



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7156

Funktionelle Charakterisierung von Pip92

I. Scholl

Institut für Toxikologie und Genetik

August 2005

Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7156

Funktionelle Charakterisierung von Pip92

Ingmar Scholl
Institut für Toxikologie und Genetik

Von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe
2005

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-071562

Funktionelle Charakterisierung von Pip92

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Ingmar Scholl

aus Landau/Pfalz

Dekan: Prof. Dr. Manfred Kappes

Referent: PD Dr. Jonathan Sleeman

Koreferent: Prof. Dr. Margot Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 21.04.05

Zusammenfassung

Das weitgehend unerforschte *immediate-early-gene pip92* rückte in den letzten Jahren bei der Arbeitsgruppe Sleeman in den Focus der Forschung, da es bei den miteinander verbundenen Prozessen Tumorprogression/Zellzykluskontrolle/Apoptose und Metastasierung/Zellmigration assoziiert oder involviert ist. Ob Pip92 eine regulierende Rolle bei diesen Prozessen einnimmt, sollte im Zuge dieser Arbeit durch funktionelle Analysen beantwortet werden. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Erforschung der Funktion von Pip92 bei Zellmigrationen, Zellzyklusregulation und Apoptose gesetzt.

Es wurden zwei verschiedene Zelllinien als Versuchsobjekte gewählt: die schwach metastasierenden Bsp73-1AS-Zellen, die sich gegenüber ihren genetisch verwandten Bsp73-ASML-Zellen unter anderem in der geringeren *pip92*-Expression unterscheiden und immortalisierte NIH 3T3-Fibroblasten.

Das Protein gilt als zytoplasmatisch. Erste Hinweise, dass es auch im Kern lokalisiert ist, konnte N.Novac (2001) sammeln. Ich konnte diese Beobachtungen in NIH 3T3-Fibroblasten nicht nur bestätigen, sondern auch einen Zusammenhang von subzellulärer Lokalisation und Kontaktinhibition herstellen. Das Protein ist bei Subkonfluenz im Kern, bei konfluenten Zellen im Zytoplasma. Diesem Mechanismus folgt das seruminduzierte, das ektopisch exprimierte und teilweise auch das durch Anisomycin induzierte Pip92. Funktionelle Versuche zeigen, dass der nukleäre Export durch das CRM1-Protein vermittelt wird.

Die nukleäre Lokalisation des Proteins in Fibroblasten bei geringer Zelldichte kann mit zwei unterschiedlichen Wirkungen auf die Zellen in Bezug gesetzt werden: Einerseits scheint es in NIH 3T3-Fibroblasten den durch Serumentzug ausgelösten Eintritt in die Ruhephase des Zellzyklus zu blockieren, andererseits fördert es in ruhenden Fibroblasten die Apoptose. Konfluente Fibroblasten zeigen beide Phänomene nicht.

Die schon beobachtete migrationsfördernde Wirkung des Proteins auf Bsp73-1AS-Zellen konnte durch zusätzliche Versuche bestätigt und auch durch mehrere Versuche in NIH 3T3-Fibroblasten nachgewiesen werden. Dies kann aber, genau wie in Bsp73-1AS-Zellen, nicht mit einer veränderten Adhäsion an ECM- und Basallaminakomponenten korreliert werden. Versuche, durch konstitutive Überexpression von *pip92* in Fibroblasten diese zu transformieren, zeigten, dass das Wildtyp-Protein dies nicht vermitteln kann. Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion von Pip92 steigert sich das Verständnis der physiologische Relevanz von *pip92*-Expression wesentlich.

Functional Characterisation of Pip92

Abstract

The function of the immediate early gene *pip92* regulation is still poorly understood, but in the last years the Sleeman lab has shown that there is a strong functional correlation between *pip92* and tumor progression, metastasis and cell migration. The aim of this thesis was to address the question of how *pip92* regulates these processes. The work was focused on functional studies of *pip92* in cell migration, cell cycle regulation and apoptosis, and used two different cell systems, namely (i) the poorly metastatic cell line Bsp73-1AS, that differs from its counterpart ASML by low Pip92 expression (ii) immortalized NIH 3T3 fibroblasts, that express Pip92 endogenously during the G0/G1 transition

Despite the fact that Pip92 is described in the literature as being a cytoplasmic protein, the Sleeman lab have found evidence in tumor cells that *pip92* can also be localized in the nucleus (unpublished data). In my work I could confirm this observation in NIH 3T3 fibroblasts. Furthermore, I could show that there is a direct relationship between expression and subcellular localisation of Pip92 and contact inhibition. Under subconfluent conditions Pip92 is constitutively expressed endogenously and is localized in the nucleus. The same subcellular localisation was observed with ectopically expressed Pip92. Conversely, virtually no endogenous Pip92 was found to be expressed in confluent fibroblasts, while ectopically expressed Pip92 protein localised exclusively to the cytoplasm. The effect of contact inhibition on Pip92 localisation was also shown with serum- and anisomycin-induced endogenous Pip92 expression. Functional studies using Leptomycin B showed that nuclear export is mediated by CRM1. In fibroblasts at low density, Pip92 blocks entry into G0 in starved fibroblasts, yet promotes apoptosis in quiescent cells. These phenomena were not observed in confluent fibroblast. In addition to regulating the cell cycle and apoptosis, I showed that *pip92* promotes cell migration in both Bsp73-1AS tumor cells and NIH 3T3 cells. This effect is not a consequence of an altered adhesion to ECM or basal lamina components. Finally, investigations with constitutively expressed *pip92* in fibroblasts suggest that Pip92 does not have an oncogenic effect.

Together the data presented in this work increase the understanding of the physiological relevance of *pip92* expression.

1	Einleitung	1
1.1	Krebsentstehung	2
1.1.1	Tumorsuppressorgene	2
1.1.2	Onkogene	2
1.2	Der Zellzyklus	3
1.2.1	Regulation des Zellzyklus durch Cycline und Cyklin-abhängige Kinasen (CDKs).....	4
1.3	Die Apoptose	6
1.3.1	Morphologische Merkmale	6
1.3.2	Der intrinsische Weg.....	6
1.3.3	Der extrinsische Weg	7
1.4	Kontaktinhibition, Anoikis und <i>anchorage independent growth</i>	7
1.4.1	Kontaktinhibition	8
1.4.2	Anoikis und <i>anchorage independent growth</i>	8
1.5	Metastasierung	9
1.5.1	Kaskade der Metastasierung.....	9
1.5.2	Proteasen	10
1.5.2.1	Serinproteinasen	10
1.5.2.2	Matrix-Metalloproteinasen.....	11
1.5.3	Zelladhäsion	12
1.5.3.1	Integrine	12
1.5.3.2	Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)	12
1.5.3.3	Cadherine	13
1.5.3.4	Leukozyten-Adhäsionsfaktoren	13
1.5.3.5	CD44 (<i>cluster of differentiation 44</i>).....	14
1.6	Zellbewegungen	14
1.7	Pip92	16
1.7.1	Die Vorgänge am <i>pip92</i> -Promotor.....	18
1.7.2	Expression von <i>pip92</i> während zellulären Prozessen und Pip92-induzierende Stimuli.....	19
1.7.2.1	Eintritt in den Zellzyklus.....	19
1.7.2.2	Differenzierungsvorgänge.....	20

1.7.2.3	apoptotische Prozesse.....	21
1.7.2.4	<i>pip92</i> -Expression und der MAP-Kinaseweg.....	22
1.7.2.5	Pip92 bei Tumorentwicklung und Metastasierung.....	22
1.8	Nukleäre Transportmechanismen	23
1.8.1	Sequenzmotive	23
1.8.2	Vorgänge auf molekularer Ebene.....	24
1.8.3	Spezifischer nukleärer Import	24
1.8.4	Spezifischer nukleärer Export	25
1.9	Zielsetzung	25
2	Material und Methoden.....	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Chemikalien und Bezugsquellen.....	26
2.1.2	Kits	28
2.1.3	Verbrauchsmaterial	29
2.1.4	Geräte	29
2.1.5	siRNA-Oligonukleotide	30
2.1.6	Plasmide	31
2.1.7	Antikörper	32
2.1.8	Eukaryotische Zelllinien	33
2.1.9	Bakterienstämme.....	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	DNA-Methoden.....	34
2.2.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	34
2.2.1.2	Fällung von Nukleinsäuren	34
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	34
2.2.1.4	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.2.1.5	Plasmid-DNA-Mini-Präparation	35
2.2.1.6	Plasmid-DNA-Maxi-Präparation	35
2.2.1.7	Elektrophorese von Agarosegelen.....	36
2.2.1.8	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	36
2.2.1.9	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	36
2.2.2	Protein-Methoden.....	37
2.2.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37

2.2.2.2	Präparation von Ganzzell-Proteinlysaten zur elektrophoretischen Auftrennung	37
2.2.2.3	Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten.....	37
2.2.2.4	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE).....	38
2.2.2.5	Immunoblot-Analyse von Proteinen („Western-Blot“).	39
2.2.2.6	Immunfluoreszenzanalyse	39
2.2.2.7	Aufreinigung von Immunglobulinen.....	40
2.2.3	Zellkultur und Transfektionsmethoden	41
2.2.3.1	Kulturbedingungen.....	41
2.2.3.2	Passagieren der Zelllinien	41
2.2.3.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	41
2.2.3.4	Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung durch Zellzählung.....	42
2.2.3.5	Definition Subkonfluenz/Konfluenz bei NIH 3T3-Fibroblasten	42
2.2.3.6	Seruminduktion von Pip92 in gehungerten konfluenten und subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten	42
2.2.3.7	Induktion von Pip92 durch Anisomycin	43
2.2.3.8	Posttranskriptionelles pip92-silencing (RNAi) und Proliferationsmessung	43
2.2.3.9	Stabile Transfektion von Zellen und Selektion von Zellklonen mit G418 ..	44
2.2.3.10	Transiente Transfektion von Zellen	44
2.2.3.11	Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	45
2.2.4	Funktionelle <i>in vitro</i> -Methoden	45
2.2.4.1	Adhäsionsexperimente	45
2.2.4.2	Messung der Proliferationsraten durch Quantifizierung des Einbaus an radioaktiven Thymidins.....	46
2.2.4.3	Bestimmung der im Zytoplasma befindlichen Histone als Maß für apoptotische Zellen	46
2.2.4.4	Wundheilungsexperimente.....	46
2.2.4.5	<i>In vitro</i> Zell-Migration	47
2.2.4.6	Zellzyklusanalyse durch Propidiumjodid-Färbung	48
2.2.4.7	Brechen der Kontaktinhibition	49
2.2.4.8	Versuche zur Focusbildung.....	49
2.2.4.9	Wachsen von Fibroblasten in Soft-Agar	49
2.2.4.10	Blockierung des nukleären Exports durch LeptomycinB	50
3	Ergebnisse.....	51

3.1	Messung der Transfektionseffizienz	51
3.2	Einfluss von exogenem Pip92 auf die Apoptose von Bsp73 1AS-Zellen.....	52
3.3	Einfluss von exogenem Pip92 auf die Proliferation von Bsp 73 1AS-und Bsp73 ASML-Zellen	54
3.4	Pip92 begünstigt die Schließung einer künstlichen Wunde im Zellkulturversuch bei Bsp73 1AS-Zellen	57
3.5	Einfluss von exogenem Pip92 auf die Zelladhäsion an Basallamina- und ECM-Bestandteile in Bsp73 1AS-Zellen	59
3.6	Funktion von Pip92 in NIH 3T3-Fibroblasten	61
3.7	Seruminduktion von Pip92 in ruhenden NIH 3T3-Fibroblasten.....	62
3.8	Subzelluläre Lokalisation von Pip92 in NIH 3T3-Fibroblasten.....	63
3.9	Brechung der Kontaktinhibition führt zur Akkumulation von Pip92 im Kern	67
3.10	Blockierung des nukleären Exports durch Leptomycin B (LMB)	69
3.11	Funktionelle Analysen.....	71
3.12	Effekt des posttranslationalen pip92-silencing auf den Eintritt in den Zellzyklus	71
3.13	Einfluss von exogenem Pip92 auf die Proliferation von logarithmisch wachsenden NIH 3T3-Fibroblasten	72
3.14	Einfluss von exogenem Pip92 auf die Apoptose von logarithmisch wachsenden NIH 3T3-Fibroblasten.....	74
3.15	Einfluss von exogenem Pip92 auf den Zellzyklus von NIH 3T3-Fibroblasten .	76
3.16	Pip92 fördert die Apoptose in ruhenden Fibroblasten	80
3.17	Subzelluläre Lokalisation von Pip92 bei Anisomyzin-vermittelter Apoptose ..	85
3.18	Einfluss von exogenem Pip92 auf die Zellmigration in NIH 3T3-Fibroblasten	90
3.18.1	Wundheilungs-Versuch.....	90
3.18.2	Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten	92
3.18.3	Invasive Wanderung durch Matrigel entlang eines Wachstumsfaktorgradienten	94

3.19	Einfluss von exogenem Pip92 auf die Zelladhäsion an Basallamina- und ECM-Bestandteile in NIH 3T3-Fibroblasten	95
3.20	Onkogenes Potential des Proteins	97
4	<i>Diskussion</i>.....	101
4.1	Subzelluläre Lokalisaton von Pip92	101
4.2	Block des nukleären Exports durch Leptomycin B	103
4.3	Pip92 und Zellmigration	104
4.4	Einfluss von Pip92 auf den Zellzyklus und die Apoptose	105
4.5	Proapoptotische Wirkung von Pip92.....	108
4.6	Hypothetische Wechselwirkungen von Pip92 mit pRb.....	109
4.6.1	Regulation der Apoptose durch pRb	109
4.6.2	Regulation der Differenzierung durch pRb	110
4.6.3	Regulation des Zellzyklus durch pRb	110
4.7	Mögliche physiologische Bedeutung von Pip92 in Fibroblasten.....	111
5	<i>Abkürzungen</i>	112
6	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	118

1 Einleitung

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Pip92 auf Tumorzellen und nicht transformierte Zellen untersucht. Die Einleitung soll den Hintergrund dieser Thematik erläutern.

Die funktionellen Analysen charakterisieren Vorgänge, die eng mit Tumorentstehung, Proliferation, Apoptose und Metastasierung assoziiert sind. Zuerst möchte ich diese zellulären Prozesse etwas näher erläutern.

Unter der umgangssprachlichen Bezeichnung Krebs versteht man alle bösartigen (malignen) Tumoren, die ungebremst in andere Gewebe wuchern. Demgegenüber unterscheidet man gutartige (benigne) Tumoren, die umliegendes Gewebe lediglich verdrängen.

Dennoch sind die Primärtumoren nur in den wenigsten Fällen für den Tod verantwortlich. Vielmehr sind es die vom Primärtumor abgewanderten Zellen, die häufig in lebenswichtigen Organen des Organismus Sekundärtumoren (Metastasen) bilden, das Organ zerstören und zum Tod führen.

Fast jeder Zelltyp kann entarten und maligne Tumoren entwickeln, deshalb wird unter Krebserkrankung eine ganze Reihe von Erkrankungen zusammengefasst, die sehr verschiedene Symptome und Verläufe haben können. In den Industrieländern sind Krebserkrankungen nach Unfällen und Herz- bzw. Kreislauferkrankungen die dritthäufigste Todesursache.

Mehrere Eigenschaften sind in Krebszellen verändert:

1. Transformierte Zellen sind in Kultur unsterblich
2. Verminderte Abhängigkeit der Proliferation von Wachstumsfaktoren
3. Keine Inhibition der Proliferation durch Kontaktinhibition
4. Wachstum ohne Zell-Zell- oder Zell-ECM-Kontakt (*anchorage independent*)
5. Verlust der Zellzykluskontrolle
6. Resistenz gegenüber Apoptosesignalen
7. Die Zelldifferenzierung ist gestört: entweder sind die Zellen nicht ausdifferenziert oder sie haben sich in einen nicht gewünschten Zelltyp ausdifferenziert
8. Veränderungen in Funktion und Struktur der Zellmembran

(nach: Cancer Medicine 6th ed.)

1.1 Krebsentstehung

Die Krankheit ist genetisch bedingt und geht von einer einzelnen Zelle aus, in der sich im Laufe der Zeit sechs bis sieben somatische Mutationen in den Genen angehäuft haben. Durch die strukturell und funktionell veränderten Proteine erlangt die Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber gesunden Zellen und expandiert bis zur Geschwulst (Kinzler & Vogelstein, 1996).

Zwei Arten von Genen sind von den Mutationen betroffen: Tumorsuppressorgene und Onkogene.

1.1.1 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene bezeichnet eine Gruppe von Genen, die verschiedene Aufgaben in der Zelle erfüllen:

Zellzykluskontrolle, Detektion und Reparatur von DNA-Schäden, Weiterleitung von mitogenen Signalen, Zelldifferenzierung und Zellwanderung. Krebserzeugende Mutationen müssen beide Allele inaktivieren (*loss of function*-Mutation), die Gene sind demnach rezessiv (nach: Cancer Medicine 6th ed.).

Die beiden bekanntesten Tumorsuppressorgene, die auch am besten charakterisiert sind, sind *p53* und das Retinoblastom-Gen (*Rb*-Gen). *p53* ist in mehr als 50% aller Tumoren mutiert (Soussi et al., 1994). Es ist verantwortlich für Proliferationsstop in der G1-Phase, speziell nach DNA-Schäden. Der Zelle wird dadurch genug Zeit gegeben die Schäden zu beheben. Falls dies nicht mehr möglich ist, leitet *p53* die Apoptose ein. Retinoblastom ist eine Krankheit, die im Kindesalter auftritt und zu einem Tumor der Retina führt. Sie kann erblich bedingt sein oder auch sporadisch durch somatische Mutationen auftreten. Es steuert den Zellzyklus am Restriktionspunkt, was einen Stop in der G1-Phase bedeutet (nach: Cancer Medicine 6th ed.).

1.1.2 Onkogene

Zur Zeit sind ca. 50 Onkogene bekannt. Diese Gene kodieren für Proteine, welche die Proliferation stimulieren. Keines dieser Gene ist von Natur aus ein krebsförderndes Gen. Alle haben ihre Aufgabe in der Zelle. Die nicht mutierten Gegenstücke nennt man Proto-Onkogene. Erst durch genetische Veränderungen werden sie in einen dauerhaft aktiven Zustand versetzt (*gain of function*) und mutieren zu Onkogenen. Im Gegensatz zu den Tumorsuppressorgenen sind Onkogene dominant, d.h., Mutation in einem Allel ist

ausreichend. Es gibt vier Möglichkeiten, wie dies geschehen kann. Erstens kann z.B. durch Mutationen im Gen eine Aminosäure ausgetauscht wurde. Das Protoonkogen *c-ras* kann z.B. durch fast jede Mutation in Aminosäure 12 in ein Onkogen umgewandelt werden. Zweitens kann durch Genamplifikation zuviel des wachstumsfördernden Proteins gebildet werden. In einigen Tumoren ist z.B. *mdm-2* amplifiziert, was zum vermehrten Abbau von p53 führt und somit die Zellzykluskontrolle außer Kraft setzt. Der dritte Mechanismus ist die Translokation eines Proto-Onkogens. Dadurch können z.B. Fusionsproteine entstehen, die onkogen wirken. Bcr-abl-Fusionstranskripte sind dafür ein Beispiel. Zudem kann ein Proto-Onkogen in eine Region inseriert werden, die eine hohe Transkriptionsrate hat. Translokiert *c-myc* in B-Zellen in die Nähe des Ig-Locus, kann sich sein Expressionsniveau erhöhen. Unreife B-Zellen differenzieren nicht mehr aus und verursachen so eine Leukämie. Eine vierte Möglichkeit ist die Deletion von Basen, wodurch es zu Leserasterverschiebungen kommt und *nonsense*-Proteine entstehen (nach: Cancer Medicine 6th ed. und Genes VIII).

1.2 Der Zellzyklus

Die Funktion vieler Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene ist die Regulation des Zellzyklus. Mutationen in ihnen führen oft zu einer Fehlregulation, es kommt zu einer erhöhten Teilungsrate der Zellen. Das wohl bekannteste Gen, das den Zellzyklus reguliert, ist der Tumorsuppressor pRb. Er bindet an die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, inhibiert sie. Der Zellzyklus wird gestoppt. Mutationen in pRb, die dazu führen, dass das Protein nicht mehr die Transkriptionsfaktoren bindet, führen zu erhöhten Teilungsraten der betroffenen Zellen (siehe Übersichtsartikel (Donjerkovic & Scott, 2000; Frolov & Dyson, 2004)).

Deshalb soll an dieser Stelle eine kurze Einführung in die grundlegenden Vorgänge beim Zellwachstum gegeben werden.

Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus, der sich aus vier definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G1-, S-, G2- und M-Phase. Er beinhaltet in den verschiedenen Phasen mehrere Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus gestoppt werden kann. Hier wird einerseits überprüft, ob die Zelle irreversibel aus dem Zellzyklus ausschert und ausdifferenziert, andererseits wird hier überprüft, ob frühere Stadien erfolgreich abgeschlossen wurden. Ist dies nicht der Fall, werden entweder

Reparaturmechanismen aktiviert oder die Zelle leitet die Apoptose ein (zur Übersicht siehe Abbildung 1).

Das Fortschreiten einer Zelle aus der G₀-Ruhephase in die G₁-Phase des Zellzyklus und aus der G₁-Phase in die S-Phase wird durch den G₁-Restriktionspunkt in der späten G₁-Phase reguliert. Hier agiert der Tumorsuppressor pRb. Ist dieser Kontrollmechanismus durch physiologische Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Mutationen aufgehoben, geht die Zelle nach Überprüfung der Integrität der DNA an einem weiteren Kontrollpunkt in die S-Phase über und beginnt mit der DNA-Synthese. (Donjerkovic & Scott, 2000; Frolov & Dyson, 2004)

Ist die S-Phase abgeschlossen, wird überprüft, ob die DNA-Replikation erfolgreich beendet wurde. Ist dies der Fall, gelangt die Zelle in die G₂-Phase, in der die Aufteilung der replizierten DNA auf die Tochterzellen vorbereitet wird. Nach erfolgreichem Überwinden eines weiteren Kontrollpunktes (G₂/M-Kontrollpunkt) geht die Zelle in die M-Phase über, in der es am Ende zur Zellteilung kommt. Die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen befinden sich nun wieder in der G₁-Phase. Sie können von hier aus wieder aus dem Zellzyklus ausscheren und in die Ruhephase (G₀) übergehen. Eine Störung des Zellzyklus kann zwei für die maligne Transformation bedeutsame Folgen haben: Zum einen kann die Zellzahl durch eine erhöhte Proliferationsrate und bzw. oder einen Block der physiologischen Apoptose erhöht werden. Zum anderen können Störungen an den Kontrollpunkten bzw. der dort ablaufenden Reparaturmechanismen zu einer erhöhten Mutagenese führen (nach: Genes VIII)

1.2.1 Regulation des Zellzyklus durch Cycline und Cyklin-abhängige Kinasen (CDKs)

Bei der Regulation des Zellzyklus spielt die Familie der Cyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) eine wichtige Rolle. Diese Serin- bzw. Threoninkinasen werden zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus aktiviert. Bei der Aktivierung sind vor allem die regulatorischen Untereinheiten der CDKs, die Cycline, beteiligt. Ihre Expression ist zellzyklusabhängig reguliert: D-Cycline werden in der G₁-Phase exprimiert, Cyclin E am G₁-S-Übergang, Cyclin A während der S-Phase und am Übergang zur G₂-Phase und Cyclin B in der Mitose. Die Cyklin-abhängigen Kinasen CDK1, 2, 3 und 6 bilden in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedliche Komplexe mit den Cyclinen und können so auch diverse Substrate zellzyklusspezifisch phosphorylieren (nach: Genes VIII). Außerdem werden die CDKs über spezifische

Phosphorylierungsereignisse reguliert (Morgan, 1997). Darüber hinaus regulieren zwei Klassen von CDK-Inhibitoren (CDKIs) die Aktivität: die CIP/Kip-Familie sowie die Ink4-Familie. Substrate der CDKs sind vor allem an Transkriptions- und Replikationsprozessen beteiligt. Das am besten untersuchte Substrat ist das Produkt des Retinoblastom-Tumorsuppressorgens *pRb*. Es wird in der G1-Phase phosphoryliert und setzt dadurch Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie frei. Diese aktivieren wiederum die Expression von wichtigen regulatorischen Proteinen für das Voranschreiten des Zellzyklus in die S-Phase wie Cyclin D und E oder sie aktivieren Gene, welche die DNA-Replikation einleiten (Stevens & La Thangue, 2003).

Vor allem die Familie der Cyclin D- und E-Proteine und ihre Inhibitoren sind bei der Tumorgenese involviert (Ortega et al., 2002) (Steege & Zhou, 1998) (Baghdassarian & Ffrench, 1996).

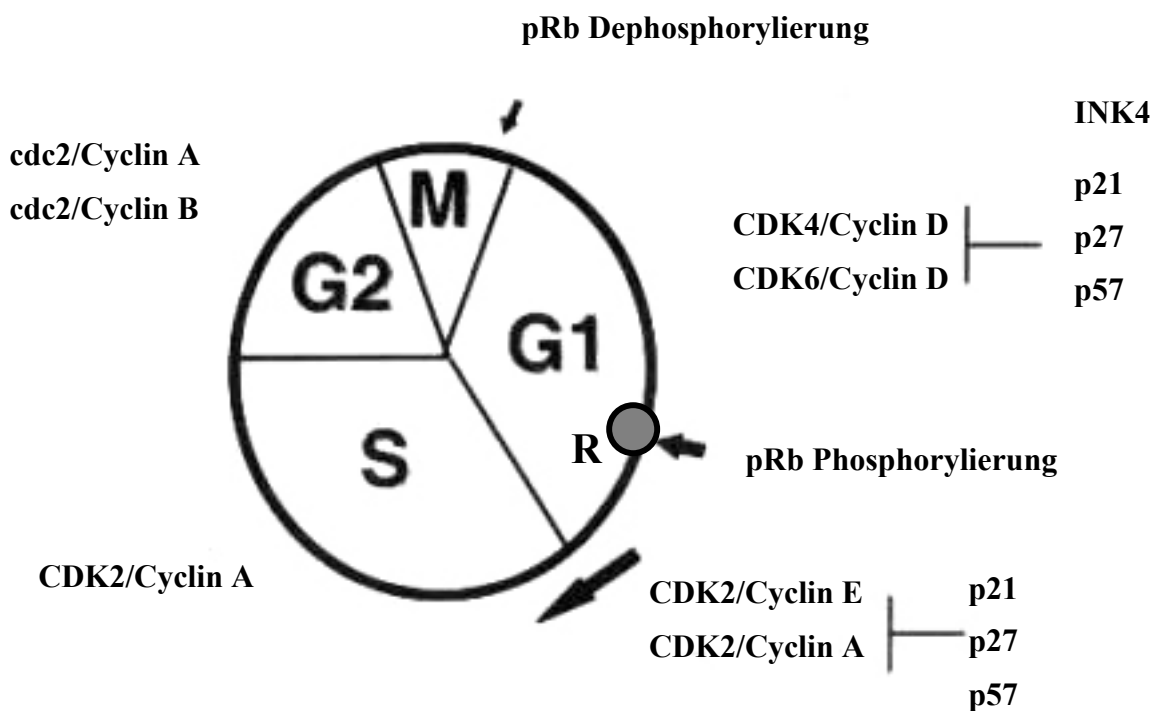


Abb. 1: Die vier aufeinanderfolgenden Stadien im Standard-Zellzyklus einer Eukaryontenzelle und ihre regulatorischen Elemente

In der G1-Phase liegt der Restriktionspunkt, der durch den Phosphorylierungsstatus des pRb-Proteins reguliert wird. In der S-Phase wird die DNA repliziert, Histone gebildet, die Zentrosomen gebildet. In der G2-Phase wird die Mitose vorbereitet. In der M-Phase trennen sich die Chromosomen und die Zelle teilt sich. Die den Zellzyklus regulierenden Proteine sind den einzelnen Phasen zugeordnet. CDK: cyclin-abhängige Kinasen INK4: *Inhibitor of kinase 4*-Familie, pRb: Retinoblastomprotein, R: Restriktionspunkt

1.3 Die Apoptose

Neben dem de-regulierten Zellzyklus ist in Krebszellen auch häufig das programmierte Selbstmordprogramm (Apoptose-Programm) außer Kontrolle geraten, das unter anderem einen Schutzmechanismus des Organismus darstellt sich vor transformierten Zellen zu schützen (nach: Genes VIII). Viele in Tumorzellen mutierte Gene beeinflussen die Apoptose. So führt z.B. die Aktivierung des Onkogens *c-myc* nicht nur zu einer verstärkten Proliferation, sondern inhibiert auch die Apoptose (Karn et al., 1989) (Nilsson & Cleveland, 2003).

Auch der Tumorsuppressor p53 ist häufig in Krebszellen mutiert. Dieses Protein ist einerseits in der Lage den Zellzyklus zu stoppen und andererseits fähig die Apoptose einzuleiten. Hierzu agiert es als Transkriptionsfaktor, der die Expression proapoptotischer Gene fördert (Shen & White, 2001).

1.3.1 Morphologische Merkmale

Der Prozess ist charakterisiert durch eine Serie von morphologischen Veränderungen:

Die Zellen beginnen zu schrumpfen und es bilden sich im Inneren membranumhüllte Vesikel. Die Membran scheint zu kochen und es kommt zur Bläschenbildung. Das Chromatin wird dicht gepackt und durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen geschnitten. Die Zellen lösen sich aus dem Zellverband ab und werden entweder von Zellen des Immunsystems eliminiert oder die Zelle zerfällt in membranumhüllte Vesikel, den sogenannten apoptotischen Körperchen. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es zu keiner Entzündungsreaktion (Kerr et al., 1972) (Strasser et al., 2000) (Ferri & Kroemer, 2001).

1.3.2 Der intrinsische Weg

Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird durch Mitglieder der BCL-2-Familie gesteuert. Es sind sowohl pro- als auch anti-apoptotische Proteine in dieser Familie vertreten. Die Proteine dieser Familie binden physikalisch aneinander und tragen durch ein komplexes Netzwerk von Homo- und Heterodimeren zur Regulation der Apoptose bei (Gross et al., 1999) (Reed, 1998). Nach einem apoptotischen Stimulus wie z.B. gamma- oder UV-Strahlung wird zum Auslösen des apoptotischen Prozesses ein Apoptose-inaktiver Heterodimer aus BCL-2 und BAX aufgelöst und ein Apoptose-induzierender BAX-Homodimer gebildet. Dieser transloziert in die äußere mitochondriale Membran und bewirkt die Freisetzung von

Cytochrom-*c* aus den Mitochondrien ins Zytoplasma. Freies Cytochrom-*c* bindet an Apaf-1, welches dadurch seine Konformation ändert und über seine NB-ARC- Domäne oligomerisiert. Dieser Komplex bindet und aktiviert Prokaspase-9. Kaspase-9 löst eine Kaspasen-Kaskade aus (Green & Reed, 1998) (Reed, 1997).

1.3.3 Der extrinsische Weg

Der extrinsische Signalweg wird zum Beispiel durch Fas, ein Mitglied der TNF-R-Familie, durch Ligandenbindung aktiviert. Aktiviertes Fas rekrutiert Fadd über dessen *death domain* an die eigene DD. Nachfolgend bindet Fadd über seine *death effector domain* (DED) Prokaspase-8, die ebenso eine *death effector domain* besitzt (Reed, 2000). Analog dazu bindet das Protein Raid über eine CARD-Domäne an Prokaspase-8, statt über eine DED-Domäne (Ahmad et al., 1997) (Duan & Dixit, 1997). Prokaspase-8 wird nach der Bindung proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert. Kaspase-8 löst ebenso wie Kaspase-9 eine Kaspasen-Kaskade aus (Salvesen & Dixit, 1997) (Wallach et al., 1999) (Yuan, 1997).

Die Eliminierung der Zellen durch Apoptose erfolgt unabhängig vom einleitenden Stimulus fast immer uniform durch die Aktivierung einer Kaspasen-Kaskade. In nicht-apoptotischen Zellen liegen Kaspasen als inaktive Zymogene im Zytoplasma vor. Zur Aktivierung werden sie nach ihrer Rekrutierung an einem spezifischen Aspartat in eine große und eine kleine Untereinheit gespalten. Dabei wird das N-terminale aktive Zentrum des Enzyms freigesetzt (Cryns & Yuan, 1998) (Thornberry & Lazebnik, 1998). Die aktive Kaspase ist eine Heterotetramer, das aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten besteht und sein Substrat wiederum an Aspartaten spaltet. Die Familie der Kaspasen ist als Untergruppe der Cystein-Aspartyl-spezifischen Proteasen definiert (Alnemri et al., 1996).

1.4 Kontaktinhibition, Anoikis und *anchorage independent growth*

Die durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen entstandenen Krebszellen werden im weiteren Verlauf der Krankheit häufig bösartiger. Sie entwickeln die Fähigkeit die durch Zell-Zell- oder Zell-ECM-Kontakte vermittelten wachstumshemmenden Stimuli zu überwinden und unter reduzierten Zell-Zell-Kontakten bzw. Zell-ECM-Kontakten zu proliferieren. Der Organismus besitzt in nicht transformierten Zellen zwei zelluläre Mechanismen, die das verhindern: die Kontaktinhibition und die Apoptose infolge von verminderten Zell-Zell- oder Zell-ECM-Kontakten (Anoikis). Beide Mechanismen sind in vielen Tumorzellen inaktiv (nach: Cancer Medicine 6th ed.).

