachgewiesen werden konnten, mussten die Paraffinschnitte durch Entparafinisierung und Rehydrierung vorbereitet werden. Die Parafinreste wurden durch 15-minütige Inkubation im Hybridisierungssofen bei 65°C und weitere 15 min in Rotihistollösung entfernt. Die Behandlung mit einer Reihe von Ethanollösungen mit absteigender Konzentration (100%, 90% und 70%) für jeweils 15 min diente der Rehydrierung der Parafinschnitte. Anschließend wurden die Schnitte 15 min in Wasser inkubiert. Die Objektträger wurden dann 20 min in 10mM Citrat-Puffer, pH 6,0 gekocht und langsam auf RT abgekühlt. Die unspezifischen Bindungen wurden durch die Inkubation in 1%-iger BSA-Lösung geblockt. Der spezifische, fluorophor-konjugierte Antikörper -Anti- β -Catenin- wurde mit einer Verdünnung von 1:50 zu den Gewebeschnitten gegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei RT wurden die Schnitte dreimal mit 1xPBS gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Objektträger 5 min in der DAPI-Lösung inkubiert. Anschließend wurde das Deckgläschen mit einem Eindeckmedium (ProLong Gold Antifade Reagent, Invitrogen) auf einen Objektträger gebracht und unter Lichtausschluss getrocknet.

2.12.1.2.2. BrdU-Färbung

Die Parafinschnitte wurden entparafinisiert, rehydriert und blockiert wie im Abschnitt 2.12.1.2.1 beschrieben ist. Die Färbung mit anti-BrdU-Antikörper erfolgte über Nacht,

bei 4°C mit einer Verdünnung von 1:100 in PBS. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Fluorophor-gekoppelter Mausantikörper (Tab. 2.7) verwendet. Die Inkubation mit sekundärem Anti-Maus-FITC Antikörper erfolgte 1h bei RT, anschließend wurden die Objektträger dreimal mit 1xPBS gewaschen. Die Zellkernfärbung wurde durch die 5-minütige Inkubation in der DAPI-Lösung erreicht. Mit Hilfe von Eindeckmedium (ProLong Gold Antifade Reagent, Invitrogen) wurde die Färbung der Schnitte versiegelt.

2.12.2. Feulgen Färbung

Die histochemische Feulgen-Färbung basiert auf DNS-Hydrolyse, die entstehenden freien Aldehydgruppen werden anschließend mit Hilfe von Schiff's-Reagenz rot gefärbt und die DNS wird so erkennbar. Der DNS-Gehalt der einzelnen Zellkerne wurde mit dem Ahrens ICM, Zytometrie System nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die Auswertung erfolgte im Institut für molekulare Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Die Schnitte wurden wie in 2.12.1.2.1 beschrieben entparafinisiert und rehydriert. Nach der ein stündigen Fixierung in 4%-igem Formalin, wurden die Schnitte 30 sec mit ddH₂O abgespült. Die DNS-Hydrolyse der Gewebeproben wurde durch 50-minütige Inkubation in 5M HCl erreicht. Die Schnitte wurden erneut 30 sec-2 min mit Wasser abgespült, dann 20 min bei RT mit Schiff's Reagenz gefärbt. Nach 2-minütigem Waschen wurden die Proben 20 min in Sulfitwasser inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 5 min mit Leitungswasser gespült. Zum Entwässern wurden die Schnitte jeweils 10 min in aufsteigender Ethanol-Reihe (70%, 90% und 100%) inkubiert. Vor dem Eindeckeln wurden die Gewebeschnitte eine Minute in Xylol gehalten. Als Eindeckmedium wurde Corbit Basalt (Hecht, Kiel-Hassee) verwendet.

2.13. Arbeiten mit Bakterien

2.13.1. Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte als Flüssigkultur bei ständigem Schütteln und 37°C in sterilem LB-Medium mit den Antibiotika, die den Resistenzmarkern der transformierten Plasmide entsprechen. Zur Selektion der Klone nach der Transformation wurden die Bakterien auf LB-Agar-Kulturschalen mit den notwendigen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.13.2. Transformation von Bakterien

2.13.2.1. *E.coli*-Transformation durch Hitzeschock

Ca. 20 µl des Ligationansatzes bzw. 1 µg Plasmid-DNS wurden mit 100 µl kompetenten *E. coli*-Top10 gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Hitzeschock (1 min bei 42°C) zur Plasmidaufnahme gebracht, der eine 10-minütige Inkubation auf Eis folgte. Zur Regeneration wurden die Zellen in 450 µl LB-Medium 1h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf LB-Agar mit Ampicillin bzw. Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit ausgewählten Transformanten wurde eine 5 ml Übernachtskultur angesetzt, aus der später Plasmide isoliert wurden (Minipräp, Abschnitt 2.14.2.1). Die Überprüfung der Plasmide auf die Anwesenheit des Inserts erfolgte mit Hilfe von Restriktionsverdau (Abschnitt 2.14.1.1). Die Übernachtskultur einer positiven Kolonie wurde zum Animpfen einer 200 ml Kultur angesetzt, die später für Plasmidpräparationen im Maxipräp-Maßstab verwendet wurde (Abschnitt 2.14.2.2). Aus den Kolonien, die das Konstrukt aufgenommen haben, wurden auch Glycerin-Stocks erstellt. Dazu wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl 96% Glycerin gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

Alternativ wurden Bakterien durch einen gesteuerten elektrischen Impuls transformiert (Abschnitt 2.13.2.2).

2.13.2.2. *E.coli*-Transformation durch Elektroporation

Pro Konstrukt wurden 50 μ l elektrokompetente *E.coli* in Suspension und 3 μ l Ligationansatz bzw. 1 μ g Plasmid-DNS zusammengefügt. Die Elektroporation wurde im GenePulser™ bei 25 μ F, 200 Ω und 2,5 kV durchgeführt. Dabei werden die Zellwände der Bakterien soweit geschädigt, dass die zu transformierende DNS durch diese „Löcher“ ins Zellinnere eindringen kann. Nach dem Elektroschock wurde 1ml LB-Medium zur Bakteriensuspension hinzugegeben. Anschließend wurden die transformierten Bakterien 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie auf Petrischalen (LB-Medium mit Kanamycin oder Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Herstellung von Übernachtskulturen und die Analyse der Transformanten erfolgte wie im Punkt 2.13.2.1 beschrieben ist.

2.14. Arbeiten mit DNS

2.14.1. Klonierung

Die Klonierung dient der Generation von neuen Vektoren, die erlauben gewünschte Gene in Bakterien, Metazoen oder Hefe zu exprimieren. Die DNS kann entweder über PCR amplifiziert oder aus einem anderen Vektor mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und in den gewünschten Expressionsvektor kloniert werden.

Im Folgenden ist eine Übersicht der Klonierungsstrategie von Cyclin E und seinen Mutanten in den pcDNA4/TO-Vektor gegeben. Die einzelnen Klonierungsschritte werden in den weiteren Abschnitten genauer besprochen. Für die Klonierung von wt-Cyclin E und seinen Mutanten in den Expressionsvektor pcDNA4/TO wurden die entsprechenden DNS-Abschnitte mit aus den Vektoren pCS2+MT-wt-Cyclin E, pCS2+MT-C3 und pCS2+MT-C8 ausgeschnitten. Der Zielvektor wurde mit zwei Endonukleasen EcoRV und XhoI (Abschnitt 2.14.1.1) verdaut, dabei wurde durch EcoRV ein glattes Ende erzeugt. Die benötigten DNS-Abschnitte aus den pCS2+-Vektoren wurden durch den sequentiellen Verdau mit ClaI und XhoI isoliert. Um die

Ligation zu ermöglichen wurde die Clal-Schnittstelle mit Hilfe der Klenow-Polymerase (NEB, Frankfurt) aufgefüllt und dadurch ein glattes Ende erzeugt. Nach dem Restriktionsverdau mit XhoI erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNS-Fragmente im Agarosegel (Abschnitt 2.14.1.5), die anschließend aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Ligation angesetzt wurden.

2.14.1.1. Restriktionsendonukleaseverdau von DNS

Restriktionsenzyme erkennen und schneiden DNS an den spezifischen Sequenzen, dabei entstehen entweder 5' und 3' Überhänge oder glatte Enden (ohne Überhang). Der Restriktionsverdau von DNS mit Hilfe von sequenzspezifischen Endonukleasen wurde nach Hersteller Vorschriften (NEB, Frankfurt) angesetzt. Die Reaktion wurde nach Tabelle 2.8 zusammengesetzt und bei 37°C im entsprechenden Puffer 1 h lang durchgeführt. Der Verdau vom Zielvektor geschah gleichzeitig mit zwei Restriktionsenzymen (EcoRV und XhoI), anschließend wurde der Vektor dephosphoryliert (Abschnitt 2.8.1.2). Für die Isolation des Inserts, wurden die entsprechenden pCS2+-Plasmide zunächst mit der Clal Endonuklease verdaut. Der generierte 5'-Überhang wurde in einer Klenow-Reaktion aufgefüllt (Abschnitt 2.14.1.3).

Tabelle 2.8: Restriktionsverdauansatz

10xNEBuffer	4 µl
Enzym 1	1-2 µl
Enzym 2	1-2 µl
10xBSA	4 µl
<u>Plasmid-DNS (10 µg)</u>	<u>x µl</u>
ddH ₂ O	auf 40 µl auffüllen

Um die Qualität und Vollständigkeit des Restriktionsverdaus zu überprüfen, wurden die Proben auf ein 0,8%-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.14.1.5). Die Beurteilung der Proben erfolgte entsprechend der Größe der DNS-Fragmente.

2.14.1.2. Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten an den 5'-Enden

Um eine Religation des Vektors beim Klonieren zu verhindern wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden der Vektor-DNS abgespalten. Hierzu wurde dem Reaktionsansatz mit Restriktionsendonukleasen zum Ende der Inkubationszeit 0,5-1,0 U Phosphatase (calf intestinal phosphatase CIP, NEB, Frankfurt) zugesetzt und weitere 1,5 h bei 37°C inkubiert (Tabelle 2.9). Zur Inaktivierung des Enzyms wurde anschließend 1 µl 1M EDTA zugegeben. Die weitere Aufreinigung der dephosphorylierten Vektor-DNS erfolgte nach 2.14.1.4.

Tabelle 2.9: Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung

Restriktionsansatz	20 µl
10xCIP-Puffer	4 µl
<u>CIP</u>	<u>1 µl</u>
ddH ₂ O	auffüllen auf 40 µl

2.14.1.3. Auffüllen von 3'-Enden mit Klenow

Die durch die Endonuklease ClaI generierten 5' Überhänge des Inserts konnten mit Klenow Enzymen aufgefüllt werden und dabei ein glattes Ende generieren. Für die Reaktion wurden 20 µl Restriktionsverdauansatzes direkt verwendet. Es wurden 2,5 µl dNTP's (25 mM) und 1 µl Klenow (1 U/µl, NEB, Frankfurt) der Reaktion zugefügt und 30 min bei 30°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz 20 min bei 75°C inkubiert. Die Aufreinigung der DNS-Fragmente erfolgte nach 2.14.1.4. Anschließend wurde der Restriktionsverdau der pCs2+MT-Plasmide mit dem zweiten Enzym XhoI zusammenpipettiert (Abschnitt 2.14.1.1). Die DNS-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.14.1.5).

2.14.1.4. DNS-Präzipitation

Vor der Ligation wurden die DNS-Fragmente aufgereinigt. Dazu wurde dem Reaktionsansatz 1/10 Volumen von 3M NaOAC und 2,5 Volumen reines Ethanol zugefügt und die DNS bei -20°C 30 min präzipitiert. Nach einer 15-minütiger Zentrifugation (13000 Upm, 4°C) wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen, um Proteinreste zu entfernen und erneut abzentrifugiert. Das DNS – Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 30-40 µl ddH₂O aufgenommen.

2.14.1.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

Die Agarosegelelektrophorese diente der Abschätzung von DNS-Fragmentlängen nach Verdau mit Restriktionsenzymen, der Kontrolle von PCR amplifizierten DNS-Fragmenten oder der Auftrennung von DNS-Fragmenten, die für spätere Ligationen benötigt wurden.

Die DNS-Fragment-Gemische wurden mit 10x DNS-Ladepuffer versetzt und in 0,8-2,0%-igen Agarosegelen (inklusive 10 µg/ml Ethidiumbromid) in 1xTBE-Puffer für 0,5 - 1,5 h bei 80 - 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größen-Marker wurde der 1 kb DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die aufgetrennten DNS-Fragmente auf einem UV-Illuminationstisch per Videokamera visualisiert und aufgenommen.

Für die Klonierung wurden die verdauten DNS-Fragmente (Insertgröße: wt-Cyclin E 1800 bp, C3- und C8-Mutante 1400 bp) aus dem Gel unter einem UV-Illuminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des exGel-OLS-Kit nach Vorgaben des Herstellers (OMNI Life Science) aufgereinigt und zur Ligation angesetzt (Abschnitt 2.14.1.6).

2.14.1.6. Ligation der DNS-Fragmente

Vor der Ligation wurde die DNS-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Für die Reaktion wurden 100 µg Vektor angesetzt, die Insert-Menge wurde nach der folgenden Formel ausgerechnet.

$$x \text{ µg Insert} = 100 \text{ µg} + \frac{100 \text{ µg} * \text{Anzahl der Insertbasenpaare}}{\text{Anzahl der Vektorbasenpaare}}$$

Ligation der DNS-Fragmente wurde mit T4 Ligase (NEB, Frankfurt) durchgeführt (Tabelle 2.10). Als Kontrolle für die Vektor-Religation wurde eine Reaktion ohne das Insert angesetzt. Die Reaktion erfolgte in 20 µl Volumen mit dem entsprechenden Puffer und 1 U T4-DNS-Ligase für 1 h bei RT.

Tabelle 2.10: Reaktionsansatz für die Ligation

Vektor	100 ng
Insert	x ng
10xLigationspuffer	2 µl
<u>Ligase</u>	<u>0,5 µl</u>
ddH ₂ O	auf 20 µl auffüllen

10 µl des Ligationsvolumens für chemokompetente Bakterien bzw. 3 µl für elektrokompetente Bakterien wurden in *E. coli* transformiert (Abschnitt 2.13.2) und diese auf Selektionsplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden die Platten auf Kolonien überprüft. Es wurde darauf geachtet, dass die Platte mit der Vektor-Religation-Kontrolle nur sehr wenig oder keine Kolonien aufwies. Die Klone wurden gepickt und in 5 ml Selektionsmedium über Nacht inkubiert. Es wurde weiter, wie im Abschnitt 2.14.2 beschrieben vorgegangen.

2.14.2. Isolierung von Plasmid-DNS

2.14.2.1. Isolierung von Plasmid-DNS in kleinen Mengen (Minipräp)

Von der 5 ml Übernachtskultur, wurde 1 ml abgenommen und 1 min bei RT und 13000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und 5 min lang auf Eis inkubiert. Die alkalische Lyse der Zellwände erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Lösung 2 und mehrmaligem Invertieren der Eppendorfgefäße. Die Zellyse durfte die 3-minutige Inkubationszeit nicht überschreiten. Anschließend wurden jeder Probe 150 µl Lösung 3 zugefügt und 5 min auf Eis inkubiert. Die chromosomale DNS und Proteine bildeten mit dem in der Lösung 3 vorhandenen NaAc Komplexe und wurden durch Zentrifugation (5 min, 13000 Upm) aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Plasmidpräzipitation erfolgte durch die Zugabe von 1 ml EtOH und 2 min Inkubation bei RT. Nach dem Zentrifugieren (2 min, RT, 13000 Upm) wurde das Pellet mit 70%-igem EtOH gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das getrocknete DNS-Pellet wurde in 30-50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.14.2.2. Aufreinigung von Plasmid-DNA in großen Mengen mit CsCl₂-Methode (Maxipräp)

Um größere Plasmidmengen zu isolieren, wurde eine 200 ml Übernachtskultur der Plasmid enthaltenden Kolonie angesetzt. Dem LB-Medium wurde das entsprechende Antibiotikum (Kanamycin oder Ampicillin) zugefügt. Die Bakteriensuspension wurde bei 4°C 10 min lang bei 4000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der Lösung 1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 24 ml Lösung 2 wurde die Zellsuspension 5 min inkubiert, bei diesem Schritt durfte die Suspension nur durch vorsichtiges Invertieren des Röhrchens gemischt werden. Wie schon im oberen Abschnitt erwähnt wurde sind in der Lösung 2 enthaltenes SDS und NaOH für die Zellwandlyse notwendig. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde die Lösung klar und viskos. Die Zugabe von 18 ml der Lösung 3 diente der Neutralisierung der Base und Fällung chromosomalen DNS und Proteinen. Nach einer 5-minütigen Inkubation

wurde die Suspension abzentrifugiert (20 min, 4°C, 4000 Upm) und anschließend filtriert. Die DNS-Präzipitation wurde durch Zugabe von 40 ml Isopropanol erreicht. Nach der Zentrifugation (20 min, 4°C, 4000 Upm) wurde das plasmid-haltige Pellet in 10 ml TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 2 ml 10M NH₄AC wurde die Lösung 15 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert (20 min, 4°C, 4000 Upm). Nach diesem Schritt wurde das Pellet verworfen, da es Proteine enthielt. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit 32 ml Ethanol gemischt, um die Plasmid-DNS zu präzipitieren. Nach der Zentrifugation (20 min, 4°C, 4000 Upm) wurde das Pellet kurz getrocknet und in 3,5 ml TE-Puffer gelöst. Es wurden der Lösung 4,71 g CsCl₂, 200 µl EtBr und 51 µl Triton100 zugegeben. Nach 20-minütiger Zentrifugation (4°C, 4000 Upm) wurde die untere Phase abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen (quick seal centrifuge tubes, Beckman) überfüllt. Die Röhrchen wurden mit TE-Puffer aufgefüllt, austariert und eingeschweißt. Durch die Zentrifugation (50.000 Upm, 20°C, über Nacht) im CsCl₂-Gradient trennten sich die DNS-Banden. Die obere Bande entsprach der chromosomalen DNS, die untere Bande enthielt Plasmid-DNS. Die Plasmidbande wurde unter UV-Licht mit Hilfe einer Kanüle abgenommen, in 15 ml Röhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen an mit 5M NaCl gesättigtem 100%-igem Isopropanol aufgefüllt. Die Lösung wurde gemischt und nach kurzer Zeit bildeten sich zwei Phasen. Die obere, EtBr-haltige Phase wurde abgenommen und verworfen. Dieser Extraktionsschritt wurde mehrmals wiederholt, bis die beiden Phasen keine EtBr-Reste mehr zeigten. Die plasmidhaltige, untere Phase wurde mit drei Volumen Wasser und 2,5 Volumen 100%-igem EtOH aufgefüllt und eine Stunde bei -20°C zur DNS-Fällung inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation (4°C, 4000 rpm) wurde das DNS-Pellet in 70%-igem EtOH gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Reinheit und Konzentration des isolierten Plasmids wurde photometrisch ermittelt. Anschließend wurde die gewonnene Plasmid-DNS durch Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese analysiert.

3. Ergebnisse

Die Grundlage der vorliegenden Arbeit war eine von Dr. rer. nat. Uta Kossatz durchgeführte Studie. Sie zeigte, dass die Überexpression von Cyclin E die Induktion von Endoreduplikationszyklen sowie die Entstehung von Multinuklei in Mauslebern verursacht (McEvoy J.D., Kossatz U., Malek N., Singer J. D. 2007). In der gleichen Studie wurde festgestellt, dass ein Verlust des Cullin 3 Proteins, welches Bestandteil einer E3-Ubiquitin-Ligase die an der Degradation von monomerem Cyclin E beteiligt ist, zur Stabilisierung von Cyclin E führt. Auch in diesen Mäusen konnte die Induktion von Endoreduplikationszyklen sowie eine erhöhte Anzahl multinukleärer Hepatozyten beobachtet werden. Aus den Ergebnissen dieser Studie stellte sich die Frage, ob ausschließlich monomeres Cyclin E für die Induktion der Endoreduplikation und Multinukleibildung verantwortlich ist oder ob die Aktivität der Cyclin E-Cdk2 Komplexe an der Bildung des Phänotyps beteiligt ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Endoreduplikation und Multinukleibildung als Folge der Cyclin E-Überexpression in Abhängigkeit der Cdk2-Bindung und Aktivierung näher zu untersuchen. Dies wurde in zwei Ansätzen durchgeführt: in einem *in vivo*-Modell wurde Cyclin E in Cdk2-Wildtyp und -Knockout Mäusen überexprimiert und die induzierten Phänotypen wurden verglichen. In einem *in vitro*-Modell wurden verschiedene Cyclin E-Mutanten analysiert. In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse der *in vivo*- Untersuchungen vorgestellt.

3.1. Genotypisierung der Tiere

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde DNS verwendet, die aus der Schwanzbiopsie der Tiere gewonnen wurde. Der Nachweis der Neokassette erfolgte per PCR (Polymerase-Kettenreaktion). Mit den ausgewählten Primerpaaren wurde für den Wildtyp ein 150 bp und für den Knockout ein 500 bp großes PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 3.1). Die Cdk2-Wildtyp- und -Knockout-Tiere wurden für die Virusinjektion verwendet. Die heterozygoten Mäuse wurden für die Paarung

zusammengesetzt, da die Cdk2-Knockout-Männchen und -Weibchen, aufgrund des Keimzelldefekts infertil waren (Ortega et al. 2003; Berthet et al. 2003).

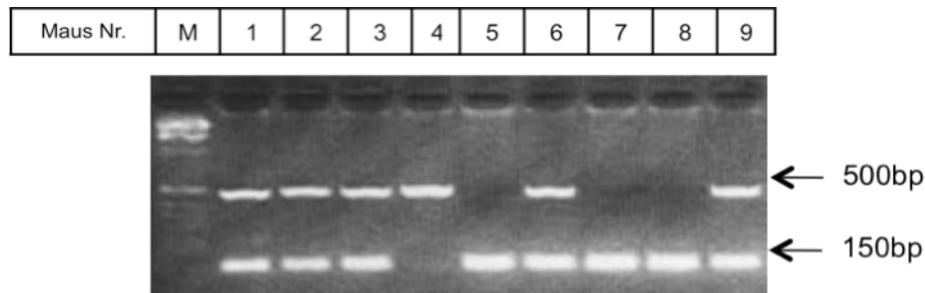


Abbildung 3.1: **Genotypisierung der Tiere.** Die Ergebnisse einer Genotypisierung sind hier exemplarisch dargestellt. Für Cdk2-Knockout wurde ein 500bp und für Cdk2-Wildtyp ein 150bp großes PRC-Produkt amplifiziert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 3%-igem Agarosegel. Die Maus Nr. 4 zeigt eine Knockoutbande, Nr. 5, 7,8 sind Wildtypmäuse. Die Nr. 1, 2, 3, 6 und 9 sind heterozygote Tiere.

3.2. Cyclin E Überexpression in der Cdk2-Knockout und –Wildtyp-Maus nach der Virusinjektion

Um die Auswirkungen der Cyclin E-Überexpression in der Mausleber zu analysieren, wurden Adenoviren verwendet, mit deren Hilfe Cyclin E in Hepatozyten überexprimiert werden kann. Die Injektion von Viruspartikeln in die Schwanzvene der Maus erlaubt eine transiente Überexpression von bestimmten Proteinen in der Leber. Für die *in vivo* Experimente wurden zwei Mausstämme verwendet: Cdk2-Wildtyp und Cdk2-Knockout. Die Mäuse des jeweiligen Stammes wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, die eine wurde mit dem Kontrollvirus (EV) behandelt, die andere mit einem Cyclin E exprimierenden Virus (Cyc E). Vier und sechs Tage nach der Virusinjektion wurden die Mäuse getötet, um die Leber zur Analyse zu entnehmen (Abb. 3.2). In der Kontrollgruppe waren insgesamt sieben Mäuse: vier davon Cdk2-Wildtyp und drei Cdk2-Knockout. Für die Cyclin E-Injektion wurden vier Cdk2-Wildtyp und fünf Cdk2-Knockout Mäuse verwendet. Für das 4-tägige Experiment wurden mindestens zwei Mäuse pro Gruppe injiziert.