1.4.1 Kontaktinhibition

Ein Charakteristikum von Krebszellen ist die außer Kraft gesetzte Zell-Zell-Kontaktvermittelte Proliferationsblockierung (Kontaktinhibition).

Nicht transformierte, adhärenzte Zellen wachsen auf Zellkulturschalen in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Zell-Zellkontakten bzw. Zell-ECM-Kontakten. Ist eine konfluente Zelldichte erreicht, so scheren sie aus dem Zellzyklus aus. Man glaubt, dass auch im adulten Gewebe dieser Mechanismus konstitutiv aktiv ist und der Verlust der Sensitivität auf diesem inhibierenden Stimulus mit abnormalem Wachstum (Tumorbildung) assoziiert ist (Übersichtsartikel (Fagotto & Gumbiner, 1996)). Mehrere Gene wurden identifiziert, die diesen Mechanismus steuern: so die Drosophilagene *dlg* und *fat*, die in mutierter Form in *in vitro*-Versuchen nicht mehr in der Lage sind die Kontaktinhibition in Drosophilazellen aufrechtzuerhalten (Woods & Bryant, 1991) (Mahoney et al., 1991). Weiterhin wird dem Transmembranprotein contactinhibin und seinem membranständigen Rezeptor in 3T3-Fibroblasten eine kontaktinhibierende Funktion bei konfluenten Zelldichten nachgesagt. (Gradl et al., 1995). Und auch Merlin, das Genprodukt des Tumorsuppressors *NF2*, beeinflusst die Kontaktinhibition. Durch Versuche in Schwann-Zellen konnte sogar ein Mechanismus postuliert werden: in logarithmisch wachsenden Zellen ist Merlin phosphoryliert und bindet über einen Komplex mit Ezrin und Moesin an den zytoplasmatischen Teil von CD44, die wachstumsfördernden Signale werden nicht inhibiert. In konfluenten Zellen hingegen ist der Tumorsuppressor Merlin dephosphoryliert und bindet ohne die Proteine Ezrin und Myosin an den zytoplasmatischen Teil von CD44. Dadurch kommt es zur Inhibition der wachstumsfördernden Stimuli (Morrison et al., 2001). Krebszellen folgen häufig nicht mehr dieser Wachstumskontrolle. Sie proliferieren weiter und bilden in Zellkulturschalen dreidimensionale Zellhaufen, die sogenannten Foci. In ihnen sind die Zell-Zell-Kontakte bzw. Zell-ECM-Kontakte stark verringert (nach Molekularbiologie der Zelle 3.Auflage).

1.4.2 Anoikis und *anchorage independent growth*

Hier würde in nicht transformierten Zellen der zweite Schutzmechanismus eingreifen.

Der Verlust oder die Reduktion dieser Kontakte führt in den meisten adulten Zellen zur Apoptose, ein Vorgang, der als Anoikis bezeichnet wird (nach Übersichtsartikel: (Valentijn et al., 2004)). So reagieren z.B. epitheliale und endotheliale Zellen auf verminderte Zell-Zell- oder Zell-ECM-Kontakte mit Apoptose. Transformation von Zellen durch verschiedene

Onkogene macht sie dem gegenüber jedoch resistent und sie proliferieren ohne Zell-Zell- bzw. Zell-ECM-Kontakte weiter (*anchorage independent growth*) (Frisch & Francis, 1994) (Meredith et al., 1993). Der Verlust der Anoikis ist für die Bildung von Sekundärtumoren unerlässlich, deshalb ist es nicht überraschend, dass dieser Vorgang auch mit der Bösartigkeit von verschiedenen Tumoren korreliert wird (Yawata et al., 1998) (Shanmugathasan & Jothy, 2000).

1.5 Metastasierung

Die Krebszelle hat jetzt alle Eigenschaften entwickelt, um losgelöst vom Primärtumor zu überleben. Um Metastasen zu bilden, muss sie noch weitere Fähigkeiten entwickeln. Die notwendigen Schritte, die zu Metastasen führen, sollen am Beispiel Karzinom- ein maligner Tumor von Abschlussgeweben- näher erklärt werden. Solche Karzinome repräsentieren ca. 90% aller Tumorerkrankungen (nach Molekularbiologie der Zelle 3.Auflage).

1.5.1 Kaskade der Metastasierung

Metastasierenden Krebszellen stellen sich mehrere Barrieren in den Weg, die es zu überwinden gilt. Hierzu muss die metastasierende Zelle viele neue Fähigkeiten entwickeln. Zunächst muss sich eine entartete Zelle aus dem Zellverband des Primärtumors lösen. Die erste Barriere ist die Basallamina an der Basis des Epithels. Ist diese mit Hilfe von Proteasen abgebaut, muss die extrazelluläre Matrix (ECM) durchquert werden. Hierzu muss sie in der Lage sein sich an die Komponenten der ECM anzulagern. Erreicht die Krebszelle bei ihrer Wanderung durch das Gewebe ein Blutgefäß, stößt sie erneut auf eine Basallamina, die erneut abgebaut wird. So erreicht sie das Blutgefäßsystem oder alternativ das lymphatische System, zwei zirkulierende Systeme, die es den Zellen ermöglicht sich im Körper zu verteilen. Im Blutgefäßsystem muss die Krebszelle dem erheblichen Strömungsdruck und den darauffolgenden Scherkräften widerstehen können. Ist sie dazu in der Lage, muss sie sich mit speziellen Oberflächenmolekülen an die Endothelzellen der Blutgefäße anheften und wieder auswandern. Alternativ kann die Zelle auch eine Kapillare aufgrund ihrer Größe verstopfen und hier proliferieren, somit ohne Auswanderung aus dem Blutgefäßsystem Metastasen bilden. Solches passiert häufig in der Lunge, da sie ein Organ ist, das extrem dünne Kapillaren besitzt. Viele Eigenschaften müssen von den über das Blutgefäßsystem metastasierenden Zellen gleichzeitig entwickelt werden. Eventuell ist deshalb auch die

Effizienz dieses Vorgangs sehr gering. Man schätzt, dass nur etwa jede zehntausendste metastasierende Zelle im Blutkreislauf überlebt, auswandert und Metastasen bildet. Im lymphatischen System sind der Druck und die Scherkräfte bedeutend geringer. Zellen in diesem System wandern häufig in die Lymphknoten, ein Vorgang, der an das Homing der Lymphozyten erinnert, wo sie sogenannte Lymphknotenmetastasen bilden können (nach: Cancer Medicine 6th ed.). Eine Theorie besagt, dass sie hier neue Eigenschaften entwickeln, die sie dazu befähigen in andere Bereiche des Körpers vorzudringen. Der Vorteil für Zellen, die dieser Theorie folgen, wäre, dass die metastasierenden Eigenschaften in zwei Schritten entwickelt werden können (Sleeman, 2000).

1.5.2 Proteasen

Basallamina wie ECM müssen von metastatischen Zellen abgebaut werden. Dies geschieht auch durch migrierende Zellen des Immunsystems, die an den Ort der Entzündung wandern, oder während der Angiogenese der Blut- oder Lymphgefäße. Die Enzyme, die für den Abbau verantwortlich sind, sind sezernierte Proteasen. Man teilt die Proteasen gemäß ihres Aktiven Zentrums in vier Gruppen ein:

- 1) Apartatproteinasen
- 2) Cysteinproteinasen
- 3) Serinproteinasen
- 4) Matrix-Metalloproteinasen

wobei den beiden letztgenannten Gruppen die größte Bedeutung während der Tumordinvasion zukommt und nur sie hier etwas näher beschrieben werden (Curran & Murray, 2000).

1.5.2.1 Serinproteinasen

Plasminogen-Aktivatoren (PAs) sind Serin-spezifische Proteasen, die inaktives Plasminogen in aktives Plasmin umwandeln. Plasmin ist ein trypsinähnliches Enzym, das eine Vielzahl von Proteinen wie z.B. Fibrin, Fibronectin, TypIV-Kollagen, Vitronectin und Laminin degradieren kann. Plasmin kommt als Gewebetyp Plasminogen-Aktivator (tPA) und als Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) vor. tPA ist für die intravaskuläre Fibrinolyse zuständig, uPA ist vor allem involviert in der zellvermittelten Proteolyse während der Makrophageninvasion, Wundheilung, Embryogenese und Metastasierung (nach: Cancer

Medicine 6th ed.). Durch die Fähigkeit von uPA Kollagenasen zu aktivieren, bzw. die Inhibitoren der Metalloproteinasen (TIMBs) zu deaktivieren unterstützt es auch die Funktion der Metalloproteinasen (Gottesman, 1990) (Conese & Blasi, 1995). Zusätzlich werden durch uPA auch Wachstumsfaktoren wie HGS/SF (Naldini et al., 1992) und TGF- β (Odekon et al., 1994) aktiviert, was vermuten lässt, dass Plasminogen nicht nur die Degradation der ECM beeinflusst, sondern auch die Proliferation von Tumorzellen. Ein hohes Expressionsniveau von uPA wurde in mehreren humanen Tumoren und Tumorzelllinien entdeckt (Kuhn et al., 1994) (Billstrom et al., 1995) (Heiss et al., 1995) und wird mit einer verringerten Überlebensrate von Krebspatienten korreliert (Schmitt et al., 1995).

1.5.2.2 Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) umfassen eine Familie von Metalloenzymen, die als inaktive Vorstufen sezerniert werden. Die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen wird außer über die Genexpression auf zweierlei Weise kontrolliert. Zum einen werden sie als inaktive Vorstufen (Zymogene) sezerniert. Durch proteolytische Abspaltung der N-terminalen Prodomäne durch Plasmin oder Membran-gebundene MMPs (MT-MMTs) entstehen die aktiven Enzyme. Zum anderen hängt ihre Aktivität von zweiwertigen Metallionen ab, entweder Zn^{2+} oder Ca^{2+} (Coussens & Werb, 1996) (Kelly et al., 1998). Die Familie der TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) ist in der Lage diese Ionen zu binden und so die Aktivität der Enzyme zu steuern (Stetler-Stevenson et al., 1989) (Goldberg et al., 1989) (Apte et al., 1995) (Leco et al., 1997).

Fünf Unterklassen von MMPs werden gemäß ihrer Substratspezifität definiert: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Membran-gebundene MMPs und Elastasen (Chambers & Matrisian, 1997). Eine erhöhte Aktivität von MMPs, sei es durch erhöhte Expression oder Aktivierung, ist verbunden mit einem erhöhten invasiven und metastatischen Potential und wurde bei vielen Krebsarten festgestellt (Liotta et al., 1976) (Liotta et al., 1980) (Coussens & Werb, 1996). Interessant ist hierbei, dass die MMPs jedoch häufig nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von den sie umgebenden stromalen Zellen produziert werden (Basset et al., 1997). Es ist beschrieben worden, dass die Tumorzellen Faktoren sekretieren, welche die Expression von MMP-1, -2, - und 3 in Fibroblasten fördern (Guo et al., 1994)

1.5.3 Zelladhäsion

Die Zelladhäsion, d.h. der Mechanismus, mit dessen Hilfe sich Zellen an angrenzende Zellen und an die extrazelluläre Matrix zwischen den Zellen binden, spielt bei der Metastasierung eine große Rolle. In welcher Weise ist nicht eindeutig, denn zum einen muss, um sich vom Primärtumor zu lösen, die Zell-Zelladhäsion bei der Metastasierung verringert werden, zum anderen müssen neue Zell-Zellkontakte geschlossen werden, z.B. beim Auswandern aus dem Blutgefäßsystem (nach: Cancer Medicine 6th ed.).

In den letzten Jahren sind viele verschiedene Zelladhäsionsmoleküle beschrieben worden:

1.5.3.1 Integrine

Die Adhäsion der Zellen an die ECM wird über Zelloberflächenrezeptoren, die Integrine, vermittelt. Dies ist eine Familie von integralen Membran-Proteinen, die aus $\alpha\beta$ -Heterodimeren aufgebaut sind. Sie besitzen eine Arginin-Glycin-Aspartat-Sequenz (RGD-Sequenz), mit der sie an Komponenten der ECM binden (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). So wird durch die Integrine die extrazelluläre ECM mit dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett verbunden. Veränderungen in der Integrin-Expression wurden in transformierten humanen Colonkarzinomen und in Brustkrebs-Gewebe beobachtet (Ruddon, 1995).

1.5.3.2 Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)

Zell-Zell-Interaktionen sind einerseits wichtig für die normale Regulation der Proliferation und Differenzierung, andererseits müssen diese Kontakte bei metastatischen Prozessen aufgelöst werden (Ablösen von Zellen des Primärtumors) bzw. neu gebildet werden (Anheftung an Gefäßzellen). Diese Interaktionen werden durch eine Familie von Molekülen vermittelt, die man als *cell adhesion molecules* (CAMs) bezeichnet. Sie agieren sowohl als Rezeptor (auf der einen Zelle) als auch als Ligand (auf der benachbarten Zelle). Die Expression der CAMs wird während der Embryonalentwicklung festgelegt und liefert der Zelle Informationen über ihre Migrationswege während der Entwicklung und ihre spätere Position im Organismus (nach: Cancer Medicine 6th ed.).

1.5.3.3 Cadherine

Eine Untergruppe der Zelladhäsionsmoleküle bildet die Familie der Cadherine. Es sind Ca^{2+} -abhängige, transmembrane Glykoproteine, die eine essentielle Funktion bei der Ausbildung und Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte ausüben. Regulation der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion ist während der Embryogenese und zur Aufrechterhaltung der normalen Gewebsdifferenzierung notwendig (Stewart & Nelson, 1997) (Uemura, 1998). Die extrazelluläre Domäne der Cadherine ist verantwortlich für die homeotypische Zell-Zell-Bindung. Das bedeutet, dass ein bestimmtes Cadherin nur auf einem bestimmten Zelltyp vorhanden ist und nur mit seinesgleichen interagieren kann. Der zytoplasmatische Teil interagiert mit den Proteinen der Catenin-Familie, die wiederum mit dem Aktin-Skelett der Zelle verbunden sind. Zellen, denen z.B. α -Catenin fehlt, verlieren die Zell-Zell-Adhäsion und Tumorzellen mit entweder mutiertem oder reduziertem α -Catenin-Niveau zeigen ein erhöhtes invasives Potential (Vermeulen et al., 1995).

Nicht nur α -Catenin wird mit einem erhöhten invasiven Potential von Tumoren assoziiert, ein weiteres bekanntes Beispiel hierfür ist das E-Catherin. Dieses Adhäsionsmolekül ist der vorherrschende Catherin-Typ in Epithelgeweben. Veränderungen in der Expression und Funktion kann man in vielen menschlichen Tumoren beobachten (Guilford, 1999). Zusätzlich wird ein reduziertes E-Catherin-Niveau in Tumoren mit einer erhöhten Invasivität, einer erhöhten Metastasierungsrate und mit schlechten Überlebensprognosen für Patienten korreliert. (Übersichtsartikel:(Cavallaro et al., 2002)) In Tumormodell-Systemen wird das hohe invasive Potential von E-Cadherin-überexprimierenden Zellen durch Behandlung mit einem spezifischen anti-E-Catherin-Antikörper oder durch E-Catherin-antisense-RNA deutlich reduziert (Guilford, 1999).

1.5.3.4 Leukozyten-Adhäsionsfaktoren

Die Interaktion von Leukozyten mit Gefäßendothelzellen ist ein normaler Vorgang, der die Zellen des Immunsystems befähigt an den Ort der Entzündung zu gelangen, bzw. den Körper nach Antigenen zu durchforsten. Auf molekularer Ebene interagieren dabei verschiedene Leukozyten-Adhäsionsfaktoren mit ihren auf den Gefäßendothelzellen sitzenden Liganden. Diese Migrationsvorgänge werden häufig mit metastatischen Migrationen verglichen und tatsächlich benutzen etliche Tumorzellen die selben Adhäsionsmoleküle, um sich im Körper auszubreiten .

Die Leukozyten-Adhäsionsfaktoren gehören zur Überfamilie der Immunglobuline und können in drei Untergruppen eingeteilt werden:

- 1) Selektine
- 2) Leukozytenintegrine
- 3) Interzelluläre und vaskuläre Adhäsionsmoleküle (ICAMs und VCAMs)
(Springer & Lasky, 1991)

1.5.3.5 CD44 (*cluster of differentiation 44*)

CD44 ist ein transmembranes Glycoprotein, das unter anderem in der zellulären Adhäsion involviert ist. Es kann mit einer großen Vielfalt von Molekülen interagieren. Hierzu zählen nicht nur ECM-Komponenten wie Hyaluronsäure, Fibronectin, Laminin und Osteopontin, sondern auch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und Matrix-Metalloproteinasen. CD44 beeinflusst etliche zelluläre Prozesse wie Embryogenese, Zellmigration, T-Zell-Aktivierung, Lymphozyten homing, Hämatopoese, Invasion und Metastasierung (Übersichtsartikel: (Ponta et al., 1998) (Herrlich et al., 1998) (Ponta et al., 2003)). Sowohl verminderte Genexpression (Sato et al., 1999) als auch erhöhte Genexpression (Koyama et al., 2000) (Gunthert et al., 1991) wurden als metastasierungsfördernd beschrieben.

1.6 Zellbewegungen

Zellbewegungen sind essentielle Prozesse im Organismus. So ist z.B. die Embryogenese sehr eng mit zellulären Wanderungen verbunden. Im adulten Organismus sind vor allem die Zellen des Immunsystems nicht ortsgebunden. Auch für metastasierende Zellen ist dies eine essentielle Eigenschaft, die sie sich aneignen müssen.

Die Zellbewegung kann in drei Phasen unterteilt werden:

- 1) die Bildung von Lamellipodien und Filopodien
- 2) die Bildung von Fokalkontakten
- 3) die Zugbewegung, mit der sich der Zellkörper vorwärts bewegt und bei der Fokalkontakte gelöst werden müssen (Übersichtsartikel: (Lee et al., 1993))

Hierzu muss das Zytoskelett umstrukturiert werden. Auf molekularer Ebene sind viele verschiedene Moleküle beteiligt, die sich in folgende Gruppen einteilen lassen:

- 1) Motogene Faktoren (Wachstumsfaktoren, Cytokine und Komponenten der ECM)
- 2) Rezeptortyrosinkinasen (RTKs)
- 3) Zelladhäsionsmoleküle (Integrine, CD44 und Cadherine)
- 4) Intrazelluläre Signalmoleküle (Rho-GTPasen, FAK, Phospholipide)
- 5) Proteine des Cytoskeletts (Actin, Myosin, Actin-bindende Moleküle)

Als motogene Faktoren wurden ganz unterschiedliche Klassen von Proteinen identifiziert, so die Wachstumsfaktoren HGF, EGF und FGF, die entweder von den Tumorzellen selbst gebildet werden können oder durch Abbau der ECM aus dieser freigesetzt werden. Nach Bindung an ihren Rezeptor werden Signalwege aktiviert, welche die Zellmotilität begünstigen (Übersichtsartikel: (Feldner & Brandt, 2002) (Matsumoto et al., 1995)).

Auch spezielle Spleißvarianten des Fibronektins wirken fördernd (Manabe et al., 1997), genau wie das Cytokin AMF (*autokrine motility factor*), das von migrierenden Tumorzellen selbst gebildet wird (Guirguis et al., 1987) (Nabi et al., 1992).

Die chemotaktische Migration kann man vor allem bei den Zellen des Immunsystems beobachten, die durch diesen Mechanismus z.B. an den Ort der Entzündung gelockt werden. Sie wird von etlichen Chemokinen (Rossi & Zlotnik, 2000, aber auch von, platelet activating factor (PAF), Leukotrienen, Prostaglandinen Sphingosine 1-phosphat Lysophospholipide, Galektine {Bautz, 2001 #184} (Ebrahimzadeh et al., 2000) (Montrucchio et al., 2000) (Paik et al., 2001) (Rabinovich et al., 2002) und Osteopontin gefördert, das unter normalen Umständen von Osteoblasten und Makrophagen sezerniert wird. Die Bedeutung des Osteopontins für Metastasierungsvorgänge zeigt zum einen der gesteigerte maligne Phänotyp von Tumorzellen nach Überexpression von Osteopontin (Denhardt & Guo, 1993), zum anderen die Beobachtung, dass viele invasive Tumoren das Protein verstärkt sezernieren (Senger et al., 1983).

Nach der Bindung der motogenen Faktoren werden Signalwege aktiviert, welche einerseits zur Auflösung der Fokalkontakte, andererseits zur Umstrukturierung des Aktinskeletts führen (Matsumoto et al., 1995). Das Schlüsselprotein in der Organisation der Fokalkontakte ist FAK (*focal adhesion kinase*). Proteolytische Abspaltung des N-terminalen Teils führt zur Auflösung der gesamten Struktur (Richardson & Parsons, 1996).

Die Organisation des Aktinskeletts wird durch Ras-ähnliche GTPasen der Rho-Familie gesteuert. Die Funktionen der Familienmitglieder RhoA, Rac1 und Cdc42 sind am besten

charakterisiert. Überexpression von RhoA in Fibroblasten führt zur Bündelung von Aktin-Filamenten zu Stress-Fasern und zur Stabilisierung der Fokalkontakte. Expression von dominant negativen Mutanten verhindert die Migration der Fibroblasten. Rac1 steuert die Bildung von Lamellipoden. Überexpression verstärkt die Bildung dieser, Expression von dominant negativen Mutanten lässt keine Lamellopodenbildung mehr zu und verhindert so die Zellmigration. Cdc42 scheint keinen Einfluss auf die Motilität zu besitzen, obwohl die Zahl der Filopodien nach Überexpression in Fibroblasten zunimmt. Es beeinflusst aber die Chemotaxis und das Wundheilungsverhalten (Machesky & Hall, 1997) (Nobes & Hall, 1995) (Ridley & Hall, 1992).

Die Zellbewegung ist ein sehr komplexer Prozess. Durch das Zusammenwirken vieler der genannten Faktoren wird sie gesteuert. Viele invasive Tumoren zeigen eine veränderte Expression der für diese Proteine kodierenden Gene, bzw. Mutationen in den Genen (Kassis et al., 2001).

1.7 Pip92

Durch vorangegangene Arbeiten in der Arbeitsgruppe Sleeman konnte das Wissen über Pip92 vergrößert werden. Wir wissen z.B. mittlerweile, dass es im Zusammenhang mit Tumorprogression, Metastasierung und Zellbewegung steht. Die vorliegende Arbeit wird zeigen, dass das Protein in mehrere zelluläre Prozesse eingreift. Deshalb soll hier eine kurze Zusammenfassung des momentanen Wissenstandes von Pip92 gegeben werden:

pip92-mRNA (*proline-rich induced protein 92*) wurde zum erstenmal 1985 in serumstimulierten murinen Fibroblasten gefunden, deren Proteinbiosynthese durch Cycloheximid geblockt war (Lau & Nathans, 1985). Der ursprüngliche Name hieß 3CH92, weitere Synonyme sind *chx1* (Coleclough et al., 1990) oder *ier2* (*immediate early response 2*). Jedoch hat sich *pip92* als Bezeichnung weitgehend durchgesetzt. Es ist wie das zu 95% identische und zu 98% homologe Rattenprotein 221 AS lang, hydrophil und schwach basisch. Die kalkulierte Größe liegt bei 24,5 kDa, das Protein erscheint jedoch nach SDS-Gelelektrophorese bei ungefähr 30 kDa (Coleclough et al., 1990). Die partielle Ähnlichkeit zu JunD und JunB (Coleclough et al., 1990) sowie seine dreidimensionale Struktur, die im N-terminalen Bereich aus 2 α -Helices, verbunden durch eine Linkersequenz, besteht, lässt vermuten, dass es an DNA bindet (Novac, 2001). Außergewöhnlich ist, dass dem Gen

jegliches Intron fehlt, was bei Mamaliern bisher nur bei den Histon-Genen und α - bzw. β -Interferongenen beobachtet wurde (Coleclough et al., 1990).

Das humane homologe Gen zu *pip92* heißt *ETR101* (*early TPA responsive 101*). Es wurde aus der humanen Leukämie-Zelllinie HL-60 nach TPA-Stimulation kloniert. ETR101 hat gegenüber Pip92 zwei zusätzliche Aminosäuren. Beide Proteine sind zu 77% identisch und zu 92% homolog. ETR101-mRNA enthält in der 3' untranslatierten Region die Sequenz GTTTG, von der angenommen wird, dass sie verantwortlich ist für die rapide Degradation. Analyse der Aminosäure-Sequenz der drei homologen Proteine zeigen mehrere mögliche posttranslationelle Modifikationsstellen: Phosphorylierungsstellen durch Protein Kinase A, Calmodulin-Kinase und Protein-Kinase C, sowie eine N-Glykosylierungsstelle (Shimizu et al., 1991) (Novac, 2001). Dennoch konnten (Charles et al., 1990) keine Phosphorylierung des Proteins feststellen. Aminosäuresequenzanalysen von Pip92 enthüllen zwei mögliche nukleäre Import-Signale (NLS) sowie ein nukleäres Exportsignal (NES), was vermuten lässt, das es sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus zu finden ist. Obwohl bisher als ausschließlich zytoplasmatisches Protein beschrieben (Charles et al., 1990), konnte N. Novac jedoch im Zuge ihrer Dissertation Hinweise sammeln, dass das ektopisch überexprimierte *pip92* wie auch das endogene *pip92* in NIH 3T3-Zellen auch im Kern lokalisiert sein kann (Novac, 2001). Alle identifizierten Sequenzmotive sind bei Maus, Ratte und Mensch konserviert, genau wie der N-terminale Bereich, der die 2 α -Helices beinhaltet (siehe Abbildung 2).

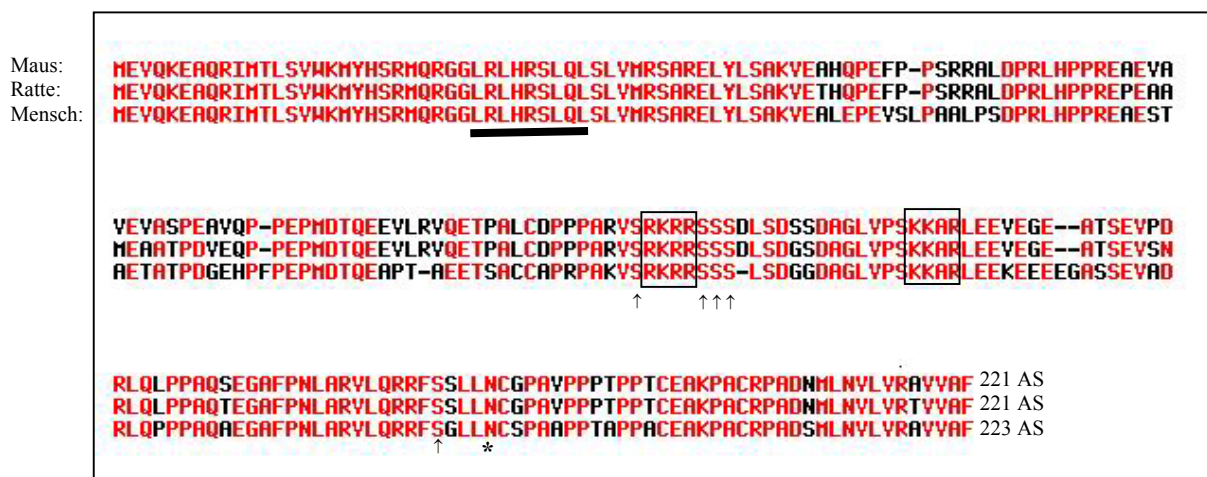


Abb. 2: Sequenzvergleich von Pip92 (Maus), Pip92 (Ratte) mit ETR101 (Mensch)

Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt. Identische Aminosäuren (AS) sind in Rot und abweichende AS in Schwarz markiert. Die beiden Kernlokalisations-signale sind eingerahmt. Pfeile signalisieren die potentiellen Phosphorylierungsstellen der Protinkinasen A (PKA) und C (PKC). Der Stern kennzeichnet die mögliche N-Glykosylierungsstelle, die unterstrichene Sequenz das nukleäre Export-Signal (NES) (verändert nach, Novac; 2001).

Pip92 und ETR101 besitzen mehrere PEST-Sequenzen (Aminosäure-Abschnitte, reich an Prolin, Glutamat, Serin und Threonin), welche vermutlich für die kurze Halbwertszeit der Proteine verantwortlich sind (Coleclough et al., 1990). *pip92* zeigt das typische Verhalten eines *immediate early gene* (IEG). Seine mRNA akkumuliert schon nach 2 Minuten in ruhenden Fibroblasten während des G0/G1-Übergangs nach Stimulation durch Serum oder TPA und das, obwohl die Neusynthese von Proteinen durch Cycloheximid geblockt wurde (Charles et al., 1990; Lau & Nathans, 1985). Cycloheximidbehandlung wirkt sogar synergistisch auf die Genexpression (Latinkic et al., 1996). Die Induktion ist jedoch nur von kurzer Dauer. Nach 10 Minuten wird die höchste Menge an mRNA erreicht, nach 1 bis 2 Stunden ist nur noch wenig an *pip92* mRNA vorhanden (Lau & Nathans, 1987). Die Halbwertszeit der mRNA ist mit 10 bis 20 Minuten sehr kurz (Lau & Nathans, 1987), was wohl auf die für schnelle Degradation verantwortliche AU-reiche Region im 3'-untranslatierten Bereich zurückzuführen ist (Arao et al., 2004; Chen & Shyu, 1995). Das Protein akkumuliert innerhalb von 1 Stunde nach Serumstimulation und ist nach einer weiteren Stunde nur noch schwer nachzuweisen (Charles et al., 1990). Auch das ist für IEGs typisch (Lim et al., 1989).

1.7.1 Die Vorgänge am *pip92*-Promotor

Der murine *pip92*-Promotor ähnelt sehr stark dem humanen *ETR101*-Promotor. Sie enthalten jeweils 2 Ets-Bindungsstellen, 2 Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SRF (*serum response element*; SRE), deren innerer Kern aus CArG-ähnlichen Boxen besteht, eine *cAMP responsive element* (CRE), 2 NFκB-Bindemotive, eine Sp-1-Bindestelle sowie eine TATA-Box. (Chen et al., 2003; Latinkic & Lau, 1994). Die Induktion durch Serum oder TPA wird durch eine Ets-Bindestelle und eine CArG-ähnliche Bindestelle vermittelt. Hier bindet ein tenärer Komplex, der aus SRF, Elk1 und der DNA besteht (Latinkic & Lau, 1994).

Dies erinnert an die Vorgänge am *c-fos*-Promotor nach Serum- und TPA-Induktion, der ebenfalls ein IEG steuert. Auch hier bildet sich ein tenärer Komplex aus DNA, SRF und ein 62 kDa schweres Protein (p62^{TCF}) (Shaw et al., 1989). Das 62 kDa große Protein kann entweder Elk-1 (Hipskind et al., 1991) oder SAP-1 (Dalton & Treisman, 1992) sein, die beide zu den Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie gehören. Der tenäre Komplex kann auch in ruhenden Fibroblasten auf dem *c-fos*-Promotor nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass posttranslationelle Modifikationen an den Transkriptionsfaktoren SRF und der Ets-Familie die Transkription des Genes steuern (Marais et al., 1993; Zinck et al., 1993). Es muss

zuerst SRF an die DNA binden, damit p62^{TCF} an diesen binären Komplex rekrutiert werden kann (Shaw et al., 1989). Dies ist beim *pip92*-Promotor nicht so. Hier können Elk-1 und SRF gleichzeitig an die DNA binden und so den Komplex formen (Latinkic & Lau, 1994).

Das vom HTLV-I (*human T-cell leukaemia virus type I*) kodierte Protein Tax induziert die Genexpression etlicher IEGs; *ETR101* eingeschlossen (Chen et al., 2003). Das Schlüsselement im *ETR101*-Promotor für die Induktion durch Tax ist die CRE-Bindestelle. Hier binden die Transkriptinsfaktoren der CREB/ATF-Familie, mit denen Tax vermutlich physisch interagiert (Zhao & Giam, 1992). Ein leichter Einfluss zeigt auch eine der beiden NFκB-Bindemotive (Chen et al., 2003). Diese Beobachtung könnte auch erklären, warum eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts in NIH 3T3-Fibroblasten zur Anreicherung der *pip92*-mRNA führt (Charles et al., 1990; Latinkic & Lau, 1994).

1.7.2 Expression von *pip92* während zellulären Prozessen und Pip92-induzierende Stimuli

1.7.2.1 Eintritt in den Zellzyklus

pip92-Expression konnte mittlerweile bei zahlreichen biologischen Prozessen in verschiedenen Zelllinien und Geweben nachgewiesen werden:

Der Übergang von G0 zu G1 nach Stimulation durch FGF, TPA, PDGF und Serum war der ursprünglichste biologische Prozess, bei dem *pip92*-mRNA nachgewiesen werden konnte (Charles et al., 1990). Dies gab Anlass zu der Vermutung, dass es allgemein bei der Proliferation genutzt wird. Tatsächlich konnten weitere Gewebe und Zelllinien identifiziert werden, bei denen das Gen aktiv ist.

In vivo konnte die Expression des Gen in vielen Geweben nachgewiesen werden, jedoch auffällig hoch in den stark proliferativen Organen Lunge, Hoden, Dünndarm und Uterus (Charles et al., 1990) (Arao et al., 2004). Auch die phäochromozytomale Ratten-Zelllinie PC12 zeigt *pip92*-Expression, wenn sie durch EGF zur Proliferation angeregt wird (Charles et al., 1990).

T- und B-Zellen müssen im Zuge der Immunabwehr unter anderem klonal expandieren. Dies kann bei B-Zellen *in vitro* simuliert werden durch Stimulation mit dem Phorbolster TPA, Quervernetzung der membranständigen Immunglobuline (IgM), PIP2-Abbau oder Erhöhung des intrazellulären Kalziumniveaus. Auf solche Weise stimulierte Zellen (Mittelstadt & DeFranco, 1993) exprimieren *pip92*; ebenso die humane Leukämie-T-Zelllinie Jurkat nach TPA-Behandlung. Interessant ist bei diesen transformierten Zellen, dass die *ETR101*-

Induktion nicht kurzfristig ist, sondern über ca. 24 Stunden anhält und durch Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Niveaus komplett geblockt werden kann (Scott et al., 1994).

Immortalisierte hippocampale H19-7-Zellen werden nach Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration durch Thapsigargin zur DNA-Synthese angeregt. *pip92* wird auch hierbei exprimiert. Dies erfolgt über 2 Signalwege: einerseits über die Proteinkinasen Raf und MEK, andererseits über die Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase Src. Die Anreicherung des Proteins ist wiederum transient, hat ihr Maximum nach 1 Stunde und ist nach 2 Stunden wieder auf dem Basallevel angelangt (Chung et al., 2001).

1.7.2.2 Differenzierungsvorgänge

Auch während Differenzierungsvorgängen wurde *pip92*-Expression beobachtet:

z.B. in der Ratten-Zelllinie PC12, die nach Stimulation mit NGF oder VIP (*vasoactive intestinal peptide*) in Neuron-ähnliche Zellen differenziert. Das Signal wird über den MAP-Kinase-Signalweg weitergeleitet und führt zu einer transienten Induktion von Pip92, die nach 1 Stunde ihr Maximum erreicht hat (Charles et al., 1990; Eschelbach et al., 1998).

Die immortalisierte hippocampale Zelllinie H19-7 exprimiert *pip92* ebenfalls während der Differenzierung in Neuronen oder Gliazellen. Dies geschieht durch Stimulation mit FGF, bzw. durch Expression von aktivierten humanen *raf-1*. Hier gibt es mindestens 2 unterschiedliche Signalwege, die zur *pip92*-Expression führen: zum einen ein MAP-Kinase-abhängiger Weg, zum anderen ein MAP-Kinase-unabhängiger Weg. Beide Wege führen zur Aktivierung von Elk-1 durch Phosphorylierung, das dadurch am *pip92*-Promotor seine Funktion erfüllen kann. Interessant ist hierbei die Kinetik der Genexpression. Während die Induktion über den MAP-Kinase-abhängigen Weg zu einer transienten Akkumulation von Pip92 führt, die nach 2 Stunden ihr Maximum erreicht hat und darauf schnell wieder abfällt, führt der MAP-Kinase-unabhängige Weg zu einer länger anhaltenden Akkumulation des Proteins (Chung et al., 1998).

Auch in der humanen Leukämie-Zelllinie HL-60 kann das humane *pip92*-Homolog ETR101 während der Differenzierung in makrophagenähnliche Zellen gefunden werden. Dies geschieht bei Behandlung mit TPA (Shimizu et al., 1991).

1.7.2.3 apoptotische Prozesse

Viele Veröffentlichungen zeigen, dass Pip92 bzw. ETR101 während apoptotischer Prozesse in verschiedensten Zelllinien und Geweben akkumuliert.

Fibroblasten, die mit Anisomycin behandelt wurden, werden nach 24 Stunden apoptotisch. Diese aus dem Bakterium *Streptomyces griseolus* isolierte Substanz blockiert die Translation durch Bindung an die 60S-Untereinheit der eukaryotischen Ribosome und aktiviert zudem die stress-aktivierten MAP-Kinasen (MAPK) (Meier et al., 1996; Zinck et al., 1995). In Fibroblasten werden hierbei die MAP-Kinasen p38 und JNK aktiviert, nicht jedoch ERK1/2. P38 und JNK sind in der Lage Elk-1 zu phosphorylieren, das am *pip92*-Promotor bindet und die Transkription einleitet (Chung et al., 2000a).

Im Zentralen Nervensystem wirken die Neurotransmitter Glutamat und Aspartat apoptosefördernd, sobald sie übermäßig die ionotropen Rezeptoren aktivieren. N-methyl-D-aspartate (NMDA) ist eine Substanz, die in Versuchen angewandt wird, um genau dies zu erreichen. Apoptoseinduktion durch NMDA-Behandlung im Hippocampus und in den immortalisierten, embryonalen Vorläuferzellen H19-7 führt zur Expression von *pip92*. Hierbei sind ebenfalls die MAP-Kinasen p38 und JNK, aber nicht ERK1/2 aktiv (Chung et al., 2000b).

Auch bei murinen Hirngewebe konnte nach einem künstlich herbeigeführten Schlaganfall eine lang andauernde Expression von *pip92* nachgewiesen werden, überraschenderweise in geschädigten als auch in nicht geschädigten Bereichen (Schneider et al., 2004). Weitere Beispiele, bei denen ETR101 während der Apoptose exprimiert wird, sind gastritische Adenokarzinoma-Zellen (AGS) nach *Helicobacter Pylori*-Infektion (Chiou et al., 2001) und primäre humane Fibroblasten nach Inkubation mit dem apoptoseauslösenden Arsentrioxid (Burnichon et al., 2003), das auch mit mehreren Krebsarten in Verbindung gebracht wird (Basu et al., 2001).

Die bisherigen Veröffentlichungen beschränkten sich auf die Beschreibung der Genexpression während verschiedener Stimuli, funktionelle Analysen, welche die Frage beantworten, ob Pip92 Proliferation, Differenzierung oder Apoptose steuert bzw. beeinflusst, gab es bis zum Jahr 2004 nicht. Hier konnte Schneider et al. zeigen, dass *pip92* einen proapoptischen und pronekrotischen Effekt in verschiedenen Zelllinien ausübt. Primäre Neuronen der Hirnrinde, humane Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa) und Cos1-Zellen, eine aus Affen isolierte Nierenzelllinie, zeigten erhöhte Apoptoseraten nach *pip92*-Überexpression (Schneider et al., 2004).

1.7.2.4 *pip92*-Expression und der MAP-Kinaseweg

Mehrere Veröffentlichungen beschreiben den MAP-Kinaseweg über p38 und JNK als Vermittler der *Pip92*-Induktion. Dass dieser Signalweg auch inhibierend auf die *pip92*-Expression wirken kann, zeigen die Hepatomazellen H4IIE. Insulinbehandlung führt bei ihnen zur Akkumulation der *pip92*-mRNA, zusätzliche Anisomycinbehandlung verstärk das Signal (Bortoff et al., 1997). Der Signalweg führt über MEK1, das ERK1/2 phosphoryliert und zur *pip92*-Expression führt. Aktives p38 wirkt inhibierend auf diesen Signalweg und reprimiert so die *pip92*-Expression (Keeton et al., 2002).

1.7.2.5 *Pip92* bei Tumorentwicklung und Metastasierung

In den letzten Jahren konnte das Protein mit weiteren biologischen Vorgängen in Verbindung gebracht werden: Tumorentwicklung, Metastasierung und Zellwanderung (von Stein et al., 1997) (Boden, 2002; Novac, 2001).

Die SSH-Technik (*suppression subtractive hybridisation*) ist eine Methode, die es erlaubt die Genexpression zweier Zelllinien miteinander zu vergleichen und nur im Überschuss vorhandene mRNA bzw. cDNA zu isolieren und zu amplifizieren (Diatchenko et al., 1996). Mit dieser Technik wurden die überexprimierten Gene aus der schwach metastasierende Zelllinie Bsp73-1AS und der genetisch verwandten, stark metastasierenden Zelllinie Bsp73-ASML isoliert. Beide Zelltypen sind Subzelllinien des Ratten-Pankreasadenokarzinomsystems Bsp73. Unter den 119 in ASML-Zellen hochregulierten Genen befand sich *pip92* (von Stein et al., 1997). Um solche Gene zu isolieren, die mit Metastasierung assoziiert sind, wurde eine zweite SSH-Bibliothek aus durch Concanavalin A aktivierten und ruhenden T-Zellen angelegt. Diese Zellen des Immunsystems sind in der Lage im Zuge einer Immunantwort aktiv an den Ort der Entzündung zu wandern und ihre Funktion dort auszuüben. Dieser Prozess wird häufig mit der Metastasierung verglichen (nach: Cancer Medicine 6th ed.). Unter den 9 Genen, die in den aktivierten T-Zellen im Vergleich zu den ruhenden hochreguliert waren, befand sich wiederum *pip92* (Novac, 2001).

Analyse weiterer Tumorsysteme erbracht die Gewissheit, dass *pip92*-Expression mit dem metastastischen Potential korreliert. Außergewöhnlich ist, dass das Gen hier konstitutiv exprimiert wird. Funktionelle Analysen an *pip92*-überexprimierenden 1AS-Zellen ergaben, das infolge der *pip92*-Expression auch die invasive Zellmigration erhöht wird. Auch wurden etliche Gene identifiziert, die infolge von *pip92*-Überexpression hochreguliert sind:

herausragend unter diesen sind Osteopontin, EF1alpha und Calpactin (Novac, 2001). Alle drei Gene werden mit Metastasierung in Verbindung gebracht (Liu et al., 2002; Pencil et al., 1993; Taniguchi et al., 1991; Wai & Kuo, 2004). Immunhistologische Färbungen zeigen zudem, dass *pip92* in mehreren invasiven Tumoren stark exprimiert wird (Novac, 2001), bzw. dass die Lymphknotenmetastasen deutlich mehr an *pip92* exprimieren als die Primärtumoren (Boden, 2002).

1.8 Nukleäre Transportmechanismen

Im Zuge dieser Arbeit wird Bezug auf die Translokation zwischen Kern und Zytoplasma genommen, deshalb ist es hier notwendig die bisher bekannten molekularen Mechanismen dieses Vorgangs kurz zusammenzufassen:

In Eukaryonten ist die RNA-Biogenese und die DNA-Replikation auf den Kern beschränkt und von der zytoplasmatischen Maschinerie der Proteinsynthese durch die Kerndoppelmembran getrennt. Als Konsequenz müssen zwischen den beiden subzellulären Kompartimenten spezifische Transportereignisse ausgeführt werden. Erstens müssen z.B. mRNAs und alle für das Zytoplasma bestimmte RNAs nach ihrer Synthese aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert werden, um, im Falle von mRNA, in Proteine translatiert zu werden. Zweitens müssen Histone, die an die DNA gebunden sind und andere Proteine, die im Kern benötigt werden, spezifisch – vom Ort ihrer Synthese im Zytoplasma - in den Kern transportiert werden.

1.8.1 Sequenzmotive

Proteine, die für einen Transport in oder aus dem Kern bestimmt sind, besitzen bestimmte Signalsequenzen, welche die Translokation vermitteln. Von den Kernexportsignalen (*nuclear-export-signal*, NES), die für den Export von Proteinen aus dem Kern verantwortlich sind und sich oft durch einen hohen Leucingehalt auszeichnen, lassen sich die Kernlokalisierungssignale (*nuclear-localisation-signal*, NLS) unterscheiden. Beides sind jedoch keine einheitlichen Sequenzmotive, sondern variieren erheblich.

1.8.2 Vorgänge auf molekularer Ebene

Der Transport durch die Kernhüllendoppelmembran erfolgt durch Porenkomplexe (NPC: *nuclear pore complexes*), die einerseits die passive, unspezifische Diffusion von Ionen und Proteinen mit einem Gewicht von bis zu 50 kDa erlauben, andererseits eine Möglichkeit für einen spezifischen Transport bieten. Dennoch werden auch viele der leichteren Proteine über spezifische Transportmechanismen in den Kern hineingeschleußt, bzw. aus ihm heraus. Die Spezifität des Transports ist, bis auf wenige Ausnahmen, an ein aus Proteinen bestehendes, lösliches Transportsystem gebunden.

Export wie Import werden hauptsächlich von Mitgliedern der Importin β -Superfamilie nucleärer Transportrezeptoren vermittelt. Diese Rezeptoren ermöglichen die Translokation durch den Porenkanal mittels direkter Bindung an Komponenten des NPC. Je nach vermittelter Transportrichtung werden sie als Importine bzw. Exportine bezeichnet (Übersichtsartikel:(Gorlich, 1997; Nakielny & Dreyfuss, 1999) (Gorlich & Kutay, 1999)).

1.8.3 Spezifischer nukleärer Import

In höheren Eukaryonten wurden bisher 23 verschiedene Importine (Gorlich & Kutay, 1999 {Macara, 2001 #168) gefunden. Die am besten untersuchten sind Transportin 1, Importin β und Importin α , an denen auch die 2 existierenden importin-abhängigen Transportmodelle entwickelt wurden.

Modell 1:

Eine Schlüsselfunktion bei der Regulation nimmt Ran (*ras-related nuclear protein*)/TC4 ein. Es liegt entweder an GDP gebunden im Zytoplasma oder an GTP gebunden im Kern vor (Moore & Blobel, 1993) (Melchior et al., 1993).

Transportin 1 oder Importin β , die ihre Substrate im Zytoplasma erkannt haben, transportieren sie durch die Kernporen in den Kern. Im Nucleoplasma führt das Binden von Ran-GTP an die Importin β -ähnlichen Rezeptoren zur Dissoziation der Importin/Substrat-Komplexe. Der Importin- Ran-GTP-Komplex ist seinerseits in der Lage die Kernpore in Richtung Zytoplasma zu durchqueren, wo das Ran-GTP in Ran-GDP hydrolysiert wird und das Importin wieder freisetzt. Der Kreislauf ist geschlossen. (Macara, 2001)

Modell 2:

Importin β bindet im Zytoplasma über das Adaptorprotein Importin α das Substrat. Der so entstandene ternäre Komplex transloziert in den Kern. Im Kern bindet wiederum Ran-GTP an Importin β . Der Komplex zerfällt in Importin β -RanGTP, Importin α und Substrat. Importin β -Ran-GTP folgt dem im Modell 1 beschriebenen Weg, Importin α braucht einen eigenen Träger, ein Exportin (Macara, 2001).

1.8.4 Spezifischer nukleärer Export

Wieder ist das Protein Ran der entscheidende Faktor. Die Exportine bilden im Kern mit Ran-GTP und dem zu exportierenden Protein einen ternären Komplex, der durch die Kernporen ins Zytoplasma transloziert wird und dort nach Hydrolyse des Ran-GTP zu Ran-GDP zerfällt. Das freigesetzte Exportin wird wieder in den Kern transportiert (Macara, 2001).

In Säugern wurden bisher vier verschiedene Exportine identifiziert, darunter CRM1 (Exportin-1), das verschiedene Substrate, die im Allgemeinen Leucin-reiche nucleäre Export-Signale (NES) besitzen, exportiert und durch Leptomycin B in seiner Funktion blockiert werden kann (Fornerod et al., 1997). Ein zweites ist das für Importin α spezifische CAS (*Cellular-Apoptosis-Susceptibility-protein*) (Kutay et al., 1997).

1.9 Zielsetzung

Vorhandene Ergebnisse der Arbeitsgruppe Sleeman lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass Pip92 die zellulären Prozesse Tumorprogression, Zellwanderung und Metastasierung positiv beeinflusst (unveröffentlichte Daten). Ob Pip92 eine regulierende Rolle bei diesen Prozessen einnimmt, sollte im Zuge dieser Arbeit durch funktionelle Analysen beantwortet werden.

Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Erforschung der Funktion von Pip92 bei Zellmigrationen, Zellzyklusregulation und Apoptose gesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Alle Chemikalien wurden in der höchst möglichen Reinheitsstufe verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser, das über ein Milli-Q-Reinstwasser-System der Firma Millipore entsalzt wurde, in sterilen Gefäßen angesetzt und autoklaviert.

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Roth, Karlsruhe
AgarAgar	Nordwald, Hamburg
Agar Noble	DIFCO, Kansas City, USA
Agarose	Biozym Diagnostik, Hameln
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Anisomycin	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bacto Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Bacto Trypton	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
5xBradford-Lösung	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma, Deisenhofen
DMEM (synthetisches Kulturmedium)	Invitrogen, Eggenstein
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Standards für Gelelektrophorese (100Bp+1000Bp)	PeqLab, Erlangen
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL	Amersham, Freiburg
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fibronektin	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe

Geneticin-Sulfat (G418)	Invitrogen, Eggenstein
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycylglycin (GLyGly)	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
[³ H]-Thymidin	Amersham (Freiburg)
Hyaluronsäure	Sigma, Deisenhofen
Immu-Mount, wässriges Einbettmedium	Shandon, Frankfurt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	Roth, Karlsruhe
Kollagen Typ IV	Sigma, Deisenhofen
Laminin	Sigma, Deisenhofen
LeptomycinB	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Roche Diagnostics, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Matrigel	SERVA, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Molekulargewichts-Standard für SDS Elektrophorese	PeqLab, Erlangen; Sigma, München
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Fluka, München
N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Opti-MEM I	Invitrogen, Eggenstein
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Gibco BRL, Eggenstein
Penicilin	Invitrogen, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Protein G-Sepharose PLUS	Amersham, Freiburg
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Promega, Heidelberg NEB, Frankfurt Invitrogen, Eggenstein

Rinderserumalbumin (BSA)	PAA, Cölbe
RNaseA	Roche Diagnostics, Mannheim
RPMI-1640 (synthetisches Kulturmedium)	Invitrogen, Eggenstein
SDS	Roth, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit	Canberra-Packard, Dreieich
Streptomycin	Invitrogen, Eggenstein
Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl, Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin	Invitrogen, Eggenstein
Tween20	Roth, Karlsruhe

Alle übrigen nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck Biosciences GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Sigma-Aldrich GmbH (München) und Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

2.1.2 Kits

Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} -Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL TM Western blotting detection reagents	Amersham, Freiburg
GenePorter TM	peqLab, Erlangen
Mycoplasmatest VenorGem [®]	Minerva Biolabs, Berlin
OligofectAMINE TM	Invitrogen, Eggenstein
QIAGEN [®] Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Düsseldorf

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Bakterien-Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Costar 24-Transwell [®] Migrations-Kammern; 8µm Poren	VWR, Bruchsal Eppendorf
Einfrierbox	NUNC, Wiesbaden
Falcon-Blaukappen-Röhrchen (15+50ml)	Greiner, Nürtingen
Glasplatten SDS-PAGE 14x16cm	peqLab, Erlangen
Hamilton Spritze 1710 RNCP, 100 µl Gauge 22S	Techlab Erkerode
Hyperfilm XR [®] (ECL und MP)	Amersham, Freiburg
Kryoröhrchen NUNC-Cryotube [™]	NUNC, Wiesbaden
Küvetten zur Konzentrationsbestimmung	peqLab, Erlangen
Lab-Tek [™] II -CC2 [™] Objektträger-Systeme	Renner, Darmstadt
PVDF-Membran (Immobilon)	Millipore, Schwalbach
Quiagen-tip AX-500-Säulen	QIAGEN, Düsseldorf
Reaktionsgefäße (1, 5 + 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Whatman-3MM-Papier	VWR, Bruchsal
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen (Quick Seal)	Beckmann, Stuttgart

2.1.4 Geräte

AxioCam	Zeiss, Jena
Binokular	Zeiss, Jena
Bakterienschüttler	Infors AG, Bottmingen (Schweiz)
Durchflusszytometer FACS-can	BectonDickinson, Franklin Lakes USA
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad, München BRL, Eggenstein Hofer Scientific Instruments (USA)
ELISA-Lesegerät	Biotek Instruments (USA)
Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme	Kodak, New Haven (USA)
Erntegerät	Tomtec, Celle
Filtermatten Typ A	Wallac, Turku (Finnland)
Immunfluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Kontron-Hermle Centrikon H-401 Zentrifuge	Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge J2-HS mit Rotoren JS-13.1 und JA-1	Beckmann, Stuttgart

Mikrowelle	Hoover, Hongkong (China)
Netzgeräte für Elektrophorese	BioRad, München
Neubauer-Zählkammer	VWR, Bruchsal
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Software Immunfluoreszenzmikroskop	OpenLab, London, U.K.
Sterilbank	Glatt AG (Schweiz)
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Typ 5410	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Desintegrator (Branson B15 Sonifier)	Branson Sonic Power Co. (USA)
UV-Lampe	Vetter, Wiesloch
Vortex-Schüttler	Bender & Hohbein, Karlsruhe
Wasserbad	GFL, Burgwedel
β-Zählautomat 1450 Microbeta	Wallac, Turku (Finnland)
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Fellbach

2.1.5 siRNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz	Position im Gen
siRNA-pip92#3	5'-GACGAAGUUGCAGUGGAAGdTdT-3 3'-dTdTCUGCUUCAACGUCACCUUC-5'	325-343
Kontroll-siRNA	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUDTdT-3 3'-dTdTAAGAGGCUUGCACAGUGCA-5'	unspezifische Sequenz

Tab.1: verwendete Oligonukleotide bei posttranskriptionellen gene silencing (RNAi)

2.1.6 Plasmide

Name	Kommentar	Hersteller/Vertreiber/Referenz
pCDNA3.1	Kontrollvektor	Invitrogen, Groningen, Niederlande
rPip92/V5/pcDNA3.1	<i>pip92</i> -Expressionskonstrukt, enthält die cDNA des murinen <i>pip92</i> im pcDNA3.1V5-Expressionsplasmid. kloniert	Kloniert von N.Novac (2001)
pGreen Lantern-1	enthält die cDNA des GFP (<i>green fluoreszenz-protein</i>) in einem Expressionsplasmid, das in Säugetierzellen exprimiert werden kann.	Invitrogen, Groningen, Niederlande
PGEJ(6.6)	Expressionsvektor, der das murine Proto-Onkogen <i>c-Ha-ras</i> enthält	(Makela et al., 1992)
pSVc-myc 1	Expressionsvektor, der das murine Proto-Onkogen <i>c-myc</i> enthält	(Makela et al., 1992)
Ras #66	Expressionsvektor, der das durch AS-Austausch gegen Alanin an Position 61 konstitutiv aktive Onkogen <i>c-Ha-ras</i> trägt. Kann das gebundene GTP nicht mehr hydrolysieren	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Helen Morrison,
pcDNA3-E1B-GFP	Expressionsvektor, der das E1B-GFP-Fusionsprotein enthält	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R.Stauber

Tab.2: transfizierte Expressionsplasmide

2.1.7 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnungsfaktor im Westernblot/Immunfluoreszenz	Hersteller
Anti-Pip92-1A2 [0,2mg/ml] (Monoklonaler Maus-AK)	1:500 / 1:10	Labor Sleeman (unveröffentl. Daten)
Anti-V5-Antikörper (Monoklonaler Maus-AK) Kataloglnr.: R960-25	1:5000 / 1:500	Invitrogen
Anti-Pip92-N567 Polyklonales Kaninchenserum	1:500	Von N.Novac hergestellt
Anti-PCNA (Monoklonaler Maus-AK) Kataloglnr.: 610664	1:5000	BD Biosciences
Anti-Paxilin Polyklonaler Ziegen-AK Katalognr.: sc-7336	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc
Anti-β-Aktin Clone AC-15 (Monoklonaler Maus-AK) Kataloglnr.: A5441	1:5000	Sigma-Aldrich
Sekundärantikörper für Westernblotanalysen	Verdünnungsfaktor im Westenblot	
Anti-Maus IgG, HRP-Konjugat	1:1000	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Rabbit IgG, HRP-Konjugat	1:1000	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Goat IgG, HRP-Konjugat	1:1000	DAKO, Glostrup, Dänemark
Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz	Verdünnungsfaktor in Immunfluoreszenz	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus IgG, FITC-Konjugat	1 :50	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus IgG, TRITC-Konjugat	1 :100	DAKO, Glostrup, Dänemark

Tab.3: verwendete Antikörper, Verdünnungsfaktor im Versuch und Bezugsquelle

2.1.8 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Kulturmedium
Bsp73 1AS	Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
Bsp73 ASML	Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS
NIH 3T3-Fibroblasten	Murine Fibroblasten	DMEM + 10 % FCS
MEF	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM + 10 % FCS
3J1	Murine Fibrosarkoma	DMEM + 10 % FCS
NIH 3T3-Fibroblasten- <i>pip92</i> -Expressionsplasmid	Murine Fibroblasten	DMEM + 10 % FCS 600µg/ml G418
NIH 3T3-Fibroblasten-pcDNA3.1	Murine Fibroblasten	DMEM + 10 % FCS 600µg/ml G418
Bsp73 1AS <i>pip92</i> -Expressionsplasmid	Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS 600µg/ml G418
Bsp73 1AS pcDNA3.1	Rattenpankreas-Krebszellsystem	RPMI + 10 % FCS 600µg/ml G418

Tab.4: verwendete Zelllinien und eingesetzte Kultivierungsmedien

2.1.9 Bakterienstämme

E.coli DH5 α

Genotyp: F⁻; Φ 80d lacZ M15; endA1, recA1, hsdR17 (rk-⁻mk-); supE44#

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Methoden

2.2.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Abtrennung von Proteinen bei DNA-Präparationen wurden die DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (50:49:1) versetzt, gemischt und anschließend zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (12000 g, 15 min, 4°C). Die wässrige, DNA-enhaltende Oberphase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Ethanol bzw. Isopropanol gefällt.

2.2.1.2 Fällung von Nukleinsäuren

Sowohl eine Aufkonzentrierung als auch Reinigung der DNA von niedermolekularen Substanzen wurde durch Alkoholfällung erreicht. Zur DNA-Lösung wurde das 0,1-fache Volumen 3M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 (bei Ethanol-fällung) bzw. 3M Kaliumacetat-Lösung pH 5,2 (bei Isopropanol-fällung) und das 2-2,5-fache Volumen eiskalten Ethanols bzw. das 0,8-1-fache Volumen eiskalten Isopropanols zugegeben und der Ansatz nach Mischen 20min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die ausgefallene DNA durch Zentrifugation (12000 g, 30min, 4°C) pelletiert, mit 500µl eiskaltem 70%igen (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in dest. Wasser gelöst.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm durchgeführt. Eine $OD_{260}=1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Einen Hinweis auf Verunreinigungen durch Phenol oder Protein gibt die OD bei 280 nm. Das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} sollte im Idealfall 1,8:1 bei DNA und 2:1 bei RNA sein.

2.2.1.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

In einer wässrigen DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 10-fach konzentrierten Puffer-Salzlösungen ein für die jeweilige Restriktionsendonuklease notwendiges Milieu, entsprechend den Herstellerangaben, eingestellt. Pro µg DNA wurden 2-3 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug mindestens das 10-fache des Volumens der zugesetzten Enzym-Glyzerin-Lösung. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) bei 37°C für mindestens 1 h. Die

verdauten Nukleinsäuren wurden im UV-Durchlicht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert.

2.2.1.5 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Die Bakterienkolonie wurde in 2 ml Nährmedium (LB) mit dem Antibiotikum Ampicillin [100 µg/ml] über Nacht bei 37°C geschüttelt (300 U/min). 1,5 ml der Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 7000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer P1 resuspendiert und 200 µl Puffer P2 hinzugegeben. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde 150µl Puffer P3 zugegeben, für 3 min auf Eis inkubiert und anschließend für 3 min bei 12000g zentrifugiert. 400µl des Überstands wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt, 1ml Ethanol zugegeben, gemischt und für 20 min bei -20°C inkubiert. Die nun gefällte DNA wurde pelletiert (10 min 12000g, 4°C) und mit 500µl kalter 75%iger Ethanolösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min 12000g, 4°C) wurde das DNA-Präzipitat bei RT getrocknet und anschließend in 50 µl Wasser gelöst. Die verwendeten Puffer stammten aus dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit.

Puffer P1:	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	0,2 M NaOH; 1% SDS
Puffer P3:	3 M Kaliumazetat pH 5,5

2.2.1.6 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

Verwendet wurde der QIAGEN® Plasmid Maxi Kit:

200 ml Selektionsantibiotika enthaltendes LB-Medium wurden mit dem gewünschten Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (300 U/min). Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 7000 g sedimentiert, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und die Bakterien in 10 ml P2 für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Das Bakterienlysate wurde mit 10 ml P3 neutralisiert (10 min bei Raumtemperatur), bei 4°C und 12000 g 30 Minuten zentrifugiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Quiagen-tip AX-500-Säulen laut Herstellerprotokoll. Nach Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde diese mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, abzentrifugiert, getrocknet und anschließend in 500 µl Wasser gelöst.

Puffer P1:	50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Puffer P2:	0,2 M NaOH; 1% SDS
Puffer P3:	3 M Kaliumazetat pH 5,5

2.2.1.7 Elektrophorese von Agarosegelen

Für die Trennung von DNA-Fragmenten wurden 1% (w/v) Agarosegele präpariert. Die entsprechende Menge Agarose wurde mit 50 ml 1x TAE im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid wurde das Gel in eine Laufkammer gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel vollständig mit Laufpuffer (1x TAE) überschichtet, der Kamm entfernt und die mit Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei konstant 90V. Die DNA wurde im UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

1x TAE: 40 mM Tris base; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA pH 8,0
Probenpuffer: 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylen, 6,7% Saccharose

2.2.1.8 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Herstellung transformierbarer Bakterien wurde ein Aliquot des Bakterienstamms *E. coli*-DH5α auf einer Agarplatte mit LB-Medium ohne Selektionsantibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie gepickt und damit eine 100 ml Vorkultur angeimpft. Diese Kultur wurde unter Schütteln bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur (800 ml) mit der Vorkultur im Verhältnis 1/100 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Dies geschah solange, bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 erreicht war. Anschließend wurden die Bakterien sofort auf Eis abgekühlt. Nach Sedimentation der Bakterien (Centrifuge H-401, Rotor A6.9, 5000 U/min, 10 min, 4°C) wurden diese mit jeweils 10 ml pro 50 ml Ausgangskultur eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung gewaschen und anschließend ebenfalls in 10 ml pro 50 ml Ausgangskultur kalter 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Nach 1 h auf Eis wurden die Bakterien erneut sedimentiert und in 1/30 bis 1/50 des Originalvolumens in 50 mM CaCl₂ mit 15% Glycerin resuspendiert und in 100 µl Aliquots abgefüllt. Nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff wurden die Bakterien bei -80°C gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurde ein Bakterienaliquot verwendet.

50mM CaCl₂-Lösung: aus 1 M Stocklösung verdünnt, bei Bedarf Zugabe einer 86% Glycerinlösung bis zur Endkonzentration 15%

2.2.1.9 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

100 µl chemisch kompetenter Bakterien wurden mit Plasmid-DNA (maximal 50 ng) vermischt und für 15 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 90 s und

Inkubation für 5 min auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Kultur für 60 min bei 37°C geschüttelt (300 U/min). Anschließend wurden 200, bzw. 20 µl des Ansatzes auf eine LB-Agarplatte ausplattiert und bis zum Erscheinen makroskopischer Kolonien bei 37°C unter Schütteln (300 U/min) inkubiert. Je nach transfiziertem Plasmid enthielt die Agarplatte entsprechende Selektionsantibiotika in der geeigneten Konzentration: [10 µg/ml] Ampicillin oder [10 µg/ml] Kanamycin.

LB-Medium: 10g/l Bacto Tryptone, 5g/l Bacto Hefeextrakt, 5g/l NaCl
LB-Agarplatten: LB-Medium mit 18g/l Agar Agar

2.2.2 Protein-Methoden

2.2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Je 4µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf 800 µl mit Wasser aufgefüllt und mit 200 µl 5xBradford-Lösung gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung wurden Eichlösungen aus BSA bekannter Proteinkonzentration (1-5µg/ml) parallel dazu verarbeitet. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte anhand der Regressionsgeraden der Eichkurve.

2.2.2.2 Präparation von Ganzzell-Proteinlysaten zur elektrophoretischen Auftrennung

Um die Ganzzelllysate für die elektrophoretische Auftrennung vorzubereiten, wurden Zellen 3x mit PBS gewaschen und in 2xLysis-Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden zum Aufschluß der Kerne und zum Scheren der DNA mit einem Ultraschall-Desintegrator mit 15 Ein-Sekunden-Impulsen behandelt. Die Impulsstärke betrug 60% (Stufe 5-6).