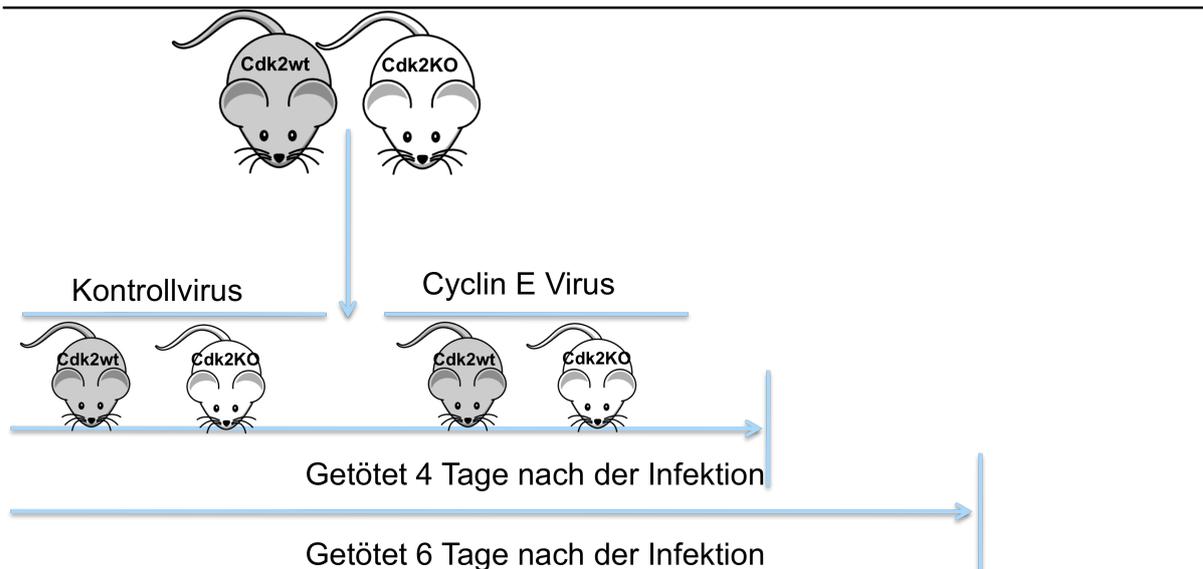


Abbildung 3.2: **Experimentübersicht.** Es wurden vier Mausgruppen im Experiment analysiert: Cdk2-Wildtyp und -Knockout Mäuse wurden mit Kontroll- und Cyclin E Virus. Ein Teil der Mäuse aus jeder Gruppe wurde nach 4 der andere nach 6 Tagen getötet und analysiert.

Phänotypanalyse

Durch die Phänotypbeschreibung sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt die Cyclin E-Überexpression zur Entstehung der multinukleären Zellen in der Mausleber und ist die Cdk2-Aktivität für die Multinukleibildung notwendig?

Um diese Frage zu beantworten, wurde die Anzahl der multinukleären Zellen in der Leber von Cdk2-Knockout- und -Wildtyp-Mäusen bestimmt. Dazu wurden die Zellmembran mit β -Catenin und die DNS mit DAPI gefärbt.

2. Was ist die Auswirkung der Cyclin E-Überexpression auf die Proliferation der Hepatozyten und wie unterscheiden sich Cdk2-Wildtyp und -Knockout Mäuse?

Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde durch die BrdU-Aufnahme und anschließende BrdU-Färbung quantifiziert.

3. Endoreduplikation ist eine Folge der Cyclin E Überexpression. Spielt Cdk2 eine Rolle bei der Endoreduplikation?

Mit Hilfe der Feulgen-Färbung kann der DNS-Gehalt der einzelnen Kerne bestimmt werden.

3.2.1. Cyclin E-Überexpression in Leberlysaten nach der Virusinjektion (Westernblot-Analyse)

Der Nachweis der Cyclin E-Überexpression in Leberlysaten wurde mit Hilfe von Westernblots überprüft, wie es in der Abbildung 3.3 gezeigt wird. Der verwendete Cyclin E -Antikörper erkannte das endogene und überexprimierte Cyclin E, so war in allen Leberlysaten eine Cyclin E-spezifische Bande zu sehen.

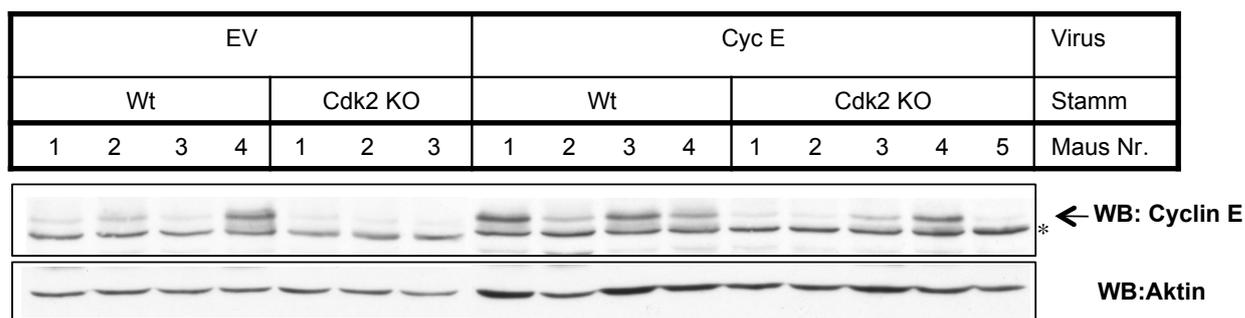


Abbildung 3.3: **Cyclin E -Spiegel in Mausleberlysaten.** Die Tiere wurden nach der Virusinjektion auf die Cyclin E Überexpression in Leber mit Hilfe von Westernblots überprüft. Die Cyclin E spezifische Bande wurde mit dem Pfeil markiert, mit dem Stern „*“ ist eine unspezifische Bande gekennzeichnet.

Wie es aus der Abbildung ersichtlich ist, wurde eine Cyclin E-Überexpression nicht in allen mit Ad-Cyclin E infizierten Mäusen erreicht. Von den fünf Cyclin E-injizierten Cdk2-Knockout- Mäusen zeigten nur zwei erhöhte Cyclin E-Spiegel, was wahrscheinlich an der Destabilisierung von Cyclin E in der Abwesenheit von Cdk2 bzw. Bindung an Cdk2 liegt (Clurman et al. 1996). Daher wurden für die weiteren Analysen nur diejenigen Mäuse berücksichtigt, die einen deutlichen Anstieg von Cyclin E im Vergleich zu den Kontrollen zeigten (wt-Mäuse Nr.: 1, 3 und 4, ko-Mäuse Nr.: 3 und 4). Die Cdk2-Wildtyp-Kontrollmaus Nr. 4 zeigte einen ungewöhnlich hohen Cyclin E-Spiegel. Es ist nicht auszuschließen, dass bei der Injektion ein Fehler unterlaufen ist und die Maus mit Cyclin E-Virus injiziert wurde, daher wurde sie von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

3.2.2. Leberanalyse nach 4-tägiger Cyclin E-Überexpression

Um das frühe Stadium der Phänotypausbildung durch die Cyclin E-Überexpression zu analysieren, wurden Cdk2-Wildtyp- und -Knockout-Tiere 4 Tage nach der Virusinjektion untersucht.

Proteinexpressionsanalyse

Wie schon im Abschnitt 3.2.1 erwähnt, wurden nur Mäuse mit erhöhtem Cyclin E-Spiegel für die Analysen ausgewählt. Zusätzlich wurde der Cdk2-Knockout mit Hilfe von Westernblots überprüft, erwartungsgemäß konnte kein Cdk2-Protein in Cdk2-Knockout Mäusen nachgewiesen werden. Cdk2 erscheint als eine Doppelbande im Westernblot, weil es während des Zellzyklus durch Phosphorylierung reguliert wird (Morgan 1995). Der Nachweis von Aktin im Westernblot wurde verwendet, um sicher zu stellen, dass alle Spuren des Gels gleichmäßig beladen wurden (Abb. 3.4).

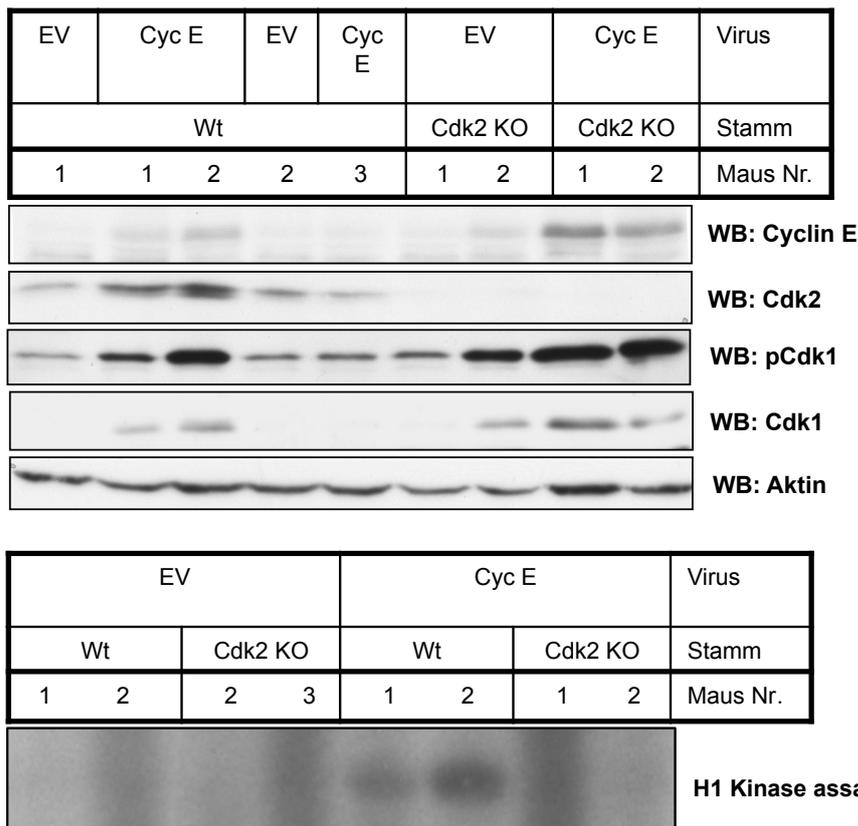


Abbildung 3.4: **Proteinanalyse der Mauseberlysate nach 4-tägigen Cyclin E Überexpression.** Westernblotanalyse der Expression von Cyclin E und Cdk1-, Cdk2-Kinasen in Leberlysaten 4 Tage nach der Virusinjektion. Bestimmung der Cyclin E gebundener Kinaseaktivität in den Leberlysaten. Zwei der Cdk2-Wildtyp Mäuse zeigten eine detektierbare Kinaseaktivität nach der Cyclin E Überexpression

Es ist bekannt, dass Cdk1 in den Cdk2-Knockout Mäusen die Funktion von Cdk2 übernimmt und damit die Progression des Zellzyklus steuert (Aleem et al. 2005). Aus diesem Grund wurde die Expression der Cdk1-Proteine in Cdk2-Wildtyp- und – Knockout-Tieren analysiert. Wie aus der Abbildung 3.4 deutlich wird, steigt der Cdk1-Spiegel in den Cyclin E-behandelten Mäusen. Dieser Anstieg korreliert mit der erhöhten inhibitorischen Phosphorylierung von Cdk1 (Thr-14 und Tyr-15), was bedeutet, dass Cdk1 zwar exprimiert wird aber überwiegend in der inaktiven Form vorliegt. Cdk2-Knockout-Kontrollmaus Nr. 2 zeigt auch einen erhöhten Cdk1-Proteinspiegel, der Cyclin E-Level dieser Maus ist aber auch leicht erhöht im Vergleich zu den anderen Kontrollmäusen. Durch die Cyclin E-Überexpression wurde eine erhöhte Kinaseaktivität der Cyclin E-Cdk2-Komplexe erwartet und mit Hilfe von Kinaseassays untersucht. Ein Anstieg der Kinaseaktivität wurde in den zwei Cyclin E-injizierten Cdk2-Wildtyp-Mäusen (Nr. 1 und 2) detektiert, Cdk2-Knockout-Mäuse zeigten keine Cyclin E gebundene Kinaseaktivität.

Phänotypanalyse

Die multinukleären Zellen wurden in Cdk2-Knockout- und –Wildtyp-Tieren nach der Cyclin E-Behandlung quantifiziert und die Ergebnisse in der Abbildung 3.5A zusammengefasst. Der Anteil der multinukleären Zellen stieg in den Cyclin E überexprimierenden Cdk2-Knockout-Hepatozyten auf 1,3%, im Vergleich dazu wurden nur 0,6% multinukleären Zellen in der Kontrolle identifiziert. In der Cdk2-Wildtyp-Mausleber wurde kein Unterschied in der Multinukleibildung zwischen der Kontrolle und der Cyclin E-behandelten Gruppe festgestellt. Die Quantifizierung der proliferierenden Zellen ergab keinen signifikanten Anstieg der Proliferation in den Cyclin E überexprimierenden Hepatozyten (Abb. 3.5B). Die Bestimmung des DNS-Gehalts der Kerne ist in der Abbildung 3.5C dargestellt. Es ist ein Anstieg der 4n, 8n und 16n Kernpopulationen sowohl in den Cyclin E überexprimierenden als auch in den Kontrolltieren zu beobachten.

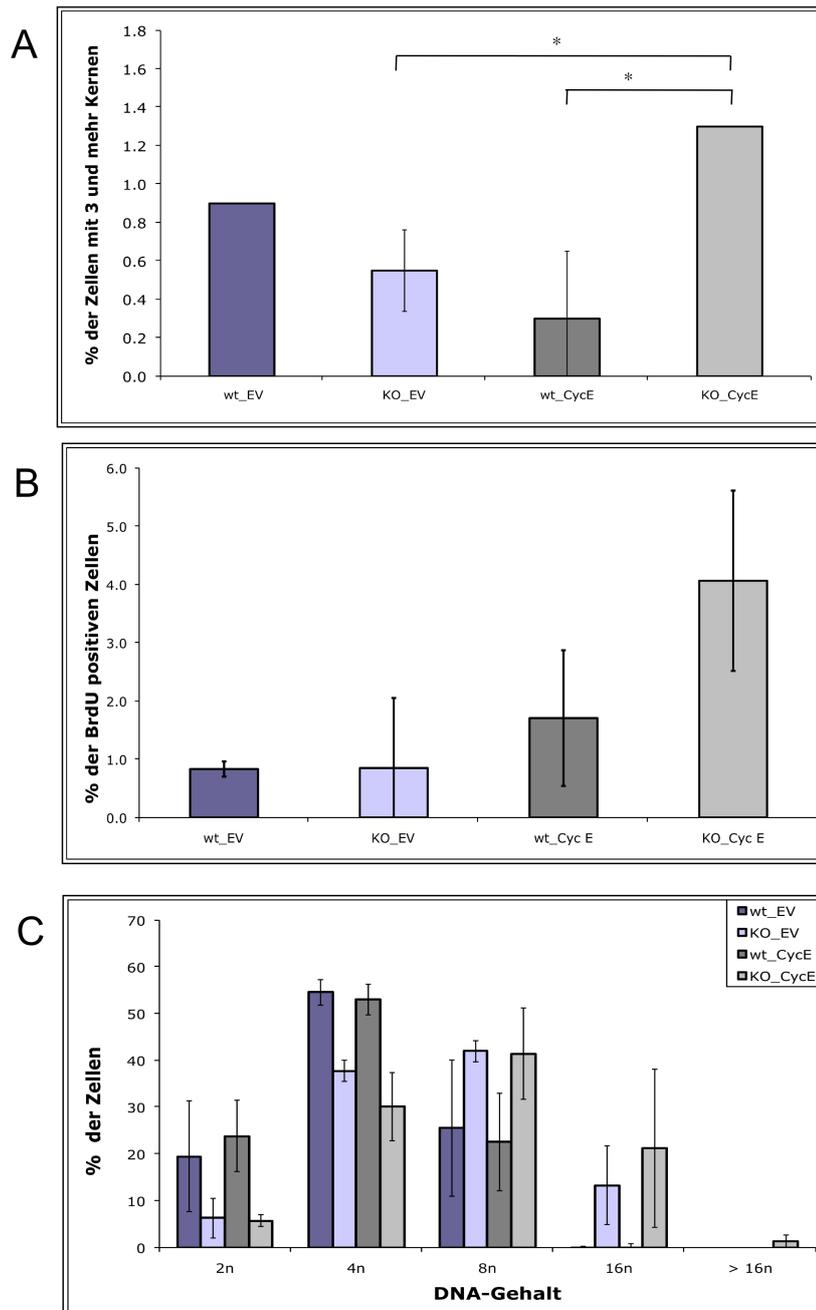


Abbildung 3.5: **Phänotypanalyse der Mausleber nach 4-tägiger Cyclin E-Überexpression.** Cdk2-Wildtyp und -Knockout Mäuse wurden mit Kontrollvirus und Cyclin E überexprimierendem Virus infiziert und deren Leber nach 4 Tagen analysiert. A) quantitative Analyse der multinukleären Zellen mit Hilfe von β -Catenin und DAPI Färbungen. Es wurden 10 Sichtfelder pro Maus ausgewertet. B) Bestimmung der BrdU-positiven Zellen. Die Visualisierung der proliferierenden Zellen erfolgte durch die BrdU-Färbung. Es wurden 10 Sichtfelder pro Maus ausgerechnet. C) DNA-Gehalt der einzelnen Kerne wurde durch die Feulgenfärbung ermittelt. 300 Nuklei pro Maus wurden ausgewertet.

Die Analyse der Mausleber vier Tage nach der Virusinjektion wurde durchgeführt, um die frühe Phase der Multinukleibildung und Endoreduplikation zu untersuchen. Es konnte kein Unterschied auf der Phänotypenebene in den Cyclin E-behandelten und Kontrolltieren festgestellt werden. Dies ist durch den starken Einfluss der Virusinfektion zu diesem Zeitpunkt zu erklären. Aus diesen Gründen wird im Weiterem nur auf die 6-tägige Überexpression genauer eingegangen.

3.2.3. Leberanalyse nach 6-tägiger Cyclin E-Überexpression

Proteinexpressionsanalyse

Die Westernblots der in den weiteren Experimenten verwendeten Mäuse sind in der Abbildung 3.6 zusammengefasst. Die Cyclin E-injizierten Mäuse zeigten einen Anstieg der Cyclin E-Expression, verglichen mit den Kontrollmäusen. Eine Cdk2-spezifische Bande wurde nur in den Wildtyp-Mäusen nachgewiesen. Die Cyclin E-Überexpression korreliert positiv mit dem Anstieg der inhibierenden Cdk1-Phosphorylierung in den Wildtyp-Mäusen und einer Cdk2-Knockout Maus. Der Einfluss der Cyclin E-Überexpression auf die anderen regulierenden Bestandteile des Zellzyklus wurde durch die Analyse des Cyclin B-Spiegels überprüft. Dabei wurde ein Anstieg der Cyclin B-Expression bei einer Cdk2-Knockout Maus und eine leichte Zunahme des Cyclin B-Spiegels bei zwei Wildtyp-Mäusen infolge der Cyclin E-Überexpression detektiert. Für eine eindeutige Aussage müssen die Cyclin B-Spiegel weiterer Kontrollmäuse durch Westernblot analysiert werden. Die gleichmäßige Beladung der Gelspuren wurde mit Hilfe des Aktin-Westernblots sichergestellt.

Mit Hilfe von Kinaseassays wurde die Aktivität der an Cyclin E gebundenen Kinasen überprüft. Trotz der starken Cyclin E-Überexpression konnte kein eindeutiges Signal der Kinaseaktivität detektiert werden. Die leicht erhöhten p27-Spiegel in den Cyclin E-injizierten Mäusen könnten ein Grund für die fehlende Kinaseaktivität sein, da p27 ein Inhibitor der Cyclin E-gebundenen Kinaseaktivität ist (Sherr & Roberts 1995; Sheaff et al. 1996).

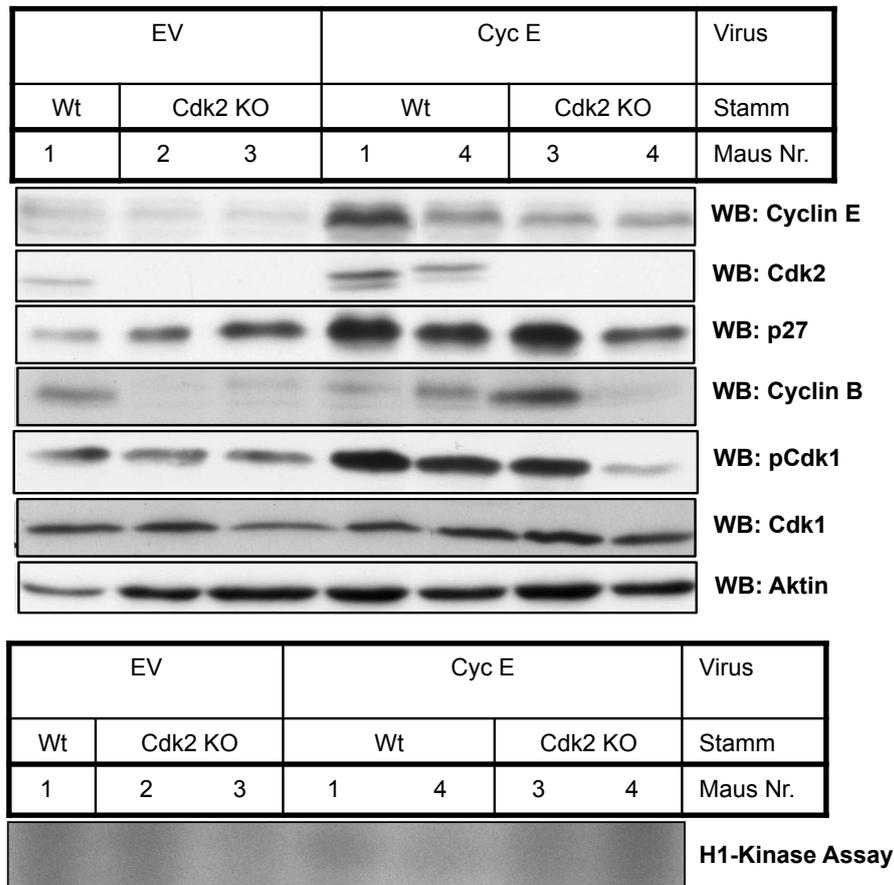


Abbildung 3.6: **Proteinanalyse der Mauseberlysate nach 6-tägigen Cyclin E Überexpression**
 Westernblotanalyse der Expression von Cyclin E, Cdk2, p27 Cdk1 und pCdk1 in Mauseberlysaten 6 Tage nach der Virusinfektion. Bei der Bestimmung der Cyclin E gebundener Kinaseaktivität in den Leberlysaten zeigte keine der Mäuse eine detektierbare Kinaseaktivität.

Bestimmung der Anzahl der multinukleären Zellen

Wie schon im Abschnitt 3.2 erwähnt wurde, ist die Multinukleibildung ein Indiz der genetischen Instabilität (Hubalek et al. 2004). Für die Bestimmung der multinukleären Zellen wurde die Zellmembran mit Hilfe der β -Catenin-Färbung sichtbar gemacht, eine DAPI-Färbung wurde verwendet, um die DNS zu visualisieren. In der Abbildung 3.7 sind Beispielbilder der β -Catenin- und DAPI-Färbung dargestellt.