2x Lysispuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau;
2% 2-Mercaptoethanol

2.2.2.3 Präparation von nukleären und zytoplasmatischen Zellextrakten

Für die Herstellung der Zellfraktionen wurde aus 10^6 - 10^7 Zellen durch Trypsinbehandlung eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Zentrifugieren (400g, 3 min, RT) wurden die Zellen in 400 µl Puffer A, der die Kernmembran intakt lässt, aufgenommen und für 15 min auf Eis lysiert. Nach erneuter Zentrifugation (12000 g, 5 min 4°C) wurde der zytoplasmatische Überstand gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Um zytoplasmatische Verunreinigungen zu entfernen, wurden die noch intakten Kerne nochmals mit 400µl Puffer A überschichtet und nach Zugabe von 25 µl 10% (v/v) NP-40, kurzem Mischen und Zentrifugation (12000 g, 5 min 4°C) von der Waschlösung abgetrennt. Überschichten der

Kerne mit 40-60 µl Puffer C und fünfzehnminütige Inkubation bei 4°C bei leichtem Schütteln führte zur Anreicherung der Kernproteine im Puffer C. Nach Zentrifugation (12000 g, 5 min 4°C) wurde das Kernpellet vom Kernextrakt abgetrennt. Der so erhaltene Kernextrakt wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Puffer A: 10mM HEPES pH 7,9; 10mM KCl; 0,1 mM EGTA; 2,5 mM DTT; 1µg/ml Leupeptin; 10µM PMSF, 5µg/ml Aprotinin

Puffer C: 20mM HEPES pH 7,9; 25% Glycerin; 0,4 M NaCl; 10mM KCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 1µg/ml Leupeptin; 10µM PMSF; 5µg/ml Aprotinin

2.2.2.4 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese gemäß ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei wurden sie zunächst durch ein niederprozentiges Sammelgel am Übergang zum direkt anschließenden 12%igen Trenngel fokussiert. Im Trenngel war die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch das Denaturieren mit SDS abhängig von der Masse des Proteins. Die Trenngel-Löung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch 1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte, vertikal ausgerichtete Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit 1ml Isopropanol wurde das Auspolymerisieren abgewartet. Das Isopropanol wurde daraufhin entfernt und mit Wasser gespült. Wasserrückstände wurden durch 3MM-Whatman-Papier entfernt. Das Trenngel wurde mit Sammelgel-Lösung überschichtet und ein Kamm wurde in die Lösung eingesetzt. Nach Polymerisation wurde das Gel vertikal in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die Reservoirs mit Elektrophorese-Puffer gefüllt. Die Protein-Proben, sofern nicht schon in 2xLysis-Puffer vorliegend, wurden mit einfachem Volumen 2x Lysis-Puffer versetzt. Anschließend wurde die Proteinlösung für 5 min auf 95°C erhitzt, für 1 min auf Eis gestellt und dann in die durch den Kamm entstandenen Taschen überführt. Zur Ermittlung der relativen molekularen Masse wurde routinemäßig ein Proteinstandard (SDS 7B, Sigma) mit aufgetragen. Solange sich die Proteine im Sammelgel befanden, sichtbar durch die blaue Lauffront, erfolgte die Elektrophorese mit 80V Spannung. Sobald sich die Proteine im Trenngel befanden, wurde die Spannung auf 130V erhöht. Durch das Austreten des blauen Farbstoffes am unteren Gel-Rand wurde das Ende der Elektrophorese sichtbar.

Trenngel-Lösung:	12% Acrylamid; 0,32% N,N'-Methylenbisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED
Sammelgel-Lösung:	4% Acrylamid; 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED
Elektrophorese-Puffer:	25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 0,1% SDS
2x Lysispuffer:	125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 2% 2-Mercaptoethanol

2.2.2.5 Immunoblot-Analyse von Proteinen („Western-Blot“)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch ein Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran überführt. Darauf wurde auf das Gel eine durch Methanol aktivierte PVDF-Membran luftblasenfrei gelegt, beides zwischen sechs Lagen mit Transferpuffer getränktem 3MM-Whatman-Papier gelegt und in die Transferzelle eingespannt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 300 mA (4°C) oder alternativ für 6 h bei 350mA (4°C). Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in Milchpuffer (5% (w/v) fettfreie Milch in TBST) geschwenkt und anschließend 1 h mit dem Primärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen oder einer empirisch ermittelten Verdünnung) in Milchpuffer (0,1 ml pro cm² Membranfläche) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 5 min in Milchpuffer gewaschen und danach 40 Minuten mit dem geeigneten Sekundärantikörper (in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung) in Milchpuffer inkubiert (0,1 ml pro cm² Membranfläche). Nach erneutem dreimaligem Waschen in Milchpuffer (je 5 min) und dreimaligem Waschen in TBST (je 5 min) wurden Proteine, die vom Primärantikörper erkannt worden sind, sichtbar gemacht. Das Detektionsverfahren richtete sich nach dem verwendeten Sekundärantikörper. Bei den hier verwendeten Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpern wurde die Membran 1 min mit einer 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen (engl.: *enhanced-chemiluminescence*) (2 ml pro dm² Membranfläche) überschichtet. Nach Entfernung überschüssiger Flüssigkeit wurde auf die Membran ein Röntgenfilm exponiert und anschließend entwickelt.

Transferpuffer:	20 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol
TBS:	20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH7,6
TBST:	TBS + 0,05% Tween 20

2.2.2.6 Immunfluoreszenzanalyse

Die subzelluläre Lokalisation von Pip92 sowie die Lokalisation des Chromatins wurden durch Immunfärbungen analysiert. Die in Lab-Tek™ II -CC2™ Objektträger-Systemen kultivierten Zellen wurden 3 mal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei RT mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Zellmembran durch 15-minütige Inkubation mit 0,1%-igen (v/v) NP-40 in PBS permeabilisiert. Alternativ wurde auch 0,5%-iges (v/v) Triton X100-in PBS verwendet. Nach dreimaligem Waschen wurden unspezifische Bindestellen mit 10%-igem FCS in PBS für 60 min abgesättigt. Die Inkubation mit dem Pip92-spezifischen monoklonalen Antikörper 1A2 erfolgte über Nacht in einer „feuchten Kammer“ (erhöhte Luftfeuchte durch Wasser auf dem Boden eines geschlossenen Gefäßes) bei 8°C. Hierbei wurde entweder 20µg/ml aufgereinigter

Antikörper benutzt oder unverdünnter Hybridomaüberstand. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde für 60 min mit Zweitantikörper, verdünnt in PBS-10% FCS, behandelt. Tabelle 3 gibt Auskunft über die alternativ verwendeten Zweitantikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen. Die Zweitantikörperlösung enthielt zur Färbung des Chromatins zusätzlich 10 µg/ml 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit Einbettmedium und Deckglas bedeckt. Zur Analyse wurden die floreszenzmarkierten Zweitantikörper mit Licht geeigneter Wellenlänge (492nm für FITC-gekoppelte, 550nm für TRITC-gekoppelte Antikörper) angeregt und die Lokalisation mit einem Fluoreszenzmikroskop mit dem geeigneten Filtersatz analysiert. Das Volumen der eingesetzten Lösungen wurde den verwendeten Objektträgersystemen angepasst und folgte der Regel: 150µl/cm² Kultivierungsfläche.

2.2.2.7 Aufreinigung von Immunglobulinen

Erster Schritt bei der Aufreinigung monoklonaler Antikörper war die Präzipitation der im Hybridoma-Kulturüberstand vorhandenen Proteine. Dazu wurden 50 Teile Hybridomaüberstand langsam und unter ständigem Rühren mit 50 Teilen kalter, gesättigter Ammoniumsulfatlösung gemischt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (8000 g, 10 min, 4 °C), der Niederschlag in 50-100 ml 150 mM NaCl/20mM Na₂HPO₄, pH 7, gelöst und 8 h gegen 150 mM NaCl/20mM Na₂HPO₄, pH 7, dialysiert. Der Dialysepuffer wurde 2 x gewechselt. Das Dialysat wurde nochmals zentrifugiert (8000g, 10 min, 4 °C) und der Überstand zu 3ml Protein G-Sepharose/Liter ursprünglichem Hybridomaüberstand gegeben und für 4 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation (3000g, 5 min., 4°C) wurde der Überstand verworfen und die Sepharose 4 x mit 150 mM NaCl/20mM Na₂HPO₄, pH 7, gewaschen und zentrifugiert (3000g, 5 min, 4°C). Die Sepharose wurde auf Econopak[®] Säulen geladen und gewartet, bis die überschüssige Flüssigkeit abgetropft war. Die an der Sepharose G gebundenen Immunglobuline wurden mit 5ml 100mM Glyzin, pH 2,5, eluiert. Je 500µl des Eluats wurden mit 50µl 1M Tris-HCl pH 9,6 neutralisiert. Die Antikörper enthaltenden Fraktionen (Messung der OD₂₈₀) wurden über Nacht gegen PBS dialysiert und bei 4 °C gelagert.

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung: 313g/l
1mg/ml Immunglobuline = 1,35 OD₂₈₀

2.2.3 Zellkultur und Transfektionsmethoden

2.2.3.1 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert. Die Kulturmedien RPMI 1640 und *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium (DMEM) wurden mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Streptomycin und 100 IE/ml Penicillin versetzt (=Vollmedium). Bei der Selektion und Kultur von stabilen Klonen der beiden Zelllinien Bsp73 1AS und NIH 3T3 wurden jeweils 600µg/ml G418 zur Erhaltung der exogenen pip92-expression zugesetzt.

Kultivierung der NIH 3T3-Fibroblasten in *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium (DMEM) mit 0,6% fötalem Kälberserum und den zugesetzten Antibiotika (=Hungermedium) wurde verwendet, um die Fibroblasten in die G₀-Phase des Zellzyklus zu zwingen.

Sämtliche Manipulationen der Zellen erfolgten an einer Sterilbank. Glaswaren und Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch sterilisiert (120°C; 1,4 bar; 20 min).

Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden regelmäßig auf Kontamination mit Mykoplasmen mit Hilfe eines PCR-Verfahrens (VenorGem[®]) untersucht. Befallene Kulturen wurden entsorgt.

2.2.3.2 Passagieren der Zelllinien

a) Adhärenz Zellen

Die adhärenz Fibroblasten-Zelllinie NIH 3T3 wurde in DMEM Kulturmedium mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 2-3 Tage 1:3 passagiert. Die adhärenz Zelllinie Bsp73 1AS wurde in RPMI 1640 Kulturmedium mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 3 Tage 1:6 verdünnt. Zum Ablösen und Passagieren von adhärenz Zellen wurde den Zellen Trypsin (0,25%) zugesetzt, so dass sie gerade vollständig benetzt waren. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen abgespült. Ein Teil wurde in frisches Vollmedium überführt.

b) Suspensionszellen

Die Suspensionszelllinie Bsp73 ASML wurde in RPMI 1640 Kulturmedium mit den angegebenen Zusätzen vermehrt und alle 3 Tage 1:6 verdünnt.

2.2.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können in Gegenwart von DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen abzentrifugiert (400g, 3 min, RT),

in 500µl FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und in ein 2 ml-Gefäß (NUNC-Cryotube™) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in einer Einfrierbox für Zellen mit Isopropanolmantel auf -80°C abgekühlt. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 20 ml vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätsprüfung durch Zellzählung

Für die Bestimmung der Vitalität und Zellzahl/ml wurde ein Teil der sich in Suspension befindlichen Zellen mit einem Teil Trypanblau-Lösung (5 mg/ml in PBS) gemischt und die nicht gefärbten, lebenden Zellen in einer Standard-Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden die Zellen innerhalb der vier großen Quadrate (mit den je 16 kleinen Quadraten) gezählt, der Mittelwert aus den 4 Zellzahlen gebildet und mit $2 \cdot 10^4$ multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu bestimmen.

2.2.3.5 Definition Subkonfluenz/Konfluenz bei NIH 3T3-Fibroblasten

Um subkonfluente Fibroblasten zu kultivieren, wurden maximal $3 \cdot 10^4$ Zellen pro cm^2 ausgesät. Konfluente Fibroblasten bedeutet die Aussaat von 10^5 Zellen pro cm^2

2.2.3.6 Seruminduktion von Pip92 in gehungerten konfluenten und subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten

a) in subkonfluenten Fibroblasten

10^6 Fibroblasten wurden in 10cm-Zellkulturschalen in Vollmedium (DMEM-10% FCS) ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Vollmedium durch Hungermedium ersetzt (DMEM-0,6% FCS). Die Zellen wurden für 48 h im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit DMEM-20% FCS stimuliert und nach zweimaligem Waschen mit gekühlten PBS (4°C) in 2x Lysispuffer lysiert. Die Zellextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° gelagert.

b) in konfluenten Fibroblasten

Die Methode wurde wie bei subkonfluenten Zellen durchgeführt, jedoch mit $5,5 \cdot 10^6$ Zellen.

2x Lysispuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau;
2% 2-Mercaptoethanol

2.2.3.7 Induktion von Pip92 durch Anisomycin

Die Induktion von Pip92 durch Anisomycin folgte der von (Chung et al., 2000a) beschriebenen Weise. Konfluente wie subkonfluente Fibroblasten wurden für 4h mit Anisomycin [50ng/ml] (Lösungsmittel der Stocklösung: Methanol) im Vollmedium im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Als Kontrolle wurde dem Kulturmedium eine äquivalente Menge an Methanol zugesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden durch Lyse mit 2x Lysis-Puffer entweder Ganzzellproteinextrakte hergestellt oder nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen. Die Ganzzellextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert, die nukleären, bzw zytoplasmatischen Proteinextrakte nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C .

2x Lysispuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau;
2% 2-Mercaptoethanol

Puffer A: 10mM HEPES pH 7,9; 10mM KCl; 0,1 mM EGTA; 2,5 mM DTT; 1µg/ml Leupeptin; 10µM PMSF, 5µg/ml Aprotinin

Puffer C: 20mM HEPES pH 7,9; 25% Glycerin; 0,4 M NaCl; 10mM KCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 1µg/ml Leupeptin; 10µM PMSF; 5µg/ml Aprotinin

2.2.3.8 Posttranskriptionelles pip92-silencing (RNAi) und Proliferationsmessung

Die transiente Transfektion zum Abbau der pip92-mRNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers von OligiectamineTM. $1,15 \cdot 10^6$ NIH 3T3-Fibroblasten wurden 24 h vor der Transfektion in 6 cm-Zellkulturschalen in DMEM mit 0,6% FCS ausgesät, so dass am folgenden Tag eine 70%-ige Konfluenz erreicht war. Zur Transfektion wurden 23µl einer 20µM Oligonukleotidlösung mit dem Transfektionsmedium Opti-MEM[®] verdünnt. Eine zweite Lösung enthielt das Transfektionsreagenz OligiectamineTM, verdünnt in Opti-MEM laut Angaben des Herstellers. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurden die beiden Lösungen vereinigt und nochmals für 20 Minuten inkubiert (RT). Die Zellen wurden zweimal mit Opti-MEM[®] gewaschen und danach mit 1840µl Opti-MEM[®] überschichtet. Jetzt erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurde 1150 µl Opti-MEM[®]-1,8%FCS zugegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank weiterkultiviert. Morgens wurden mit Hilfe von Trypsin (0,25%) Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die enzymatische Reaktion des Trypsins wurden durch DMEM-0,6% FCS gestoppt. Nach Zentrifugation (400g, 3min, RT) und Resuspension in DMEM-0,6% wurden die Zellen aufgeteilt: 10^4 Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät (Endvolumen 100µl), 10^6 Zellen wurden in 6cm-Zellkulturschalen überführt (Endvolumen 5ml). Nach zweistündiger Inkubation im Zellkulturbrutschrank wurden den nun wieder adhärennten Zellen

in der 96-Loch-Platte 100 µl DMEM-30% FCS zugegeben, das zudem 0,25 µCi/ml [³H]-Thymidin enthielt. Nach weiteren 6 Stunden wurde die Menge der freigesetzten β-Strahlung (durch das in die DNA eingebaute [³H]-Thymidin) automatisch im β-Zählautomat quantifiziert. Die Zellen in der 6cm-Zellkulturschale wurden benutzt, um das posttranskriptionelle pip92-silencing im Western-Blot nachzuweisen. Hierzu wurde gewartet, bis die Zellen wieder adhärent waren (2 Stunden). Daraufhin wurde das Hungermedium gegen DMEM-20%FCS ausgetauscht. Die Zellen wurden für eine Stunde im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch 2x-Lysis Puffer lysiert und die Zellextrakte bis zur weiteren Verwendung bei –20° gelagert.

2x Lysispuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau;
2% 2-Mercaptoethanol

2.2.3.9 Stabile Transfektion von Zellen und Selektion von Zellklonen mit G418

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 14.5 cm-Schalen bis zu einer 70%-igen Konfluenz kultiviert. Die Transfektion von 15µg Plasmid-DNA mit GenePorterTM in serumfreiem Medium ohne Antibiotika (DMEM bzw. RPMI 1640) wurden nach Angaben des Herstellers (PEQLAB) durchgeführt (5 µl GenePorterTM Reagenz pro 1 µg transfizierter DNA). Am übernächsten Tag wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin in 13 Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) überführt und G418 (600 µg/ml Endkonzentration) dem Kulturmedium hinzugegeben. In den ersten Tagen nach Transfektion wurde das Kulturmedium täglich vorsichtig gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen. Zwei bis drei Wochen später wurden auswachsende Zellklone mit einer 20µl-Pipette und 7µl Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und klonal expandiert.

2.2.3.10 Transiente Transfektion von Zellen

Die zu transfizierenden Zellen wurden 24h vor der Transfektion in 6-Loch-, 6 cm- bzw. 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät, so dass am folgenden Tag eine 70%-ige Konfluenz erreicht war. Transfiziert wurde mit GenePorterTM in serumfreiem Medium (DMEM oder RPMI 1640) ohne Antibiotika. Die Menge an transfizierter Plasmid-DNA sowie die Transfektionsbedingungen (5 µl GenePorterTM Reagenz pro 1 µg transfizierter DNA) wurden laut Angaben des Herstellers (PEQLAB) an die Größe des Kulturgefäßes angepasst. Die Ermittlung der Transfektionseffizienz erfolgte durch Kotransfektion mit einem GFP-Expressionskonstrukt (2 µg/10 cm-; 0,5 µg/6 cm-; 0,3µg/6-Loch-Petrischale) und anschließender Identifizierung und Quantifizierung der transfizierten Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

2.2.3.11 Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Im Durchflusszytometer passieren die Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl, welcher in Einzeltropfen zerlegt wird, einen fokussierten Laserstrahl (Argonlaser mit 488 nm). Der Laserstrahl regt den an die Antikörper gekoppelten fluoreszierenden Farbstoff an und die daraus resultierende Licht-Emission kann mit Hilfe spezieller Filterkombinationen detektiert und in elektrische Signale umgewandelt werden. Weiterhin können mit Hilfe des Lasers die Zellgröße (Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung = „Forward Scatter“) sowie die Zellgranularität (Lichtstreuung in Seitwärtsrichtung = „Sideward Scatter“) analysiert werden

2.2.4 Funktionelle *in vitro*-Methoden

2.2.4.1 Adhäsionsexperimente

96 Loch-Suspensionszellplatten wurden für 2h bei 37°C oder über Nacht bei 8°C mit 75 µl Beschichtungslösung inkubiert. Tabelle 5 gibt Auskunft über die verschiedenen Lösungen und ihre Konzentrationen.

Beschichtungslösung	Konzentration in PBS
Fibronektin	10µg/ml
Kollagen Typ IV	10µg/ml
Kollagen	10µg/ml
Hyaluronsäure	1mg/ml
Laminin	10µg/ml
BSA	40µg/ml

Tab.5: verwendete Beschichtungslösungen und ihre Konzentration

Vor der Aussaat der transient transfizierten Zellen ($4 \cdot 10^4$ /Vertiefung) wurde die Beschichtungslösung abgesaugt und die Platte zweimal mit PBS gewaschen. Den Zellen wurde 45 Minuten Zeit gegeben, um zu adhären. Die adhären Zellen wurden mit 70%igen Ethanol (v/v in Wasser) fixiert (30 min 8°C) und nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für 25 Minuten mit Kristallviolett (0,1 % w/v in Wasser) bei RT gefärbt. Entfernung der überschüssigen Kristallviolettlösung durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser und 10 minütiges Trocknen bei RT (Zellkulturplatte kopfüber auf Zellstoff)

ging der Entfärbung der Zellen durch 200 µl Essigsäure (10% v/v in Wasser) voran. Zur Quantifizierung der adhärenierten Zellen wurde ein 100µl-Aliquot in neue 96-Loch-Platten gegeben und die optische Dichte bei 595nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die Extinktionswerte sind proportional zur Zellzahl. Es wurde mit Triplikaten gearbeitet.

2.2.4.2 Messung der Proliferationsraten durch Quantifizierung des Einbaus an radioaktiven Thymidins

Transient transfizierte Zellen wurden 24 h nach der Transfektion in Triplikaten zu je 1 bzw. 2 *10⁴ Zellen auf 96 Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Das Endvolumen betrug 150µl. Je nach Versuch waren die Zellen in Vollmedium oder Hungermedium resuspendiert. Eine Stunde nach Aussaat wurde pro Vertiefung 0,25 µCi/ml [³H]-Thymidin zugegeben und für 8 bis 16 Stunden inkubiert. Nach Ablösen der Zellen von der Zellkulturplatte durch Trypsinisierung für 1h wurden die Zellen mit einem Erntegerät auf Filtermatten übertragen, wobei die DNA mit dem eingebauten [³H]-Thymidin auf der Matte festgehalten wurde. Nach zweiminütigem Trocknen durch Mikrowellen (600W) wurden die Matten in eine Folie mit etwas Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt. Die Menge der durch [³H]-Thymidin freigesetzten β-Strahlung wurde automatisch im β-Zählautomat quantifiziert. Hierbei entspricht eine erhöhte Radioaktivität einer verstärkten Proliferation.

2.2.4.3 Bestimmung der im Zytoplasma befindlichen Histone als Maß für apoptotische Zellen

Benutzt wurde der Cell Death Detection ELISA^{PLUS}-Kit der Firma Roche. Hier werden die bei apoptotischen Zellen ins Zytoplasma freigesetzten Nukleosome durch einen biotinkgekoppelten anti-Histon-Antikörper erkannt und an Streptavidin gebunden, das an die Oberfläche einer Zellkulturschale gebundenen ist. Ein Peroxidase-gekoppelter (POD) zweiter Antikörper bindet an die an den Nukleosomen gebundene DNA. Zugegebenes ABTS (2,2'-Azido-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) wird von POD zu einem wasserlöslichen Farbstoff umgesetzt, dessen Menge durch Absorptionsmessung bei 405nm erfasst werden kann. Es wurde immer in Triplikaten gearbeitet. Die Durchführung erfolgte streng nach mitgeliefertem Protokoll. Alle eingesetzten Materialien waren im Kit enthalten.

2.2.4.4 Wundheilungsexperimente

Zellen wurden in 6cm-Zellkulturschalen bis zum Erreichen einer Einzelzellschicht kultiviert. Nach Entfernen von Zellen mit Hilfe einer sterilen 1000µl-Pipettenspitze („ziehen einer Linie“) und Wegspülen der abgelösten Zellen durch dreimaliges Waschen mit serumfreiem

Kulturmedium wurde mit GenePorter™ Plasmid-DNA transfiziert. Das Schließen der Wunde wurde mit Hilfe eines Binokulars verfolgt und über 3 Tage hinweg fotografisch dokumentiert. Um eine quantitative Aussage über die Anzahl der in die künstliche Wunde eingewanderten Zellen zu machen, wurden zusätzlich Aufnahmen eines Mikrometermaßstabes bei gleichem Vergrößerungsfaktor angefertigt. Die Auswertung erfolgte durch Quantifikation der Zellen, die sich in einem 800µm²-Areal im inneren Wundbereich befanden. Nach Abschluss der Dokumentation wurden die transfizierten Zellen mit 2xLysisPuffer lysiert und die Zellextrakte bis zur weiteren Verwendung bei -20° gelagert.

2x Lysispuffer: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 2% 2-Mercaptoethanol

2.2.4.5 *In vitro* Zell-Migration

a) Herstellung von konditioniertem 3J1-Medium

Es wurden Zellen der Fibrosarkoma -Zelllinie 3J1 in 14,5 cm-Zellkulturschalen mit DMEM-Vollmedium kultiviert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Nun wurde das Medium gegen DMEM-Kulturmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden für weitere 2 Tage im Zellkulturschrank inkubiert. Der Mediumüberstand (=konditioniertes Medium) wurde gesammelt, 2x zentrifugiert und sofort bei den *in vitro* Zell-Migrations-Versuchen eingesetzt.

b) Bestimmung der invasiven Migration

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellen mit Plasmid DNA transient transfiziert. Gleichzeitig wurde das bei -20°C gelagerte Matrigel, eine Mischung aus Basallaminakomponenten, in eine 4°C Umgebung überführt. Um den Filter der oberen Kammer des 24-Transwell®-Systems (8µm Poren) mit Matrigel zu bedecken, wurde das Matrigel mit vorgekühltem (4°C) DMEM-Kulturmedium auf eine Endkonzentration von 10µg/ml eingestellt und 50µl dieser Mischung mit gekühlten Pipettenspitzen (4°C) in die obere Kammer überführt. Die Polymerisation der Matrigel-Medium-Mischung erfolgte über 60 min bei 37°C im Zellkulturbrutschrank. Daraufhin wurde die untere Kammer mit 500µl konditioniertem 3J1-Medium gefüllt und 10⁵, in 100µl DMEM-Medium resuspendierte, transfizierte Zellen auf das auspolymerisierte Matrigel pipettiert. Die Zellen wurden in den Brutschrank überführt. Nach 16h wurde die obere Kammer von Matrigel und nicht migrierten Zellen gereinigt und der Filter zur Fixierung der adhären Zellen für 30 min. in 70% Ethanol überführt. Nach zweimaligem Waschen durch kurzes Eintauchen in Wasser und anschließendem Trocknen (10 min. RT) wurde der Filter für 25 min. in Kristallviolett-Lösung (0,1% w/v in Wasser) getaucht. Überschüssige Färbelösung wurde durch dreimaliges

Waschen mit Wasser entfernt. Nach Trocknen der Filter (10 min RT) wurden die durch Kristallviolett gefärbten Zellen mit 200µl 10%ige Essigsäure entfärbt. Überführen von 100µl der Essigsäurelösung in eine 96-Loch-Zellkulturplatte ermöglichte die Messung der optischen Dichte bei 595nm (OD₅₉₅). Die Extinktionswerte sind proportional zur Zellzahl. Es wurde mit Triplikaten gearbeitet.

c) Bestimmung der chemotaktischen Motilität

Die Durchführung erfolgte wie unter Punkt b) beschrieben, jedoch wurde kein Matrigel in die obere Kammer des 24-Transwell[®]-Systems gegeben. Stattdessen wurden 10⁵, in 150µl DMEM-Medium resuspendierte, transient transfizierte Zellen direkt auf den Filter pipettiert. In der unteren Kammer befanden sich 500µl Medium: konditioniertes von 3J1-Zellen oder als Kontrolle DMEM-Kulturmedium. Nach sechsstündiger Inkubation der Zellen im Zellkulturschrank wurde der Versuch durch Fixierung, Färbung und Quantifikation abgeschlossen. Die Durchführung der drei letztgenannten Schritte erfolgte wieder wie unter Punkt b) beschrieben.

2.2.4.6 Zellzyklusanalyse durch Propidiumjodid-Färbung

Durch fünfminütige Trypsinbehandlung wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach Zentrifugation (400g, 3 min, RT) wurden die Zellen mittels 1ml 70% Ethanol fixiert (60 min 8°C) und anschließend mit einer Propidiumjodidlösung (50µg/ml in PBS) behandelt (30 min 4°C, im Dunkeln). Das Propidiumjodid färbt Nukleinsäuren. Die Behandlung mit RNase A (40µg/ml), das der Propidiumjodidlösung zugesetzt war, verhindert, dass die zellulären RNA-Moleküle gefärbt werden. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt. Grafische Darstellung und quantitative Auswertung der Messdaten erfolgten mit dem Softwareprogramm CellQuest©. Apoptotische Zellen enthalten weniger DNA als solche in der G1-Phase, Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus weniger DNA als solche in der S-Phase, und diese wiederum weniger DNA als G2/M-Phase-Zellen.

2.2.4.7 Brechen der Kontaktinhibition

Ein 2-Kammer Lab-Tek™ II -CC2™ Objektträger wurde über Nacht mit Fibronectin (10µg/ml in PBS) beschichtet. Am nächsten Morgen wurde aus subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten mit Hilfe von Trypsin (0,25%) eine Einzelzellsuspension in Vollmedium hergestellt und 10^6 Fibroblasten/cm² Objektträger ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden aus der sich gebildeten konfluenten Einzelzellschicht mit Hilfe einer sterilen 1000µl Pipettenspitze Zellen entfernt („ziehen einer Linie“). Nach 0 bis 2 Stunden wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung fixiert. Die subzelluläre Lokalisation des Pip92, bzw. des Chromatins wurde fluoreszenzmikroskopisch ermittelt.

2.2.4.8 Versuche zur Focusbildung

Murine embryonale Fibroblasten wurden in 10 cm-Zellkulturschalen bis zum Erreichen der Konfluenz in Vollmedium kultiviert und darauf mit Expressionsplasmiden mit Hilfe von GenePorter™ transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Transfektionsmedium gegen Vollmedium ausgetauscht. Alle 3 Tage erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Nach 12-14 Tagen wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und durch 30 minütige Behandlung mit 70% Ethanol (v/v in Wasser) fixiert. Zweimaliges Eintauchen in Wasser entfernte Ethanolspuren. Nach zehnminütigem Trocknen bei RT wurden die Zellen für 25 Minuten mit Kristallviolett (0,1 % w/v in Wasser) gefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde durch dreimaliges Eintauchen in Wasser entfernt. Nach der Trocknung der Zellen (30 Minuten bei RT) wurde die Anzahl der Foci, die sich durch eine deutlich intensivere Färbung von den Zellen der Einzelzellschicht unterscheiden, pro Zellkulturplatte bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellkulturplatten fotografiert.

2.2.4.9 Wachsen von Fibroblasten in Soft-Agar

$5 \cdot 10^3$ Zellen wurden in 1,8 ml DMEM-Vollmedium resuspendiert. 200µl heiße 3,3%ige Softagarlösung wurde zugegeben. Nach mehrmaligem, vorsichtigem Auf- und Abpipettieren wurden je 500 µl der obigen Lösung mit einer 1000µl Pipettenspitze in 24-Loch-Zellkulturplatten überführt, die daraufhin zum Aushärten auf Eis gestellt wurden. Nachdem die gelartige Substanz ausgehärtet war, wurden die Zellen für 7-10 Tage im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Die Dokumentation erfolgte durch fotografische Aufnahmen mit Hilfe des Binokulars.

3,3%ige Softagarlösung: 3,3% (w/v) Agar Noble in sterilem, doppeltdestilliertem Wasser.

2.2.4.10 Blockierung des nukleären Exports durch Leptomycin B

Konfluente NIH 3T3-Zellen wurden auf dem 8-Kammer Lab-Tek™ II -CC2™ Objektträger-System kultiviert. Um den CRM1-abhängigen nukleären Export zu blockieren, wurden die Zellen für 5 h mit in Kulturmedium gelöstem Leptomycin B [4ng/ml] inkubiert. Die Analyse der subzellulären Lokalisation des Pip92, bzw. des Chromatins erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse. Als Kontrolle wurde eine äquivalente Menge an 70% Methanol dem Kulturmedium zugesetzt, welches das Lösungsmittel für die Leptomycin B-Stocklösung darstellt.

3 Ergebnisse

Kapitel I: Versuchssystem Bsp73-1AS/ASML

Um die Funktion von Pip92 in den zellulären Prozessen Zellmigration, Zellzyklusregulation und Apoptose im Kontext mit transformierten Zellen zu studieren, wurde das Bsp73-Rattenadenokarzinomasystem als Versuchssystem gewählt, das, vereinfacht gesagt, aus der stark metastasierenden Zelllinie Bsp73-ASML sowie aus der gering metastasierenden Zelllinie Bsp73-1AS besteht. Beides sind pankreatische Krebszellen gleichen genetischen Ursprungs.

Die ASML-Zellen zeigen eine konstitutive Expression von *pip92*, während in 1AS-Zellen fast kein Pip92 nachzuweisen ist (Novac, 2001; von Stein et al., 1997).

3.1 Messung der Transfektionseffizienz

Um die genannten zellulären Prozesse zu untersuchen, wurde mittels transienter Transfektionen *pip92* in diesen Zellen überexprimiert. Da relevante Daten nur durch hohe Transfektionseffizienzen erhalten werden können, wurde zunächst überprüft, ob die benutzten Zelllinien durch die gewählte Transfektionsmethode in genügend hohem Maße transfizierbar sind. Aus demselben Grund wurde die Transfektionseffizienz in NIH 3T3-Zellen gemessen, die das zweite verwendete zelluläre Versuchssystem bildeten.

Es wurden Bsp73-1AS-Zellen und 3T3-Zellen laut Protokoll des Herstellers des Transfektionsreagenz ausplattiert und mit einem GFP-Expressionsvektor transient transfiziert. 48 Stunden später wurde mittels FACS-Analyse der Prozentsatz der fluoreszierenden Zellen ermittelt. Solche Zellen wurden demnach mit dem Plasmid transfiziert. Abbildung 3 zeigt anhand von Beispielen die Transfektionseffizienzen für 1AS-Zellen und für NIH 3T3-Fibroblasten. Beide Zelllinien werden durch die gewählte Methode zu mehr als 90% transfiziert, zu 92% die 1AS-Zelllinie zu 95% die Fibroblastenzelllinie.