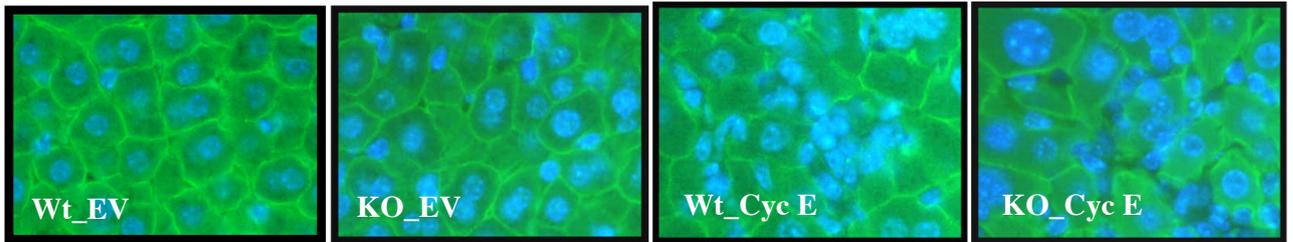


Abbildung 3.7: **6-tägige Cyclin E Überexpression führt zur Bildung multinukliären Zellen in der Mausleber.** Exemplarische Darstellung der β -Catenin-Färbung für Zellmembran (grün) und DAPI-Färbung für DNS (blau) an den Paraffinschnitten der Mausleber zur Quantifizierung der multinukliären Zellen.

Leberschnitte der Kontrollmäuse (Wt-EV und KO-EV) zeigten überwiegend gleichgeformte Zellen, während in Cyclin E überexprimierenden Lebern (Wt-Cyc E und KO-Cyc E) besonders große Zellen mit vielen Kernen auffielen. Die Anzahl dieser multinukleären Zellen wurde in den Cyclin E-injizierten und Kontroll-Mäusen bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.8 zusammengefasst. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der Zellen mit mehr als drei Zellkernen in den Kontroll- und Cyclin E überexprimierenden Tieren. Ein signifikanter Anstieg der multinukleären Zellen wurde in Cdk2-Knockout-Leberschnitten nach der Cyclin E Überexpression beobachtet. Der Anteil der multiplen Kerne erreichte hier 14% und überstieg damit den Kontrollwert (6%) um das Doppelte.

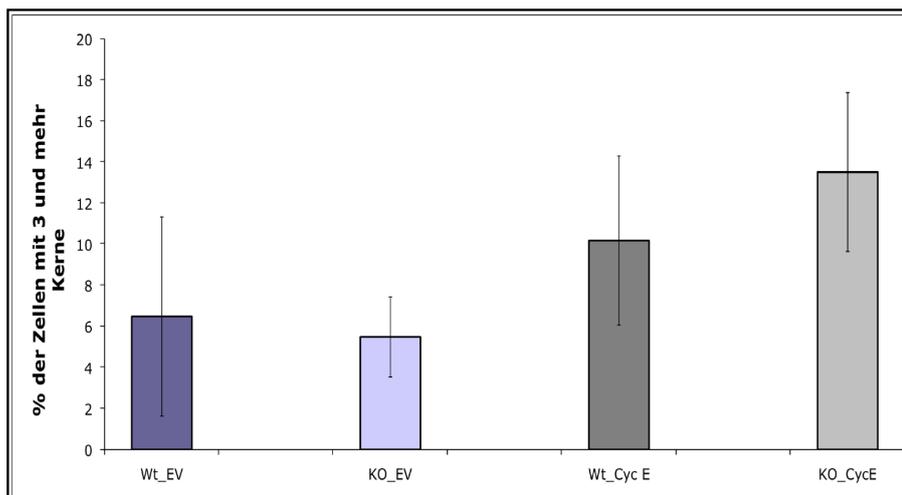


Abbildung 3.8: **6-tägige Cyclin E Überexpression führt zur Bildung multinukliären Zellen in der Mausleber.** Quantifizierung der multinukleären Zellen (3 oder mehr Nuklei) durch β -Catenin- und DAPI-Färbungen. Es wurden 10 Sichtfelder pro Maus ausgewertet.

Die vorliegenden Analysen zeigen, dass die Cyclin E-Überexpression zur Multinukleibildung in der Leber von Cdk2-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen führt. Dies weist darauf hin, dass Cdk2 keine Rolle bei der Ausbildung multinukleärer Zellen spielt.

Bestimmung der Anzahl der proliferierenden Zellen

Als nächstes wurde überprüft, ob eine Cyclin E-Überexpression eine erhöhte Proliferation der Zellen induziert. Die proliferierenden Zellen wurden durch die BrdU-Aufnahme und entsprechende Färbung identifiziert, mit Hilfe der DAPI-Färbung konnte die Gesamtzahl der Kerne pro Sichtfeld bestimmt werden. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in der Abbildung 3.9 dargestellt. Es ist ein geringer Anstieg der Proliferation durch die Cyclin E -Überexpression zu verzeichnen, so stieg der Anteil der proliferierenden Zellen von 1% auf ca. 4%. Dieser Unterschied war nur im Falle der Cdk2-Knockout Mäuse signifikant, in den Cyclin E-überexprimierenden Cdk2-Wildtyp-Hepatozyten konnte aufgrund der großen Standardabweichung keine Signifikanz ermittelt werden.

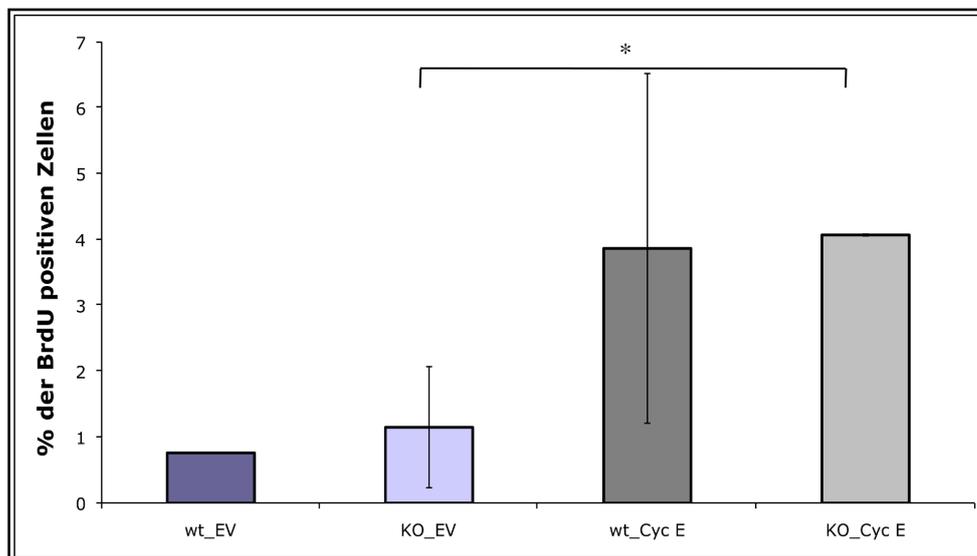


Abbildung 3.9: **Quantifizierung der proliferierenden Hepatozyten nach 6-tägigen Cyclin E-Überexpression.** Cdk2-Wildtyp und -Knockout Mäuse wurden mit Kontrollvirus und Cyclin E überexprimierendem Virus behandelt und deren Leber nach 6 Tagen analysiert. Bestimmung der proliferierenden Zellen durch die BrdU-Färbung. Es wurden 10 Sichtfelder pro Maus ausgerechnet

Das vorliegende Experiment zeigt, dass die Cyclin E-Überexpression zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation der Cdk2-Knockout Hepatozyten führt.

Bestimmung der Anzahl der endoreduplizierenden Zellen

Rückschlüsse auf eine Endoreduplikation können aus der Ploidiebestimmung der Zellkerne gemacht werden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.10 dargestellt. Auf der X-Achse ist die Ploidie der Kerne aufgetragen, auf der Y-Achse der dazugehörige Prozentanteil der Kerne. Die ersten zwei Balken repräsentieren die zwei Kontrollgruppen, die beiden nachfolgenden stehen für die Cyclin E-behandelten Mäuse (Cdk2-Wildtyp und -Knockout). Nach der 6-tägigen Cyclin E-Überexpression zeichnete sich in den Cdk2-Wildtyp und -Knockout-Mauslebern ein eindeutiger, signifikanter Anstieg der polyploiden (8n und 16n) Kerne ab. So hatten Cdk2-Wildtyp-Hepatozyten 17,4% und die Cdk2-Knockout-Hepatozyten sogar 38% der Kerne mit 8n-DNS-Gehalt. Damit lag der Wert deutlich über dem der Kontrollgruppe (mit 4%). Durch die Cyclin E-Überexpression stieg der Anteil der 16-ploiden Zellkerne auf 0,87% in Cdk2-Wildtyp- und auf 3,9% in Cdk2-Knockout-Hepatozyten, während in der Kontrollgruppe keine 16-ploiden Kerne indentifiziert werden konnten. Auffallend bei diesen Ergebnissen ist auch ein signifikanter Unterschied zwischen den Cdk2-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen: die Cyclin E-Überexpression induziert mehr endoreduplizierende Kerne in der Cdk2-Knockout- als in -Wildtyp-Leber.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Cyclin E unabhängig von der Cdk2-Aktivität die Endoreduplikation der Hepatozyten induzieren kann. Möglicherweise spielt Cdk2 sogar eine Rolle bei der Inhibierung der Endoreduplikation, da die Cdk2-Wildtyp- Hepatozyten signifikant weniger polyploide Kerne ausbilden.

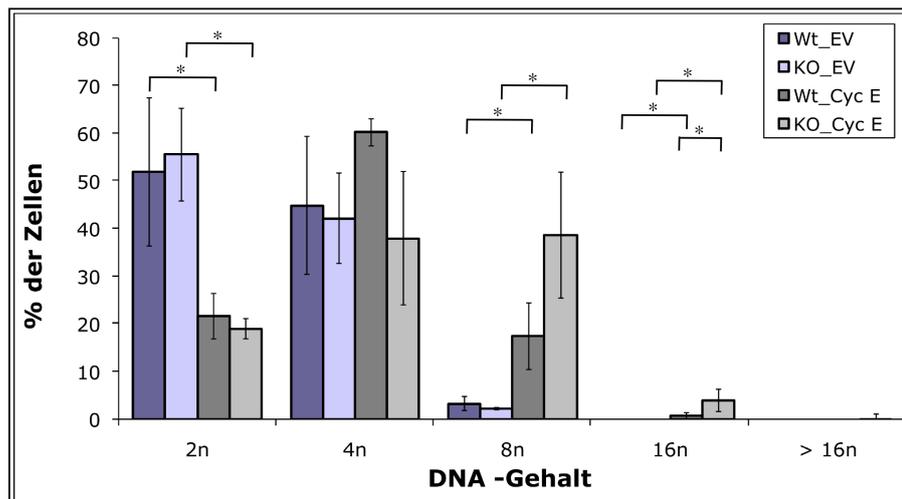


Abbildung 3.10: **6-tägige Überexpression von Cyclin E in Mausleber führt zu Endoredublikation.** Cdk2-Wildtyp und -Knockout Mäuse wurden mit Kontrollvirus und Cyclin E überexprimierendem Virus behandelt und deren Leber nach 6 Tagen analysiert. Quantifizierung von DNS-Gehalt durch Feulgenfärbung. 300 Nuklei pro Maus wurden ausgewertet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Multinukleibildung und die Endoreduplikation als eine Folge der Cyclin E-Überexpression sowohl in der Cdk2-Wildtyp- als auch in der Cdk2-Knockout-Mausleber festzustellen war. Dies deutet daraufhin, dass der Phänotyp auch durch monomeres Cyclin E und nicht nur durch Cyclin E-Cdk2-Komplexe verursacht wird. Der auffallend größere Anstieg der polyploiden Kerne in den Cdk2-Knockout-Hepatozyten spricht für eine schützende Funktion von Cdk2 vor der Endoreduplikation. Der frühe Einfluss der Cyclin E-Überexpression konnte nicht bewertet werden, da zu diesem Zeitpunkt der Effekt der Virusinfektion überwog.

3.3. Charakterisierung der wt Cyclin E-Mutanten im transienten System

Die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchungen haben bestätigt, dass die Cyclin E-Überexpression zur Endoreduplikation und Multinukleibildung führt, einen verstärkten Phänotyp konnte man durch die Deletion von Cdk2 erreichen. Um die molekularen

Mechanismen zu erklären, wurden unterschiedliche Cyclin E-Mutanten, die von der Arbeitsgruppe J. Singer zur Verfügung gestellt wurden, zur Analyse herangezogen. Das Ziel der nachfolgenden Experimente war es, die Abhängigkeit der Bi- bzw. Multinukleibildung von der intrazellulären Lokalisation der Mutanten sowie der Bindung und Aktivierung von Cdk2 zu untersuchen.

24 Cyclin E Mutanten wurden von Kerstin Römermann im Rahmen ihrer Bachelorarbeit mit dem Thema „Funktionelle Charakterisierung von Mutanten des Cyclin E Proteins“ analysiert. Für die genaueren Untersuchungen wurden diejenigen Mutanten ausgewählt, die, verglichen mit wt-Cyclin E, einen großen Anteil an Binuklei induzierten.

Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Cyclin E-Mutanten

Um die intrazelluläre Lokalisation und Binukleibildung der Cyclin E-Mutanten zu bestimmen, wurden NIH3T3 mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert und 48h später fixiert. Da alle Mutanten und wt-Cyclin E mit einem 6-fachen myc-Tag fusioniert waren, konnten sie mit anti-myc-AlexaFluor555-Antikörper gefärbt und damit von den nicht transfizierten Zellen unterschieden werden (Abb. 3.11A und B). Aufgrund der Lokalisation konnten die Cyclin E Mutanten in drei Gruppen eingeteilt werden. Eine Gruppe schloss die Mutanten mit überwiegend nukleärer Lokalisation ein, wie z.B. C4. Die Mutanten der zweiten Gruppe waren zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilt, zu dieser Gruppe gehörten C3 und C6. Ein Teil der Cyclin E-Proteine dieser Gruppe zeigte auch eine reine nukleäre oder zytoplasmatische Lokalisation. Die dritte Gruppe der Mutanten war überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wie C8 (Abb. 3.11A und Tab. 3.1).

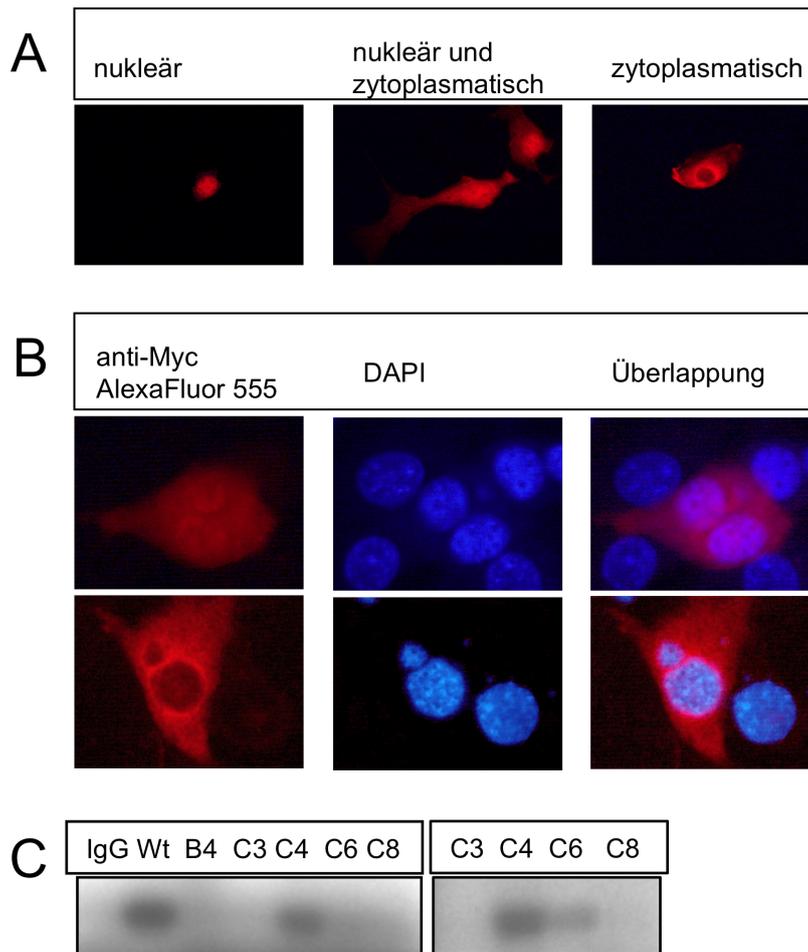


Abbildung 3.11: **Lokalisation und Kinaseaktivität von Cyclin E und seinen Mutanten** A) repräsentatives Beispiel für die Lokalisation der Cyclin E Mutanten. NIH3T3-Zellen wurden transient mit Cyclin E Mutanten transfiziert und mit anti-myc-AlexaFluor555 (rot) gefärbt. B) repräsentatives Beispiel der Binukleibildung in NIH3T3-Zellen durch die Überexpression von Cyclin E und seinen Mutanten. Färbung von Cyclin E und Mutanten mit anti-myc-AlexaFluor555 (rot), DAPI-Färbung (blau) für DNS. C) Bestimmung der Cyclin E gebundener Kinaseaktivität mit Proteinlysaten transfizierter 293HEK-Zellen

Bestimmung der Anzahl der multinukleären Zellen

Mit Hilfe der Bi- bzw. -Multinukleibestimmung sollten die Mutanten identifiziert werden, deren Expression zur genetischen Instabilität in NIH3T3-Zellen führen kann. Die binukleären Zellen enthielten entweder zwei gleich große Kerne oder einen zusätzlichen Mikronukleus neben dem normalen Zellkern (Abb. 3.11 B). Die Quantifizierung der Binuklei ist in der Tabelle 3.1 dargestellt. Die Überexpression

sämtlicher, hier aufgeführter Mutanten führte zum Anstieg der binukleären Zellen. Um den Anstieg der multinukleären Zellen besser vergleichen zu können, wurde der Multinukleianteil der Mutanten auf wt-Cyclin E bezogen und in Prozent umgerechnet.

Aktivierung von Cdk2 durch Cyclin E-Mutanten

Als nächstes sollte untersucht werden, ob einige der phänotypbildenden Mutanten kinase-unabhängig agierten. Um diese Frage zu beantworten, wurden Kinaseassays mit den Mutanten durchgeführt. Durch die Immunpräzipitation der Cyclin E-Mutanten mit myc-Antikörper und anschließender Inkubation mit dem Substrat Histon H1 und radioaktivem $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ konnte die Fähigkeit der Cyclin E-Mutanten eine Kinase zu aktivieren ermittelt werden. Wie aus der Abbildung 5.11C ersichtlich ist, zeigten nur Proteinkomplexe mit wt-Cyclin E, C4- und C6-Mutanten eine detektierbare Kinaseaktivität.

Die gefundenen Eigenschaften der Cyclin E-Mutanten sind in der Tabelle 3.1 noch einmal zusammenfassend dargestellt. Anhand der beschriebenen Parameter konnten zwei Mutanten identifiziert werden (C3 und C8), die trotz fehlender Kinaseaktivität zur Binukleibildung führten. Die ausgewählten Mutanten werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der untersuchten Eigenschaften von wt Cyclin E und seinen Mutanten
Übersicht der beobachteten Phänotypen, induziert durch die transiente Überexpression von Cyclin E und seinen Mutanten. Legende: + 0-25%, ++ 25-50%, +++ 50-75%, +++++ 75-100%.

	Nuk	Nuk+Zyt	Zyt	Binuclei in % zum Wt	Kinase-aktivität	Mutation	Domäne
Wt	++++	+		100	hoch		
C3	++	+++	+	369	keine	188-192	N-terminal cyclin box
C4	+++	++		216	mittel	278	VxCxE-Motiv
C6	++	+++	+	277	niedrig	70-72 349-358	N-terminal cyclin box
C8	+	+	++++	211	keine	273-278	C-terminal cyclin box, VxCxE-Motiv

3.3.1. Die ausgewählten Cyclin E Mutanten

Die Mutationen der ausgewählten Mutanten wurden durch Sequenzierung ermittelt (Tab. 3.2)

Tabelle 3.2: Ermittelten Mutationen der C3- und C8-Mutanten

Die fünf Aminosäuren (EEIYP) der C3-Mutante wurden durch Alanine ersetzt. Die C8-Mutante wies eine Deletion von sechs Aminosäuren (DVDCLE) auf.

wt Cyclin E	181	LFIAAKL EEIYP PKLHQFAYVTDGACSGDEILTMELMIMKALKWRLSPLTIVSWLNVYMQ	240
C3_Cyclin E	181	LFIAAKL AAAAA PKLHQFAYVTDGACSGDEILTMELMIMKALKWRLSPLTIVSWLNVYMQ	240

wt Cyclin E	241	VAYLNDLHEVLLPQYPQQIFIQIAELLDLCVLD DVDCLE FPYGILAASALYHFSSSELMQK	300
C8_Cyclin E	241	VAYLNDLHEVLLPQYPQQIFIQIAELLDLCVL-----FPYGILAASALYHFSSSELMQK	294

C3-Mutante

Die C3-Mutante weist eine Mutation in der N-terminalen Cyclin Box auf, die Aminosäuren 188-192 wurden durch Alanine ersetzt (Tab. 3.2). Wie mit Hilfe vom Kinaseassays gezeigt wurde (Abb. 3.9C), war die Mutante unfähig Cdk2 zu aktivieren. Die fehlende Kinase-Aktivität schließt aber die Bildung von inaktiven C3-Cdk2-Komplexen nicht aus. Die Abbildungen 3.12 A und B zeigen die Ergebnisse einer Immunpräzipitation, die mit Lysaten transient transfizierter 293HEK (Abb. 3.12A) und HeLa (Abb. 3.12B), sowie stabil-induzierbaren NIH3T3 (Abb. 3.12C) durchgeführt wurde. In den Ko-Immunpräzipitation-Experimenten mit anti-myc- und anti-Cdk2-Antikörpern wurde gezeigt, dass nur wt-Cyclin E und die C3-Mutante an Cdk2 banden. Geng et al. 2007 analysierten diese Mutante und stellten fest, dass die C3-Cdk2-Komplexe inaktiv waren und die Cyclin E-Cdk2-Substrate, wie H1, pRb, Cdc6, p107, Cdc25 nicht phosphorylieren konnten. Die Lokalisationsanalyse der Mutante zeigte, dass das Protein nukleär und zytoplasmatisch lokalisiert war. Durch die transiente Überexpression der C3-Mutante konnte ein dreifacher Anstieg an Binuklei erreicht werden.

C8-Mutante

Die C8-Mutante wies eine Deletion im VxCxE-Motiv auf (Tab. 3.2). Das VxCxE-Motiv liegt in der Cyclin Box (Aminosäuren 273-278) und wurde zunächst von Kelly et al. 1998 als Binde- und Interaktionssequenz für das Rb-Protein vermutet, dies wurde von Honda et al. 2005 aufgrund der Strukturanalyse der Proteinkomplexe jedoch in Frage gestellt. Die C8-Mutante war unfähig die Cdk2 Kinase zu aktivieren (Abb. 3.11C). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Mutante nicht an Cdk2 bindet (Abb. 3.12A, B und C). Das Protein war überwiegend im Zytoplasma lokalisiert und war in der Lage doppelt so viele Binuklei zu induzieren wie wt-Cyclin E (Tab. 3.1).

Die Aufgabe bei der Charakterisierung der Cyclin E-Mutanten war die Abhängigkeit des Phänotyps (hier multinukleäre Zellen) von der Kinaseaktivität und Lokalisation zu ermitteln. Durch die Analyse konnten zwei Mutanten (C3 und C8) identifiziert werden, die sich in der intrazellulären Lokalisation stark unterschieden, aber beide zu der

Binukeibildung im transienten System führten (Tab. 3.1). Die beiden Mutanten waren unfähig eine Kinase zu aktivieren.