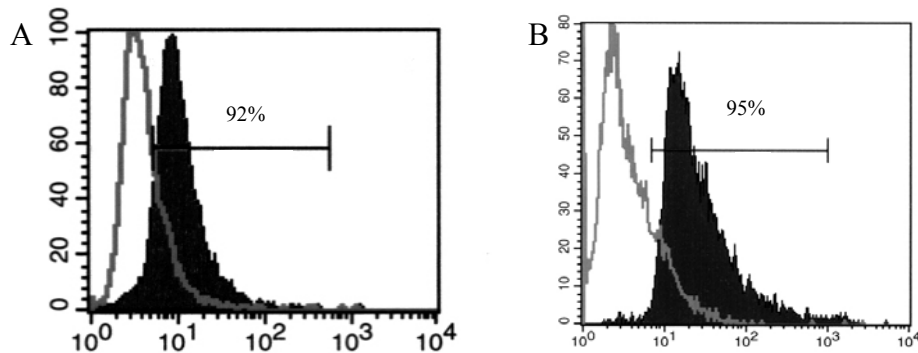


Abbildung 3: 1AS- und NIH 3T3-Zellen werden durch GenePorter™ zu mehr als 90% transfiziert

1AS- und NIH 3T3-Zellen wurden laut Protokoll des Herstellers des Transfektionsreagenz ausplattiert und transient mit dem Plasmid pGreen Lantern-1 transfiziert. 48 h später wurden die Zellen fixiert und die Transfektionseffizienz mittels FACS-Analysen bestimmt.

A) Transfektionseffizienz für Bsp73-1AS-Zellen: 92%

B) Transfektionseffizienz für NIH 3T3-Zellen: 95%

3.2 Einfluss von exogenem Pip92 auf die Apoptose von Bsp73 1AS-Zellen

Pip92 wurde als Apoptose-förderndes Protein beschrieben (Schneider et al., 2004), bzw. als Protein, welches bei apoptotischen Prozessen akkumuliert (Burnichon et al., 2003) (Chung et al., 2000a) (Chung et al., 2000b). Ob exogenes Pip92 auch in Bsp73 1AS-Zellen die Apoptose fördert, war Gegenstand des folgenden Versuchs. Hierzu wurden Bsp73 1AS-Zellen transient mit einem *pip92*-Expressionsvektor transfiziert. Zur Bestimmung des proapoptischen Effekts von Pip92 wurden nach Transfektion eventuell apoptotische Zellen anhand der ins Zytoplasma freigesetzten Histone detektiert und durch eine spezifische Antikörperreaktion kolorimetrisch quantifiziert. Als Positivkontrolle für apoptotische Zellen wurden Bsp73 1AS-Zellen für 4 h mit dem Apoptoseinduktor Camptothecin (5 μ M) behandelt. Die Versuche wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt. Als Transfektionskontrolle wurde das exogene, V5-getagte Pip92 in den Zelllysaten mit Hilfe eines V5-spezifischen Antikörpers detektiert. Dies erfolgte nach SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin auf derselben Nylonmembran.

Die Transfektion war erfolgreich (Abbildung 4 A, Spur 2), es wurden annähernd gleiche Mengen an Protein geladen (Abbildung 4 B, Spur 1 und 2).

Die Überexpression von *pip92* in 1AS-Zellen zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate dieser Zellen im Vergleich zur Kontrolltransfektion (vergl. Abbildung 4 Säule 1

und 2). Beide Zelllinien sind im Vergleich zu den mit Camptothecin behandelten Zellen (Säule 3) kaum apoptotisch.

Ein proapoptotischer Effekt von Pip92 ist unter diesen Bedingungen nicht erkennbar.

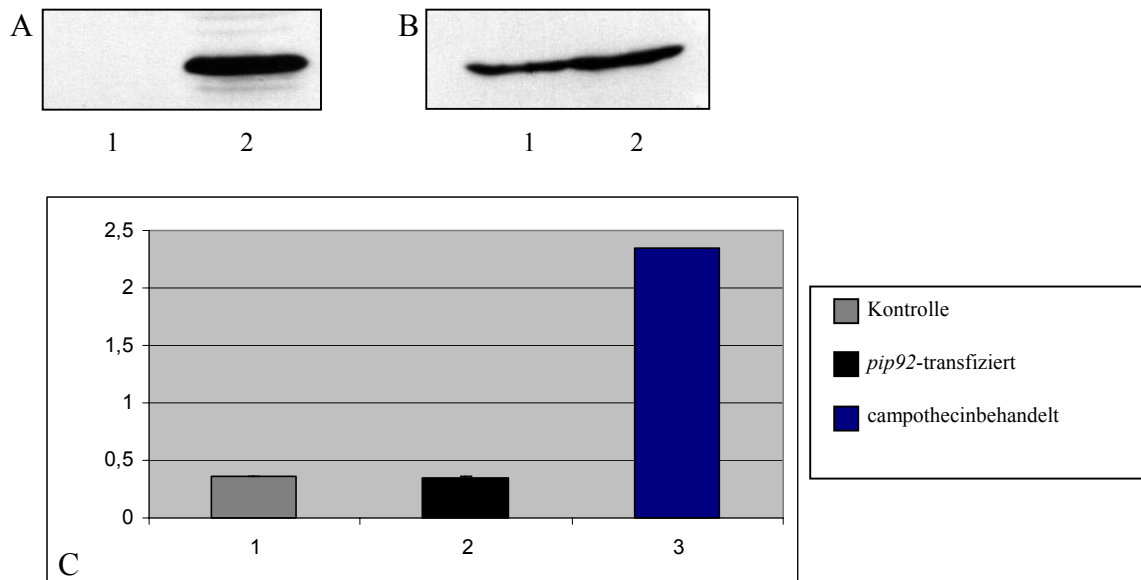


Abb. 4: *pip92*-Überexpression verstärkt nicht die Apoptose in logarithmisch wachsenden Bsp73 1AS-Zellen *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des tranfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Gestripter und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelter Blot aus Abbildung A

C) 10^4 vektortransfizierte (Säule 1), *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte (Säule 2) Bsp73 1AS-Zellen sowie für 4h mit $5\mu\text{M}$ Camptothecin behandelte Zellen (Säule 3) wurden in $200\mu\text{l}$ lysiert und $20\mu\text{l}$ des Lysats auf Histone im Zytoplasma per Farbreaktion im ELISA-reader bei 405nm quantifiziert. Die Messung der Absorption bei 490 nm diente als Kontrolle der Hintergrundabsorption der eingesetzten ABTS-Lösung. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

3.3 Einfluss von exogenem Pip92 auf die Proliferation von Bsp 73 1AS- und Bsp73 ASML-Zellen

Endogenes *pip92* wird in gehungerten NIH 3T3-Zellen nach Serumstimulation kurzzeitig während des G0/G1-Übergangs exprimiert (Lau & Nathans, 1985),(Charles et al., 1990). Ein Zeitpunkt also, an dem Zellen in den Zellzyklus eintreten, was zur Zellteilung führt. Auch in stark proliferativen Organen kann *pip92*-Expression beobachtet werden (Charles et al., 1990). Krebszellen proliferieren stark und histologische Analysen zeigen, dass *pip92* in etlichen Tumoren exprimiert wird (Boden, 2002; Novac, 2001). Es ist vorstellbar, dass exogen zugeführtes Pip92 einen Einfluss auf die Proliferation von Bsp73 1AS-Zellen zeigt. Um dies zu untersuchen, wurden diese Zellen transient mit dem Expressionsvektor Pip92/V5/pcDNA3.1 oder als Kontrolle mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert. Anschließend wurde die Proliferation mittels Messung des Einbaus von radioaktiv markierten Thymidins in die neu synthetisierte DNA quantifiziert. Berechnet wurden Mittelwerte aus 6 unabhängigen Messungen. Als Transfektionskontrolle diente ein Lysat der transfizierten Zellen. Nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot erfolgte der Nachweis des V5-getagten Pip92-Proteins.

Abbildung 5A zeigt die Detektion des getagten Pip92 (Spur2). Als Ladekontrolle diente β -Aktin in beiden Lysaten, nachgewiesen mittels eines spezifischen anti- β -Aktin-Antikörpers (Abbildung 5B Spur 1 und 2).

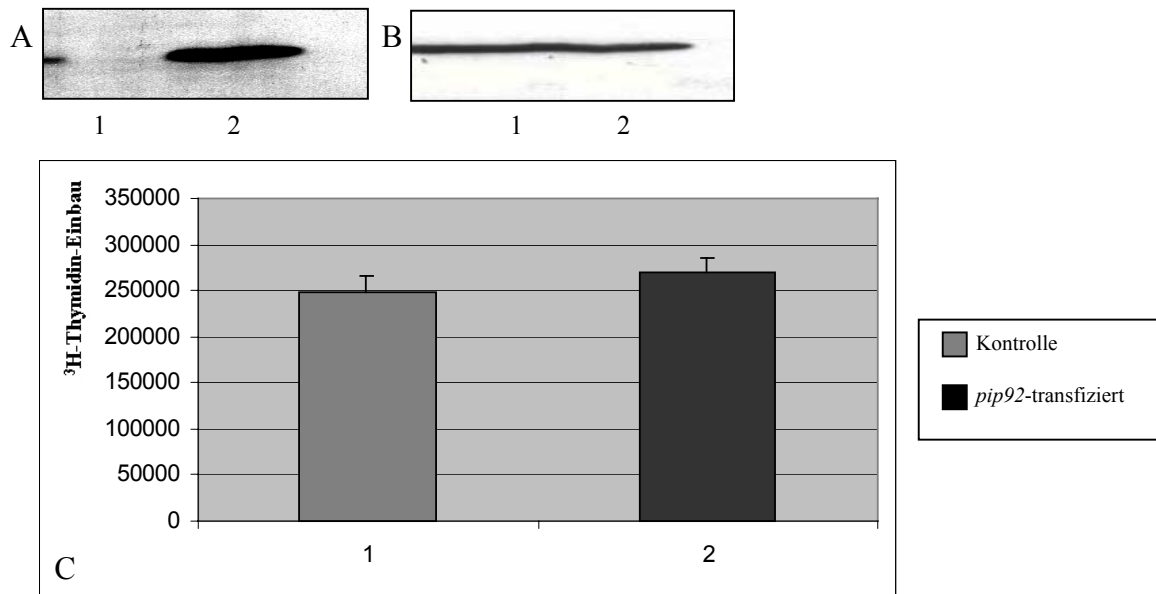


Abb. 5: *pip92*-Überexpression in logarithmisch wachsenden Bsp73 1AS-Zellen hat keinen Einfluss auf die Proliferation *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des tranfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C) ^3H -Thymidineinbauraten von Kontroll- (Säule 1) oder *pip92*-Expressionskonstrukt (Säule 2) -transfizierten Bsp73 1AS-Zellen. 10^4 Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in 96-Loch-Platten ausgesät und ihnen für 8 h ^3H -Thymidin angeboten. Die emittierte β -Strahlung wurde quantifiziert und graphisch dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Messungen.

Falls Pip92 einen Einfluss auf den Zellzyklus ausübt, sollte auch eine Veränderung in der Menge des eingebauten Thymidins sichtbar sein. Dies ist jedoch nicht der Fall. Abbildung 5C zeigt, dass sich die Proliferationsraten nicht unterscheiden. Sowohl kontrollvektortransfizierte (Säule 1), als auch mit dem *pip92*-Expressionsvektor transfizierte Zellen (Säule 2) zeigen die gleiche Einbauraten an Thymidin.

Wie ist die Situation in der stark metastasierenden Zelllinie Bsp73 ASML? Hier ist die Menge an endogenem Pip92 hoch, verglichen mit der schwach metastasierenden Bsp 73 1AS-Zelllinie (Novac, 2001) (von Stein et al., 1997). Bewirkt exogen zugeführtes Pip92 hier eine Änderung in der Proliferation? Um dies zu beantworten, wurden diese Zellen genau wie für 1AS-Zellen beschrieben transfiziert und die Proliferation durch Quantifikation des Thymidineinbaus gemessen. Abbildung 6A zeigt, dass Pip92 in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden kann (Spur 2). Es wurden gleiche Proteinmengen geladen, wie das Signal von β -Aktin beweist (Abbildung 6B, Spur 1 und 2). Die Proliferation unterscheidet sich auch hier nicht. Beide Zelllinien zeigen ähnliche Thymidineinbauraten (Abbildung 6C

vergl. Säule 1 mit Säule 2), was einen Einfluss von Pip92 auf den Zellzyklus auch in diesen Zellen unter den gewählten Bedingungen ausschließt.

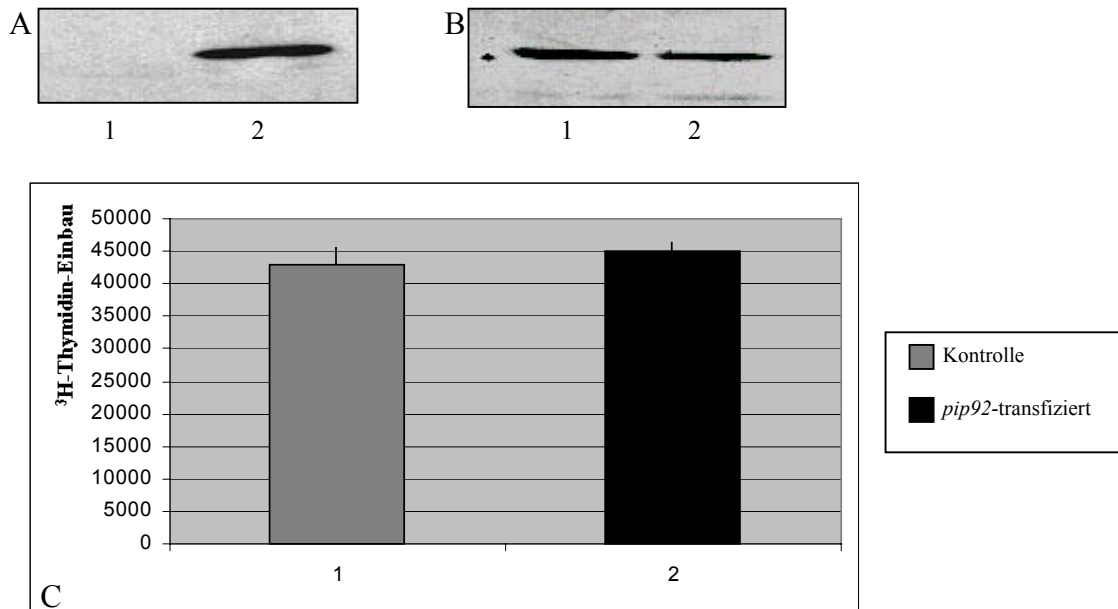


Abb. 6: *pip92*-Überexpression in logarithmisch wachsenden Bsp73 ASML-Zellen hat keinen Einfluss auf die Proliferation *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des tranfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C) ^3H -Thymidineinbauraten von Kontroll- (Säule 1) oder *pip92*-Expressionskonstrukt (Säule 2) -transfizierten Bsp73 ASML-Zellen

10^4 Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in 96-Loch-Platten ausgesät und ihnen für 8 h ^3H -Thymidin angeboten. Die emittierte β -Strahlung wurde quantifiziert und graphisch dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 6 unabhängigen Messungen.

3.4 Pip92 begünstigt die Schließung einer künstlichen Wunde im Zellkulturversuch bei Bsp73 1AS-Zellen

Um Metastasen zu bilden, müssen Zellen eines Primärtumors spezifische Eigenschaften entwickeln, die sie dazu befähigen invasiv zu werden und sekundäre Tumoren zu bilden. In solchen Zellen läuft ein, verglichen mit den Zellen des Primärtumors, verändertes genetisches Programm ab (nach: Cancer Medicine, 6th ed.) Pip92 ist ein Gen, das sowohl in einigen metastasierenden Zelllinien als auch in aktivierten T-Zellen zu finden ist (Novac, 2001). Beides weist auf eine Rolle für Pip92 in Zellmigrationsprozessen hin.

Es konnte bereits bewiesen werden, dass überexprimiertes *pip92* in Bsp73 1AS-Zellen die invasive Wanderung durch Matrigel erhöht (Novac, 2001). Der Wundheilungsversuch sollte zeigen, ob solche Zellen auch in der Lage sind eine künstliche Wunde in einer Einzelzellschicht schneller zu schließen. Hierzu wurden mit Hilfe einer 1000 μ l-Pipettenspitze Zellen entfernt und das Zuwachsen dieser künstlichen Wunde über 3 Tage hinweg dokumentiert. Am Tag 3 erfolgte die Lyse der Zellen und eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Gesamtzelllysate. Detektion des transfizierten *pip92* erfolgte nach dem Blotting auf eine Nylonmembran mit Hilfe eines spezifischen anti-V5-Antikörpers. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin mit einem spezifischen anti- β -Aktin-Antikörper.

Abbildung 7A zeigt, dass die transfizierten Zellen auch am Tag 3 noch *pip92* überexprimieren (Spur 2) und dass gleiche Mengen an Proteinextrakt geladen wurden (siehe β -Aktin-Signal in beiden Lysaten; Abbildung 7B, Spur 1 und 2). Der Effekt dieser Überexpression ist in Abbildung 7D zu sehen: *pip92*-überexprimierende Zellen (rechtes Bild) schließen die Wunde schneller als die kontroll-transfizierten Zellen (linkes Bild). Dies bekräftigt die Hypothese, dass Pip92 die Zellmigration positiv beeinflusst. Die Quantifizierung ergibt eine ca. 3-fach erhöhte Zellzahl im inneren Wundbereich (vergl. Abbildung 7E Säule 1 mit Säule 2)

Ergebnisse

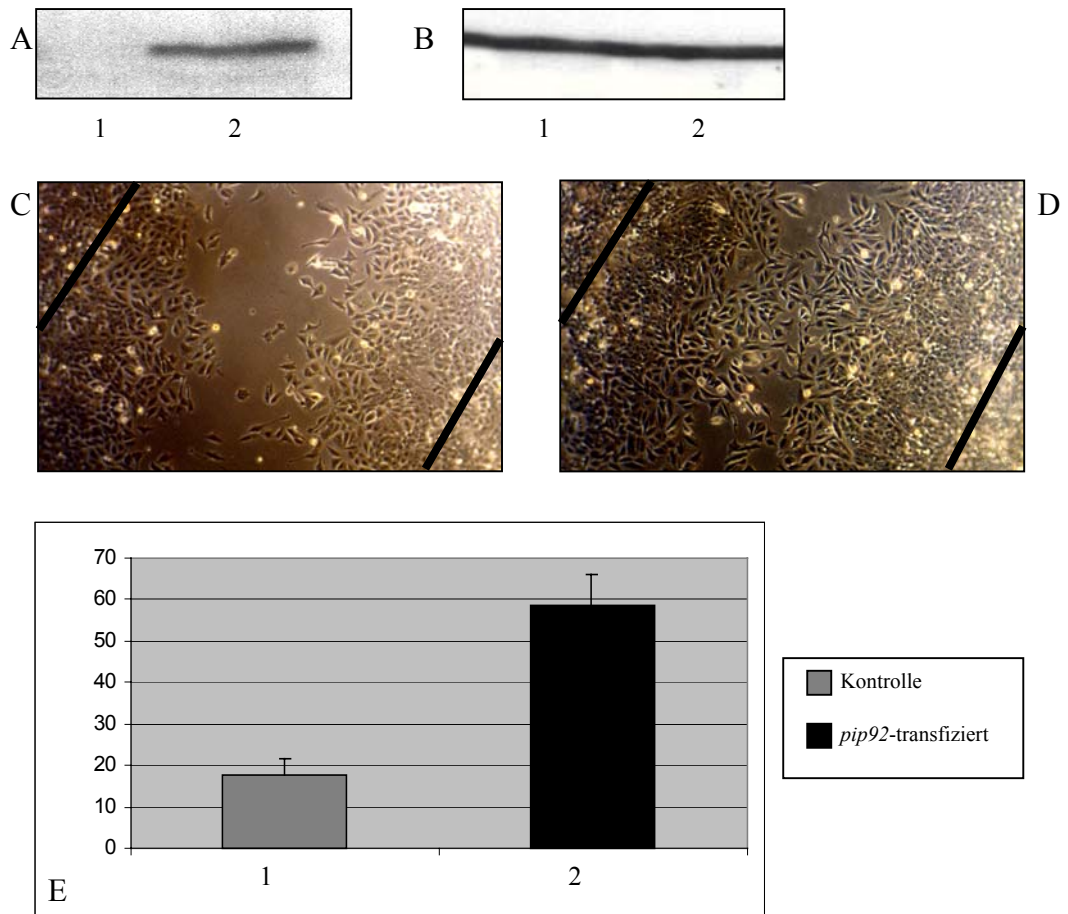


Abb. 7: *pip92*-Überexpression in Bsp73 1AS-Zellen begünstigt die Wundschließung *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten (gesammelt nach Dokumentation am Tag 3) der transfizierten Zellen. Detektion des transfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers
Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Blot aus Abbildung A, gestriipt und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C+D) Aus einer Einzelzellschicht wurden Zellen entfernt und die verbleibenden mit *pip92*- oder Kontroll-Expressionskonstrukt transfiziert. Zu sehen sind Lichtbilder von der künstlichen Wunde der kontrolltransfizierten (c) oder *pip92*-transfizierten (D) Zellen am Tag 3 nach Transfektion. Die schwarzen Linien zeigen die Ränder der ursprünglichen „Wunde“ am Tag 1.

E) Quantifizierung der in den inneren Wundbereich eingewanderten Zellen. Die Anzahl der vektortransfizierten (Säule 1) und *pip92* (Säule 2) -transfizierten Zellen in vier 800 μm^2 großen inneren Wundbereichen wurde bestimmt und die Mittelwerte graphisch dargestellt.

3.5 Einfluss von exogenem Pip92 auf die Zelladhäsion an Basallamina- und ECM-Bestandteile in Bsp73 1AS-Zellen

Um Metastasen zu bilden, müssen die Zellen des Primärtumors mehrere Barrieren überwinden. Zuerst müssen sie an die Basallamina der Organe und Gefäße adhären, diese abbauen und danach die extrazelluläre Matrix (ECM) durchwandern. Hierzu müssen Bindungen zu den Komponenten der Basallamina und ECM aufgebaut und gelöst werden.

Kann die erhöhte Zellmigration (Abbildung 7) mit einer alterierten Adhäsion an diese Komponenten korreliert werden? Um diese Fragen zu beantworten, wurden die Zellen mit einem *pip92*-Expressionskonstrukt oder Kontrollvektor transient transfiziert und jeweils 20000 Zellen für 1 Stunde auf 96-Loch-Zellkulturschalen ausgesät. Die 96-Loch-Platten wurden zuvor über Nacht oder für 1 Stunde bei 37°C im Zellkulturbrutschrank mit Fibronectin (10µg/ml in PBS), Kollagen (10µg/ml in PBS), Hyaluronsäure (1mg/ml), Kollagen Typ IV (10µg/ml in PBS), Laminin (10µg/ml in PBS) oder zur Kontrolle einer unspezifischen Bindung mit Rinderserumalbumin (40µg/ml in PBS) behandelt. Adhärenente Zellen wurden fixiert und mit einer 0,1% Kristallviolett-Lösung gefärbt. Nachfolgendes Entfärben mit 10% Essigsäure und Messung der optischen Dichte bei 595nm ermöglichte die Quantifizierung der adhärenierten Zellen. Die *pip92*-Überexpression wurde auf Western-Blot-Ebene durch einen spezifischen anti-V5-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis des β -Aktins in beiden Zelllysaten.

Abbildung 8A zeigt in Spur 2 das Signal des exogenen Pip92. Spur 1 und 2 in Abbildung 8B zeigen die Signale des β -Aktins in beiden Lysaten. Die Transfektion war erfolgreich.

Dennoch führt Überexpression von *pip92* nicht zu signifikanten Unterschieden bei der Adhäsion an ECM- und Basallamina-Komponenten. Beide Zelllinien adhären sehr stark an Fibronectin und Laminin. Die Bindungsstärke an Kollagen, Hyaluronsäure oder Kollagen Typ IV entspricht der unspezifischen Bindung an BSA (vergl. in Abbildung 8C graue mit schwarze Säulen).

Ergebnisse

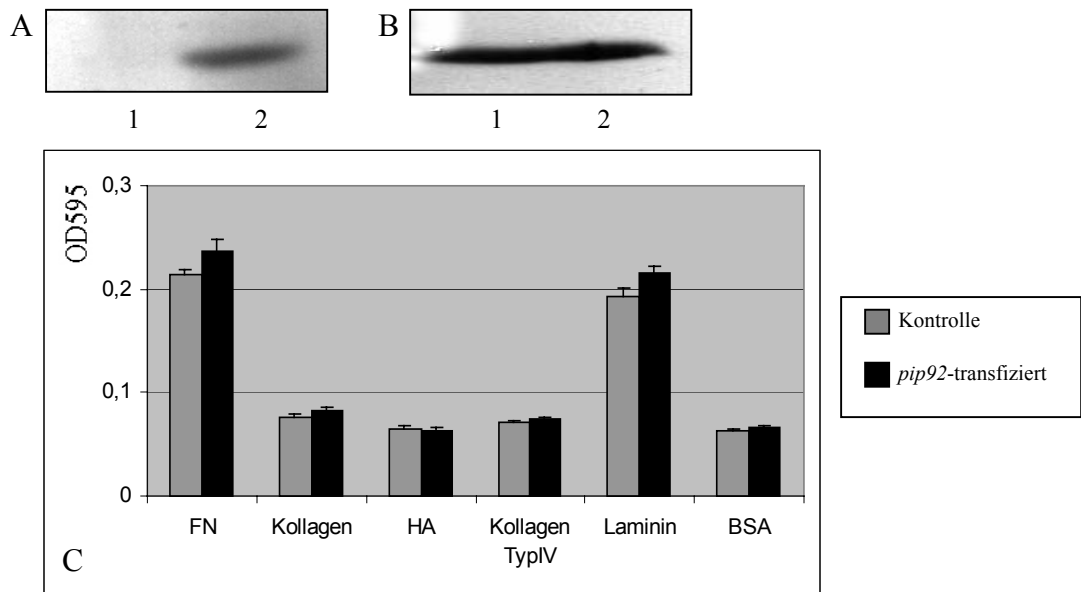


Abb. 8: Erhöhte Expression von *pip92* hat keinen Einfluss auf die Adhäsion an ECM- und Basallaminakomponenten von Bsp73 1AS-Zellen *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des transfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C) $4 \cdot 10^4$ Kontroll- (graue Säulen) oder *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierten Bsp73 1AS-Zellen (schwarze Säulen) wurden 24 h nach Transfektion auf Fibronectin (FN), Kollagen, Hyaluronsäure (HA), Kollagen Typ IV, Laminin und Rinderserumalbumin (BSA)-behandelte Zellkulturplatten ausgesät und nach 45 min fixiert. Nach Färbung der Zellen mit 0,1% Kristallviolett und Entfärbung in 10% Essigsäure wurde die Optische Dichte (OD) bei 595nm im ELISA-reader gemessen. Die Absorption von 10% Essigsäure bei 595 nm wurde von den Messwerten subtrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Überexpression von *pip92* in den pankreatischen Adenokarzinomazellen keinen Einfluss auf die Proliferation hat, allerdings die Zellwanderung im Wundheilungsversuch begünstigt. Dies kann nicht mit einer veränderten Adhäsion an ECM- oder Basallamina-Komponenten korreliert werden.

Kapitel II: Versuchssystem NIH 3T3-Fibroblasten

3.6 Funktion von Pip92 in NIH 3T3-Fibroblasten

Krebszellen sind genomisch instabil und haben multiple Mutationen angehäuft. Dadurch sind viele Zelleigenschaften verändert. Um die Funktion von Pip92 in nicht transformierten Zellen zu studieren, wurden immortalisierte NIH 3T3-Fibroblasten als Versuchsobjekt gewählt.

Diese Zelllinie exprimiert *pip92* während des G0/G1-Übergangs in einer Art, die der Expression von *immediate early genes* (IEGs) entspricht (Charles et al., 1990; Lau & Nathans, 1985).

Zum anderen akkumuliert das Protein in einer IEG-untypischen Weise für mehrere Stunden nach Behandlung mit dem apoptoseauslösenden Anisomycin.

Dies lässt vermuten, dass das Protein in Fibroblasten mehrere Funktionen besitzt. Die folgenden in NIH 3T3-Fibroblasten durchgeführten Versuche sollen einen tieferen Einblick in das Verständnis der Pip92-Funktion im Zellzyklus bzw. bei der Apoptose-Regulation geben.

Zusätzlich soll geklärt werden, ob Pip92 wie bei den pankreatischen Bsp73 1A5-Krebszellen einen Einfluss auf die Motilität, bzw. das invasive Verhalten hat.

3.7 Seruminduktion von Pip92 in ruhenden NIH 3T3-Fibroblasten

Pip92 wird in ruhenden Fibroblasten während des durch Serum stimulierten Übergangs von der G0-Phase zur G1-Phase transient induziert. (Charles et al., 1990; Lau & Nathans, 1985). Um dies im Western-Blot zu bestätigen, wurden subkonfluente NIH 3T3-Fibroblasten für 2 Tage bei 0,6% FCS in DMEM gehungert und anschließend für bis zu 2 Stunden mit 10% FCS in DMEM stimuliert. Daraufhin wurden Ganzzelllysate hergestellt, die mit Hilfe eines polyklonalen, spezifisch Pip92 erkennenden Antikörpers auf Pip92 analysiert wurden.

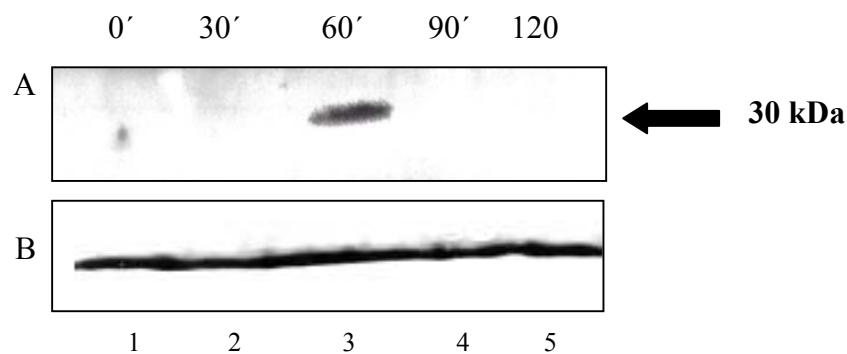


Abb. 9: Seruminduktion von Pip92 in ruhenden, subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten

Subkonfluente NIH 3T3-Fibroblasten wurden für 48h in Hungermedium kultiviert und anschließend für 1h durch DMEM-20%FCS stimuliert und lysiert. Der Nachweis von Pip92 erfolgte mit Hilfe des polyklonalen anti-Pip92-Antikörpers N 567im Westernblot.

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten ruhender, serumstimulierter Fibroblasten Spur 1: ohne Seruminduktion, Spur 2: 30' Seruminduktion, Spur 3: 60' Seruminduktion, Spur 4: 90' Seruminduktion, Spur 5: 120' Seruminduktion

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt

Es ist zu erkennen, dass Serumstimulation zu einer transienten Akkumulation von Pip92 nach einer Stunde führt. Nach bereits 90 Minuten kann mit dieser Technik kein Pip92 mehr nachgewiesen werden (Abbildung 9A, Spur 1-5). Das Signal von β -Aktin bestätigt, dass gleiche Mengen an Protein geladen wurden (Abbildung 9B, Spur 1-5). Die Ergebnisse bestätigen mittels Western-Blot die Beobachtungen von N. Novac (2001), Charles (1990) und Lau (1985).

3.8 Subzelluläre Lokalisation von Pip92 in NIH 3T3-Fibroblasten

Viele Proteine erfüllen ihre Funktion erst, wenn sie sich im passenden Zellkompartiment befinden. Ein bekanntes Beispiel ist NFκB, das inaktiv an seinen Inhibitor gebunden im Zytoplasma vorliegt und erst nach Freisetzung von diesem in den Kern transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor agiert. Andere Proteine haben in verschiedenen Zellkompartimenten unterschiedliche Funktionen. Cytochrom *c* ist ein Beispiel hierfür. Im Mitochondrium ist es ein Teil der Atmungskette, im Zytoplasma induziert es die Apoptose.

Obwohl die Aminosäuresequenzanalyse für Pip92 zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS) enthüllt (Novac, 2001), konnte das Protein in 3T3-Zellen bisher nur im Zytoplasma lokalisiert werden (Charles et al., 1990). Erste Hinweise, dass sowohl das endogen als auch exogen zugeführte Pip92 im Kern lokalisiert ist (Novac, 2001), lassen vermuten, dass das Protein zwischen Kern und Zytoplasma transloziert, was eventuell mit funktionellen Konsequenzen verbunden ist.

Welche Bedingungen führen nun zu einer Akkumulation im Kern, bzw. im Zytoplasma?

Vorläufige immunfluoreszenzische Pip92-Lokalisation in Fibroblasten zeigten, dass das seruminduzierte Protein in ein und derselben Zellpopulation im Kern und Zytoplasma vorzufinden war. Es schien, dass Zellen mit mehr Zell-Zell-Kontakten das Protein im Zytoplasma akkumulierten, Zellen mit geringer Zelldichte das Protein im Kern lokalisiert hatten (nicht gezeigte Daten). Um eine genaue Beziehung von Zelldichte und subzellulärer Lokalisation des Proteins herzustellen, wurde die Lokalisation des seruminduzierten Pip92 in 3T3-Zellen unterschiedlicher Zelldichten (10000, 50000 oder 100000 Zellen/cm²) per Immunfluoreszenz mit Hilfe eines monoklonalen anti-Pip92-Antikörpers untersucht. Hierbei zeigte sich, dass das Protein sowohl bei konfluenten als auch bei subkonfluenten Zellen akkumuliert. Western-Blot-Analysen von Ganzzelllysaten bestätigen dies (Daten nicht gezeigt). Die subzelluläre Lokalisation des seruminduzierten Proteins unterscheidet sich jedoch. Abhängig von der Zelldichte kann das Protein entweder im Zytoplasma (bei 100000 Zellen/cm²) oder im Kern (bei 10000 Zellen/cm²) lokalisiert werden (vergl. Abbildung 10A und B). Eine Zelldichte von 50000 Zellen/cm² zeigt eine Mischpopulation aus Zellen, die das Protein im Kern akkumuliert haben und solchen, bei denen es im Zytoplasma vorliegt (Daten nicht gezeigt). Sowohl Färbung mit einem unspezifischen, isotypgleichen monoklonalen Antikörper als auch Behandlung der Zellen nur mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper zeigte, dass das Signal Pip92-spezifisch ist (Daten nicht gezeigt).

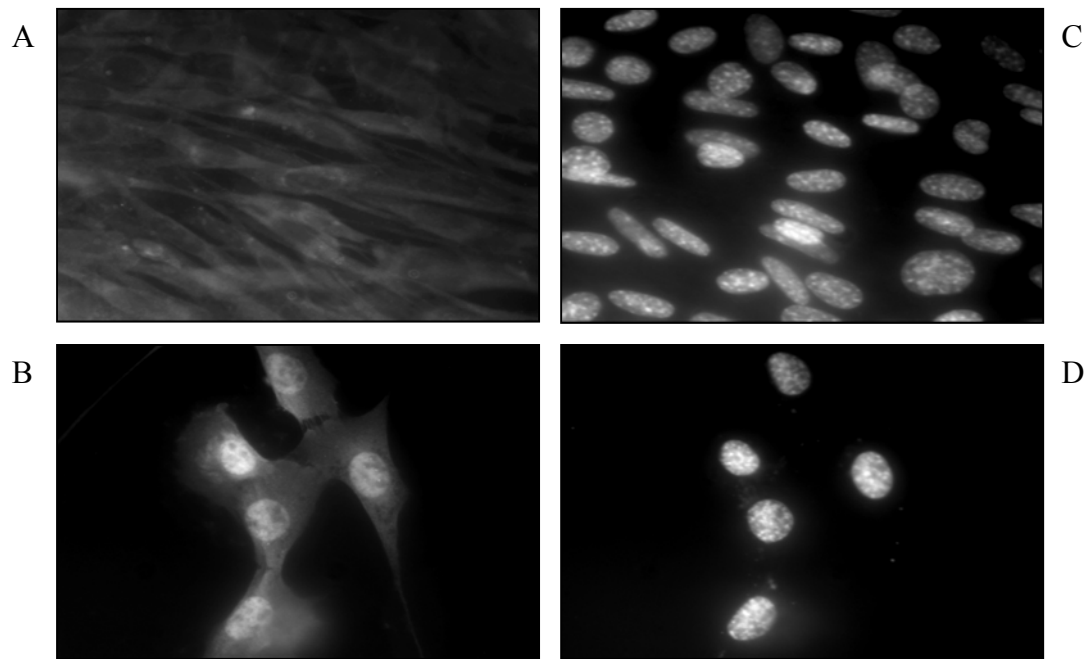


Abb. 10: Seruminduziertes Pip92 ist je nach Zelldichte in unterschiedlichen Zellkompartimenten

Immunfluoreszenzanalysen von konfluenten (A) und subkonfluenten (B) NIH 3T3-Fibroblasten. Die Zellen wurden für 48h in Hungermedium kultiviert und anschließend für 1h durch DMEM-20%FCS stimuliert, fixiert und die subzelluläre Lokalisation des Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörper 1A2 analysiert. Zweitantikörper: anti-Maus-FITC-gekoppelt. Die Färbung des Chromatins erfolgte durch DAPI, das der Zweitantikörperlösung in der Konzentration 0,1 mg/ml zugesetzt war.

C) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung A

D) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung B

Demselben Mechanismus ist auch das ektopische Pip92 unterworfen. Durch Integration des *pip92*-Expressionskonstrukts in das Genom von 3T3-Zellen konnten konstitutiv *pip92*-überexprimierende Klone hergestellt werden. V5-getagtes Pip92 wurde mit Hilfe eines monoklonalen, gegen den V5-Tag gerichteten Antikörpers analysiert. Abbildung 11 zeigt als Beispiel einen *pip92*-überexprimierenden Klon. Auch hier kann Pip92 bei subkonfluenten Zellen im Kern nachgewiesen werden, während es bei konfluenten Zellen im Zytoplasma zu finden ist (vergl. Abbildung 11A und B). Vektortransfizierte Klone, bzw. Behandlung der Zellen nur mit Zweitantikörper zeigen keine Pip92-Färbung (Daten nicht gezeigt).

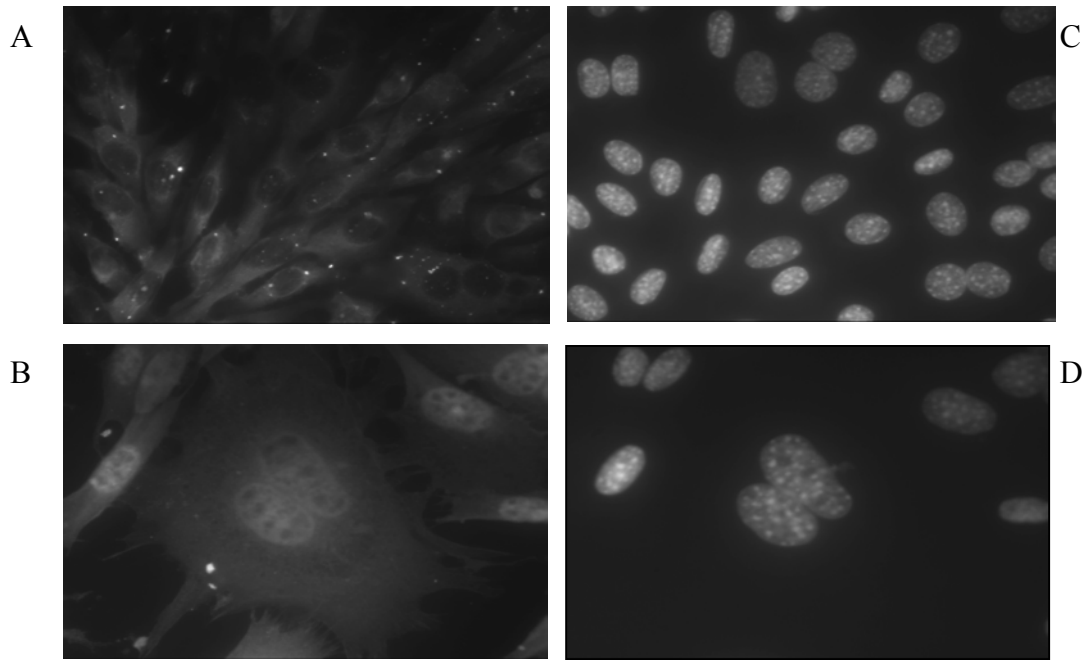


Abb. 11: Ektopisches Pip92 transloziert in gleicher Weise wie seruminduziertes Pip92

Immunfluoreszenzanalysen eines *pip92*-überexprimierenden Klons. Die Zellen wurden entweder konfluent (A) oder subkonfluent (B) ausplattiert und die subzelluläre Lokalisation des ektopischen Pip92 mit Hilfe eines monoklonalen anti-V5-Antikörpers analysiert. Zweitantikörper: anti-Maus-FITC-gekoppelt. Die Färbung des Chromatins erfolgte durch DAPI, das der Zweitantikörperlösung in der Konzentration 0,1 mg/ml zugesetzt war. C) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung A
D) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung B

Die Beobachtung, dass das Protein bei serumstimulierten, subkonfluenten Zellen im Kern zu finden ist, führte zu der Spekulation, dass das Protein bei subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten konstitutiv im Kern vorzufinden ist, unabhängig von Stimuli.

Deshalb wurden sowohl unstimulierte, ruhende Fibroblasten als auch im Vollmedium kultivierte Fibroblasten verschiedener Zelldichten mittels Immunfluoreszenz auf die Lokalisation von Pip92 untersucht.

Abbildung 12B und 12D zeigen, dass Pip92 jeweils in subkonfluenten Zellen im Kern nachgewiesen werden kann. Die konfluenten Zellen zeigen eine sehr schwache zytoplasmatische Färbung (siehe Abbildung 12A; bzw. Abbildung 12C). Pip92 ist bei subkonfluenten Fibroblasten konstitutiv im Kern lokalisiert. Die Spekulation erwies sich als korrekt.

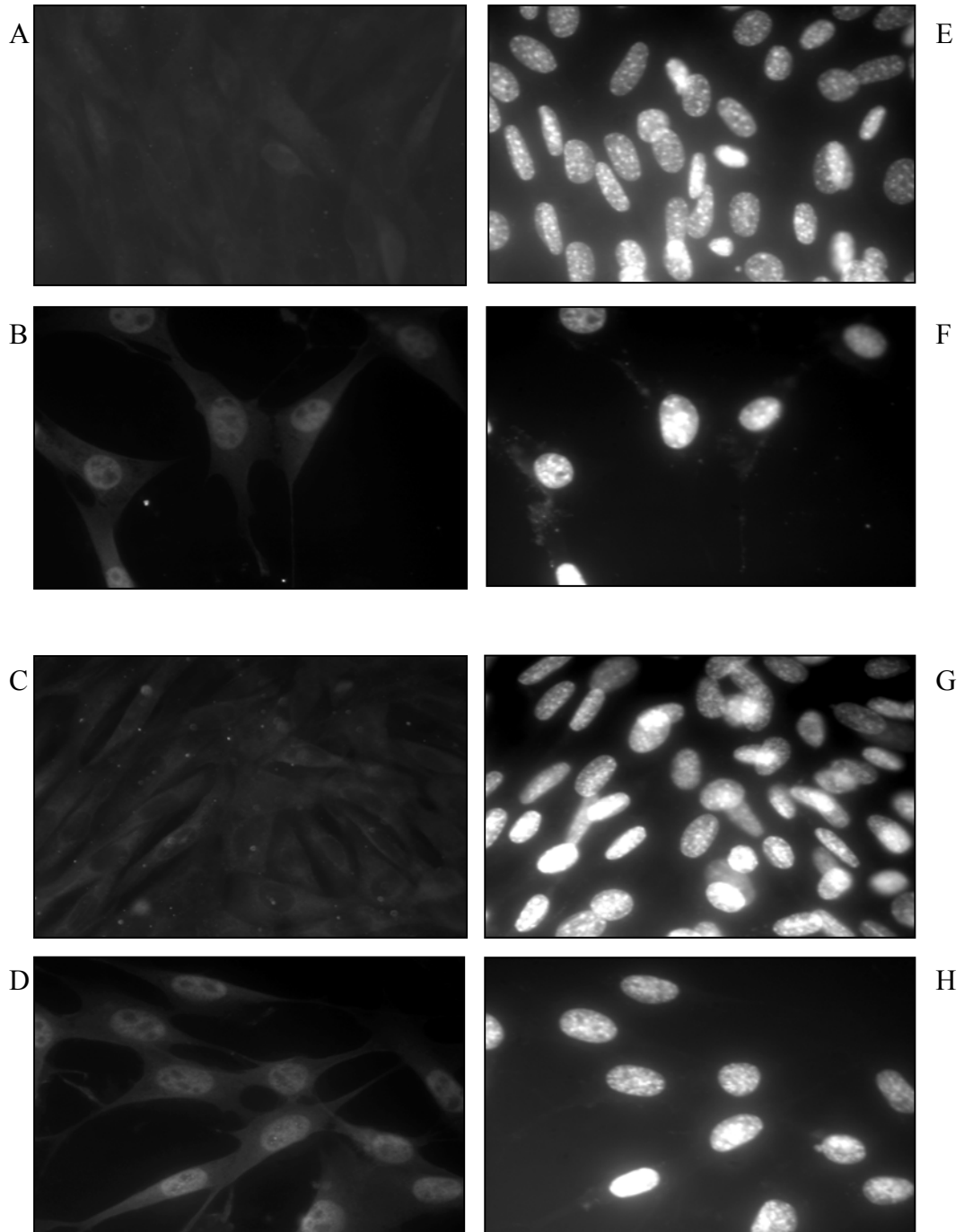


Abb. 12: Pip92 ist bei subkonfluenten Fibroblasten konstitutiv im Kern lokalisiert

Immunfluoreszenzanalysen von ruhenden konfluenten (A) und subkonfluenten (B) NIH 3T3-Fibroblasten. Die Zellen wurden für 48 h in Hungermedium kultiviert, fixiert und die subzelluläre Lokalisation des Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörpers 1A2 analysiert. Zweitantikörper: anti-Maus-FITC-gekoppelt. Die Färbung des Chromatins erfolgte durch DAPI, das der Zweitantikörperlösung in der Konzentration 0,1 mg/ml zugesetzt war. Immunfluoreszenzanalysen von in Vollmedium kultivierten, konfluenten (C) und subkonfluenten (D) NIH 3T3-Fibroblasten. Die Zellen wurden für 24h in Vollmedium kultiviert, fixiert und die subzelluläre Lokalisation des Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörper 1A2 analysiert. Zweitantikörper: anti-Maus-FITC-gekoppelt. Die Färbung des Chromatins erfolgte durch DAPI, das der Zweitantikörperlösung in der Konzentration 0,1 mg/ml zugesetzt war.

E) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung A

F) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung B

G) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung C

H) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung D

3.9 Brechung der Kontaktinhibition führt zur Akkumulation von Pip92 im Kern

Die Immunfluoreszenzanalysen lassen vermuten, dass die Kontaktinhibition der Schlüsselreiz ist, der die Kern-Zytoplasma-Translokation von Pip92 steuert.

Somit sollte in Fibroblasten, welche die Kontaktinhibition verloren haben, das Protein im Kern akkumulieren.

Um dies zu überprüfen, wurden aus einer Einzelzellschicht Fibroblasten mit Hilfe einer 1000 μ l Pipettenspitze Zellen entfernt, so dass eine künstliche Wunde entstand. Sofort nach dem Entfernen der Zellen, bzw. nach einer Stunde wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenz die subzelluläre Lokalisation des Pip92 überprüft. Es zeigte sich, dass die Zellen am Rand der künstlichen Wunde innerhalb einer Stunde Pip92 im Kern akkumuliert haben (Abbildung 13B). Die immer noch kontaktinhibierten, innerhalb der Einzelzellschicht gelegenen Zellen weisen kein Pip92 auf, genau wie die Zellen, die sofort nach Zufügung der Wunde fixiert wurden (Abbildung 13A). Dies erhärtet die Beobachtung, dass die Lokalisation von Pip92 von der Zelldichte abhängt und nicht kontaktinhibierte NIH 3T3-Fibroblasten Pip92 im Kern akkumulieren.

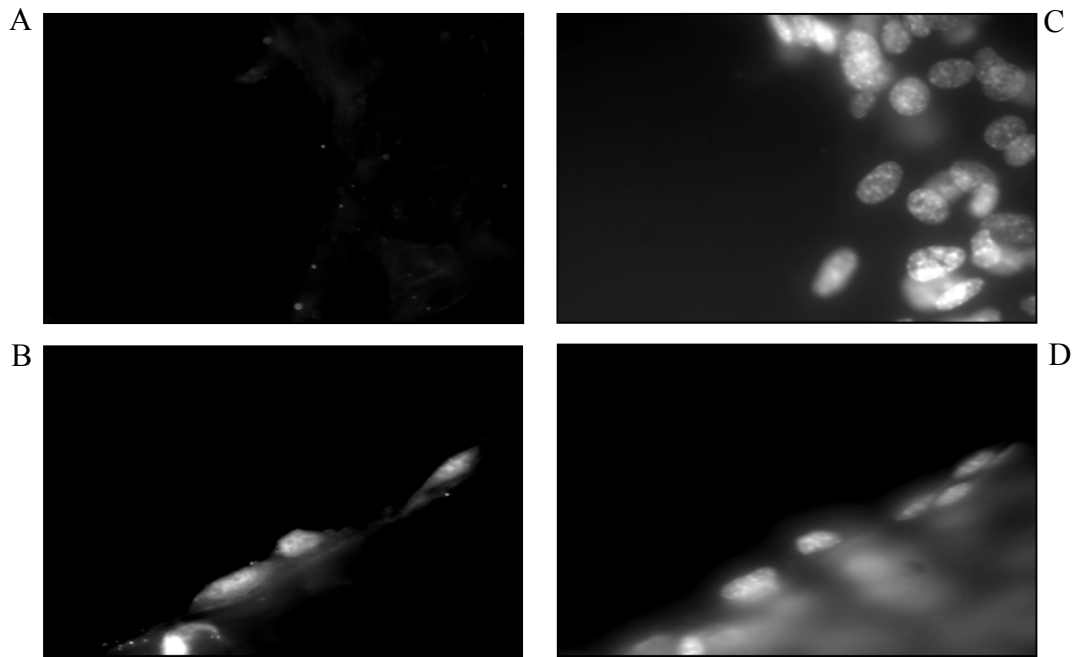


Abb. 13: Brechung der Kontaktinhibition von NIH 3T3-Fibroblasten lässt Pip92 im Kern akkumulieren
NIH 3T3-Fibroblasten wurden bis zur Konfluenz in Vollmedium kultiviert. Unmittelbar nach mechanischer Entfernung einiger Zellen (A) oder nach 1 h (B) wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt

Lokalisation des Pip92 erfolgte mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörpers 1A2. Zweitantikörper: anti-Maus-FITC-gekoppelt. Die Färbung des Chromatins erfolgte durch DAPI, das der Zweitantikörperlösung in der Konzentration 0,1 mg/ml zugesetzt war.

C) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung A

D) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung B

3.10 Blockierung des nukleären Exports durch Leptomycin B (LMB)

Was ist der mechanistische Hintergrund der Translokation?

Die Aminosäuresequenzanalyse des Pip92-Proteins zeigt neben zwei NLS (*nuclear localisation signal*) ein NES (*nuclear export signal*) zwischen den Aminosäuren 28 und 36. Es folgt der allgemeinen Formel LXLXXXLXL (Mattaj & Englmeier, 1998), wobei L die Aminosäure Leucin bedeutet und X eine beliebige Aminosäure sein kann. Dies ist die Erkennungssequenz für das Protein CRM1, welches den nukleären Export vermittelt. CRM-1 kann in seiner Funktion durch Leptomycin B geblockt werden. Diese ursprünglich aus dem Bakterium *Streptomyces sp.* isolierte Substanz ist in der Lage kovalent an CRM1 zu binden und somit die Interaktion zwischen CRM1 und den leucinreichen NES-Motiven der Zielproteine zu verhindern (Kudo et al., 1999).

Ob der nukleäre Export von Pip92 ebenfalls von CRM1 abhängt, sollte durch Leptomycin B-Behandlung der Fibroblasten festgestellt werden.

NIH 3T3-Fibroblasten wurden konfluent ausgesät und für 5 Stunden mit Leptomycin B (20nM) behandelt, fixiert und das Protein mit einem monoklonalen anti-Pip92-Antikörper in Immunfluoreszenzanalysen detektiert.

Als Positivkontrolle wurden Fibroblasten mit einem E1B-GFP-Expressionskonstrukt transfiziert. Der nukleäre Export dieses Proteins wird durch Leptomycin B geblockt (R. Stauber).

Es zeigt sich, dass die Behandlung mit Leptomycin B zu einer Anreicherung von Pip92 im Kern vieler konfluenten Zellen führt (Abbildung 14 A), während es bei unbehandelten Zellen dort nicht nachweisbar ist (Abbildung 14 B). Auch bei der eingesetzten Positivkontrolle war der nukleäre Export des E1B-GFP-Fusionsproteins nach Leptomycin B-Behandlung nicht bei allen Zellen unterbunden (Daten nicht gezeigt). Der Versuch beweist, dass das Protein aktiv mit Hilfe des Exportins CRM1 aus dem Kern transportiert wird.

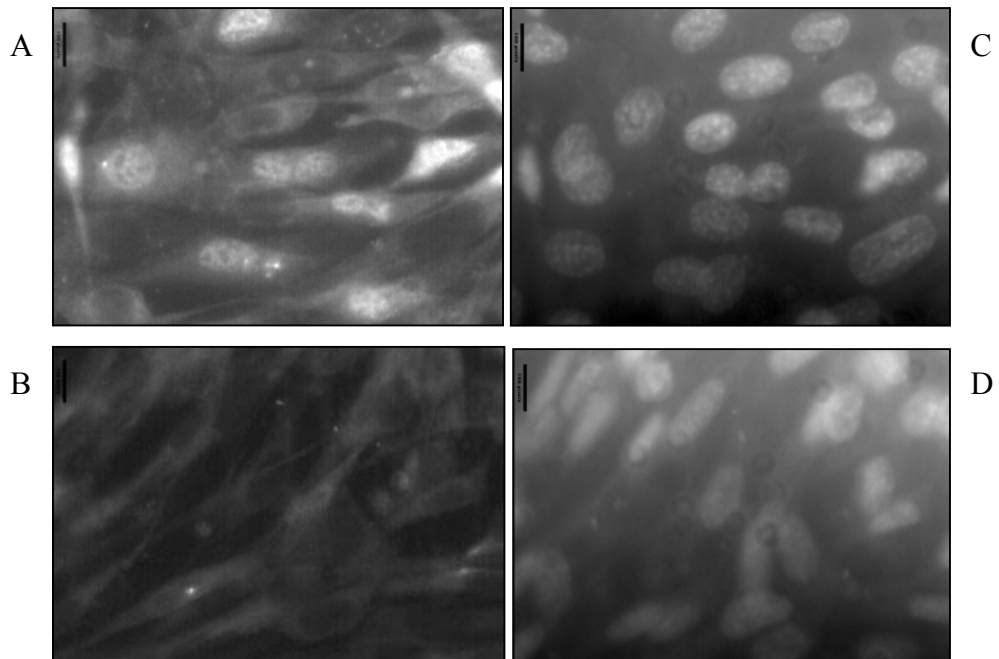


Abb. 14: Leptomycin B blockt den nukleären Export von Pip92 in konfluenten NIH 3T3-Zellen

Die Zellen wurden in Vollmedium in der unten angegebenen Konfluenz kultiviert und dem Kulturmedium für 5 h Leptomycin B [4ng/ml] zugesetzt (A), danach fixiert und Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Menge an 70% Methanol (B) (Lösungsmittel für Leptomycin B) dem Kulturmedium zugesetzt. Die subzelluläre Lokalisation des Pip92 wurde mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörpers 1A2 analysiert. Zweitantikörper: anti-Maus-FITC-gekoppelt. Die Färbung des Chromatins erfolgte durch DAPI, das der Zweitantikörperlösung in der Konzentration 0,1 mg/ml zugesetzt war.

- A) Konfluente, für 4h mit Leptomycin B (20 nM) behandelte NIH 3T3-Zellen
- B) Konfluente, kontrollbehandelte NIH 3T3-Zellen
- C) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung A
- D) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung B

3.11 Funktionelle Analysen

Pip92 wird in ruhenden Fibroblasten während des G0/G1-Übergangs kurzzeitig exprimiert (Charles et al., 1990; Lau & Nathans, 1985). Diese Tatsache könnte für eine regulatorische Funktion in der Zellzykluskontrolle bei Fibroblasten sprechen.

Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, welche die Funktion des Proteins in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zeigen sollen.

3.12 Effekt des posttranslationalen pip92-silencing auf den Eintritt in den Zellzyklus

Die Beobachtung, dass Pip92 am G0/G1-Übergang akkumuliert, führt zur Frage, ob das Protein den Eintritt in den Zellzyklus steuert.

Um dies zu beantworten, wurden subkonfluente, ruhende NIH 3T3-Fibroblasten mit einem si-pip92-Oligomer transfiziert, so dass sie nach Serumstimulation kein Pip92 mehr bilden konnten. Danach wurden die Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät, ³H-Thymidin angeboten und die Proliferationsrate durch Messung des eingebauten radioaktiven Thymidins quantifiziert. Als Vergleich wurde parallel ein unwirksames Oligomer transfiziert.

Abbildung 15A zeigt im Western-Blot, dass die Menge an Pip92 durch Transfektion mit dem pip92-spezifischen Oligomer dramatisch reduziert wurde (vergl. Spur 1 mit Spur 2). Das β -Aktin-Signal in beiden Zelllysaten lässt auf eine äquivalente Proteinmenge schließen (Abbildung 15B; vergl. Spur 1 mit Spur 2). Die Reduktion von Pip92 hat jedoch keinen Effekt auf die Proliferation. Beide Zelllinien proliferieren in gleichem Maße. (Abbildung 15C vergl. Säule 1 mit Säule 2).

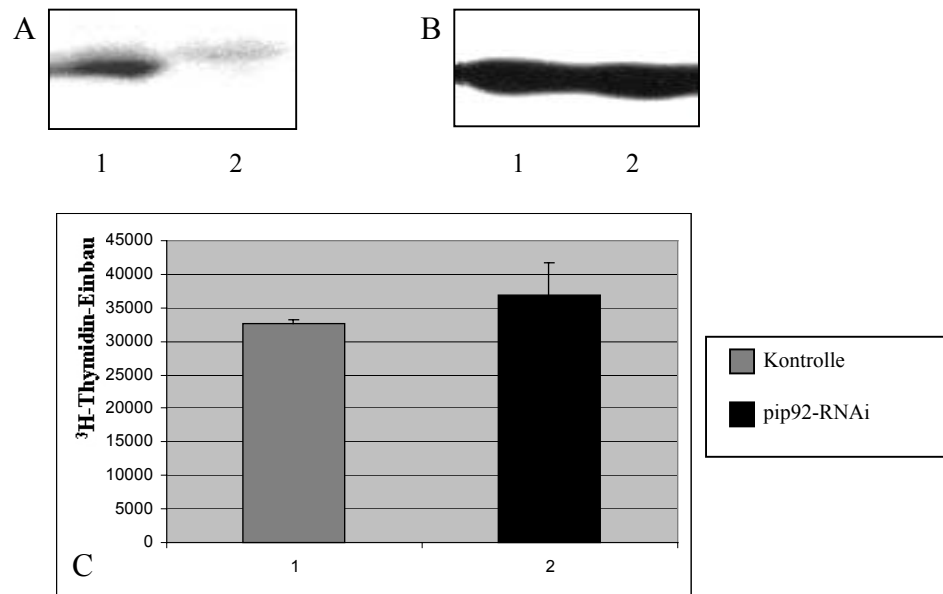


Abb. 15: Spezifische Reduktion der seruminduzierten Pip92-Menge verhindert nicht den Eintritt in den Zellzyklus *in vitro*

Subkonfluente Fibroblasten wurden 24 h in Hungermedium kultiviert, mit einem Kontroll- oder pip92-siRNA-Oligomer transfiziert und für weitere 24 h gehungert. Danach für 6 h mit DMEM-15% FCS stimuliert, dem ³H-Thymidin zugesetzt war. Die emittierte β -Strahlung wurde quantifiziert und graphisch dargestellt (C). Parallel subkonfluent ausplattierte Zellaliquots wurden verwendet, um nach 1h Serumstimulation gebildetes Pip92 im Western-Blot nachzuweisen (A+B)

A) Westernblotanalyse mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörpers 1A2 von Gesamt-Zelllysaten des seruminduzierten Pip92 in kontrolltransfizierten (Spur 1) und pip92-siRNA-Oligomer-transfizierten (Spur 2) Zellen.

B) Ladekontrolle: Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: pip92-siRNA-Oligomer-transfizierte Zellen

C) Grafische Darstellung der ³H-Thymidineinbauwerten von Kontroll- (Säule 1) oder pip92-Expressionskonstrukt (Säule 2) -transfizierten NIH 3T3-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen.

3.13 Einfluss von exogenem Pip92 auf die Proliferation von logarithmisch wachsenden NIH 3T3-Fibroblasten

Wie ist die Situation in logarithmisch wachsende Fibroblasten? Kann Pip92 hier den Zellzyklus beeinflussen?

Um dies zu beantworten, wurden Fibroblasten subkonfluent ausgesät und ansteigende Mengen an pip92-Expressionsvektor transfiziert.

Die Gesamtmenge der transfizierten DNA betrug 4 μ g. Hierbei stieg die des pip92-Expressionsvektors von 0 auf 4 μ g an, die Menge des Kontrollvektors nahm entsprechend von 4 auf 0 μ g ab. Dies hatte zur Folge, dass bei gleicher Proteinnmenge (siehe Signal des β -Aktins im Westen-Blot; Abbildung 16B Spur 1-4) mit steigender Menge an transfiziertem pip92-

Expressionsvektor das Pip92-Signal im Western-Blot verstärkt wurde (vergl. Abbildung 16A Spur 1-4). Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Proliferation, die anhand der Menge des eingebauten radioaktiven Thymidins ermittelt wurde (vergl. Abbildung 16C Säulen 1-4). Pip92 beeinflusst den Zellzyklus unter diesen Bedingungen nicht.

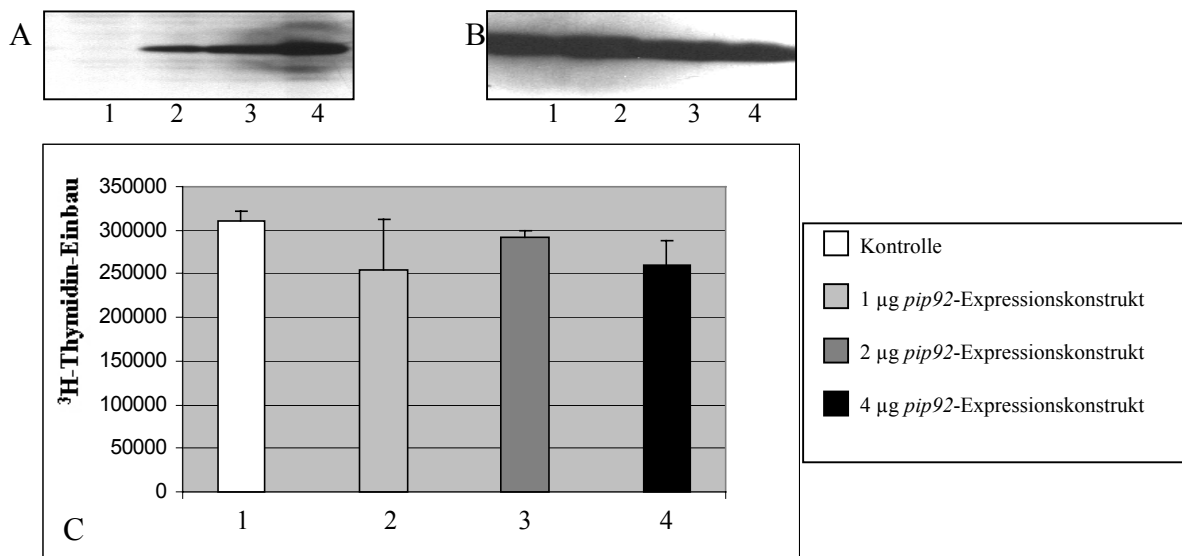


Abb. 16: *pip92*-Überexpression in subkonfluenten logarithmisch wachsenden NIH 3T3-Zellen hat keinen Einfluss auf die Proliferation *in vitro*

A+B) Kontrolle des transfizierten Pip92

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zellysaten der transfizierten Zellen. Detektion des transfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: mit 1 µg *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen, Spur 3: mit 2 µg transfiziert, Spur 4: mit 4 µg transfiziert

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti-β-Aktin-Antikörper behandelt. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: mit 1 µg *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen, Spur 3: mit 2 µg transfiziert, Spur 4: mit 4 µg transfiziert

C) ³H-Thymidineinbau von Kontroll- (Säule 1) und *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierten NIH 3T3-Zellen (Säulen 2-4). 10⁴ Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion in 96-Loch-Platten ausgesät und ihnen für 16 h ³H-Thymidin angeboten. Die emittierte β-Strahlung wurde quantifiziert und graphisch dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen Die Menge an transfiziertem *pip92*-Expressionskonstrukt nimmt von links nach rechts zu; die Gesamtmenge an transfizierter DNA betrug 4µg, was durch Zugabe von Kontrollvektor erreicht wurde: Säule 1: 0µg *pip92*, Säule 2: 1µg *pip92*, Säule 3: 2 µg *pip92*, Säule 4: 4 µg *pip92*. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen.

3.14 Einfluss von exogenem Pip92 auf die Apoptose von logarithmisch wachsenden NIH 3T3-Fibroblasten

Exogenes Pip92 zeigte auf logarithmisch wachsenden Bsp73 1AS-Zellen keinen proapoptotischen Effekt (siehe Abbildung 4). Doch sind dies transformierte Zellen, deren Apoptoseprogramm unter Umständen gestört ist. Hat Pip92 einen proapoptotischen Effekt auf logarithmisch wachsende nicht transformierte Fibroblasten?

Logarithmisch wachsende Maus-Fibroblasten wurden subkonfluent ausgesät, transient mit dem *pip92*-Expressionsvektor transfiziert und die ins Zytoplasma freigesetzten Histone als Maß für die Menge an apoptotischen Zellen quantifiziert. Die Durchführung erfolgte wie für Bsp73 1AS-Zellen beschrieben.

Ein lysiertes Aliquot der transfizierten Zellen wurde mittels Western-Blot auf das Vorhandensein von Pip92 überprüft. Abbildung 17A Spur 2 zeigt, dass dies der Fall ist. Behandlung des Blots mit einem spezifischen β -Aktin-Antikörper beweist, dass in beiden Lysaten gleiche Proteinmengen vorliegen (siehe Abbildung 17B Spur 1 und 2).