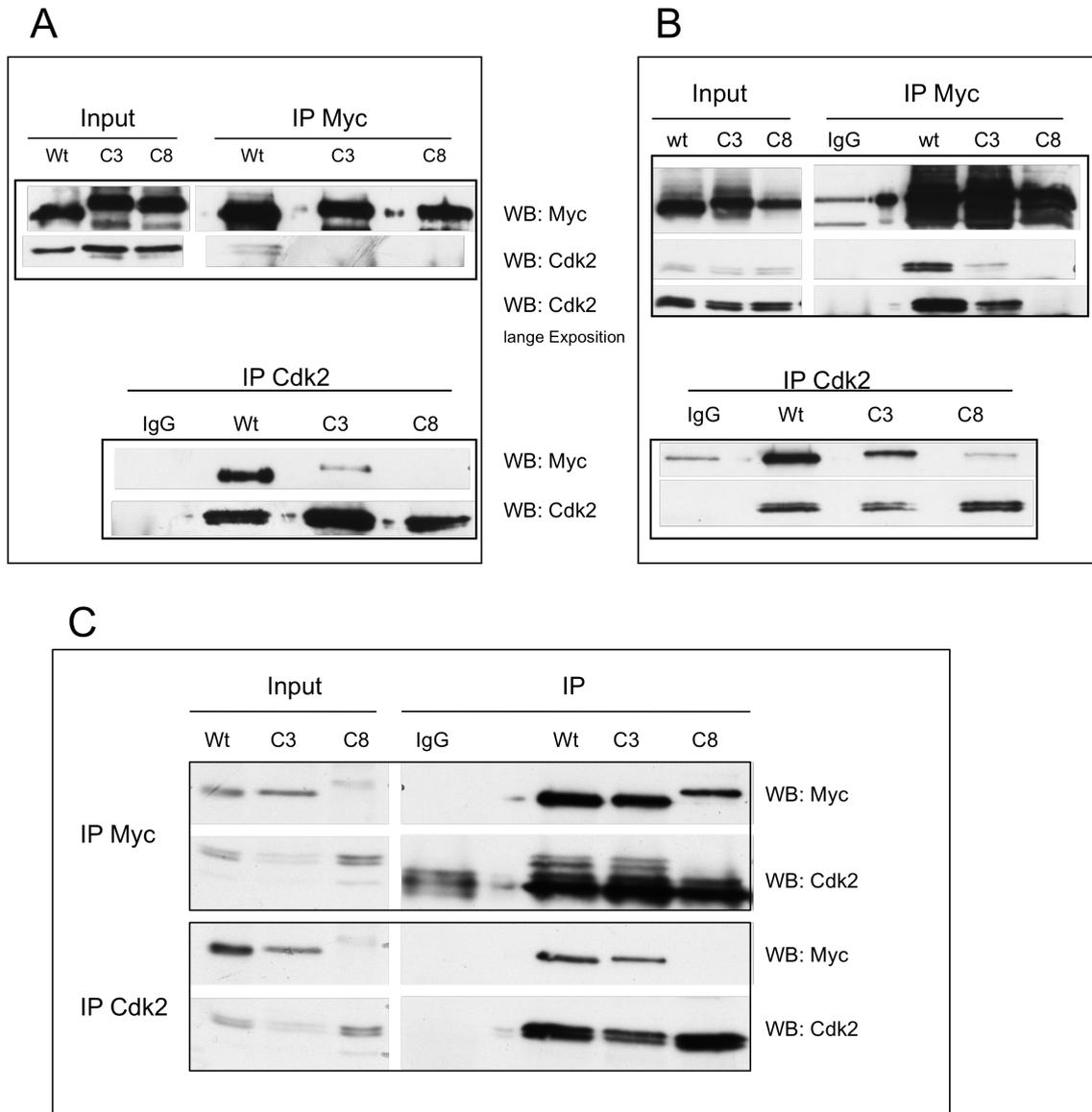


Abbildung 3.12: **Bindung der wt Cyclin E und seinen Mutanten an Cdk2** A) 293HEK-Zellen und B) HeLa-Zellen wurden mit wt Cyclin E, C3 und C8 Mutante transfiziert. Es wurde in Ko-Immunopräzipitationen mit anti-Cdk2 und anti-myc Antikörper Bindung an Cdk2 untersucht. C) Co-Immunopräzipitation wie in A) in stabilen induzierbaren NIH3T3.

In weiteren Experimenten sollte der Effekt der Überexpression von wt-Cyclin E und der Mutanten (C3 und C8) auf den Zellzyklus bzw. die Zellzyklusphasen analysiert werden. Da die Dauer der Experimente mehrere Tage überschritt, war es nicht möglich sie im transienten System durchzuführen. Es wurden also unterschiedliche stabile Zelllinien mit dem wt-Cyclin E und den Mutanten generiert.

3.4. Charakterisierung der Cyclin E-Mutanten im stabilen System

Durch die stabile Integration der linearisierten Cyclin E-Plasmide wurden stabile Cyclin E überexprimierende Zelllinien in Maushepatomazellen (HePa1-6) generiert. Die positiven Klone wurden mit Hilfe von anti-myc-Westernblots ermittelt. Es ist anzumerken, dass es nur wenige Klone gab, die eine detektierbare Cyclin E-Überexpression aufwiesen. Es wäre denkbar, dass die Klone mit hohem Cyclin E-Spiegel während der Selektion starben, da Cyclin E zur genetischen Instabilität und DNS-Schäden führt (Spruck et al. 1999; Hubalek et al. 2004) und damit ein Zellwachstum über einen längeren Zeitraum verhindert. Es wurde für die weiteren Experimente ein wt-Cyclin E- und ein C8-Mutante-Klon ausgewählt. Die Generierung von stabilen C3-überexprimierenden Zelllinien lieferte keine positiven Klone. Als Kontrolle wurde ein Klon mit stabiler Integration des Puromycin-Plasmids verwendet.

3.4.1. Nocodazolarrest in stabilen Hepa1-6 Zelllinien

In den *in vivo*-Experimenten wurde gezeigt, dass eine Cyclin E-Überexpression zur Entstehung von multinukleären Zellen in der Mausleber führt. Die multiplen Kerne können dabei eine Folge der fehlerhaften Mitose oder Cytokinese sein (Storchova & Kuffer 2008). Zunächst wurde der Einfluss der Cyclin E-Überexpression auf die Mitose analysiert. Die Zellen wurden mit Nocodazol (einer mikrotubuli-destabilisierenden Chemikalie) in der Metaphase arretiert. Nach 10-stündiger Behandlung wurden die abgerundeten, mitotischen Zellen durch Abschütteln isoliert (Abb. 3.13A und B). Durch das Auswaschen von Nocodazol konnten die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten. Der Eintritt in die G1-Phase wurde mit Hilfe von

Westernblots und Durchflusszytometrie verfolgt. In der Abbildung 3.13B ist die Entlassung aus dem Nocodazolarrest exemplarisch dargestellt.

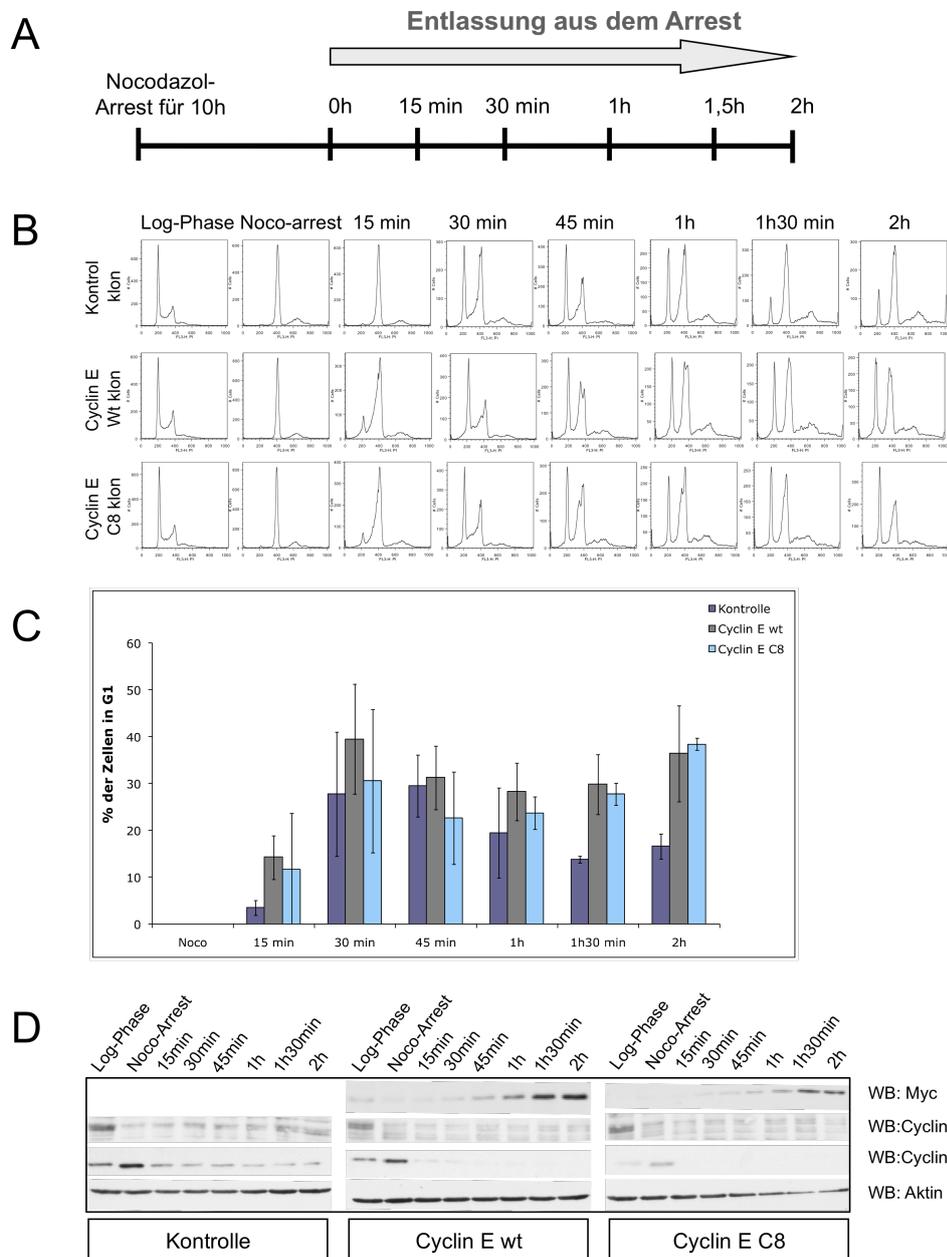


Abbildung 3.13: **Stabile Überexpression von wt Cyclin E in HePa1-6 Klonen führt zur beschleunigten Zellteilung nach der Entlassung aus dem Nocodazolblock.** A) Zeitlicher Ablauf des Experimentes. B) repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse des Kontrollklons, wt Cyclin E und C8 überexprimierenden Klonen während der Entlassung aus dem Nocodazolblock C) Zusammenfassung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. D) Westernblotanalyse der Expression von myc-Cyclin E, Cyclin E und Cyclin B im und nach dem Nocodazolblock

Die obere Reihe zeigt den Kontrollklon, die unteren wt-Cyclin E und die C8-Mutante. Die asynchron wachsenden Zellen zeigen ein typisches Zellzyklusprofil, bei dem sich der größere Teil der Zellen in der G1-Phase (ca. 40%) befindet und ca. 30% der Zellen in G2/M. In der zweiten Reihe sind die durch Abschütteln isolierten Metaphase-Zellen dargestellt, die einen doppelten DNS-Gehalt haben. Die weiteren Histogramme zeigen, wie sich das Zellzyklusprofil während der Entlassung aus dem Nocodazolarrest verändert.

Die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten sind in der Abbildung 3.13C zusammengefasst. Im Diagramm ist die Prozentzahl der Zellen in der G1-Phase nach der Entlassung aus dem Nocodazolarrest dargestellt. Die erste Messreihe repräsentiert die Kontrolle, gefolgt von wt-Cyclin E und der C8-Mutante. Das Diagramm zeigt, dass wt-Cyclin E in den früheren (15min und 30min) und späten (1h30min und 2h) Zeitpunkten nach der Entlassung mehr Zellen in G1 hatte als der Kontrollklon. Die C8-Mutante verhielt sich in der ersten Stunde nach der Entlassung ähnlich wie die Kontrolle, nur in den letzten zwei Zeitpunkten (1h30min und 2h) ist ein eindeutiger Anstieg der G1-Zellen zu verzeichnen. Trotz der großen Standardabweichung wurde in jedem der Experimente eine gleiche Tendenz beobachtet.

Die Progression durch die Zellzyklusphasen kann durch die Expression der im Zellzyklus regulierten Bestandteile der basalen Zellzyklusmaschinerie im Westernblot verfolgt werden (Abb. 3.13D). Cyclin E ist ein G1/S-regulierendes Cyclin, so ist sein endogener Spiegel während des Nocodazolarrests (G2/M-Phase) und 2h nach der Entlassung (G1-Phase) niedrig und zeigt, dass der G1/S-Übergang noch nicht erreicht wurde. Westernblots mit anti-Myc-Antikörper zeigten die Spiegel der überexprimierten Proteine (wt-Cyclin E und C8-Mutante), die während der Entlassung anstiegen. Cyclin B ist für die Regulation der G2/M-Phasen verantwortlich, es wird im Nocodazolarrest exprimiert und nach dem Abschluss der Mitose abgebaut, so war der Cyclin B-Spiegel 15min nach der Entlassung kaum detektierbar. Die gleichmäßige Beladung der Geltaschen wurde durch den Aktin-Westernblot ermittelt.

Das Ziel des vorliegenden Experimentes war es, die Entstehung der multinukleären Zellen als Folge der fehlerhaften Mitose zu überprüfen. In diesem Fall hätte man

einen Anstieg der bi- bzw. polyploiden Zellen nach der Entlassung aus dem Nocodazolarrest erwartet. Die vorliegenden Daten bestätigen einerseits, dass die Überexpression von Cyclin E und der C8-Mutante zu einer fehlerhaften Mitose führen (beschleunigter Mitoseaustritt), andererseits wurde kein Anstieg an polyploiden Zellen (Hinweis auf die multinukleären Zellen) beobachtet. Es ist nicht auszuschließen, dass der Phänotyp der Binukleibildung nur in den früheren Phasen der Cyclin E-Überexpression eintritt, was bei den stabilen Zelllinien jedoch nicht der Fall ist, da sie schon seit dem Zeitpunkt der Selektion der Cyclin E-Überexpression ausgesetzt waren, womit der frühe Effekt der Cyclin E Überexpression verloren ginge. Um dies zu überprüfen wurden die stabilen induzierbaren Zelllinien hergestellt.

3.5. Charakterisierung der Cyclin E-Mutanten im stabilen induzierbaren System

Für die Generation der stabilen induzierbaren Zelllinien (Tet-Off-System, Invitrogen) wurden NIH3T3 und HePa1-6 ausgewählt. Im Gegensatz zu den stabilen Zelllinien wurde in weiteren Experimenten der gleiche Klon ohne Doxycyclin-Zugabe als Kontrolle verwendet, womit Artefakte durch das Verhalten der einzelnen Klone, wie es bei den stabilen Zelllinien der Fall sein kann, ausgeschlossen werden konnten. Die positiven Klone wurden mit Hilfe der Detektion von Cyclin E im anti-myc-Immunoblot ermittelt, indem die mit Doxycyclin induzierten und nicht induzierten Proben nebeneinander aufgetragen wurden. Für die weiteren Experimente wurden die Klone ausgewählt, die keine bzw. eine geringe Hintergrundexpression aufwiesen.

3.5.1. Cyclin E-Überexpression führt zur Akkumulation der polyploiden Zellen nach dem Nocodazolarrest

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Abschnitt 3.4.1 wurde ein Experiment mit Nocodazolarrest mit der stabilen induzierbaren HePa1-6 Zelllinie durchgeführt. Es fiel schon während der Selektion auf, dass nicht alle Zellen gleiche Mengen an Cyclin E überexprimierten. Um gezielt Cyclin E überexprimierende Zellen zu analysieren, wurden diese mit anti-AlexaFluor555 gefärbt und anschließend im

Durchflusszytometer untersucht. Es konnte kein beschleunigter Mitoseaustritt in den Cyclin E-positiven Zellen festgestellt werden, wie es in den stabilen Zelllinien beobachtet wurde. Die Zunahme der G1-Zellen nach dem Nocodazolarrest verzögerte sich im Vergleich zu den Cyclin E-negativen, bzw. nicht induzierten Zellen (Abb. 3.14A). Bei der Auswertung des Experimentes fiel eine große polyploide ($>4n$) Population in den Cyclin E-positiven Zellen auf, sie erreichte den Maximalwert von ca. 25% (15 min nach der Nocodazolentlassung), während sie in der Kontrolle unter 10% blieb. Diese Zellpopulation wurde sowohl bei der Nocodazolentlassung als auch in den asynchron wachsenden Zellen beobachtet (Abb. 3.14B). Gleichzeitig fiel der Anteil der diploiden Population auf 15% in den asynchronwachsenden Zellen, die Kontrolle zeigte mit 35% eine für die log-Phase typische Verteilung.

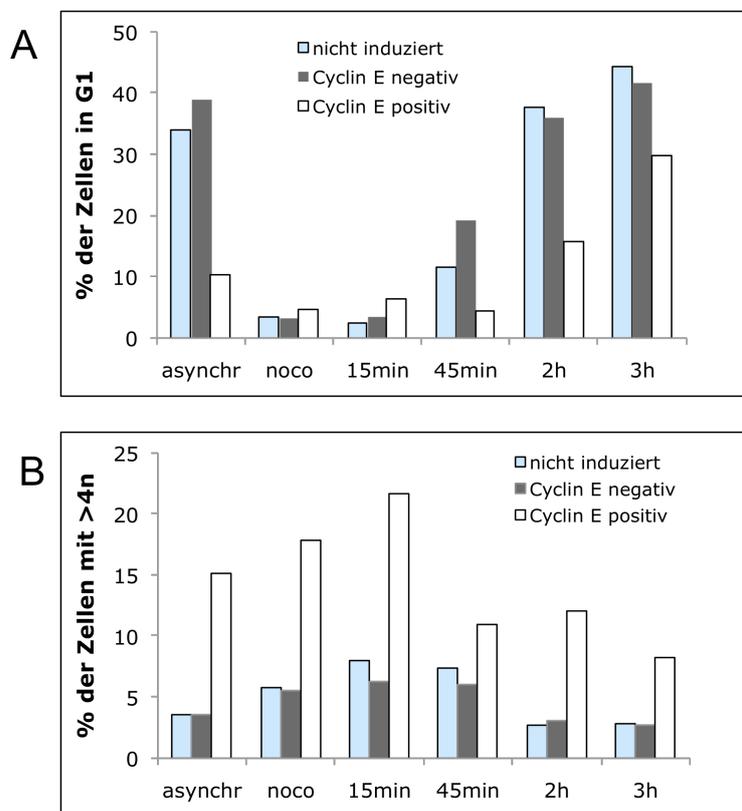


Abbildung 3.14: **Induzierbare Überexpression von wt Cyclin E im Hepa1-6 Klon führt zur Akkumulierung der polyploiden Zellen.** A) prozentualer Anteil der Zellen in der G1-Phase nach dem Nocodazolarrest und in der log-Phase. Die Cyclin E überexprimierenden Zellen wurden mit anti-myc-AlexaFluor555 gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet. B) prozentualer Anteil der Zellen mit $>4n$ DNS-Gehalt nach dem Nocodazolarrest und in der log-Phase. Die Cyclin E überexprimierenden Zellen wurden wie in A) beschrieben selektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der beschleunigte Mitoseaustritt durch die Cyclin E-Überexpression in den stabilen induzierbaren Zelllinien nicht reproduziert werden konnte. Die Analyse der Cyclin E-positiven Zellen ergab eine starke Zunahme der polyploiden Zellen. Die weiteren Analysen wurden in den stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinien durchgeführt.

3.5.2. Überexpression von Cyclin E und C8-Mutante in NIH3T3-Zelllinien induziert Polyploidisierung der Zellen

Das vorausgegangene Experiment in stabilen induzierbaren HePa1-6 zeigte eine Zunahme der polyploiden Zellen durch die Cyclin E-Induktion. Um wt-Cyclin E und die Mutanten vergleichen zu können, wurde das gleiche Experiment in den stabilen induzierbaren NIH3T3 durchgeführt. In der Abbildung 3.15 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von wt-Cyclin E und seinen Mutanten nach einer eintägigen Induktion dargestellt.

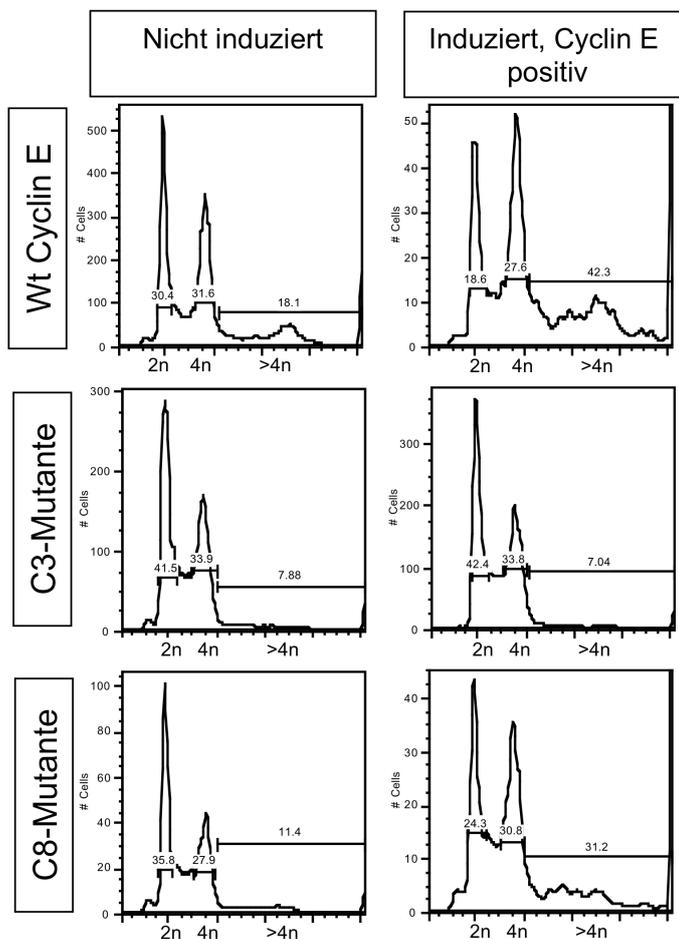


Abbildung 3.15: **Induzierbare Überexpression von wt-Cyclin E und C8- aber nicht C3-Mutante führt zu Akkumulation der tetra- und polyploiden Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie.** Die Induktion der Proteinüberexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 24h. Nach der Zellernte wurden die überexprimierenden Zellen durch die anti-myc-AlexaFluor555 gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet. Es sind die Zellzyklusprofile der Kontrollen und wt-Cyclin E, C3- und C8-Mutanten überexprimierenden Zellen dargestellt.

Wie in der stabilen induzierbaren HePa1-6 Zelllinie, wurden die überexprimierenden Zellen mit Hilfe der anti-myc-AlexaFluor555-Färbung selektiert. Die Auswertung bestätigte den in den HePa-Zellen beobachteten Effekt, wobei auch Unterschiede zwischen den Mutanten festgestellt werden. Ähnlich wie wt-Cyclin E führte die Überexpression der C8-Mutante zum Anstieg der 4n und >4n Zellpopulationen, dagegen hatte die Überexpression der C3-Mutante keinen Einfluss auf das Zellzyklusprofil. Um aufzuklären, ob es sich dabei um einen kurzfristigen oder

anhaltenden Effekt handelte, wurden die Zellen über vier Tage der Proteinüberexpression ausgesetzt. Es stellte sich außerdem die Frage, ob die polyploide Population aus endoreduplizierenden oder multinukleären Zellen bestand.

3.5.2.1. Längerfristige Überexpression von Cyclin E und C8-Mutante führt zum Anstieg der polyploiden und multinukleären Zellen in NIH3T3-Zelllinien

In stabilen induzierbaren NIH3T3 Zellen wurde der Effekt der langzeitigen Überexpression von Cyclin E und seinen Mutanten (C3 und C8) analysiert. Durch die Doxycyclin-Zugabe wurde die Überexpression der Proteine induziert und vier Tage lang aufrecht erhalten. Jeden Tag wurde eine Probe von induzierten und nicht induzierten Zellen genommen und mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Um den Vergleich von Mutanten und wt-Cyclin E zu ermöglichen, wurde in den Diagrammen der Anteil der Zellpopulationen (2n, 4n und >4n) zu 100% der jeweiligen Kontrolle dargestellt (Abb. 3.16).

Die Quantifizierung der multinukleären Zellen erfolgte mikroskopisch und wurde wie im Abschnitt 3.3 beschrieben durchgeführt, dabei wurde zwischen binukleären, multinukleären und Zellen mit einem Mikronukleus unterschieden (Abb. 3.17-3.19). Abbildungen 3.16-3.19 stellen die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

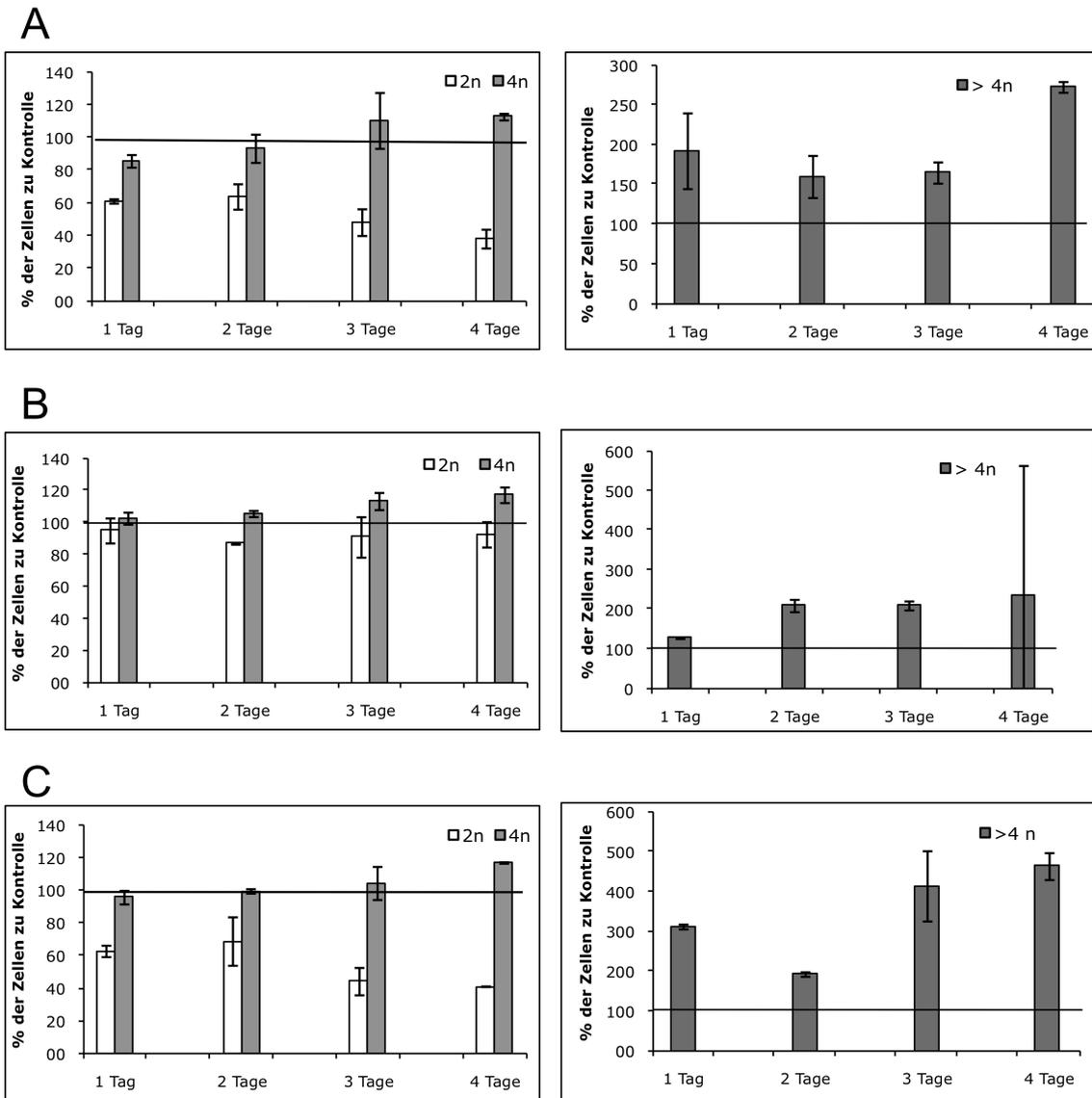


Abbildung 3.16: **Längerfristige Überexpression von wt-Cyclin E und C8- aber nicht C3-Mutante führt zu Akkumulation der tetra- und polyploiden Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie.** Die Induktion der Proteinüberexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 μ g/ml Doxycyclin über 4Tage. Jeden Tag wurde eine Probe zur Analyse entnommen. Nach der Zellernte wurden die überexprimierende Zellen mit anti-myc-AlexaFluor555 gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet. A) Überexpression von wt-Cyclin E verursacht Akkumulation von tetra- und polyploiden Zellen. In den Diagrammen ist der prozentuale Anteil der di- tetra- und polyploiden Zellen, bezogen auf die jeweilige Kontrolle dargestellt. B) Überexpression der C3-Mutante hat keinen Einfluss auf das Zellzyklusprofil. Diagrammdarstellung wie in A). C) Überexpression der C8-Mutante verursacht Akkumulation von tetra- und polyploiden Zellen. Diagrammdarstellung wie in A).

Bestimmung der Anzahl der multinukleären Zellen in Cyclin E überexprimierenden NIH3T3-Zellen

In der Abbildung 3.16A sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zusammengefasst. Die Überexpression von wt-Cyclin E in NIH3T3-Zellen führte zu einer Reduktion (60-40%) der Zellen mit 2n DNS-Gehalt, begleitet von einem zwei- bis dreifachen Anstieg (200-300%) der Zellpopulation mit mehr als 4n DNS-Gehalt. Dieser Effekt wurde über den gesamten Zeitraum des Experimentes beobachtet.

Der Anteil der Multinuklei in den Cyclin E überexprimierenden Zellen betrug ca. 9% und blieb über 4 Tage unverändert. Die multinukleären Zellen bestanden zum größten Teil aus binukleären Zellen (ca. 7%) und jeweils zu 1,5% aus Zellen mit Mikronuklei und Zellen mit mehr als 2 Kernen (Abb. 3.17A und B).

Bestimmung der Anzahl der multinukleären Zellen in C3-überexprimierenden NIH3T3-Zellen

Die Überexpression der C3-Mutante zeigte keinen Einfluss auf das Zellzyklusprofil der asynchron wachsenden Zellen. Das Diagramm zeigt zwar einen großen relativen Anstieg der polyploiden Zellen (Abb. 3.16B), die Absolutwerte lagen aber nur zwischen 4-8%, so dass die Quantifizierung ungenau war und dadurch auch die große Standardabweichung zustande kam. Es konnte auch ein geringer Anteil an multinukleären Zellen in den C3-überexprimierenden Zellen quantifiziert werden, der sich aber kaum von der Kontrolle unterschied (Abb. 3.18 A und B).

Bestimmung der Anzahl der multinukleären Zellen in C8-überexprimierenden NIH3T3-Zellen

Ähnlich wie das wt-Cyclin E führte die Überexpression der C8-Mutante zu einem Anstieg der polyploiden Zellen (300-450%), begleitet von einer Abnahme der 2n Zellpopulation (60-40%) (Abb. 3.16C). Nach der eintägigen C8-Überexpression wurde noch kein Unterschied in der Multinukleibildung beobachtet. Ab dem zweiten Tag der C8-Überexpression stieg der Multinukleianteil auf ca. 8% und blieb über die restlichen drei Tage auf dem gleichen Niveau (Abb. 3.19A und B).

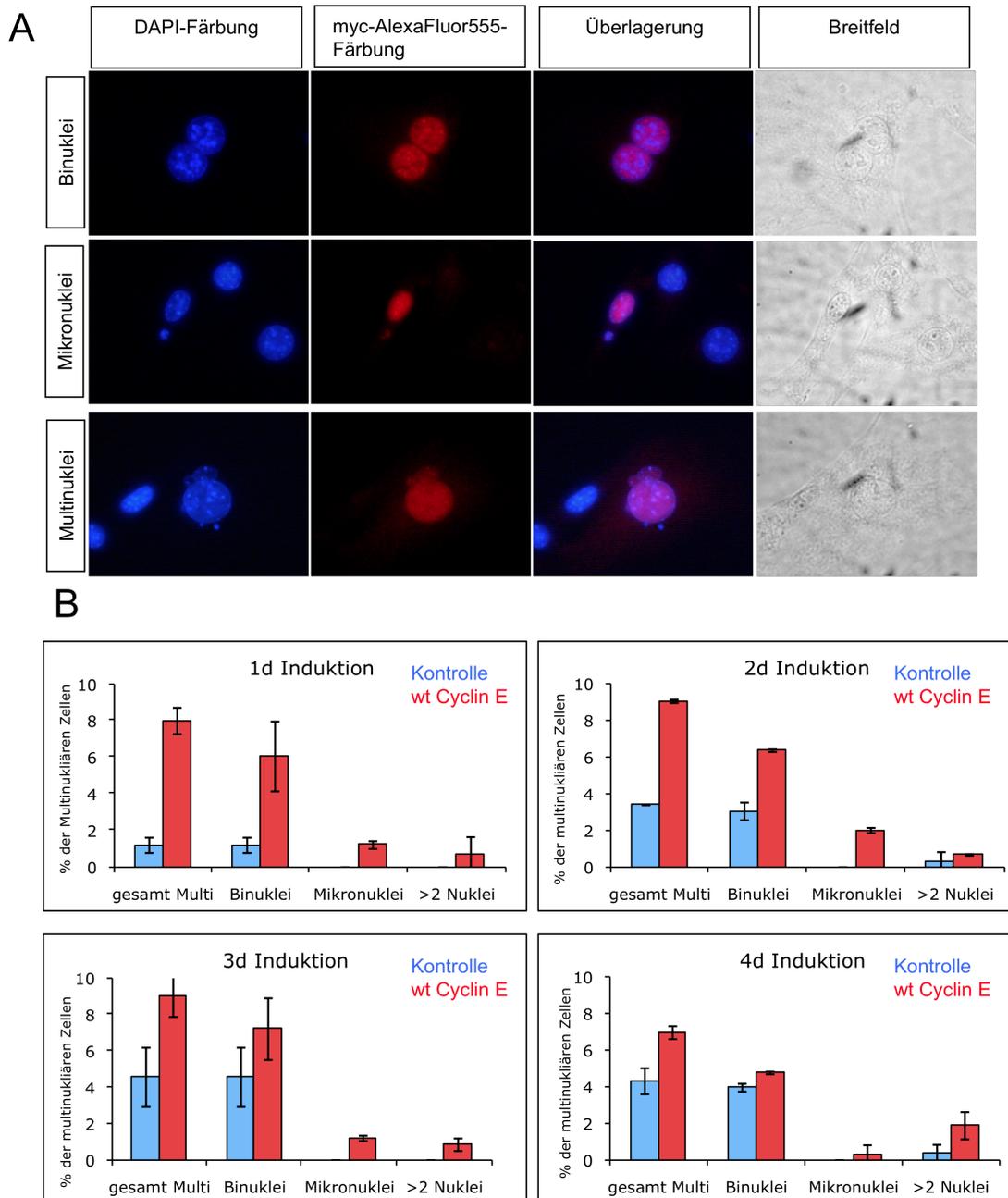


Abbildung 3.17: **Überexpression von wt-Cyclin E führt zur Akkumulation der multinukleären Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie.** Die Induktion der Proteinüberexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin über 4 Tage. Jeden Tag wurde eine Probe zur Analyse entnommen. Die wt-Cyclin E überexprimierende Zellen wurden mit anti-myc-AlexaFluor555 gefärbt. A) repräsentative Beispiele der bi-, multi- und mikronukleären Zellen. B) In den Diagrammen ist der prozentuale Anteil der bi-, multi- und mikronukleären Zellen über die 4-tägige wt-Cyclin E Überexpression dargestellt.

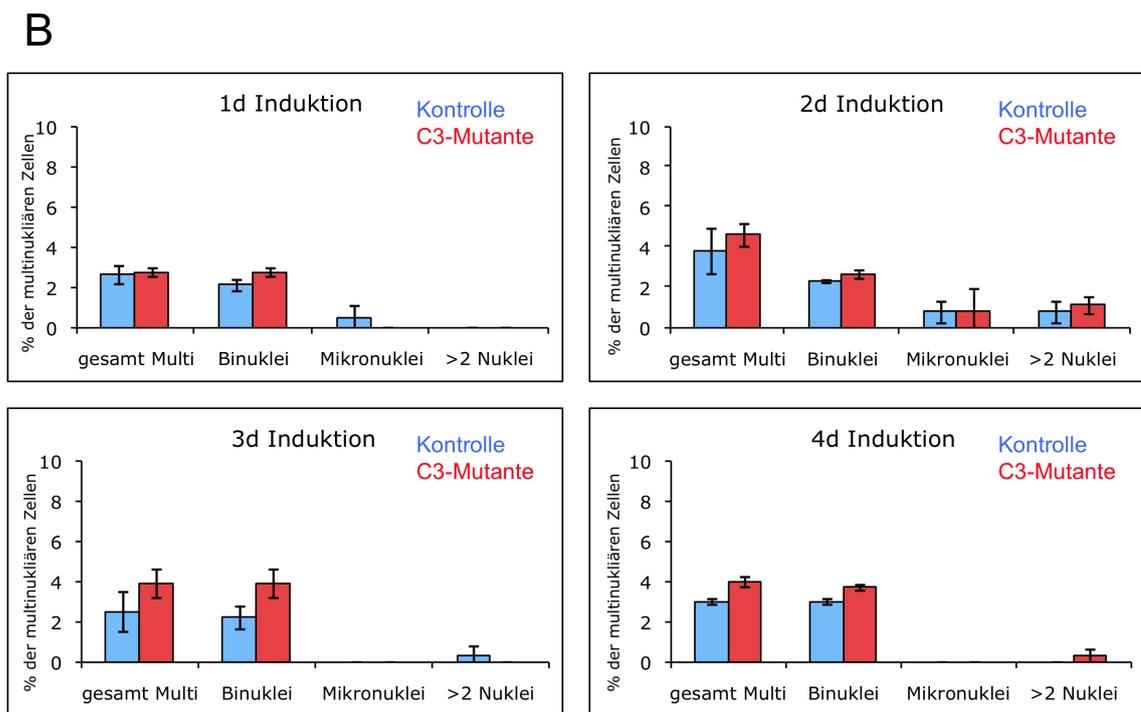
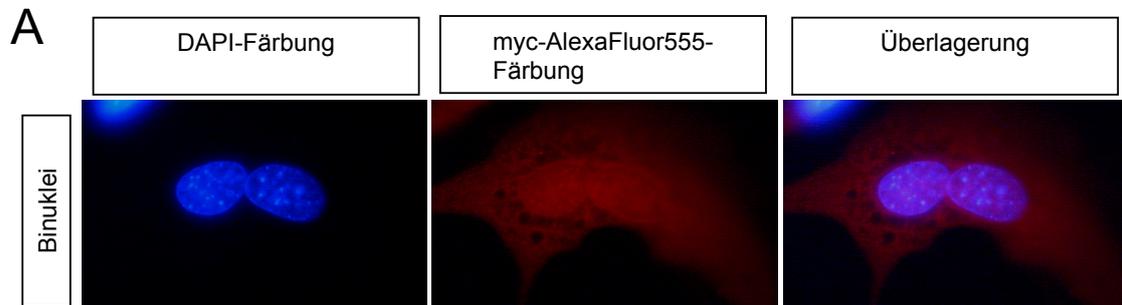


Abbildung 3.18: **Überexpression der C3-Mutante induziert keine Akkumulation der multinuklären Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie.** Die Induktion der Proteinüberexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin über 4 Tage. Jeden Tag wurde eine Probe zur Analyse entnommen. Die C3-Mutante überexprimierende Zellen wurden mit anti-myc-AlexaFluor555 gefärbt. A) repräsentative Beispiele der binukleären Zellen. B) In den Diagrammen ist der prozentuale Anteil der bi-, multi- und mikronukleären Zellen über die 4-tägige C3-Überexpression dargestellt.

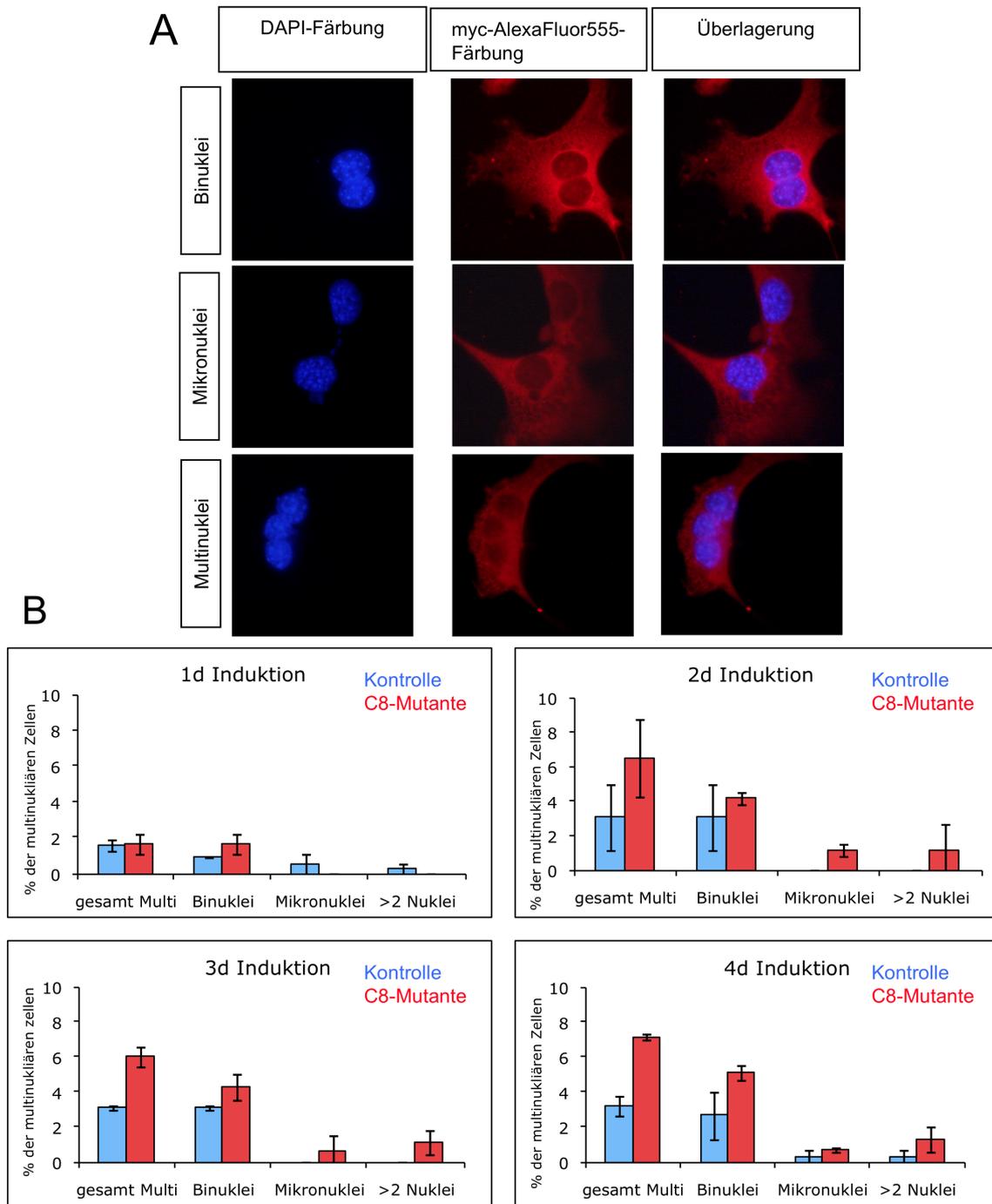


Abbildung 3.19: **Überexpression der C8-Mutante führt zur Akkumulation der multinukleären Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie.** Die Induktion der Proteinüberexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin über 4 Tage. Jeden Tag wurde eine Probe zur Analyse entnommen. Die C8-Mutante überexprimierende Zellen wurden durch anti-myc-AlexaFluor555 gefärbt. A) repräsentative Beispiele der bi-, multi- und mikronukleären Zellen. B) In den Diagrammen ist der prozentuale Anteil der bi-, multi- und mikronukleären Zellen über die 4-tägige C8-Überexpression dargestellt.

Somit ist festzuhalten, dass die Überexpression von wt-Cyclin E und der C8-Mutante zu einer konstanten Bildung von polyploiden und multinukleären Zellen führt. Da die C8-Mutante keine Cdk2-Aktivierung und -Bindung zeigte, ist der beobachtete Phänotyp Cdk2-unabhängig. Diese Daten korrelieren mit den *in vivo* erreichten Erkenntnissen, wo die Überexpression von Cyclin E zur Akkumulation von polyploiden und multinukleären Zellen führte.

3.5.2.2. Untersuchungen der Gründe der Entstehung multinukleären Zellen und Polyplöidy

Der Anstieg der multinukleären Zellen nach der Cyclin E-Induktion ist nicht durch die Zentrosomenamplifikation verursacht

Zentrosomenamplifikation ist eine der häufigsten Ursachen für die Entstehung der multinukleären Zellen. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Zellen mit einem, zwei und mehr als zwei Zentrosomen in den Cyclin E- und C8-überexprimierenden NIH3T3-Zellen (Abb. 3.20) quantifiziert.

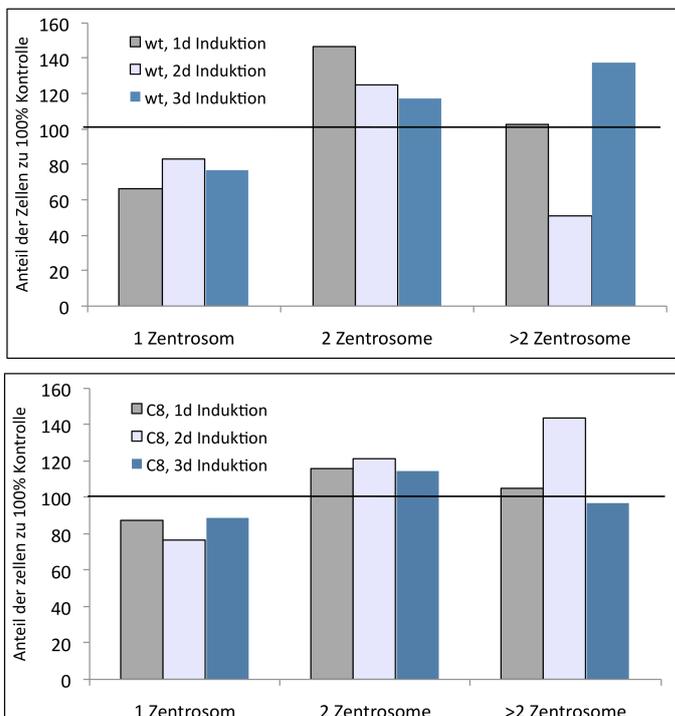


Abbildung 3.20: **Überexpression von wt-Cyclin E und C8-Mutante führt nicht zur Zentrosomenamplifikation.**

Die Induktion der Proteinüberexpression erfolgte durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin über 3 Tage. Jeden Tag wurde eine Probe zur Analyse entnommen. Die wt-Cyclin E und C8-Mutante überexprimierende Zellen wurden durch anti-myc-AlexaFluor555 gefärbt. Die Zentrosomen wurden durch γ -TubulinIn-Färbung sichtbar gemacht. In den Diagrammen ist der prozentuale Anteil der Zellen mit einem zwei und mehr als zwei Zentrosomen, bezogen auf die jeweilige Kontrolle dargestellt.