Ergebnisse

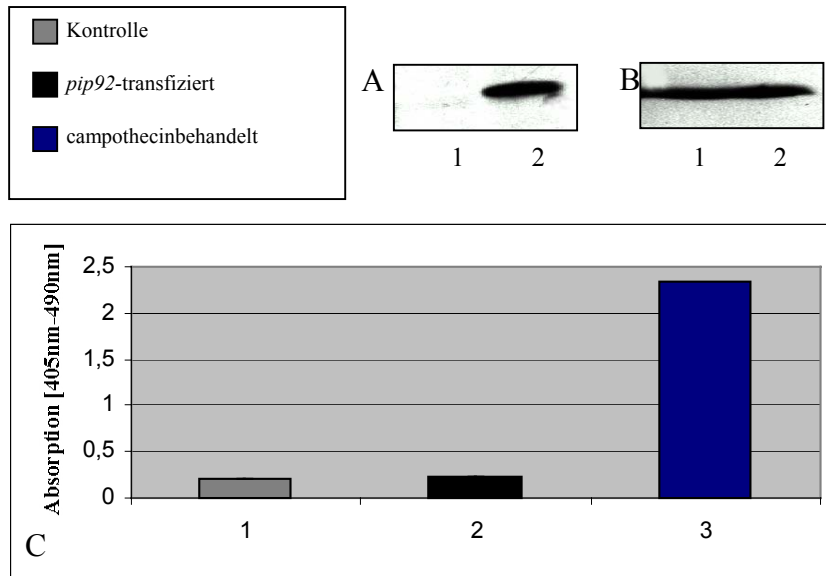


Abb. 17: *pip92*-Überexpression verstärkt nicht die Apoptose in logarithmisch wachsenden NIH 3T3-Zellen *in vitro*

A+B) Kontrolle der exogenen *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des tranfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Gestripter und mit anti-β-Aktin-Antikörper behandelter Blot aus Abbildung A

C) 10^4 vektortransfizierte (Säule 1), *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte (Säule 2) NIH 3T3-Zellen sowie für 4h mit 5μM Camptothecin behandelte Zellen (Säule 3) wurden in 200μl lysiert und 20 μl des Lysats auf Histone im Zytoplasma per Farbreaktion im ELISA-reader bei 405nm quantifiziert. Die Messung der Absorption bei 490 nm diente als Kontrolle der Hintergrundabsorption der eingesetzten ABTS-Lösung. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

Die Menge an apoptotischen Zellen ist in beiden Zelllinien sehr gering und unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den kontrolltransfizierten und den *pip92*-überexprimierenden Zellen (vergl. in Abbildung 17C Säule 1 und Säule 2). Die für 4h mit 5 μM Camptothecin behandelten Fibroblasten dienten als Positivkontrolle zum Nachweis apoptotischer Zellen (Abbildung 17C Säule 3). Es ist ersichtlich, dass Pip92 unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die Apoptose von NIH 3T3-Zellen hat.

3.15 Einfluss von exogenem Pip92 auf den Zellzyklus von NIH 3T3-Fibroblasten

Anhand der Analyse der Proliferation in ruhenden serumstimulierten Fibroblasten, deren endogenes Pip92 durch posttranskriptionelles *gene silencing* (RNAi) dramatisch reduziert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass Pip92 allein den Eintritt in den Zellzyklus steuert.

Weitere wichtige zu beantwortende Fragen sind, ob *pip92*-Überexpression ausreicht die Zellen unabhängig von Serum in die G1-Phase des Zellzyklus zu zwingen, bzw. den Eintritt in die G0-Phase zu blocken. Die Förderung des serumunabhängigen Eintritts in den Zellzyklus ist für Onkogene beschrieben worden (Dulbecco, 1970) (Holley & Kiernan, 1968) (Jainchill & Todaro) (1970; Smith et al., 1971).

Zuerst wurde überprüft, unter welchen Bedingungen sich die Fibroblasten in der G0-Phase befinden. Subkonfluente Zellen wurden für bis zu 48 Stunden in Hungermedium gesetzt (DMEM, 0,6% FCS) und das Zellzyklusprofil durch Propidiumjodidfärbung und anschließende FACS-Analyse sichtbar gemacht. Abbildung 18 zeigt, wie die logarithmisch wachsenden Fibroblasten (A) nach 48 Stunden Hungern (B) größtenteils aus dem Zellzyklus ausgeschert sind. Der Anteil der Zellen in G0/G1 steigt von 42 auf 84%. Der Anteil der Zellen in S- bzw. G2-Phase nimmt entsprechend ab (vergl. Abbildung 18A mit B).

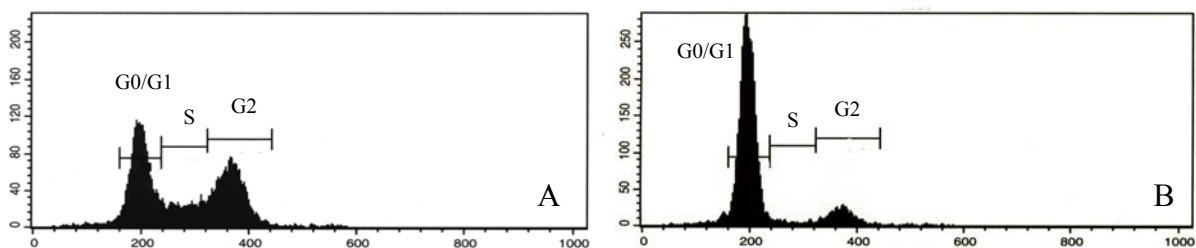


Abb. 18: Zellzyklusprofil logarithmisch wachsender und ruhender, subkonfluenter NIH 3T3-Zellen
 subkonfluente NIH 3T3-Zellen wurden für 48 h entweder in Vollmedium (A) oder Hungermedium (B) kultiviert, fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt. Das Zellzyklusprofil wurde per FACS analysiert und quantitativ ausgewertet. Die Bestimmung der prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte nach Setzen von sogenannten Gates, welche die einzelnen Zellzyklusphasen abgrenzen.
 A) 42% der Zellen befinden sich in der G0/G1-, 17% in der S- und 38% in der G2-Phase
 B) 84% der Zellen befinden sich in der G0/G1-, 3% in der S- und 10% in der G2-Phase

Dieses Wissen wurde verwendet, um mit Fibroblasten arbeiten zu können, die überwiegend aus dem Zellzyklus ausgeschert waren (G0-Phase) oder sich im Zellzyklus befinden. In diesen wurde *pip92* transient überexprimiert, um den Effekt auf den Zellzyklus zu studieren. Da die subzelluläre Lokalisation des Pip92-Proteins von der Zelldichte abhängt (siehe z.B. Abbildung 11B) und das Protein in unterschiedlichen Zellkompartimenten vermutlich unterschiedliche Funktionen ausübt, wurde zusätzlich darauf geachtet, dass subkonfluente und konfluente Zellen parallel zur Transfektion herangezogen wurden. Nach insgesamt 72 Stunden wurde der Versuch nach Zählung der Zellzahl und Präparation von Zelllysaten, die mittels Western-Blot auf transfiziertes Pip92 überprüft wurden, beendet. Übt Pip92 einen Einfluss auf den Zellzyklus aus, so sollte sich dies im Vergleich zur Kontrolltransfektion in der Zellzahl widerspiegeln.

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über den Versuchsansatz:

Versuch	Zellzyklusphase bei Transfektion	Transfizierter Expressionsvektor	Kultivation in Hungermedium nach Transfektion	Zelldichte bei Transfektion
1	Im Zellzyklus	Kontrollvektor	72h	10.000/cm ²
	Im Zellzyklus	Pip92-Expressionsvektor	72h	10.000/cm ²
2	G0 (durch 48h Hungern)	Kontrollvektor	24h	10.000/cm ²
	G0 (durch 48h Hungern)	Pip92-Expressionsvektor	24h	10.000/cm ²
3	Im Zellzyklus	Kontrollvektor	72h	100.000/cm ²
	Im Zellzyklus	Pip92-Expressionsvektor	72h	100.000/cm ²
4	G0 (durch 48h Hungern)	Kontrollvektor	24h	100.000/cm ²
	G0 (durch 48h Hungern)	Pip92-Expressionsvektor	24h	100.000/cm ²

Tab. 6: Übersicht über den Versuchsansatz: Einfluss von exogenem Pip92 auf den Zellzyklus von NIH 3T3-Fibroblasten

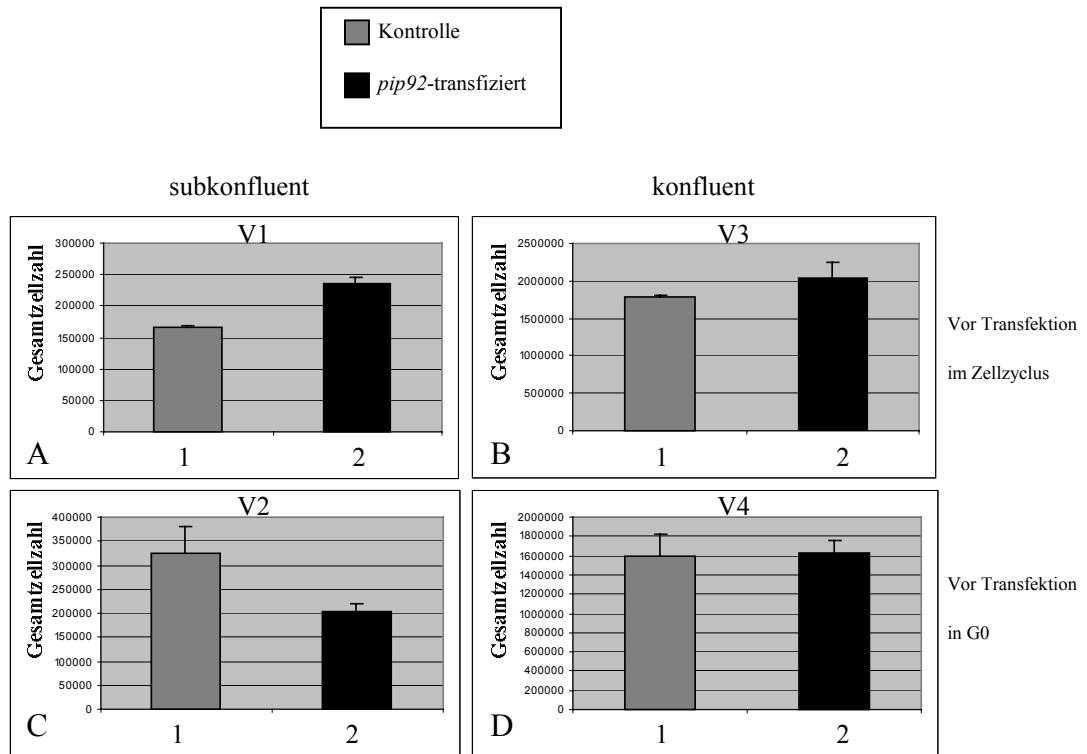


Abb. 19: *pip92*-Überexpression wirkt auf subkonfluente NIH 3T3-Fibroblasten auf zweierlei Weise: Hemmend beim Eintritt in G0, proapoptisch in G0; *in vitro*

Fibroblasten wurden am Tag 1 subkonfluent (A+C) in Vollmedium kultiviert. Am Tag 2 wurde entweder mit Kontroll- (Säulen 1) bzw. *pip92*-Expressionskonstrukt (Säulen 2) transfiziert, in Hungermedium weiterkultiviert (A) oder das Medium gegen Hungermedium ausgetauscht (C). Hier ist definitionsgemäß Stunde 0. In Stunde 48 wurden die sich nun größtenteils in G0 befindlichen, noch nicht transfizierten Fibroblasten (C) mit Kontroll- (Säulen 1) oder *pip92*-Expressionskonstrukt (Säulen 2) behandelt und danach in Hungermedium für weitere 24 h kultiviert. In Stunde 72 wurde jeweils die Gesamtzellzahl bestimmt und grafisch dargestellt.

Säulen 1: kontrolltransfizierte Fibroblasten; Säule 2 *Pip92*-transfizierte Fibroblasten

Der gleiche Versuch wurde mit konfluenten Zellen durchgeführt. Die grafische Darstellung der vor der Transfektion in Vollmedium kultivierten Fibroblasten ist in Abbildung B zu sehen; die der vor Transfektion gehungerten Fibroblasten in Abbildung D

Säulen 1: kontrolltransfizierte Fibroblasten; Säule 2 *Pip92*-transfizierte Fibroblasten

A) Gesamt-Zellzahlen nach 72h von Versuch 1. Mit Kontrollvektor (1) oder *pip92*-Expressionsvektor (2) transfizierte Fibroblasten

B) Gesamt-Zellzahlen nach 72h von Versuch 2. Mit Kontrollvektor (1) oder *pip92*-Expressionsvektor (2) transfizierte Fibroblasten

C) Gesamt-Zellzahlen nach 72h von Versuch 3. Mit Kontrollvektor (1) oder *pip92*-Expressionsvektor (2) transfizierte Fibroblasten

D) Gesamt-Zellzahlen nach 72h von Versuch 4. Mit Kontrollvektor (1) oder *pip92*-Expressionsvektor (2) transfizierte Fibroblasten

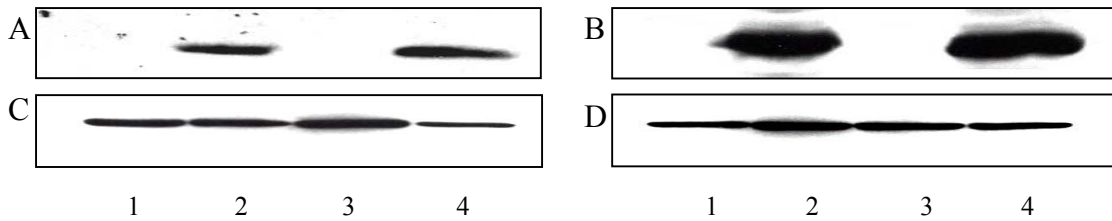


Abb. 20: Kontrolle der exogenen Pip92-Expression in den Versuchen 1 bis 4 nach 72h

Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden von allen Versuchsansätzen Zellaliquots zur Präparation von Ganzzellextrakten isoliert und diese im Western-Blot mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers auf Anwesenheit von transfiziertem Pip92 hin überprüft.

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten. Spur 1: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 1 Spur 2: *pip92*-transfizierte Zellen aus Versuch 1. Spur 3: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 2. Spur 4: *pip92*-transfizierte Zellen aus Versuch 2 .

B) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten. Spur 1: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 3, Spur 2: *pip92*-transfizierte Zellen aus Versuch 3. Spur 3: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 4. Spur 4: *pip92*-transfizierte Zellen aus Versuch 4 .

C) Blot aus Abbildung A, gestriipt und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt

D) Blot aus Abbildung B, gestriipt und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt

Tatsächlich unterscheiden sich die Zellzahlen bei verschiedenen Versuchsansätzen erheblich. So ist die Gesamtzellzahl bei subkonfluenten Fibroblasten, die sich bei Transfektion mit *pip92*-Expressionsvektor im Zellzyklus befanden, höher als bei kontrolltransfizierten (Abbildung 19A vergl. Säule 1 mit 2). Bei konfluenten Fibroblasten ist dies nicht der Fall (Abbildung 19B vergl. Säule 1 mit 2). Bei Fibroblasten, die vor Transfektion aus dem Zellzyklus ausgeschert waren, ist die Situation genau gegensätzlich. Hier ist die Gesamtzellzahl bei den subkonfluenten, *pip92*-überexprimierenden Fibroblasten geringer als bei kontrolltransfizierten (Abbildung 19C vergl. Säule 1 mit 2). Konfluente Fibroblasten zeigen keinen Unterschied (Abbildung 19D vergl. Säule 1 mit 2). Lysierte Aliquots der transfizierten Zellen wurden mittels Western-Blot auf das Vorhandensein von Pip92 überprüft. Abbildung 20 A Spur 2 und 4 zeigt, dass dies bei den subkonfluenten Zellen der Fall ist. Behandlung des Blots mit einem spezifischen β -Aktin-Antikörper (Abbildung 20C) beweist, dass in beiden Lysaten gleiche Proteinmengen vorliegen (Spur 1-4). Abbildung 20B zeigt die *pip92*-Überexpression in konfluenten Fibroblasten (Spur 2 und 4). Auch hier kann β -Aktin in gleichen Mengen in allen Lysaten nachgewiesen werden (Abbildung 20D).

3.16 Pip92 fördert die Apoptose in ruhenden Fibroblasten

Wie sind die in Abbildung 19 A und C gezeigten unterschiedlichen Gesamtzellzahlen zu erklären? Eine höhere Apoptoserate könnte dafür verantwortlich sein. Dies kann durch FACS-Analyse des Zellzyklusprofils mittels Propidiumjodid-Färbung untersucht werden. Apoptotische Zellen fragmentieren ihr Chromatin mittels Endonucleasen. Die so degradierte DNA erscheint im Zellzyklusprofil als sogenannter *sub G1-Peak*.

Der Versuch 1-4 (siehe Tabelle 6) wurde wiederholt, jedoch wurde nach 72 Stunden das Zellzyklusprofil erstellt. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über den Versuchsansatz:

Versuch	Zellzyklusphase bei Transfektion	Transfizierter Expressionsvektor	Kultivierung in Hungermedium nach Transfektion	Zelldichte bei Transfektion
1a	Im Zellzyklus	Kontrollvektor	72h	10.000/cm ²
1b	Im Zellzyklus	Pip92-Expressionsvektor	72h	10.000/cm ²
2a	G0 (durch 48h Hungern)	Kontrollvektor	24h	10.000/cm ²
2b	G0 (durch 48h Hungern)	Pip92-Expressionsvektor	24h	10.000/cm ²
3a	Im Zellzyklus	Kontrollvektor	72h	100.000/cm ²
3b	Im Zellzyklus	Pip92-Expressionsvektor	72h	100.000/cm ²
4a	G0 (durch 48h Hungern)	Kontrollvektor	24h	100.000/cm ²
4b	G0 (durch 48h Hungern)	Pip92-Expressionsvektor	24h	100.000/cm ²

Tab. 7: Übersicht über den Versuchsansatz: Einfluss von exogenem Pip92 auf das Zellzyklusprofil von NIH 3T3-Fibroblasten

Bei subkonfluenten Fibroblasten zeigte sich, dass sich die Apoptoserate bei aus dem Zellzyklus ausgescherten, transfizierten und anschließend gehungerten Zellen deutlich unterscheidet. Bei kontrolltransfizierten Zellen sind nur 5 % apoptotisch, während 29% der *pip92*-überexprimierenden Fibroblasten apoptotisch sind (siehe Abbildung 21C und D). Bei vor der Transfektion logarithmisch wachsenden, subkonfluenten Fibroblasten sind in diesem Punkt kaum Unterschiede zu erkennen (siehe Abbildung 21A und B).

Konfluent ausgesäte Fibroblasten zeigen keine nennenswerte Zahl an apoptotischen Zellen. Hier hat *pip92*-Überexpression keinen Einfluss (siehe Abbildung 21E-H). Die nach 72h gesammelten Lysate der transfizierten Zellen wurden auf das Vorhandensein des transfizierten Pip92 mittels Western-Blot überprüft. Abbildung 22A Spur 2 und 4 zeigen, dass dies bei den subkonfluenten Zellen der Fall ist. Behandlung des Blots mit einem spezifischen β -Aktin-Antikörper (Abbildung 22B) beweist, dass in beiden Lysaten gleiche Proteinmengen vorliegen (Spur 1-4). Abbildung 22C zeigt die *pip92*-Überexpression in konfluenten Fibroblasten (Spur 2 und 4), Abbildung 22D das Signal des β -Aktins in den Lysaten. Dies beweist, dass die Transfektionen erfolgreich waren.

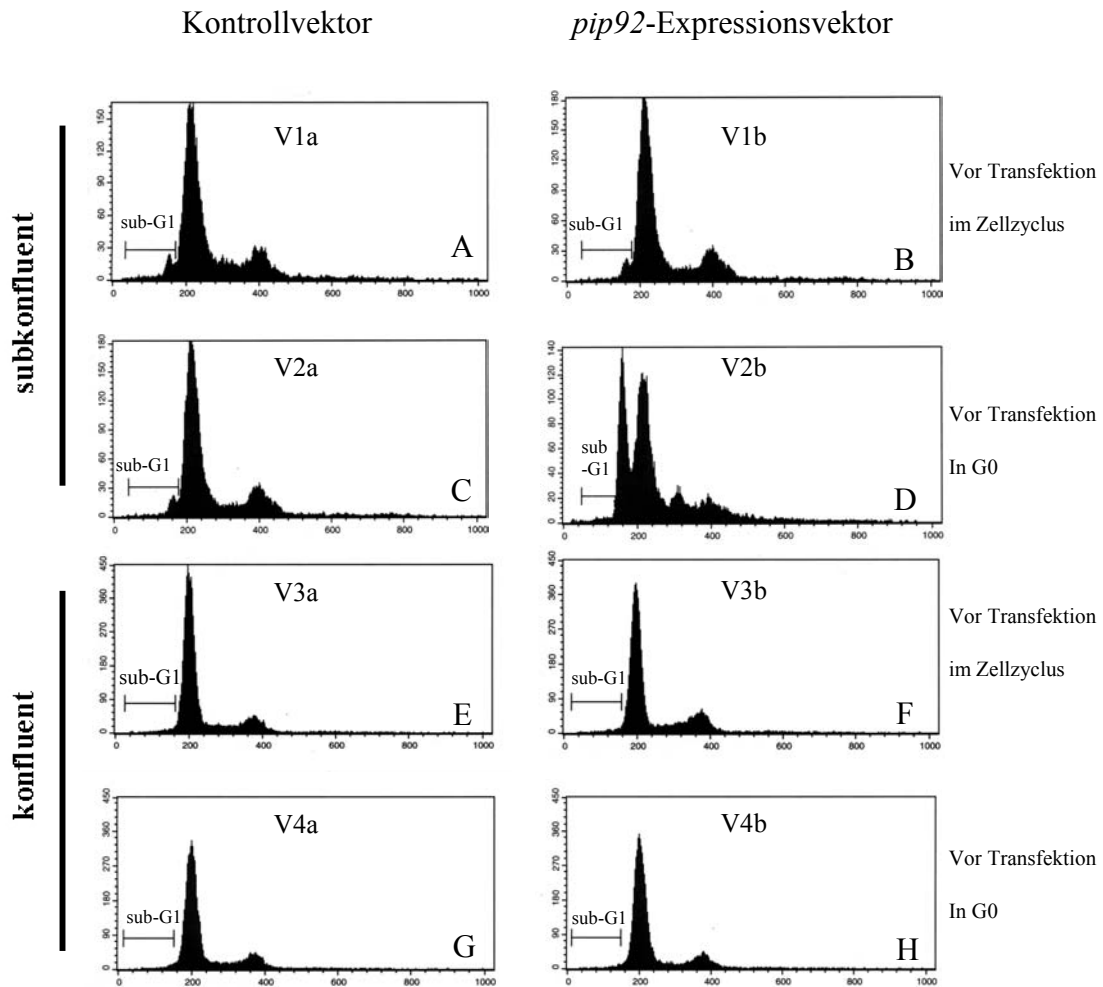


Abb. 21: *pip92*-Überexpression in ruhenden, subkonfluenten Fibroblasten erhöht die Apoptoserate *in vitro*
 Fibroblasten wurden am Tag 1 subkonfluent (A-D) in Vollmedium kultiviert. Am Tag 2 wurde entweder mit Kontroll- (A)- bzw. *pip92*-Expressionskonstrukt (B) transfiziert und in Hungermedium weiterkultiviert oder das Medium gegen Hungermedium ausgetauscht (C+D). Hier ist definitionsgemäß Stunde 0. In Stunde 48 wurden die sich nun größtenteils in G0 befindlichen, noch nicht transfizierten Fibroblasten (C+D) mit Kontroll- (C) oder *pip92*-Expressionskonstrukt (D) transfiziert und danach in Hungermedium für weitere 24 h kultiviert. Nach Stunde 72 wurden die Zellen fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und das Zellzyklusprofil per FACS analysiert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen wurde durch Quantifikation der Zellen im *sub-G1*-Peak bestimmt.

Der gleiche Versuch wurde mit konfluenten Zellen (E-H) durchgeführt. Zellzyklusprofile der vor der Transfektion in Vollmedium kultivierten Fibroblasten sind in Abbildung E+F zu sehen; die der vor Transfektion gehungerten Fibroblasten in Abbildung G+H; kontrolltransfizierte in Abbildung E+G; *pip92*-transfizierte in Abbildung F+H.

Abbildung 21	A	B	C	D	E	F	G	H
% apoptotisch	5	6	5	29	2	2	1	1

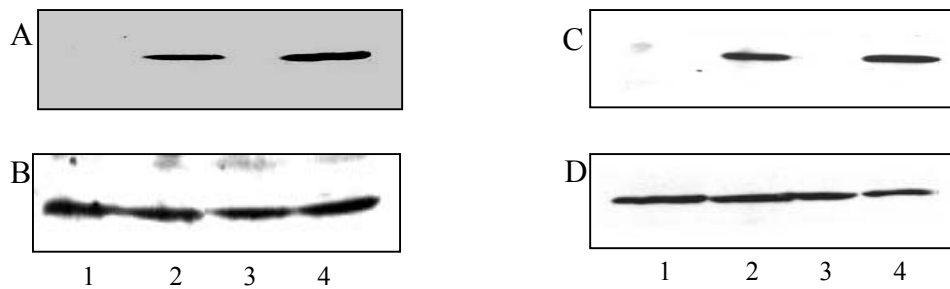


Abb. 22: Kontrolle der Pip92-Expression

Es wurden Zellaliquots der transfizierten Zellen aus den Versuchen 1a/b - 4a/b zur Präparation von Ganzzellextrakten isoliert und diese im Western-Blot mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers auf Anwesenheit von transfiziertem *pip92* hin überprüft.

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten. Spur 1: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 1b Spur 2: Pip92-transfizierte Zellen aus Versuch 1b. Spur 3: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 2b. Spur 4: Pip92-transfizierte Zellen aus Versuch 2b .

B) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten. Spur 1: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 3b, Spur 2: Pip92-transfizierte Zellen aus Versuch 3b. Spur 3: kontrolltransfizierte Zellen aus Versuch 4b. Spur 4: Pip92-transfizierte Zellen aus Versuch 4b.

C) Blot aus Abbildung A, gestriipt und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt

D) Blot aus Abbildung B, gestriipt und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt

Die Analyse der Zellzyklusprofile beweist, dass Pip92 in subkonfluenten, ruhenden Fibroblasten proapoptotisch wirkt. Dies erklärt auch die geringere Zellzahl (vergl. Abbildung 19C Säule 1 und 2). Ein proapoptotischer Einfluss des Gens auf konfluente Fibroblasten ist nicht zu erkennen..

Vergleichbare Versuche mit stabil transfizierten Fibroblasten bestätigen die proapoptotische Wirkung von Pip92. Setzt man diese in Hungermedium, so werden die subkonfluent ausgesäten, konstitutiv *pip92*-überexprimierenden Klone apoptotisch. Dies geschieht schon nach 48 Stunden, während kontrolltransfizierte Klone nicht in Apoptose gehen. Dieselben Klone konfluent ausgesät und für 72h gehungert lassen keine apoptotischen Zellen erkennen. Abbildung 23 zeigt dies jeweils an einem repräsentativen Klon. Der *pip92*-überexprimierende Klon zeigt eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen, wenn er unter subkonfluenten Bedingungen in Hungermedium kultiviert wird (vergl. Abbildung 23 C mit D). Der Kontrollklon ist dafür unempfindlich (Abbildung 23 A und B). Der genaue prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen kann der Bildunterschrift entnommen werden.

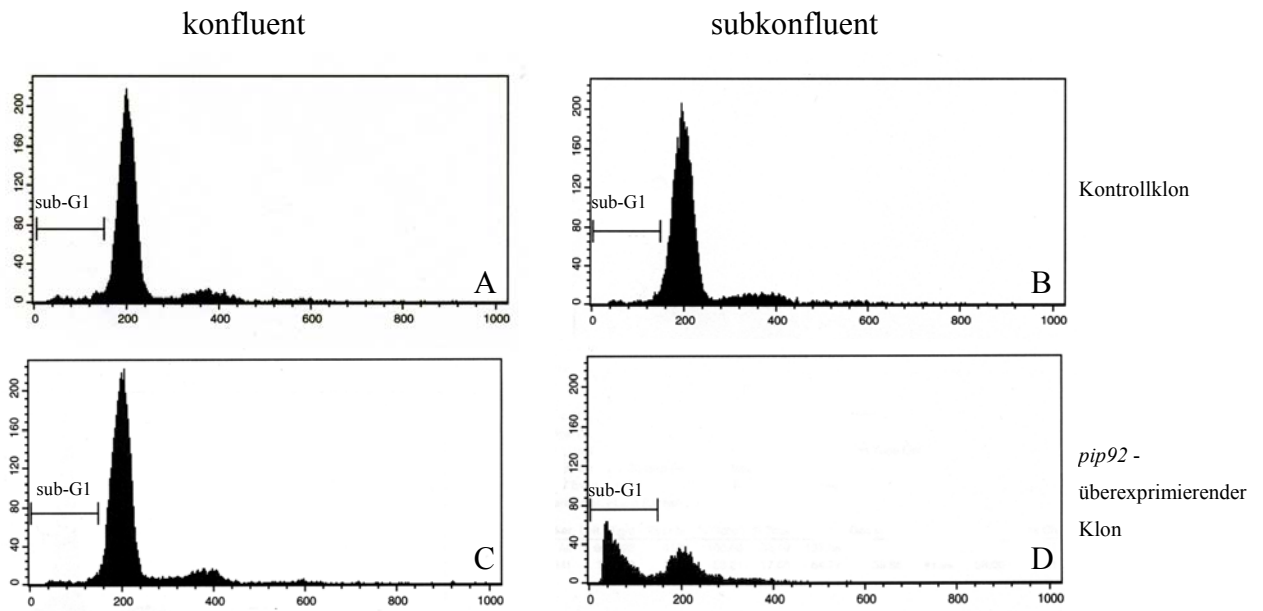


Abb. 23: konstitutive *pip92*-Expression führt in Verbindung mit Hungern zur Apoptose; *in vitro*
 Der Kontrollklon (A+B) bzw. *pip92*-überexprimierende Klon (C+D) wurde entweder konfluent (A bzw. C) oder subkonfluent (B bzw. D) ausgesät und für 48 Stunden in Hungermedium kultiviert, danach fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und das Zellzyklusprofil per FACS analysiert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen wurde durch Quantifikation der Zellen im *sub-G1*-Peak bestimmt.

Abbildung 23	A	B	C	D
% apoptotisch	2	3	2	63

3.17 Subzelluläre Lokalisation von Pip92 bei Anisomyzin-vermittelter

Apoptose

Die vorhergehenden Versuche zeigen, dass *pip92*-Überexpression die Apoptose in ruhenden 3T3-Zellen verstärkt. Der Effekt ist jedoch auf subkonfluente Fibroblasten beschränkt, was mit einer Kernlokalisierung von Pip92 korreliert.

Anisomycin ist eine apoptoseauslösende Substanz aus dem Bakterium *Streptomyces griseolus*. Es inhibiert die Peptidyltransferase-Aktivität an eukaryotischen Ribosomen und führt somit zur Blockierung der Proteinsynthese (Kochi & Collier, 1993). Über Stress-aktivierte Protein-Kinasen (SAPKs) werden etliche IEGs (*immediate early genes*) induziert (Bebien et al., 2003), wie z.B. *pip92* in NIH 3T3-Fibroblasten (Chung et al., 2000a).

Welche subzelluläre Lokalisation zeigt Pip92, wenn es durch Anisomycin induziert wird?

Wo ist es in konfluenten, wo in subkonfluenten Fibroblasten lokalisiert?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden zunächst konfluente und subkonfluente Fibroblasten für 4 Stunden mit Anisomycin behandelt [50 ng/ml] und Ganzzelllysate durch Western-Blot-Analyse auf Pip92 untersucht. Überraschenderweise zeigte sich, dass in konfluenten Fibroblasten Anisomycinbehandlung nicht zur Pip92-Induktion führt, während subkonfluente Zellen sich wie erwartet verhielten (siehe Abbildung 24A, Spur 1 bzw. 3). Dass das fehlende Pip92-Signal in Abbildung 24A Spur 3 nicht auf eine ungleiche Proteinmenge in den Lysaten zurückzuführen ist, zeigt das gleichmäßige Signal des spezifischen anti- β -Aktin-Antikörpers in den 4 Lysaten (siehe Abbildung 24B, Spur 1 bis 4).

Da Pip92 nur in subkonfluenten Zellen induziert wurde, lag die Vermutung nahe, dass das Protein hier ausschließlich im Kern zu finden ist. Um darüber Gewissheit zu erlangen, wurden nukleäre und zytoplasmatische Extrakte von subkonfluenten, anisomycinbehandelten Zellen isoliert und mittels Western-Blot auf die Anwesenheit von Pip92 überprüft. Es zeigte sich, dass sich das Protein tatsächlich nur in Kernlysaten nachweisen lässt (Abbildung 25A, Spur 4). Zur Kontrolle der Reinheit der Extrakte wurde, wiederum mittels Western-Blot, überprüft, wo einerseits PCNA, ein ausschließlich nukleäres Protein, und andererseits Paxilin, ein ausschließlich zytoplasmatisches Protein, detektiert werden können. Abbildung 25B und C zeigt, dass die Fraktionierung erfolgreich war. PCNA befindet sich nur in der nukleären Fraktion (vergl. Abbildung 25B, Spur 1 und 2 mit 3 und 4), Paxilin nur in der zytoplasmatischen (vergl. Abbildung 25C, Spur 1 und 2 mit 3 und 4).