Es wurde keine Zentrosomenamplifikation weder in den Cyclin E- noch in den C8-überexprimierenden Zellen beobachtet. Es ist ein leichter Anstieg der Zellen mit zwei Zentrosomen in wt-Cyclin E und C8-überexprimierenden Zellen zu verzeichnen. Dieses Ergebnis lässt sich nicht eindeutig auswerten: Es könnte ein Grund für den Anstieg der binucleären Zellen sein oder auch ein Hinweis auf die erhöhte Zellproliferation. Um diese Frage zu klären ist ein weiteres Experiment erforderlich, indem die proliferierenden Zellen durch BrdU-Markierung quantifiziert werden können.

Polyploidy kann durch G2/M-Arrest oder Endoreduplikationszyklen entstehen

Die durchflusszytometrischen Analysen der Cyclin E und C8-Mutante überexprimierenden Zellen zeigten einen Anstieg der polyploiden Zellen (Abb. 3.16). In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, ob dies auf die endoreduplizierende Zellen oder auf den G2/M-Arrest zurückzuführen ist.

Ein G2/M-Arrest zeichnet sich u. a. durch eine inhibitorische Phosphorylierung von Cdk1 (Thr-14 und Tyr-15) und eine aktivierende Histon H3-Phosphorylierung (Ser-10). Es wurde kein Unterschied in den Proteinspiegeln von pCdk1 und pH3 in den Proteinlysaten der induzierten und nicht induzierten Proben detektiert (Abb. 3.21).

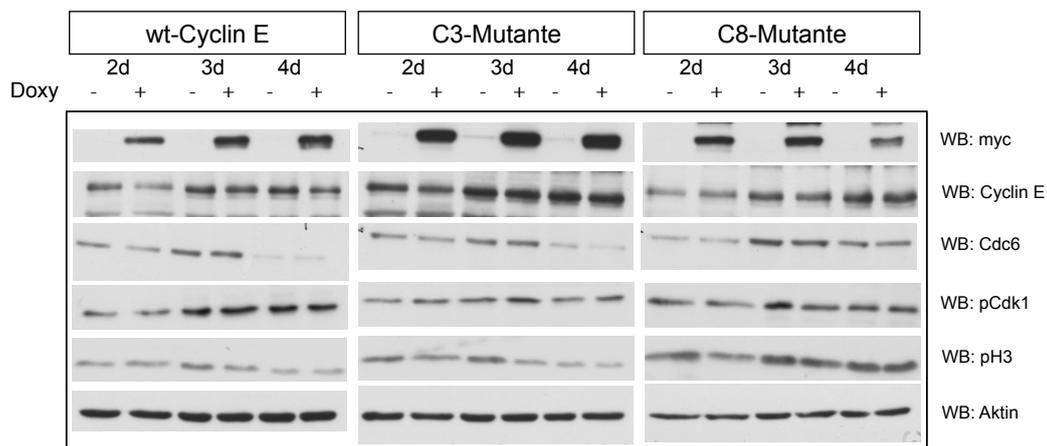


Abbildung 3.21: **Proteinanalyse der NIH3T3-Lysate nach der 4-tägigen Überexpression von Cyclin E und seinen Mutanten.** Westernblotanalyse der Expression der überexprimierten Proteinen, Cyclin E, Cdc6, pH3 und pCdk1 in Proteinlysaten von wt-Cyclin E und den C3,- C8-Mutanten. Die Induktion der Proteinüberexpression erfolgte durch die Zugabe von 1µg/ml Doxycyclin über 4 Tage. Aktinblot diente als Ladekontrolle.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Cyclin E für die Endoreduplikation verantwortlich ist, dabei interagiert Cyclin E mit den Proteinen des Prereplikationskomplexes (Geng et al. 2003; 2007). Cdc6 ist einer der möglichen Kandidaten, da seine Stabilisierung und Beteiligung an der Endomitose durch Cyclin E Überexpression gezeigt wurde (Mailand & Diffley 2005; Barnejo et al. 2002).

Mit Hilfe von Westernblots wurde die Cdc6-Expression in den NIH3T3-Zelllinien überprüft (Abb. 3.21). Es wurde allerdings keine Stabilisierung des Cdc6 weder durch Cyclin E noch durch eine der Mutanten festgestellt. Es kann durch einen geringen Anteil der überexprimierenden Zellen erklärt werden, so waren die Änderungen des Cdc6-Spiegels (aber auch von pCdk1 und pH3) im Gesamtproteinlysate nicht detektierbar. Als nächstes wurde die Bindung von Cyclin E und seinen Mutanten an das endogene Cdc6 mit Hilfe der Immunpräzipitation überprüft (Abb. 3.22).

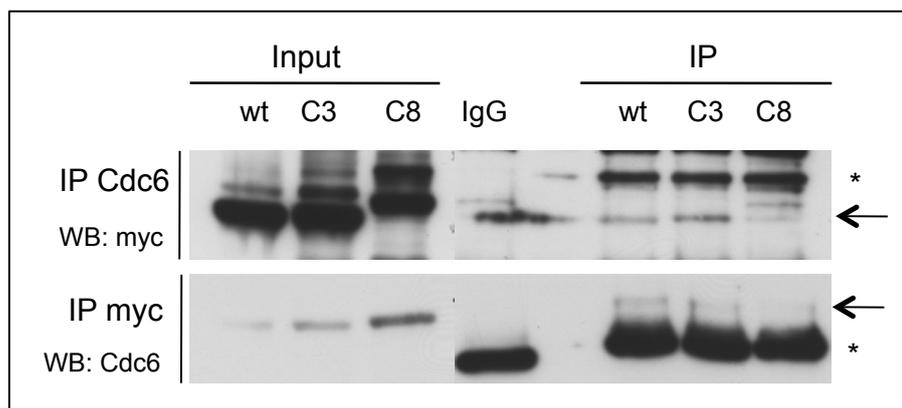


Abbildung 3.22: **Bindung von wt Cyclin E und seinen Mutanten an Cdc6.** Es wurde in Ko-Immunopräzipitationen mit anti-myc Antikörper und anti-Cdc6 die Bindung an Cdc6 untersucht. Mit den Pfeilen wurde die Bandenhöhe der untersuchten Proteine markiert. Die beiden Sternzeichen markieren die unspezifischen Banden bzw. schwere Kette des Antikörpers

Wie es der Abbildung 3.22 zu entnehmen ist, kann eine schwache Bindung von wt-Cyclin E und C3-Mutante detektiert werden. Die Charakterisierung der Funktion von Cdc6 bei der Phänotypbildung soll in weiteren Experimenten ermittelt werden. Durch die Immunfluoreszenzfärbung kann die Lokalisation und Expression von Cdc6 in den wt-Cyclin E- und Mutanten-überexprimierenden Zellen beurteilt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zentrosomenamplifikation nicht an der Entstehung der multinukleären Zellen beteiligt ist. Defekte in der Zytokinese und Mitose können auch Gründe für die multinukleären Zellen sein und müssen in weiteren Experimenten untersucht werden. Es konnte kein eindeutiger Grund für die Polyploidie ermittelt werden, die Analysen der Bindung zu anderen Prereplikationskomplexproteinen sowie die Immunfluoreszenzfärbungen würden bei der Aufklärung weiterhelfen.

4. Diskussion

Cyclin E ist ein hoch konserviertes Protein und wurde 1991 mit Hilfe eines mRNA-Screens in Hefe entdeckt (Lew et al. 1991). Anfangs wurde Cyclin E eine essentielle Rolle im Zellzyklus als ein Regulator des G1/S-Übergangs zugeordnet. Cyclin E ist ein Zielgen von E2F und ist selbst, zusammen mit Cdk2, ein Rb-E2F-Aktivator. Wie im Abschnitt 1.3 beschrieben wurde, ist Cyclin E in die Regulation mehrerer Prozesse involviert: Es bindet und aktiviert Cdk2, phosphoryliert die Substrate von Cyclin E/Cdk2-Komplexen und die daraus folgende Genaktivierung initiiert die S-Phase. Das Wirkspektrum von Cyclin E beschränkt sich aber nicht nur auf die Cdk2-abhängigen Funktionen. So fördert Cyclin E die Bildung des Präreplikationskomplexes (PRK) am G0/S-Übergang. Diese Funktionen sind auch an der Entstehung maligner Tumoren beteiligt. Es ist in vielen humanen Karzinomen überexprimiert, die einen aggressiven Verlauf und verringerte Heilungschancen aufweisen. Somit ist die Aufklärung der Funktionen von Cyclin E in der Tumorentstehung von großem Interesse.

4.1. Endoreplikation und genetische Instabilität durch die Cyclin E-Überexpression sind unabhängig von der Cdk2-Bindung und -Aktivität

Das Ziel dieser Arbeit war, die Funktion von Cyclin E bei der Endoreplikation und Multinukleibildung in Abhängigkeit von Cdk2 zu untersuchen. Die Überexpression von Cyclin E in der Leber von Cdk2-Wildtyp und -Knockout Tieren führte zu Endoreplikationszyklen und zur Bildung genetisch-instabiler Zellen. Beide Phänotypen waren unabhängig von der Cdk2-Bindung und -Aktivität (Abb. 3.8 und 3.10). Eine Cdk2-unabhängige Funktion von Cyclin E in der Endoreplikation bzw. Polyploidisierung hatte man schon durch Studien mit Knockout Mäusen vermutet. 2003 wurden Cyclin E-Knockout- und Cdk2-Knockout-Mäuse generiert. Da man bis dahin die Cyclin E-Funktionen in der S-Phasen-Regulation im Zusammenhang mit der Aktivierung von Cdk2 vermutet hatte, wurde der gleiche Phänotyp in den Knockout-Mäusen erwartet, also eine Beeinträchtigung der Zellproliferation. Es stellte

sich jedoch heraus, dass Zellen weder Cyclin E noch Cdk2 für den kontinuierlichen Zellzyklus brauchen. Die Endoreplikation der Throphoblasten hingegen war nur von der Cyclin E Expression abhängig, während die Endoreplikation in den Cdk2-Knockout-Mäusen normal verlief (Geng et al. 2003; Parisi et al. 2003; Berthet et al. 2003; Ortega et al. 2003). Eine Tetraploidisierung wurde auch in primären endometrialen Adenokarzinomen durch eine Cyclin E-Überexpression als Folge der hCdc4-Mutationen beobachtet (Hubalek et al. 2004). Des Weiteren zeigten die Analysen von McEvoy et al. 2007 einen Anstieg an polyploiden Zellen in der Mausleber, nach Deletion von Cul3, einer E3-Ligase, die monomeres Cyclin E für die Degradation ubiquitiniert (Abschnitt 1.3.3). Diese Daten zeigen, dass Cyclin E für die Ausbildung von Endoreplikationszyklen notwendig ist. Hinsichtlich der Überexpression von Cyclin E in der Cdk2-Knockout-Leber, die zu genetisch instabilen Zellen und endoreduplizierenden Zellen führte, stellte sich die Frage nach den molekularen Mechanismen.

Um diesen in der Leber beobachteten Mechanismus genauer untersuchen zu können, wurden verschiedene Cyclin E-Mutanten bezüglich der Phänotypbildung (Binuklei) und Cyclin E-assoziierten Kinaseaktivität analysiert (Abb. 3.11C). Die ausgewählten Mutanten bildeten Binuklei im transienten System, wobei keine Mutanten-assoziierte Kinaseaktivität detektiert wurde. Die Analyse der Zellzyklusprofile dieser Mutanten im stabilen induzierbaren System zeigte, zumindest bei der Mutante C8, einen Anstieg der polyploiden und multinukleären Zellen (Abb. 3.16, 3.17B und 3.19B). Diese Ergebnisse sind mit den bereits *in vivo* erzielten Resultaten vergleichbar, wo in der Cdk2-Knockout-Leber eine vermehrte Polyploidisierung und Ausbildung multinukleärer Zellen nach Cyclin E-Überexpression beobachtet wurde. Die Mutantenanalyse lieferte neue Einsichten in die Mechanismen der Endoreplikation und genetischen Instabilität (GIN). So ist die C8-Mutante zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 3.19A) und unterscheidet sich damit erheblich von dem im Nukleus lokalisierten Wildtyp-Cyclin E (Abb. 3.17A). Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die durch Cyclin E induzierte Endoreplikation und GIN weder von der Lokalisation noch von der Kinaseaktivität abhängig sind. Die Fähigkeit der Cdk2-unabhängigen onkogenen Transformation von Cyclin E wurde in der Arbeit von Geisen und Möröy 2002 vorgestellt, in der die Mutanten ebenfalls eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation aufwiesen. Des Weiteren wurde auch in

einigen humanen Tumoren eine zytoplasmatische Akkumulation von Cyclin E detektiert, deren Auswirkung und Folgen aber noch unklar sind (Donnellan & Chetty 1999). Daraus ergibt sich die Frage, was die Funktion von monomerem oder zytoplasmatischem Cyclin E in den Endoreplikationszyklen und in der Entstehung der multinukleären Zellen ist.

4.1.1. Stabilisierung von PRK-Proteinen kann die Endoreplikation fördern

Als eine mögliche Ursache der Endoreplikation wurde eine Akkumulation der PRK-Proteine vermutet. Zuerst wurde der Proteinspiegel von Cdc6 mit Hilfe von Westernblots in Cyclin E und C8 überexprimierenden Zellen untersucht, da von Mailand & Diffley 2005 gezeigt wurde, dass die Cyclin E -Expression positiv mit der Akkumulation von Cdc6 korreliert und der Überschuss von Cdc6 in einigen Zelllinien zur Endoreplikation führt (Bermejo et al. 2002). Die Ergebnisse zeigten keine Unterschiede der Cdc6-Spiegel zwischen Cyclin E bzw. C8 überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen. Eine andere Möglichkeit wäre die Änderung der Cdc6-Lokalisation. Wie im Abschnitt 1.3.2 beschrieben wurde, wird der PRK nach der Initiierung der DNS-Synthese aufgelöst. Durch die Cdk2-abhängige Phosphorylierung wird Cdc6 für den proteolytischen Abbau und den nukleären Export markiert (Petersen et al. 1999). Es wäre denkbar, dass die C8-Überexpression zur Akkumulation von Cdc6 im Zellkern führt und damit die Bildung des PRK und eine Endoreplikation ermöglicht. Die fehlende Cdk2-Aktivität, wie es in den Cdk2-Knockout-Mäusen der Fall ist, würde wahrscheinlich einerseits den PRK stabilisieren, andererseits würde eine Anreicherung von Cdc6 im Zellkern die Endoreplikation fördern. In den Cyclin E überexprimierenden Cdk2-Wildtyp-Mauslebern ist die Cdk2-Aktivität wahrscheinlich durch die Expression von p27 inhibiert. Dafür spricht auch die fehlende Cyclin E-assoziierte Kinaseaktivität (Abb. 3.6). Eine nukleäre Akkumulation von Cdc6 ließe sich durch eine Immunfluoreszenz-Färbung überprüfen. Die Bildung und Stabilisierung des PRK kann auch durch die Interaktion von Cyclin E mit anderen PRK-Proteinen beeinflusst werden. So wurde gezeigt, dass Cyclin E mit Mcm5, -7 und Cdt1 interagiert und dadurch die Mcm-Proteine an das Chromatin bindet (Geng et al. 2007). Wie es in der Abbildung 4.1

gezeigt ist, könnte Cyclin E, als ein E2F-Aktivator, auch die Expression der PRK-Proteine erhöhen und zu deren Akkumulation in der Zelle führen. Mehrere Studien zeigten, dass die Transkription der Cdc6-, Cdt1- und Orc1 –Proteine über den E2F-Transkriptionsfaktor reguliert wird (Yoshida et al. 2004; Hateboer et al. 1998; Yan et al. 1998; Ohtani et al. 1996). Die Überexpression der drei Proteine des PRK (Cdc6, Cdt1 und Orc1) war ausreichend, um in humanen Fibroblasten eine starke Rereplikation zu induzieren (Sugimoto et al. 2009).

Die Endoreplikation könnte natürlich auch durch eine Interaktion von Cyclin E mit einem unbekanntem Protein angeregt werden. Entweder könnte die Bindung von Cyclin E dieses Protein aktivieren oder inaktivieren und damit auch die Endoreplikation positiv beeinflussen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass ein unbekanntes Protein (Endoreplikationsaktivator) durch die Cyclin E-Cdk2-abhängige Phosphorylierung oder eine Bindung inaktiviert wird. In Abwesenheit von Cdk2 würde dieses Protein aktiv und könnte so die Endoreplikation fördern. Die neuen Interaktionspartner von Cyclin E könnten z.B. durch einen Yeast-two-hybrid-screen oder eine Immunpräzipitation mit anschließender Silbergefärbung identifiziert werden. Die Endoreplikation als Folge der erhöhten Expression der PRK-Proteine (Cdc6, Cdt1, Orc1) ließe sich durch RT-PCR und Immunfluoreszenz-Färbungen überprüfen. Es ist wahrscheinlich, dass an der Endoreplikation mehrere Wege gleichzeitig beteiligt sind.

4.1.2. Die Inhibierung der Cdk1-Kinaseaktivität kann zur Endoreplikation führen

Bei der Proteinspiegelanalyse der Leberlysate der Cyclin E überexprimierenden Tiere wurde ein Anstieg der inhibierenden Phosphorylierung von Cdk1 festgestellt (Abb. 3.4 und 3.6). Wie im Abschnitt 1.3.6 beschrieben wurde, ist die inhibierende Phosphorylierung von Cdk1 ein Hinweis auf den aktivierten DNS-Schaden-Kontrollpunkt. Ein direkter Nachweis von DNS-Doppelstrangbrüchen kann über eine γ H2X-Färbung bestimmt werden. Aus anderen Studien ist aber bereits bekannt, dass eine Cyclin E-Überexpression zu DNS-Schäden führt (Spruck et al. 1999; Hubalek et al. 2004). Einer der möglichen Gründe für die Cyclin E-induzierten DNS-Schäden

wurde in der Arbeit von Ekholm-Reed et al 2004 dargelegt. In dieser Studie wurde durch die Cyclin E-Überexpression eine Beeinträchtigung der Bindung der Mcm-Proteine (Mcm-3, -4 und -7) an das Chromatin und eine damit verbundene niedrige Replikationsrate festgestellt. Dies kann zu einer erhöhten Anzahl an blockierten Replikationsgabeln und auch zu DNS-Doppelstrangbrüchen führen, was in der Zelle eine Aktivierung des DNS-Schaden-Kontrollpunkts zur Folge hat. Die DNS-Schaden-Signalkaskade induziert den Zellzyklusarrest durch eine Inhibierung der Kinaseaktivität (Abschnitt 1.3.6). In einer Veröffentlichung von Bartkova et al. 2005 wurde durch die Cyclin E-Überexpression in U2OS-Zellen (Osteosarkomzellen) eine steigende Ploidie, eine Aktivierung der DNS-Schaden-Kontrollpunkt-Proteine (ATM und Chk1) und als deren Folge auch eine erhöhte inhibitorische Phosphorylierung von Cdk1 beobachtet. In welcher Weise können diese Mechanismen die Entstehung von Endoreplikationszyklen verursachen? Wie in einigen Studien gezeigt wurde, führt die Inhibierung der Cdk1-Aktivität in NCI-H1299 (non-small cell lung cancer) und U2OS-Zellen zur DNS-Rereplikation (Itzhaki et al. 1997; Cai et al. 2006). In HT1080-Zellen (Fibrosarkomzellen) wurde auch ein Übergang in Endoreplikationszyklen nach induziertem DNS-Schaden und Cdk1-Inaktivierung beobachtet (Badie et al. 2000). Cyclin B/Cdk1-Komplexe phosphorylieren die PRK-Komponente Mcm-2 und -4 und verhindern damit ihre Reassoziierung mit dem Chromatin. Durch eine Inhibierung der Cdk1-Aktivität wird somit die Bindung der Mcm-Komplexe an das Chromatin und damit auch die Rereplikation ermöglicht (Coverley et al. 1996; Coverley et al. 1998; Fujita et al. 1998). Ein weiteres Protein des PRK, Cdt1, wird ebenfalls durch die Inhibierung der Cdk1-Aktivität stabilisiert. Cdt1 wird durch Cdk1 phosphoryliert und über SCF/Skp2 ubiquitiniert, während die Cdk1-Inaktivierung in der G2/M-Phase zur Akkumulation von Cdt1 im Chromatin führt (Sugimoto et al. 2004). Die Möglichkeit der Endoreplikation durch die Cdk1-Inhibierung ist in der Abbildung 4.1 dargestellt. Die vorliegenden Daten liefern Hinweise auf einen Zellzyklusarrest, der wahrscheinlich durch DNS-Schäden zustande kommt. Der Zellzyklusarrest ließe sich durch die Messung der Cdk1-Kinaseaktivität überprüfen. Die Induktion der DNS-Schadenkaskade könnte über die Quantifizierung der DNS-Doppelstrangbrüche (γ H2X-Färbung) und der Aktivierung der Signaltransduktionsproteine (ATM, ATR, Chk1 und Chk2) untersucht werden. Zusätzlich könnte die Stabilität der Cdc25-Phosphatasen durch Westernblots analysiert werden.

4.1.3. Endoreplikation als Folge des G2/M-Arrests

Die weiteren Analysen der Proteinspiegel der Leberlysate einiger Cyclin E überexprimierenden Mäuse zeigten eine Akkumulation von Cyclin B (Abb. 3.6). Cyclin B ist ein Substrat von APC/Cdc20- bzw. APC/Cdh1-Ligase, seine Akkumulation kann auf einen G2/M-Arrest und eine Inhibierung der APC-Ligaseaktivität hinweisen. Die mitotischen Defekte wurden in der stabilen-induzierbaren HePa1-6-Zelllinie durch eine Cyclin E-Überexpression festgestellt. So wurde ein verzögerter Mitoseverlauf sowie eine Anreicherung von polyploiden Zellen während des Nocodazolarrests und der Entlassung aus dem Arrest beobachtet (Abb. 3.14). Die Endoreplikation kann von Wildtyp-Cyclin E und der C8-Mutante gleichermaßen induziert werden. Wie es schon erwähnt wurde, sind die beiden Proteine unterschiedlich lokalisiert (Wildtyp-Cyclin E nukleär und C8 zytoplasmatisch) und nur während der Mitose im Zytoplasma zu finden. Aus diesem Grund würde man vermuten, dass der Interaktionspartner in der G2/M-Phase zu suchen ist. In einer Studie von Keck et al. 2007 wurden auch Defekte in der Mitose durch eine Cyclin E-Überexpression detektiert. Die Zellen schlossen die Anaphase nicht ab, sondern dekondensierten die Chromosomen und wurden so polyploid. Bei der Analyse der molekularen Mechanismen wurde festgestellt, dass APC/Cdh1 durch den Cyclin E-Cdk2-Komplex inhibiert wird, indem dieser an Cdh1 bindet und es phosphoryliert, was wiederum eine Akkumulation der APC/Cdh1-Substrate wie Cyclin B, Cdc20 und Securin zur Folge hat. Diese Beobachtung wurde auch bei der Polyploidisierung humaner Megakaryozyten durch eine Cyclin E-Überexpression gemacht (Eliades et al. 2010). Der erhöhte Cyclin B-Spiegel verzögert den Austritt aus der Mitose und kann damit zur Regression der Zytokinese führen. Durch die inhibierte Cdk1-Kinaseaktivität wird wiederum die Bildung des PRK und auch die Rereplikation ermöglicht. An dieser Stelle muss der so genannte „Tetraploidy“-Kontrollpunkt, dessen Existenz derzeit kontrovers diskutiert wird, erwähnt werden (Vogel et al. 2004; Wong & Stearns 2005). Er besagt, dass die Zellen eine Polyploidisierung nach dem G2/M-Arrest durch die Akkumulation von p53 und eine damit verbundene Apoptoseinduktion verhindern. Dieser Kontrollpunkt muss allerdings für jede Zelllinie überprüft werden. So wurde z.B. in primären Mausepithelzellen kein Hinweis auf die Aktivierung dieses Kontrollpunktes gefunden

(Fujiwara et al. 2005). Ob polyploide Zellen der Cyclin E-behandelten Tiere auch einen „Tetraploidy“-Kontrollpunkt haben, ließe sich durch die Bestimmung der Anzahl der apoptotischen Zellen (TUNEL-Färbung) und des p53-Proteinspiegels überprüfen. Die Endoreplikation durch einen G2/M-Arrest ist in der Abbildung 4.1 zusammengefasst und kann mit Hilfe folgender Hypothese erklärt werden: Eine Cyclin E-Überexpression führt zur APC/Cdh1-Inhibierung und induziert dadurch einen G2/M-Arrest. Durch den verlängerten Block teilen die Zellen sich nicht, bleiben polyploid und können so wahrscheinlich in den nächsten Zellzyklus eintreten. Für die Überprüfung der Hypothese müsste zunächst die Bindung von Cyclin E und der C8-Mutante an Cdh1 untersucht werden. Es wäre denkbar, dass auch eine einfache Bindung von Cyclin E und evtl. seiner Mutante die Assoziation von APC und Cdh1 verhindert und dadurch die Inhibierung der APC-Ligaseaktivität erreicht wird. Die Akkumulation der APC/Cdh1-Substrate (Cyclin B, Cdc20, Securin) in den stabilen-induzierbaren Zelllinien könnte mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht werden.

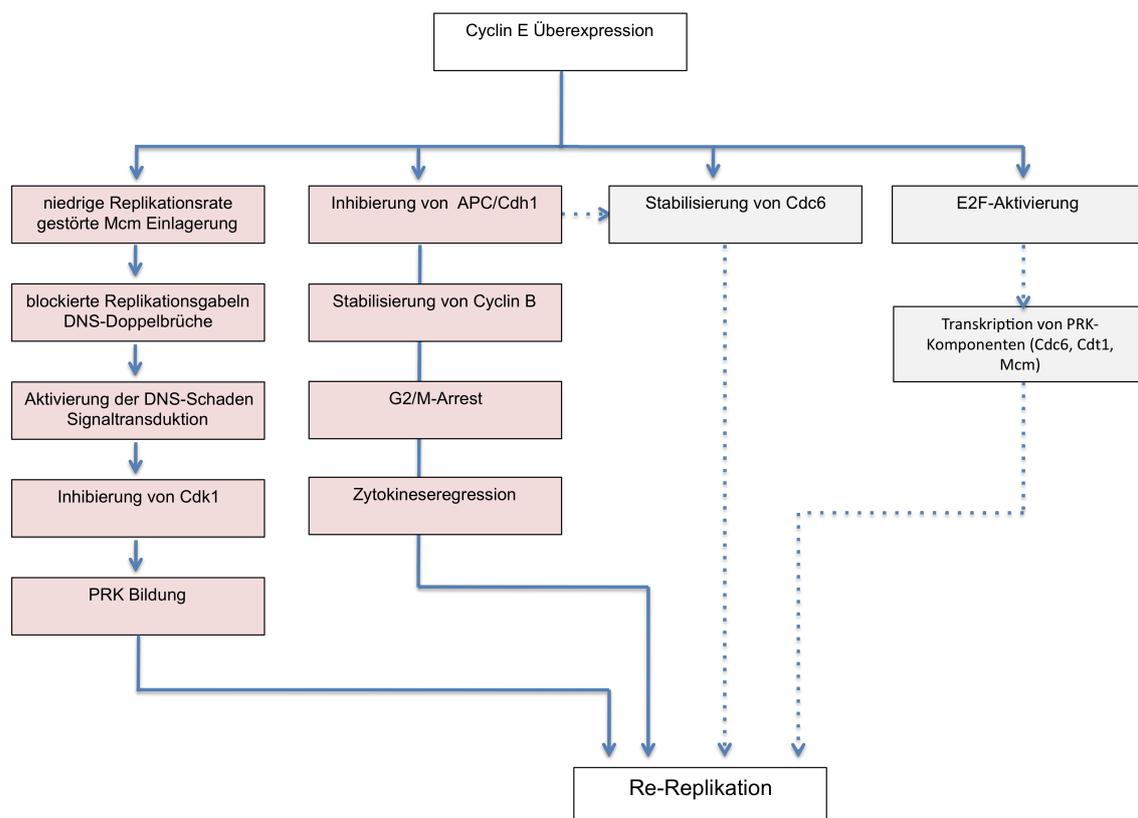


Abbildung 4.1: **Die wahrscheinlichen Wege der Endoreplikation durch die Cyclin E Überexpression**

4.2. Die Entstehung multinukleärer Zellen durch Cyclin E ist unabhängig von der Cdk2-Bindung und Aktivität

Ein weiterer Phänotyp, der sich in *in vivo*- und *in vitro*-Analysen zeigte, war die genetische Instabilität (GIN). Oft wird eine GIN durch die Fehler in den DNS-Schaden- und SAC (spindle assembly checkpoint)-Kontrollpunkten in das Genom integriert. Multinukleäre Zellen können durch mitotische Defekte entstehen, wobei eine ungleiche Verteilung der genetischen Information zwischen den einzelnen Kernen stattfindet. Sie sind ein Indiz der GIN und können als Vorstufe der aneuploiden Zellen betrachtet werden. Sowohl in der Mausleber als auch in den Cyclin E und C8-Mutante überexprimierenden Zelllinien wurden multinukleäre Zellen quantifiziert. Auch hier wurde festgestellt, dass die Multinukleibildung in einem Cdk2-unabhängigen Prozess geschieht (Abb. 3.8, 3.17 und 3.19). Für die Bildung multinukleärer Zellen sind hauptsächlich Chromosomen-Missegregationen (Shi & King 2005) als Folge der SAC-Defekte, eine Zentrosomenamplifikation oder auch Zytokinesefehler verantwortlich. Im Folgenden werden die genannten Ursachen im Einzelnen besprochen. Die inkorrekte Chromosomenverteilung kann durch eine verlängerte Aktivierung oder eine Abschwächung des mitotischen Kontrollpunktes eintreten. Bei einer verlängerten Aktivierung des mitotischen Kontrollpunktes (SAC) durch die Überexpression der Kontrollpunktproteine wie z.B. MAD2 (Sotillo et al. 2007) oder einer Akkumulierung der APC-Substrate (Cyclin B, Securin) werden oft rückständige Chromosomen (lagging chromosome) beobachtet. Dadurch entstehen zwei ungleiche Kerne, der eine mit einem Überschuss, der andere mit einem Defizit an Chromosomen. Eine Abschwächung des SAC durch die Reduktion der Kontrollpunktproteine wie z.B. MAD2 (Michel et al. 2001) oder BubR1 (Wang et al. 2004) würde zu einer vorzeitigen Chromosomensegregation und ebenfalls zwei ungleichen Kernen führen (Schvartzman et al. 2010). Eine Quantifizierung der multinukleären Zellen nach dem Nocodazolarrest in den stabilen-induzierbaren Zelllinien sowie die Analyse des Mitoseverlaufs in den Cyclin E und C8-Mutante überexprimierenden Zellen würde die Frage aufklären, ob eine Dysregulation des SAC für die Multinukleibildung verantwortlich ist und ob es sich dabei um eine verlängerte Aktivierung oder eine Abschwächung des mitotischen Kontrollpunktes handelt. Als nächste mögliche Ursache für die Bildung der multinukleären Zellen ist die Zentrosomenamplifikation zu verzeichnen, die auch in vielen Tumoren mit einer

chromosomalen Instabilität assoziiert ist. Bei der Zentrosomenquantifizierung in den Cyclin E und C8-Mutante überexprimierenden Zelllinien (Abb. 3.20) wurde jedoch kein Anstieg der Zentrosomenzahl pro Zelle festgestellt, es konnte lediglich eine Zunahme der Zentrosomenduplikation ermittelt werden. Die erhöhte Anzahl der Zentrosomen wurde in einigen Studien zusammen mit der Cyclin E-Überexpression und p53-Dysregulation beobachtet (Rajagopalan et al. ; Minella et al. 2007; Kawamura et al. 2004). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass einige der Cyclin E-Dysfunktionen mit der assoziierten Kinaseaktivität verbunden sind und erst durch einen Verlust der Kinaseinhibitoren wie p21 quantifizierbar werden. Die Entstehung der multinukleären Zellen kann auch direkt auf Zytokinesedefekte zurückgeführt werden. Bei der Regulation der Zytokinese spielt die Kinase Aurora B eine entscheidende Rolle. Zusammen mit anderen Proteinen bildet sie einen so genannten „chromosomal passenger complex“ (CPC), der verschiedene Prozesse während der Mitose und Zytokinese reguliert. In der Anaphase wird Aurora B durch die Cul3-Ligase ubiquitiniert, was zur Translokation des CPC zur Spindelmitzone und zum Abschluss der Zytokinese führt (Maerki et al. 2009). Anhand einer Aurora B-Färbung während der Zytokinese könnte überprüft werden, ob die Cyclin E- und C8-Überexpression zur Dyslokalisierung von Aurora B und damit auch zur Zytokineseregression führt. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Inhibierung der Aurora B-Aktivität den Abschluss der Zytokinese verhindert (Guse et al. 2005). So könnten Cyclin E und C8-Mutante auch durch eine direkte Interaktion mit Aurora B die Inhibierung der Zytokinese hervorrufen. Dieser Ansatz könnte durch Immunpräzipitationsexperimente überprüft werden.

4.3. Cdk2 und seine schützende Funktion während Endoreplikationszyklen und genetischen Instabilität

Die Untersuchungen der Leber der Cdk2-Wildtyp- und -Knockout-Mäuse zeigten, dass die Cdk2-Knockout-Hepatozyten unter dem Einfluss von Cyclin E mehr polypleide Zellen ausbildeten als die Cdk2-Wildtyp-Hepatozyten (Abb. 3.10). Welche Rolle kann Cdk2 bei der Endoreplikation bzw. Polyploidisierung der Zellen spielen? In einer Studie von Satyanarayana et al. 2008 wurde gezeigt, dass Cdk2-Knockout-Mäuse sensitiver auf IR-Stress reagieren und höhere Letalitätsraten haben, da die

Cdk2-Knockout-Zellen mehr DNS-Schäden zeigten, als die Cdk2-Wildtyp-Zellen. Der p53-p21-Weg aber war in beiden Mausstämmen (Cdk2-Wildtyp und -Knockout) im gleichen Maße aktiviert. Es gäbe dafür zwei mögliche Erklärungen: entweder kann in den Cdk2-Knockout-Mäusen der induzierte Arrest nicht aufrechterhalten werden, womit der DNS-Schaden unbehoben bleiben würde, oder Cdk2 ist direkt an der Bildung des DNS-Reparaturkomplexes beteiligt. Die genauen Mechanismen sind noch ungeklärt, aber als ein möglicher Kandidat käme die Brca1-Ubiquitinligase (Breast cancer-associated protein 1) in Frage. Brca1, ein Tumorsupressorprotein, ist ein wichtiger Bestandteil der DNS-Reparaturkaskade und wird neben anderen Proteinen durch DNS-Schäden aktiviert (Zhang & Powell 2005). Es wurde gezeigt, dass Cdk2/Cyclin A- oder auch Cdk2/Cyclin E-Komplexe Brca1 am Serin 1497 phosphorylieren (Ruffner et al. 1999). Die genaue Funktion dieser Phosphorylierung ist unbekannt, aber sie könnte für die Aktivierung des Reparaturkomplexes oder für die Bindung anderer Proteine an Brca1 von Bedeutung sein. Es wäre denkbar, dass die Zellen in Abwesenheit von Cdk2 den DNS-Schaden nicht beheben können und dadurch länger arretiert bleiben, was eine steigende Ploidie oder Ausbildung multinukleärer Zellen zur Folge haben könnte. Nun stellt sich auch die Frage, ob der Verlust von Cdk2 nur durch DNS-Schäden zur erhöhten Polyploidisierung führt oder ob dies auch ohne solche Einflüsse der Fall wäre. Dies ließe sich durch eine Untersuchung der Cdk2-Knockout-Mausleber verschiedenen Alters überprüfen. Es ist bekannt, dass Maus- und Rattenhepatozyten mit steigendem Alter mehr polyploide und multinukleäre Zellen ausbilden (Enesco & Samborsky 1983; Sigal et al. 1995). Durch die Analyse der Ploidie der Leber von älteren Cdk2-Knockout-Tieren könnte ermittelt werden, ob der Verlust von Cdk2 unabhängig von der Cyclin E-Überexpression zu einer Steigerung der Endoreplikation führt.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde die Cdk2-unabhängige Rolle von Cyclin E bei den Endoreplikationszyklen und bei der Entstehung der genetischen Instabilität bestätigt. Es wurden darüber hinaus Hinweise auf mögliche Mechanismen vorgelegt, die durch weitere Experimente untersucht werden könne.

5. Anhang

5.1. Verbrauchsmaterialien

12 Lochplatten	Greiner, Solingen
24 Lochplatten	Greiner, Solingen
96 Lochplatten	Greiner, Solingen
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

5.2. Laborgeräte

Analysenwaage	AE 200, Mettler-Toledo, Gießen
Brutschrank	Hera Cell, Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Biolumat	Lumat LB 9501 Berthold
Durchflusszytometer:	
FACScan Calibur	BD, Heidelberg
LSR II	BD, Heidelberg
Flexcycler	Analytik Jena, Jena
Fluoreszenzmikroskope	Leica DM5000, Leica, Wetzlar

Gelelektrophorese	Mini-Sub Cell GT Cell, BioRAD, München
Kühl- und Gefrierkombination	Leifheit, Nassau/Lahn
Magnetrührer	HANNA, HLL, Hannover
Mikrotiterplatten-Reader	MK II Multiskan, Titertek-Berthold
Mikrowelle	Bauknecht, Stuttgart
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
Sterilbank	Hera Safe, Kendro, Osterode
Schüttler	Rocky, Heidolph, Schwabach
Thermomixer für Eppendorfgefäße,	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
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. Verwendete Computerprogramme

Adobe Photoshop 7.0	Bildbearbeitung
BD CellQuest Pro™	FACS-Messung
FlowJo Version 7.3	FACS-Analyse und-Auswertung
Leica FireCam	Mikroskopsteuerung und Bildaufnahme

MacVector Version 10.1	Sequenzanalyse
Microsoft Excel 2007	Tabellenkalkulation
Microsoft Word 2007	Textbearbeitung

5.4. Organismen

5.4.1. Zelllinien

Die nachfolgend aufgeführten Zelllinien wurden verwendet:

HeLa humane Zervixkarzinom-Zelllinie	(ATCC CCL 2)
NIH3T3 murine Fibroblasten-Zelllinie	(ATCC CRL 1658)
HePa 1-6 murine Hepatoma-Zelllinie	(ATCC CRL 1830)
293HEK humane embryonale Nieren-Zelllinie	(ATCC CRL 1573)

5.4.2. Bakteriensämme

Es wurde folgender *E.coli* K12-Stamm eingesetzt.

Top10 F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *nupG* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(Str^R) *endA1* λ^- (Invitrogen)

5.4.3. Mausstämme

Es wurden Mäuse zur Leberinfektion des Stamms Cdk2-Knockout und –Wildtyp verwendet, die vom Philip Kaldis Laboratorium und eigener Nachzucht stammen.

5.5. Verwendete Antikörper

Anti- α -Aktin (C-4)	ICN Biomedicals, Frankfurt am Main
Anti- α -Aktin (C-2)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-BrdU	GE Healthcare Amersham, Freiburg
Anti- β -Catenin (C-14)	BD Biosciences, Heidelberg

Anti-Cdk2 (M-2)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Cdk1 (Ab-4)	NeoMarkers, Dreieich
Anti-Cyclin E (C-19)	Delta Biolabs, Gilroy, CA
Anti-Cyclin B1(GNS1)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Cdc6 (180.2)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti- γ -Tubulin	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt	GE Healthcare Amersham, Freiburg
Anti-Maus Peroxidase gekoppelt	GE Healthcare Amersham, Freiburg
Anti-myc AlexaFluor555 gekoppelt (4-A6)	Upstate, Schwalbach
Anti-myc 9E10	Sigma Aldrich, Schnelldorf
Anti-pCdk1(pT/pY ^{14/15})	BD Transduction Lab, Heidelberg
Anti-p27Kip1	BD Transduction Lab, Heidelberg
Anti-pHiston 3 (Ser10)	Cell Signaling, Frankfurt am Main

5.6. Verwendete 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
A-Sepharosekugeln	GE Healthcare, München
BactoTMPeptide	Becton Dickinson, Heidelberg
Benzamidine	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Blasticidin S	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt

Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Cäsiumchlorid 99%	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid- Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau	AppliChem, Darmstadt
DAPI	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
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
FKS	Biochrom, Berlin
Formaldehydlösung min 37 % säurefrei	Merck, Darmstadt
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
G-Sepharosekugeln	GE Healthcare, München
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	AppliChem, Darmstadt

Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Luminol min 97%, HPLC	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Natriumcarbonat wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen	AppliChem, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	AppliChem, Darmstadt
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Nonidet P40	AppliChem, Darmstadt
Penicillin- Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
ProLongGold Antifade Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Trasylo® (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

PEI (Polyethylenimin)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
PMSF	AppliChem, Darmstadt
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Propidium Iodid	Fluka, Steinheim
SDS ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Vanadat	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 Gew % Lösung in Wasser,	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

5.7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Zusammenfassung der Zellzyklusregulation	3
Abbildung 1.2: Aktivitätsmuster der Cyclin-abhängigen Kinasen während des Zellzyklus	5
Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der Bildung des Präreplikationskomplexes und Initiierung der DNS-Synthese	9
Abbildung 1.4: Zwei Wege der Cyclin E-Degradation	12
Abbildung 1.5: Kontrollpunkte des eukaryotischen Zellzyklus ¹⁷	
Abbildung 1.6: Zusammenfassung der bekannten Funktionen und Dysfunktionen von Cyclin E	20
Abbildung 3.1: Genotypisierung der Tiere	59
Abbildung 3.2: Experimentübersicht	60
Abbildung 3.3: Cyclin E -Spiegel in Mausleberlysaten	61
Abbildung 3.4: Proteinanalyse der Mausleberlysate nach 4-tägigen Cyclin E Überexpression	62
Abbildung 3.5: Phänotypanalyse der Mausleber nach 4-tägiger Cyclin E-Überexpression	64
Abbildung 3.6: Proteinanalyse der Mausleberlysate nach 6-tägigen Cyclin E Überexpression	66
Abbildung 3.7: 6-tägige Cyclin E Überexpression führt zur Bildung multinukliären Zellen in der Mausleber	67
Abbildung 3.8: 6-tägige Cyclin E Überexpression führt zur Bildung multinukliären Zellen in der Mausleber	67
Abbildung 3.9: Quantifizierung der proliferierenden Hepatozyten nach 6-tägigen Cyclin E-Überexpression	68
Abbildung 3.10: 6-tägige Überexpression von Cyclin E in Mausleber führt zu Endoredublikation	70
Abbildung 3.11: Lokalisation und Kinaseaktivität von Cyclin E und seinen Mutanten	72
Abbildung 3.12: Bindung der wt Cyclin E und seinen Mutanten an Cdk2	76
Abbildung 3.13: Stabile Überexpression von wt Cyclin E in HePa1-6 Klonen führt zur beschleunigten Zellteilung nach der Entlassung aus dem Nocodazolblock	78

Abbildung 3.14: Induzierbare Überexpression von wt Cyclin E im Hepa1-6 Klon führt zur Akkumulierung der polyploiden Zellen	81
Abbildung 3.15: Induzierbare Überexpression von wt-Cyclin E und C8- aber nicht C3-Mutante führt zu Akkumulation der tetra- und polyploiden Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie	82
Abbildung 3.16: Längerfristige Überexpression von wt-Cyclin E und C8- aber nicht C3-Mutante führt zu Akkumulation der tetra- und polyploiden Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie	84
Abbildung 3.17: Überexpression von wt-Cyclin E führt zur Akkumulation der multinukliären Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie	86
Abbildung 3.18: Überexpression der C3-Mutante Induziert keine Akkumulation der multinukliären Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie	87
Abbildung 3.19: Überexpression der C8-Mutante führt zur Akkumulation der multinukliären Zellen in stabilen induzierbaren NIH3T3-Zelllinie	88
Abbildung 3.20: Überexpression von wt-Cyclin E und C8-Mutante führt nicht zur Zentrosomenamplifikation	89
Abbildung 3.21: Proteinanalyse der NIH3T3-Lysate nach der 4-tägigen Überexpression von Cyclin E und seinen Mutanten	90
Abbildung 3.22: Bindung von wt Cyclin E und seinen Mutanten an Cdc6	91
Abbildung 4.1: Die wahrscheinlichen Wege der Endoreplikation durch die Cyclin E Überexpression	99

5.8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: PCR-Ansatz	30
Tabelle 2.2: PCR Programm	30
Tabelle 2.3: verwendete Antibiotikumkonzentrationen	38
Tabelle 2.4: Pipetierschema zur Herstellung der BSA-Standardreihe	42
Tabelle 2.5: Protokoll zur Herstellung eines 10 und 12%-igen Polyacrylamidgels ...	43
Tabelle 2.6: Antikörperverdünnung für die Westernblots	45
Tabelle 2.7: Antikörperverdünnungen für die Immunfluoreszenzfärbungen	47
Tabelle 2.8: Restriktionsverdauansatz	52
Tabelle 2.9: Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung	53
Tabelle 2.10: Reaktionsansatz für die Ligation	55
Tabelle 3.1: Zusammenfassung der untersuchten Eigenschaften von wt Cyclin E und seinen Mutanten	74
Tabelle 3.2: ermittelten Mutationen der C3- und C8-Mutanten	74

6. Literaturverzeichnis

Adams P.D., Sellers W.R., Sharma S.K., Wu A.D., Nalin C.M., Kaelin Jr W.G.: Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* 12: 6623-6633 (1996)

Ait-Si-Ali S., Ramirez S., Barre F.X., Dkhissi F., Magnaghi-Jaulin L., Girault J.A., Robin P., Knibiehler M., Pritchard L.L., Ducommun B., Trouche D., Harel-Bellan A.: Histone acetyltransferase activity of CPB is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature.* 396(6707): 184-186 (1998)

Ait-Si-Ali S., Poleskaya A., Filleur S., Ferreira R., Duquet A., Robin P., Vervish A., Trouche D., Cabon F., Harel-Bellan A.: CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* 19: 2430-2437 (2000)

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: *Molecular biology of the cell.* *Garland Publishing, Inc.* (1994)

Aleem E., Kiyokawa H., Kaldis P.: Cdc2-Cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nature cell biology.* 7(8): 831-836 (2005)

Arias E.E., Walter J.C: Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* 19: 114-126 (2005)

Bartek J., Lukas J.: Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr.Opinion in Cell Biology* 13: 738-747 (2001)

Badie C, Itzhaki JE, Sullivan MJ, Carpenter AJ, Porter AC: Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells. *Mol Cell Biol.* 20:2358-2366 (2000).

Bell S.P., Dutta A.: DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 333-74 (2002)

Bermejo R., Vilaboa N., Cales C.: Regulation of cdc6, germinin and cdt1 in human cells that undergo polyploidization. *Mol. Biol. Cell.* 13: 3989-4000 (2002)

Berthet C., Aleem E., Coppola V., Tessarollo L., Kaldis P.: Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol.*13(20): 1775-85 (2003)

Besson A., Dowdy S.F., Roberts J.M.: CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell.* 14:159-169 (2008)

Blow J.J.: Both cyclin A and cyclin E have S-phase promoting (SPF) activity in *Xenopus* egg extracts. *J. cell. Sci.* 109, 1555-1563 (1996)

Bortner D., Rosenberg M.P.: Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. *Mol. Cell. Biol.* 453-459 (1997)

Cai D, Latham VM Jr., Zhang X, Shapiro GI: Combined depletion of cell cycle and transcriptional cyclin-dependent kinase activities induces apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 66: 9270-9280 (2006)

Cardozo T., Pagano M.: The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 739-51 (2004)

Carrano A.C., Eytan E., Hershko A., Pagano M.: Skp2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the Cdk inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* 1: 193-9 (1999)

Chan F.K., Zhang J., Cheng L., Shapiro D.N., Winto A.: Identification of human and mouse p19, a novel cdk4 and cdk6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol.Cell.Biol.* 15: 2682-2688 (1995)

Clurman B.E., Sheaff R.J., Thress K., Groudine M., Roberts J.M.: Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes & Development* 10: 1979-1990 (1996)

Courjal F., Louason G., Speiser P., Katsaros D., Zeillinger R., Theillet C.: Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int. J. Cancer* 69: 247-253 (1996)

Connell-Crowley L., Elledge S.J., Harper J.W.: G1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblast. *Curr. Biol.* 8: 65-68 (1998)

Cook J.G., Park C.H., Burke T.W., Leone G., DeGregori J., Engel A., Nevins J.R.: Analysis of Cdc6 function in the assembly of mammalian prereplication complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1347–1352 (2002).

Coverley D., Wilkinson H.R., Downes C.S.: A protein kinase-dependent block to reinitiation of DNA replication in G2 phase in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 225: 294–300 (1996).

Coverley D., Wilkinson H.R., Madine M.A., Mills A.D., Laskey R.A.: Protein kinase inhibition in G2 causes mammalian Mcm proteins to reassociate with chromatin and restores ability to replicate. *Exp. Cell Res.* 238: 63–69 (1998).

Coverley D., Pelizon C., Trewick S., Laskey R.A.: Chromatin-bound Cdc6 persist in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A dependent process. *J. Cell Sci.* 113: 1929-1938 (2000)

Deng C.X.: Roles of Brca1 in centrosome duplication. *Oncogene.* 21: 6222-6227 (2002)

Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., Sherr C.J.: Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localisation. *Genes Dev.* 22: 3499-3511 (1998)

Donnellan R., Chetty R.: cyclin E in human cancers. *FASEB J.* 13: 773-780 (1999)

Donzelli M., Draetta G.R.: Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep.* 4: 671-677 (2003)

Draetta G., Beach D.: Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell.* 54: 17-26 (1988)

Draetta G., Luca F., Westendorf J., Brizuela L., Ruderman J., Beach D.: Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell*. 56: 829-838 (1989)

Dulic V., Stein G.H., Far D.F., Reed S.I.: Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol.Cell.Biol*. 18: 546-57 (1998)

Duursma A.M., Agami R.: Cdk-dependent stabilization of cdc6: Linking growth and stress signals to activation of DNA replication. *Cell Cycle* 4: 1725-8 (2005)

Ekholm-Reed S., Mendez J., Tedesco D., Zetterberg A., Stillman B., Reed S.I.: Dereglulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J. Cell Biol*. 165: 789-800 (2004)

Eliades A., Papadantonakis N., Ravid K.: New roles for cyclin E in megakaryocytic polyploidization. *JBC* 285: 18909-18917 (2010)

Enesco H.E., Samborsky J.: Liver polyploidy: influence of age and dietary restriction. *Exp. Gerontol*. 18:79-87 (1983).

Ferguson R.L., Maller J.L.: Cyclin E-dependent localisation of MCM5 regulates centrosome duplication. *J. Cell Science*. 121: 3224-3232 (2008)

Fukasawa K., Choi T., Kuriyama R., Rulong S., Vande Woude G.F.: Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*. 271: 1744-1747(1996)

Fujita M., Yamada C., Tsurumi T., Hanaoka F., Matsuzawa K., Inagaki M.: Cell cycle- and chromatin binding state- dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase. *J. Biol. Chem*. 273: 17095-17101 (1998).

Fujiwara T., Bandi M., Nitta M., Ivanova E., Bronson R.T, Pellman D.: Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*. 437: 1043-1047 (2005)

Geisen C., Möröy T.: The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. *JBC*. 277: 39909-39918 (2002)

Geng Y., Yu Q., Sicinska E., Das M., Schneider J.E., Bhattacharya S., Rideout III W.M., Bronson R.T., Gardner H., Sicinski P.: Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*. 114: 431-443 (2003)

Geng Y., Lee Y-M., Welcker M., Swanger J., Zagodzón A., Winer J.D., Roberts J.M., Kaldis P., Clurman B.E., Sicinski P.: Kinase-independent function of cyclin E. *Mol. Cell*. 25: 127-139 (2007)

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

Guan K.L., Jenkins C.W., Li Y., Nichols M.A., Wu X., O'Keefe C.L., Matera A.G., Xiong Y.: Growth suppression by p18, a p16INK4/MST1-and p14INK4B/MST2-related cdk6 inhibitors, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*. 8: 2939-2952 (1994)

Guse A., Mishima M., Glotzer M.: Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr.Biol*. 15: 778-786 (2005)

Hall C., Nelson D.M., Ye X., Baker K., DeCaprio J.A., Seeholzer S., Lipinski M., Adams P.D.: HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol.Cell. Biol*. 5: 1854-1865 (2001)

Hannon G.J., Beach D.: p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 371: 257-261 (1994)

Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge S.J.: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75: 805-816 (1993)

Hartwell L.H., Weinert T.A.: Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-34 (1989).

Hateboer G., Wobst A., Petersen B.O., Le Cam L., Vigo E., Sardet C., Helin K.: Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol. Cell. Biol*. 18: 6679-6697 (1998).

Hubalek M.M., Widschwendter A., Erdel M., Gschwendtner A., Fiegl H.M., Müller H.M., Goebel G., Mueller-Holzner E., Marth C., Spruck C.H., Reed S.I., Widschwendter M.: Cyclin E dysregulation and chromosomal instability in endometrial cancer. *Oncogene*. 23: 4187-4192 (2004)

Hwang H.C., Clurman B.C.: Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene*. 24: 2776-2786 (2005)

Ishimi Y., Komamura-Koho Y., You Z., Omori A., Kitagawa M.: Inhibition of Mcm 4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J. Biol. Chem.* 275: 16235-41 (2000)

Itzhaki J.E., Gilbert C.S., Porter A.C.: Construction by gene targeting in human cells of a "conditional" CDC2 mutant that rereplicates its DNA. *Nat. Genet.* 15: 258–265 (1997).

Jeffrey P.D., Russo A.A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N.P.: Mechanism of cdk activation by the structure of a cyclin A-cdk2 complex. *Nature*. 376: 313-320 (1995)

Kaldis P.: The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 284-296 (1999)

Kastan M.B., Bartek J.: Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432: 316-323 (2004)

Kawamura K., Izumi H., Ma Z., Ikeda R., Moriyama M., Tanaka T., Nojima T., Levin L.S., Fujikawa-Yamamoto K., Suzuki K., Fukasawa K.: Induction of centrosome amplification in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. *Cancer Research*. 64: 4800-4809 (2004)

Koep D.M., Schaefer L.K., Ye X., Keyomarsi K., Chu C., Harper J.W., Elledge S.J.: Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294: 173-177

Kops G.J.P.L., Weaver B.A.A., Cleveland D.W.: On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature*. 5:773-785 (2005)

Kossatz U., Breuhahn K., Wolf B., Hardtke-Wolenski M., Wilkens L., Steinemann D., Singer S., Brass F., Kubicka S., Schlegelberger B., Schirmacher P., Manns M.P., Singer J.D., Malek N.P.: The cyclin E regulator cullin 3 prevents mouse hepatic progenitor cells from becoming tumor-initiating cells. *J Clin Invest.* :3820-33 (2010)

Lee J.W., Soung Y.H., Kim H.J., Park W.S., Nam S.W., Kim S.H., Lee J.Y., Yoo N.J., Lee S.H.: *Eur. J. Cancer.* 42: 2369-73 (2006)

Lee H.O., Davidson J.M., Duronio R.J.: Endoreplication: Polyploidy with purpose. *Genes & Dev.* 23: 2461-2477 (2009)

Lew D.J., Dulic V., Reed S.I.: Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (cln) function in yeast. *Cell.* 66: 1197-1206 (1991)

Lewin B.: *Molekularbiologie der Gene.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (2002)

Li C.J., Vassilev A., DePamphilis M.L.: Role for Cdk1 (Cdc2)/Cyclin A in preventing the mammalian origin recognition complex's largest subunit (Orc1) from binding to chromatin during mitosis. *Mol. Cell. Biol.* 24:5875-86 (2004).

Liu D., Matzuk M.M., Sung W.K., Guo Q., Wang P., Wolgemuth D.J.: Cyclin A is required for meiosis in the male mouse. *Nat. Genet.* 20: 377-80 (1998)

Loeb K.R., Kostner H., Firpo E., Norwood T., Tsuchiya K.D., Clurman B.E., Roberts J.M.: A mouse model for cyclin E-dependent genetic instability and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 8: 35-47 (2005)

Lowe S.W., Cepero E., Evan G.: Intrinsic tumor suppression. *Nature.* 432: 307-15 (2004)

Lu X., Liu J., Legerski R.J.: Cyclin E is stabilized in response to replication fork barriers leading to prolonged S-Phase arrest. *J.B.C.* 284: 35325-35337 (2009)

Luo Y., Hurwitz J., Massague J.: Cell-cycle inhibition by independent Cdk and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature.* 375: 159-161 (1995)

Machida Y.J., Hamlin J.L., Dutta A.: Right place, right time, and only once: Replication initiation in metazoans. *Cell* 123: 13-24 (2005)

Maerki S., Olma M.H., Staubli T., Steigemann P., Gerlich D.W., Quadroni M.,

Sumara I., Peter M.: The Cul3-KLHL21 E3 ubiquitin ligase targets Aurora B to midzone microtubules in anaphase and is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.* 187: 791-800 (2009)

Mailand N., Diffley J.F.X.: Cdk's promote DNA replication origin licensing in human cells by protection cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell.* 122: 915-926 (2005)

Malumbres M., Barbacid M.: Cell cycle, Cdk's and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer.* 9: 153-66 (2009)

Matsumoto Y., Maller J.: A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 306: 885-888 (2004)

Mazumder S., Plesca D., Kinter M., Almasan A.: Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 3511-3520 (2007)

McEvoy J.D., Kossatz U., Malek N., Singer J. D.: Constitutive turnover of Cyclin E by Cul3 maintains quiescence. *Mol. Cell Biol.* 27(10): 3651-66 (2007)

McGarry T.J., Kirschner M.W.: Germinin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell.* 93: 1043-53 (1998)

McGowan C. H.: Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Progress in cell research* 5:1-4 (2003)

Michel L.S., Liberal V., Chatterjee A., Kirschwegger R., Pasche B., Gerald W., Dobles M., Sorger P.K., Murty V.V., Benezra R.: MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature.* 409: 355-359 (2001)

Minella A.C., Swanger J., Bryant E., Welcker M., Hwang H., Clurman B.E.: p53 and p21 form an inducible barrier that protect cells against cyclin E-cdk2 deregulation. *Curr. Biol.* 12: 1817-1827 (2002)

Minella A.C., Grim J.E., Welcker M., Clurman B.E.: p53 and SCF/Fbw7 cooperatively restrain cyclin E-associated genome instability. *Oncogene*. 1-6 (2007)

Morgan D. O.: The cell cycle. Principles of control. *New science press Ltd* (2007)

Morgan D.O.: Principles of Cdk regulation. *Nature*. 374: 131-134 (1995)

Morgan D.O.: cyclin-dependent kinases: engines clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (13):261-291 (1997)

Murphy M., Stinnakre M-G., Senamaud-Beaufort C., Winston N.J., Sweeney C., Kubelka M.: Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat Genet* 15: 83-86 (1997)

Murray A. W.: Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234 (2004)

Nallamshetty S., Crook M., Boehm M., Yoshimoto T., Olive M., Nabel E.G.: The cell cycle regulator p27Kip1 interacts with Mcm7, a DNA replication licensing factor, to inhibit initiation of DNA replication. *FEBS Lett.* 579: 6529-6536 (2005)

Nurse P.: Checkpoint pathways come of age. *Cell*. 91: 865-867 (1997)

Ohtani K., DeGregori J., Nevins J.R., Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 92: 12146-50 (1995)

Ohtani K., DeGregori J., Leone G., Herendeen D.R., Kelly T.J., Nevins J.R.: Expression of the HsOrc1 gene, a human Ocr1 homolog, is regulated by cell proliferation via the e2f transcription factor. *Mol.Cell. Biol.* 16: 6977-84 (1996).

Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., Pagano M.: Human Cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S Phase transition. *Mol.Cell.Biol.* 15: 2612-2624 (1995)

Okuda M., Horn H.F., Tarapore P., Tokuyama Y., Smulian A.G., Chan P-K., Knudsen E.S., Hofman I.A., Snyder J.D., Bove K.E., Fukasawa K.:

Nucleophosmin/B23 is a target of Cdk2/Cyclin E in centrosome duplication. *Cell*. 103: 127-140 (2000)

Ortega S., Malumbres M., Barbacid M.: Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1602: 73-87 (2002)

Ortega S., Prieto I., Odajima J., Martin A., Dubus P., Sotillo R., Barbero J. L., Malumbres M., Barbacid M.: Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat. Genet.* 35(1): 25-31 (2003)

Pagano M.: Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *The FASEB Journal*. 11: 1067-1075 (1997)

Parisi T., Beck A.R., Rougier N., McNeil T., Lucian L., Werb Z., Amati B.: Cyclin E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO* 22: 4794-4803 (2003)

Peters J-M.: The anaphase-promoting complex: Proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular Cell*. 9: 931-943 (2002)

Petersen B.O., Lukas J., Sorensen C.S., Bartek J., Helin K.: Phosphorylation of mammalian Cdc6 by Cyclin A/Cdk2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* 18: 396-410 (1999)

Pines J.: Cyclins: wheels within wheels. *Cell Growth Differ.* 6: 305-310 (1991)

Rajagopalan H., Jallepalli P.V., Rago C., Velculesu V.E., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C.: Inactivation of hCdc4 can cause chromosomal instability. *Nature*. 428: 77-81 (2004)

Rajagopalan H., Lengauer C.: Aneuploidy and cancer. *Nature*. 432: 338-341 (2004)

Resnitzky D., Gossen M., Bujard H., Reed S.I.: Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclin D1 and E with inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1669-1679 (1994)

Ruffner H., Jiang W., Craig A.G., Hunter T., Verma I.M.: Brca1 is phosphorylated an serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. *Mol. Cell. Biol.* 4843-4854 (1999)

Russo A.A., Jeffrey P.D., Pavletich N.P.: Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat.Struct. Biol.* 3: 696-700 (1996)

Sancar A., Lindsey-Boltz L., Ünsal-Kacmaz K., Linn S.: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 39-85 (2004)

Santamaria D., Barriere C., Cerqueira A., Hunt S., Tardy C., Newton K., Caceres J.F., Dubus P., Malumbres M., Barbacid M.: Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448: 16 (2007)

Satyanarayana A., Hilton M.B., Kaldis P.: p21 inhibits Cdk1 in the absence of cdk2 to maintain the G1/S phase DNA damage checkpoint. *Mol. Biol. Cell.* 19: 65-77 (2008)

Satyanarayana A., Kaldis P.: Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene.* 28: 2925-2939 (2009)

Sauer K., Knoblich J.A., Richardson H., Lehner C.F.: Distinct models of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes&Dev.* 9: 1327-39 (1995)

Schvartzman J.M., Sotillo R., Benezra R.: Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nature.* 10: 102-115 (2010).

Schulman B.A., Lindstrom D.L., Harlow E.: Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 18: 10453-10458 (1998)

Serrano M., Hannon G.J., Beach D.: A new regulatory motif in cell cycle causing specific inhibition of cyclin D/cdk4. *Nature.* 366: 704-707 (1993)

Shafer K. A.: The cell cycle: a review. *Vet. Pathol* 35: 461-478 (1998)

Sheaff R.J., Groudine M., Gordon M., Roberts J.M., Clurman B.E.: Cyclin E-Cdk2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 11: 1464-78 (1997).

Sherr C.J., Roberts J.M., Inhibitors of mammalian G cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev.* 9: 1149-1163 (1995)

Sherr C.J., Roberts J.M.: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512 (1999)

Shi Q., King R.W.: Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature.* 437: 1038-42 (2005)

Sigal S.H., Gupta S., Gebhard D.F.Jr., Holst P., Neufeld D., Reid L.M.: Evidence for a terminal differentiation process in the rat liver. *Differentiation.* 59: 35-42 (1995).

Singer J.D., Gurian-West M., Clurman B., Roberts J.M.: Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes & Development.* 13: 2375-2387 (1999)

Skarr J.R., Pagano M: Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 816-824 (2009)

Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Benezra R.: Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell.*11:9-23 (2007).

Spruck C.H., Won K-A., Reed S.I.: Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature.* 401: 297-300 (1999)

Spruck C.H., Strohmaier H., Sangfelt O., Müller H.M., Hubalek M., Müller-Holzner E., Marth C., Widschwedter M., Reed S.I.: hCdc4 gene mutations in endometrial cancer. *Cancer Res.* 62: 4535-9 (2002)

Storchova Z., Kuffer C.: The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *Journal of cell science.* (23): 3859-3866 (2008)

Strausfeld U.P., Howell M., Descombes P., Chevalier S., Rempel R.E., Adamczewski J., Maller J.L., Hunt T., Sherr C.J., Roberts J.M.: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501-1512 (1999)

Sugimoto N., Tatsumi Y., Tsurumi T., Matsuokage A., Kiyono T., Nishitani H., Fujita M.: Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting germinin binding. *J. Biol. Chem.* 279: 19691-7 (2004)

Sugimoto N., Yoshida K., Tatsumi Y., Yugawa T., Narisawa-Saito M., Waga S., Kiyono T., Fujita M.: Redundant and differential regulation of multiple licensing factors ensures prevention of re-replication in normal human cells. *J. Cell. Sci.* 122: 1184-91 (2009)

Tetzlaff M., Yu W., Li M., Zhang P., Finegold M., Mahon K., Harper J.W., Schwartz R.J., Elledge S.J.: Defective cardiovascular development and elevated cyclin E and Notch proteins in mice lacking the Fbw7 F-box protein. *PNAS* 101: 3338-3345 (2004)

Toyoshima H., Hunter T.: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin –Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 78: 67-74 (1994)

van Drogen F., Sangfelt O., Malyukova A., Matskova L., Yeh E., Means A.R., Reed S.I.: Ubiquitylation of Cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Molecular Cell.* 23: 37-48 (2006)

Vidal A., Koff A.: Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247: 1-15 (2000)

Vogel C., Kienitz A., Hofman I., Müller R., Bastians H.: Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene* 23: 6845-6853 (2004)

Wang Q., Liu T., Fang Y., Xie S., Huang X., Mahmood R., Ramaswamy G., Sakamoto K.M., Darzynkiewicz Z., Xu M., Dai W.: BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood.* 103: 1278-1285 (2004)

Watanabe H., Pan Z.Q., Schreiber-Agus N., DePinho R.A., Hurwitz J., Xiong Y.: Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2

requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1392-1397 (1998)

Welcker M., Clurman B.E.: Fbw7 ubiquitin ligase: a tumor suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nat. Rev. Cancer*. 8: 83-93 (2008)

Wie Y., Jin J., Harper J.W.: The cyclin E/Cdk2 substrate and cajal body component p220/NPAT activates histone transcription through a novel lisH-like domain. *Mol. Cell Biol.* 23: 3669-3680 (2003)

Wohlschlegel J.A., Dwyer B.T., Dhar S.K., Cvetic C., Walter J.C., Dutta A.: Inhibition of eukaryotic DNA replication by germinin binding to Cdt1. *Science*. 290: 2309-12 (2000)

Won K-A., Reed S.I.: Activation of cyclin E/cdk2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *The EMBO Journal*. 15: 4182-4193 (1996)

Wong C., Stearns T.: Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol.* 6: 6 (2005)

Xie S., Xie B., Lee M.Y., Dai W.: Regulation of cycle checkpoints by polo-like kinases. *Oncogene*. 24(2): 277-286 (2005)

Yan Z., DeGregori J., Shohet R., Leone G., Stillman B., Nevins J.R., Williams R.S.: Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3603–3608 (1998).

Yan T., Wunder J.S., Gokgoz N., Seto K.K., Bell R.S., Andrusis I.L.: hCdc4 variation in osteosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 169: 138-42 (2006)

Yanagi K., Mizuno T., You Z., Hanaoka F.: Mouse geminin inhibits not only Cdt1–MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 277: 40871–40880 (2002).

Ye X., Nalepa G., Welker M., Kessler B.M., Spooner E., Quin J., Elledge S.J., Clurman B.E., Harper J.W.: Recognition of phosphodegron motifs in human cyclin E by the SCF(Fbw7) ubiquitin ligase. *J. Biol.Chem.* 279: 50110-50119

Yeh K.H., Kondo T., Zheng J., Tsvetkov L.M., Blair J., Zhang H.: The F-box protein skp2 bind to the phosphorylated threonine 380 in cyclin E and regulates ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 884-890 (2001)

Yoshida K., Inoue I.: Regulation of Geminin and Cdt1 expression by E2F transcription factors. *Oncogene.* 23: 3802–3812 (2004).

Yu H., Yau X.: Cyclin B1: conductor of mitotic symphony orchestra. *Cell research* 18:218-220 (2008)

Zachariae W.: Progression into and out of mitosis. *Curr. Op. Cell Biol.* 11: 708-716 (1999)

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

Zhang J., Powell S.N.: The role of the Brca1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Res.* 3: 531-9 (2005)

Zhao J., Dynlacht B., Imai T., Hori., Harlow E.: Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-Cdk2, promotes S-phase entry. *Genes & Dev.* 12: 456-461 (1998)

Zhou B-B.S., Elledge S.J.: The DNA damage response: putting checkpoint in perspective. *Nature.* 408: 433-9 (2000).

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Nisar Malek, der als Aufgabensteller den Anstoß zu dieser Doktorarbeit gab und mich während der gesamten Ausführung fachlich sehr gut betreute und unterstützte.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Jorg Jacobsen und Herrn Prof. Dr. med. Lars Zender für die Übernahme des Koreferats ganz herzlich bedanken.

Bei Frau Dr. rer. nat. Uta Kossatz bedanke ich mich für die engagierte Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft.

Bei meinen lieben Kolleginnen Dr. Sangeeta Chauhan und Hanane Belahmer möchte ich mich ganz herzlich für die sehr nette Zusammenarbeit, hilfreiche Diskussionen und stets offenes Ohr mir gegenüber bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekularbiologie bedanken, für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung während der praktischen Ausführung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinen ehemaligen Studienkommilitoninnen Dr. Katharina Theophile und Sonja Wilke für die kritische Durchsicht und meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Nazim, die mich während meines Studiums und Doktorarbeit stets unterstützt und ermuntert haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 03/09/1978
Pawlodar /Kasachstan
deutsche Staatsangehörigkeit
ledig

Promotion

05/2007 – 12/2010 wissenschaftliche Angestellte an der MH-Hannover
Schwerpunkte: Molekular- und Zellbiologie
angestrebter Abschluß: Dr. rer. nat.

Studium

10/2004 – 12/2006 Studium an der Universität Hannover
Studiengang: Life Science
Schwerpunkte: Molekularbiologie und Bioinformatik
Abschluss: Master of Science

10/1999 - 12/2003 Studium an der Fachhochschule Bingen,
Fachrichtung Biotechnologie
Schwerpunkte: Biotechnologie, Allgemeine
Verfahrenstechnik, Physikalische und Analytische
Chemie
Abschluss: Dipl. Ing. (FH)

Schulausbildung

09/1997 - 07/1999 Fachhochschulreife an den Berufsbildenden Schulen I
des Landkreises Bitterfeld

Weiterbildungen

03 - 07/2004 Intensive Business English an den Wallstreet Instituten
in Hannover

Zusätzliches

Sprachen Russisch, Deutsch, Englisch
EDV Microsoft-Office Word, Excel, Powerpoint

Hannover, März 2011

Olga Weikum