Diese Beobachtung wird durch Immunfluoreszenzanalysen bestätigt. Während bei unbehandelten, subkonfluenten Fibroblasten lediglich ein relativ schwaches, nukleäres Pip92-Signal zu erkennen ist, zeigen anisomycinbehandelte Fibroblasten eine deutlich stärkere Pip92-Färbung im Kern (vergl. Abbildung 26A mit B). Konfluent ausgesäte Fibroblasten zeigen unter beiden Bedingungen schwache zytoplasmatische Färbung (siehe Abbildung 26C und D).

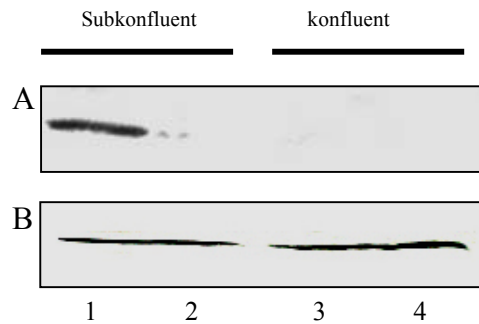


Abb. 24: Pip92 wird nur in subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten durch Anisomycin induziert

Subkonfluent (Spur 1 und 2) und konfluent (Spur 3 und 4) gewachsene NIH 3T3-Fibroblasten wurden für 4h mit Anisomycin [50ng/ml] oder Methanol (Lösungsmittel für Anisomycin) behandelt, Ganzzelllysate hergestellt und Westernblotanalysen unterzogen. Pip92 wurde mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörper 1A2 nachgewiesen.

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten aus Fibroblasten, +/- 4h Anisomycinbehandlung Spur 1: subkonfluente Fibroblasten, 4h Anisomycinstimulation, Spur 2: subkonfluente Fibroblasten, unstimuliert; Spur 3: konfluente Fibroblasten, 4h Anisomycinstimulation; Spur 4: konfluente Fibroblasten unstimuliert.

B) Blot aus Abbildung A, gestriipt und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt

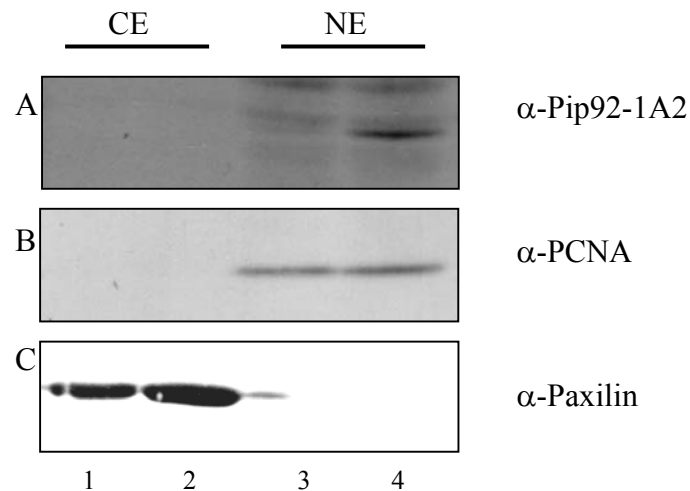


Abb. 25: Anisomycininduziertes Pip92 akkumuliert im Kern von subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten

Subkonfluent gewachsene NIH 3T3-Fibroblasten wurden für 4h mit Anisomycin [50ng/ml] oder Methanol (Lösungsmittel für Anisomycin) behandelt, Kern- (NE) und zytoplasmatische (CE) Extrakte hergestellt und Westernblotanalysen unterzogen. Pip92 wurde mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörper 1A2 nachgewiesen

A) Westernblotanalyse der Zellfraktionen. Spur 1: zytoplasmatische Fraktion aus unstimulierten Zellen. Spur 2: zytoplasmatische Fraktion aus stimulierten Zellen. Spur 3: nukleäre Fraktion aus unstimulierten Zellen. Spur 4: nukleäre Fraktion aus stimulierten Zellen

B) Blot aus Abbildung A, gestriipt und mit anti-PCNA-Antikörper behandelt

C) Blot aus Abbildung A, gestriipt und mit anti-Paxilin-Antikörper behandelt

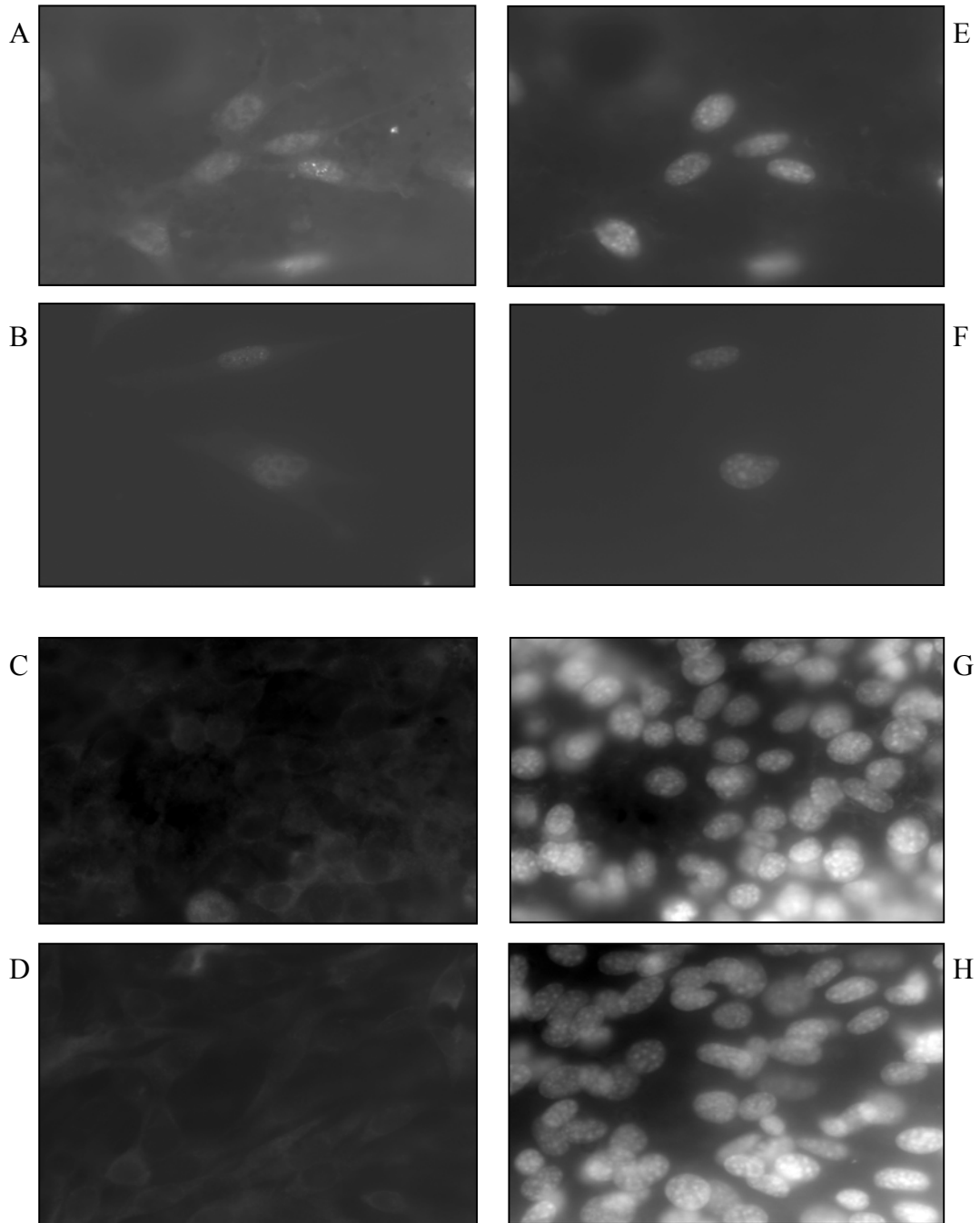


Abb. 26: Immunfluoreszenzanalyse der subzellulären Lokalisation des anisomycininduzierten Pip92 in subkonfluenten NIH 3T3-Fibroblasten

Immunfluoreszenzanalysen von subkonfluenten (A+B) und konfluenten (C+D) NIH 3T3-Fibroblasten. Die Zellen wurden in Vollmedium in der angegebenen Konfluenz kultiviert und dem Kulturmedium für 4 h Anisomycin [50ng/ml] zugesetzt (A+C), danach fixiert und Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Menge an Methanol (B+D) (Lösungsmittel für Anisomycin) dem Kulturmedium zugesetzt. Die subzelluläre Lokalisation des Pip92 wurde mit Hilfe des monoklonalen anti-Pip92-Antikörper 1A2 analysiert. Zweitantikörper: anti-Maus-FITC-gekoppelt. Die Färbung des Chromatins erfolgte durch DAPI, das der Zweitantikörperlösung in der Konzentration 0,1 mg/ml zugesetzt war.

- E) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung A
- F) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung B
- G) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung C
- H) DAPI-gefärbte Zellkerne der Fibroblasten aus Abbildung D

Die Versuche zeigen, dass Pip92 auch bei anisomycininduzierter Apoptose bei subkonfluenten Zellen im Kern zu finden ist. Überraschenderweise wird das Protein durch Anisomycin in konfluenten Fibroblasten nicht induziert. Dennoch werden beide Zellpopulationen apoptotisch. Dies zeigen Zellzyklusanalysen durch Propidiumjodidfärbung von anisomycinbehandelten konfluenten und subkonfluenten Fibroblasten, deren quantitative Auswertung in Abbildung 27 zu sehen ist. Beide Zellpopulationen zeigen nach 12 h Anisomycinbehandlung ähnliche prozentuale Anteile an apoptotischen Zellen: die subkonfluenten 52%, die konfluenten 54%. Auch zu früheren Zeitpunkten (4-8h) kann kein signifikanter Unterschied in der Zahl der apoptotischen Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

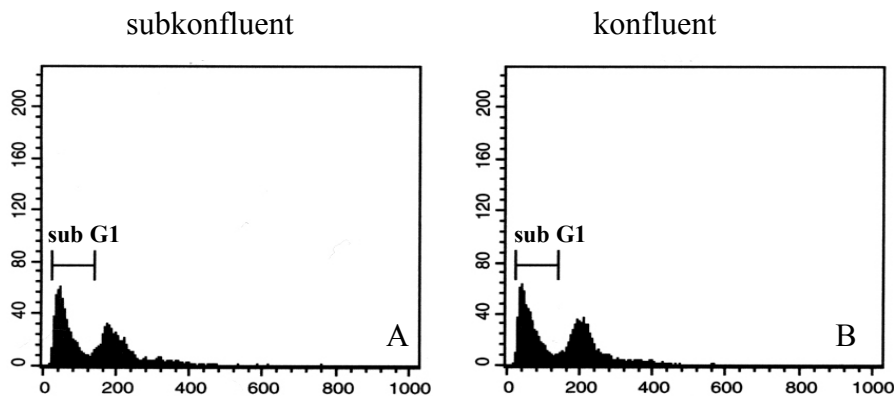


Abb. 27: Anisomycinbehandlung führt zur Apoptose; in subkonfluenten und konfluenten Fibroblasten
 Zellzyklusanalyse von subkonfluenten (A) und konfluenten (B), für 12 h mit Anisomycin behandelten Fibroblasten. Die Zellen wurden in der entsprechenden Dichte ausgesät und für 12 h mit Anisomycin [50ng/ml] behandelt, danach fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und das Zellzyklusprofil per FACS analysiert. Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen wurde durch Quantifikation der Zellen im *sub-G1-Peak* bestimmt.

Abbildung 27	A	B
% apoptotisch	52	54

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass Pip92 unterschiedliche Effekte auf Fibroblasten hat, je nachdem ob sich diese im Zellzyklus befinden oder aus diesem ausgeschert sind. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die subkonfluente Zelldichte und somit das Vorhandensein des Proteins im Kern. So führt *pip92*-Überexpression zu einer erhöhten Zellzahl, wenn logarithmisch wachsende Zellen durch Serumentzug in die G0-Phase

gezwungen werden. Andererseits fördert Pip92 die Apoptose von ruhenden Fibroblasten, jedoch nicht von logarithmisch wachsenden. Auch bei durch Anisomycin vermittelter Apoptose kann das Protein in subkonfluenten Zellen im Kern nachgewiesen werden. Konfluente zeigen keine Pip92-Induktion durch Anisomycin.

3.18 Einfluss von exogenem Pip92 auf die Zellmigration in NIH 3T3-Fibroblasten

Der Einfluss von Pip92 auf die Zellwanderung konnte bisher bei der pankreatischen Adenokarzinomazelllinie bewiesen werden (Novac, 2001). Dies wurde in dieser Arbeit durch den in Abbildung 7 beschriebenen Wundheilungsversuch bestätigt. Bewirkt das Protein das Gleiche in Fibroblasten? Deshalb wurden auch mit transient transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten mehrere Versuche durchgeführt, die diese Frage beantworten sollten.

3.18.1 Wundheilungs-Versuch

Die Methode entspricht der unter Punkt 3.4 beschriebenen. Die Quantifikation erfolgte mittels Zählung der vorhandenen Zellen im inneren Wundbereich pro $800\mu\text{m}^2$. Abbildung 28A zeigt in Spur 2 das Signal des transfizierten Pip92. Spur 1 und 2 in Abbildung 28B zeigen die Signale des β -Aktins in beiden Lysaten. Die Transfektion war erfolgreich. Der Wundheilungsversuch zeigt, dass Pip92 auch hier die Schließung der Wunde begünstigt (vergl. Abbildung 28C mit D). Die Quantifizierung ergibt eine ca. 2,2-fach erhöhte Zellzahl im inneren Wundbereich (vergl. Abbildung 28E Säule 1 mit Säule 2).

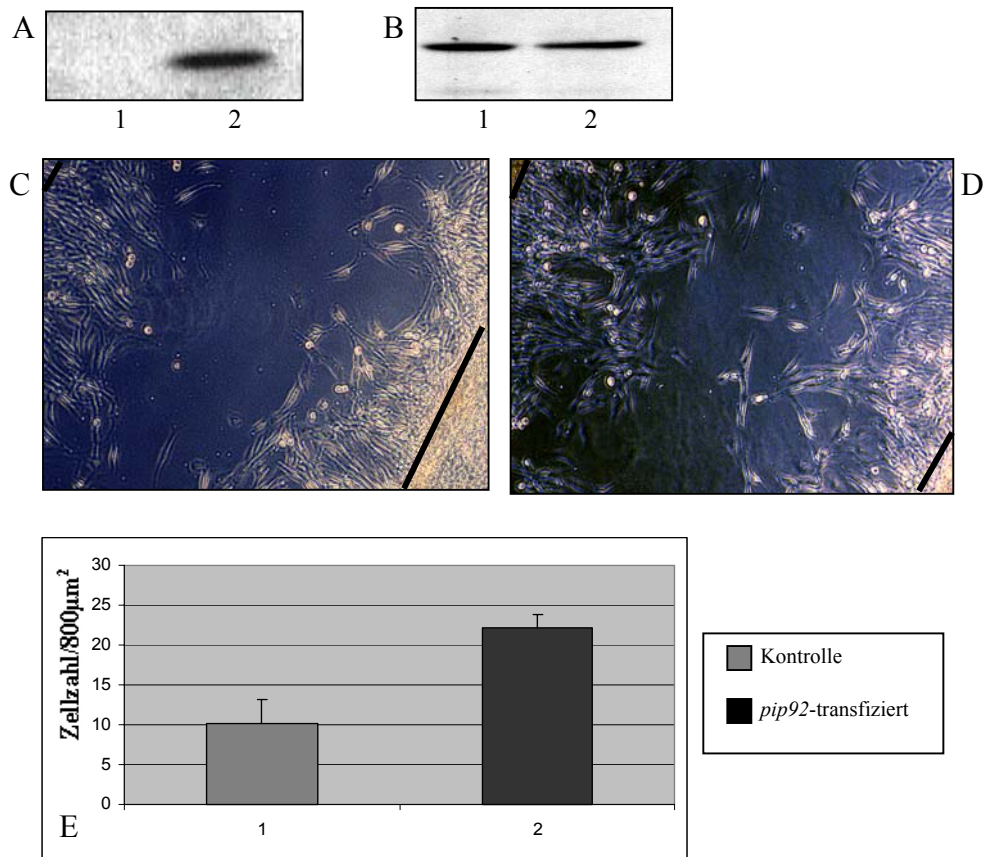


Abb. 28: *pip92*-Überexpression in NIH 3T3-Zellen begünstigt die Wundschließung *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten (gesammelt nach Dokumentation am Tag 3) der transfizierten Zellen. Detektion des transfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers
Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti-β-Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C+D) Aus einer Einzelzellschicht wurden Zellen entfernt und die verbleibenden mit *pip92*- oder Kontroll-Expressionskonstrukt transfiziert. Zu sehen sind Lichtbilder von der künstlichen Wunde der kontrolltransfizierten (C) oder *pip92*-transfizierten (D) Zellen am Tag 3 nach Transfektion. Die schwarzen Linien zeigen die Ränder der ursprünglichen „Wunde“ am Tag 1.

E) Quantifizierung der in den inneren Wundbereich eingewanderten Zellen. Die Anzahl der vektortransfizierten (Säule 1) und *pip92*- (Säule 2) transfizierten Zellen in vier 800μm² großen inneren Wundbereichen wurde bestimmt und die Mittelwerte graphisch dargestellt

3.18.2 Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten

Die chemotaktisch beeinflusste Wanderung ist in etlichen metastasierenden Tumorzellen verstärkt (Senger et al., 1983). Deshalb war es von Interesse, ob auch die chemotaktische Wanderung von Fibroblasten entlang eines Wachstumsfaktorgradienten von Pip92 positiv beeinflusst wird. Hierzu wurden jeweils 10^5 transient transfizierte Zellen (mit Kontrollvektor oder *pip92*-Expressionvektor) in serumfreiem Medium auf den Polycarbonatfilter ausgesät. Die untere Kammer enthielt konditioniertes, Wachstumsfaktoren enthaltendes 3J1-Medium. Den Zellen wurde 6 Stunden Zeit gegeben, entlang des Wachstumsfaktorgradienten zu wandern. Die durch die Poren gewanderten, an der Unterseite des Filters adhären Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt und die Zellzahl wurde kolorimetrisch bestimmt. Nachweis des transfizierten Pip92 erfolgte durch Western-Blotanalyse der Zelllysate mittels des anti-V5-Antikörpers (siehe Abbildung 29A, Spur 2). Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β -Aktin in den Lysaten (Abbildung 29B).

Die in Abbildung 29C zu sehende Quantifizierung zeigt, dass die chemotaktisch stimulierte Wanderung durch Pip92 erhöht wird (vergl. Säule 1 mit 2). Dieser Unterschied ist ohne Wachstumsfaktorgradient nicht vorhanden (vergl. Abbildung 29D Säule 1 und 2). Hierbei enthielt auch die untere Kammer serumfreies Medium.

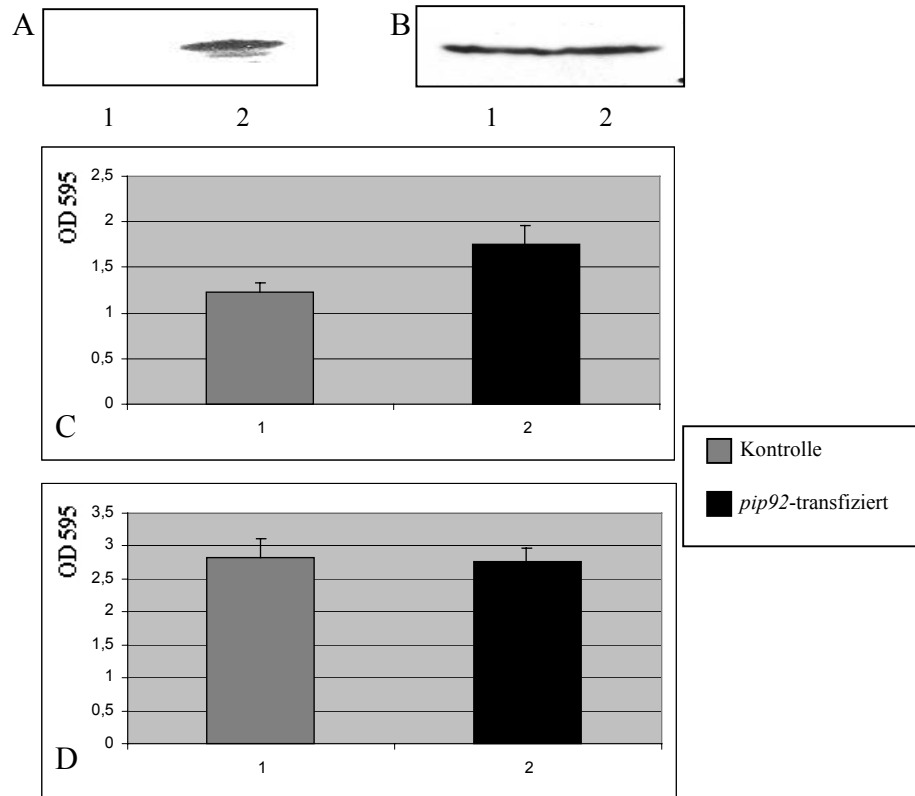


Abb. 29: Pip92-Überexpression in NIH 3T3-Zellen begünstigt die Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des transfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers.

Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Blot aus Abbildung A, gestriipt und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C) Quantifikation der entlang des Wachstumsfaktorgradienten gewanderten NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3-Zellen wurden entweder mit Kontrollvektor (Säule 1) oder Pip92-Expressionkonstrukt (Säule 2) transfiziert und jeweils 10^5 Zellen in die obere Kammer des Transwell® Systems in serumfreiem Medium ausgesät. Als Chemoattraktant enthielt die untere Kammer konditioniertes 3J1-Medium. Die an der Unterseite des Filters adhärirten Zellen wurden fixiert, mit 0,1% Kristallviolett gefärbt, in 200 μ l 10% Essigsäure entfärbt und zur Quantifizierung die optische Dichte bei 595 nm gemessen (OD₅₉₅)

Die Messung der Absorption von 10% Essigsäure bei 595 nm diente als Kontrolle der Hintergrundabsorption. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen

D)Wie C, jedoch kein Wachstumsfaktorgradient. Obere und untere Kammer enthielten serumfreies Medium.

3.18.3 Invasive Wanderung durch Matrigel entlang eines Wachstumsfaktorgradienten

Bei diesem Versuch wird getestet, inwiefern sich die Zellen invasiv verhalten und den auf Polycarbonatfilter ausplattierten, aus Engelbreth-Holm-Swarm-Tumoren isolierten Basalmembran-Extrakt (Matrigel) (Kleinman et al., 1986) degradieren können. Invasiv gewanderte Zellen adhäreren an der Unterseite des Filters. Fixierung und Färbung mit Kristallviolett erlaubt eine quantitative Aussage über die Anzahl der Zellen.

Der Einfluss von Pip92 auf die invasive Zellwanderung konnte schon bei der pankreatischen Adenokarzinomazelllinie Bsp73 1AS bewiesen werden (Novac, 2001).

Deshalb war es von Interesse, ob dieser Effekt auch in Fibroblasten zu sehen ist.

Es wurden jeweils 10^5 transient transfizierte Zellen (siehe Western-Blot, Abbildung 30A Spur 1 und 2 und β -Aktin-Ladekontrolle Abbildung 30B Spur 1 und 2) in serumfreiem Medium auf $50\mu\text{l}$ Matrigel ausgesät. Die untere Kammer enthielt wieder konditioniertes 3J1-Medium. Den Zellen wurde 16 Stunden Zeit gegeben invasiv entlang des Wachstumsfaktorgradienten zu wandern.

Genau wie bei den Adenokarzinomazellen Bsp73 1AS wird auch bei den NIH 3T3-Fibroblasten die invasive Migration durch *pip92*-Überexpression verstärkt. Im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen lassen sich in etwa doppelt so viele Zellen auf der Unterseite des Polycarbonatfilters nachweisen (vergl. Abbildung 30C Säule 1 mit 2).

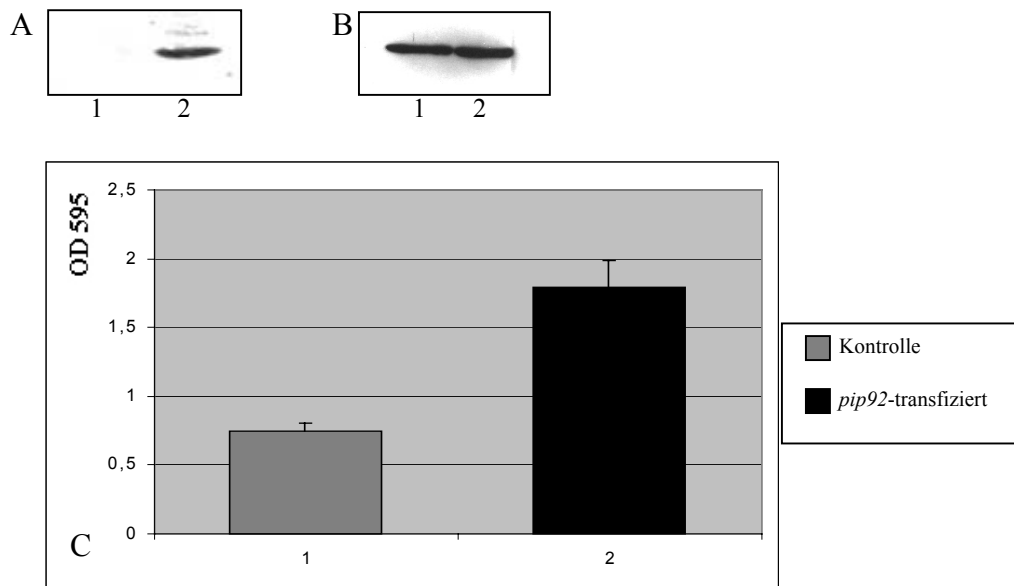


Abb. 30: *pip92*-Überexpression in NIH 3T3-Zellen begünstigt die invasive Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des transfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers.

Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C) Quantifikation der invasiv entlang des Wachstumsfaktorgradienten gewanderten NIH 3T3-Zellen.

NIH 3T3-Zellen wurden entweder mit Kontrollvektor (Säule 1) oder *pip92*-Expressionkonstrukt (Säule 2) transfiziert und jeweils 10^5 Zellen in die obere Kammer des Transwell® Systems auf 50 μ l Matrigel in serumfreiem Medium ausgesät. Als Chemoattraktant enthielt die untere Kammer konditioniertes 3J1-Medium. Die an der Unterseite des Filters adhärirten Zellen wurden fixiert, mit 0,1% Kristallviolett gefärbt, in 200 μ l 10% Essigsäure entfärbt und zur Quantifizierung die optische Dichte bei 595 nm gemessen (OD₅₉₅).

Die Messung der Absorption von 10% Essigsäure bei 595 nm diente als Kontrolle der Hintergrundabsorption. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen.

3.19 Einfluss von exogenem Pip92 auf die Zelladhäsion an Basallamina- und ECM-Bestandteile in NIH 3T3-Fibroblasten

Kann die durch Pip92 erhöhte Migration mit einer veränderter Adhäsion an ECM- oder Basallamina-Komponenten korreliert werden, oder trifft dies wie bei den pankreatischen Adenokarzinomazellen nicht zu? Hierzu war es nötig die Menge der an verschiedene ECM- bzw. Basallaminakomponenten adhärirten Zellen von transient *pip92*-überexprimierenden Fibroblasten mit der von kontrolltransfizierten zu vergleichen. Die Durchführung entsprach der bei den Bsp73 1AS-Zellen. Wie bei den transformierten Zellen konnte auch hier kein signifikanter Unterschied im adhäsiven Verhalten ausgemacht werden. (vergl. Abbildung 31 C graue Säulen mit schwarzen Säulen). Jedoch adhärirten die Fibroblasten nicht nur gut an

Fibronektin und Laminin, wie die 1AS-Zellen, sondern zusätzlich auch an Kollagen und Kollagen Typ IV. Dass die Transfektion erfolgreich war, sieht man am Pip92-Signal, das im Western-Blot durch V5-Antikörper in Zelllysaten *pip92*-transfizierter Zellen detektiert wurde (Abbildung 31A Spur 2). Auch hier diente der Nachweis von β -Aktin in den Lysaten als Ladekontrolle (Abbildung 31B). Die erhöhte Migration kann also nicht mit einer veränderten Adhäsion in Bezug gesetzt werden. Es muss hierfür eine andere Erklärung geben.

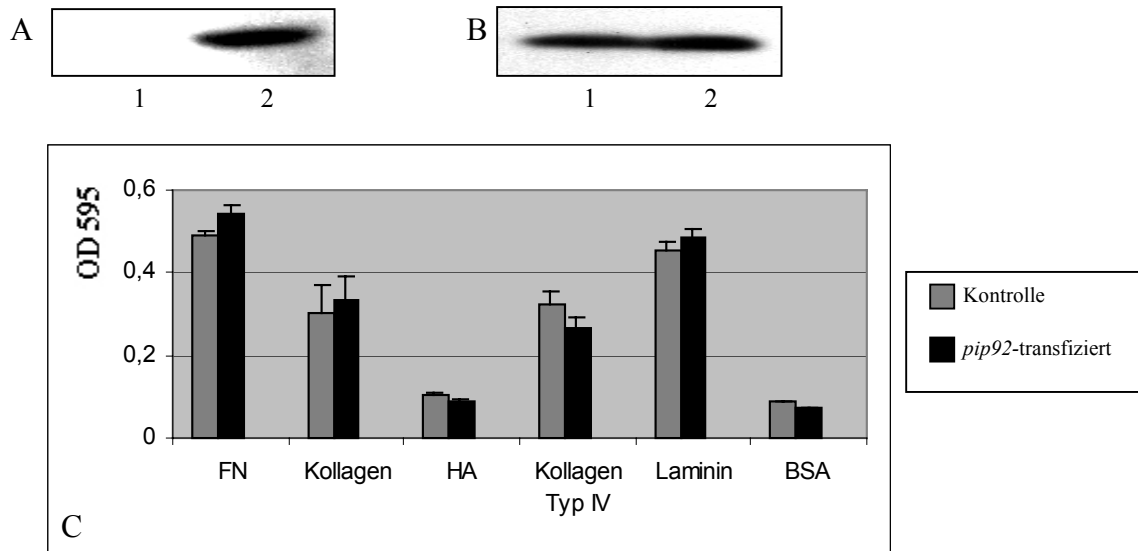


Abb. 31: Erhöhte Expression von *pip92* hat keinen Einfluss auf die Adhäsion an ECM- und Basallaminakomponenten von NIH 3T3-Zellen *in vitro*

A+B) Kontrolle der *pip92*-Expression

A) Westernblotanalyse von Gesamt-Zelllysaten der transfizierten Zellen. Detektion des transfizierten Pip92 mit Hilfe des monoklonalen anti-V5-Antikörpers. Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen.

B) Blot aus Abbildung A, gestript und mit anti- β -Aktin-Antikörper behandelt Spur 1: Kontrolltransfizierte, Spur 2: *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierte Zellen

C) $4 \cdot 10^4$ Kontroll- (graue Säulen) oder *pip92*-Expressionskonstrukt-transfizierten NIH 3T3-Zellen (schwarze Säulen) wurden 24 h nach Transfektion auf Fibronektin (FN), Kollagen, Hyaluronsäure (HA), Kollagen Typ IV, Laminin und Rinderserumalbumin (BSA)-behandelte Zellkulturplatten ausgesät und nach 45 min fixiert. Nach Färbung der Zellen mit 0,1% Kristallviolett und Entfärbung in 10% Essigsäure wurde die Optische Dichte (OD) bei 595nm im ELISA-reader gemessen. Die Absorption von 10% Essigsäure bei 595 nm wurde von den Messwerten subtrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Pip92 die Zellmigration auch in NIH 3T3-Fibroblasten positiv beeinflusst. Dies wurde bewiesen: erstens im Wundheilungsversuch, zweitens bei der chemotaktisch beeinflussten Wanderung und drittens bei der invasiven Wanderung. Allerdings wird die allgemeine Zellmotilität durch Pip92 nicht beeinflusst, da hierfür auch die Wanderung ohne Wachstumsfaktorgradient verstärkt sein sollte.

Die erhöhte Motilität kann nicht mit einer veränderten Adhäsion an ECM- oder Basallamina-Komponenten korreliert werden.

3.20 Onkogenes Potential des Proteins

Meine Versuche zeigen, dass Pip92 die Motilität und die invasive Migration von Fibroblasten positiv beeinflusst. Zusätzlich scheint es blockierend auf den durch Serumentzug vermittelten Eintritt in die Ruhephase zu wirken. Eine Eigenschaft, die vielen Onkogenen nachgesagt werden kann, z.B. *ras* (Barbacid, 1987). Hinzu kommt, dass Pip92 über Signalwege induziert wird, die mehrere Onkogene oder deren Vorläufer enthalten, wie z.B. *v-src* (Chung et al., 2001) oder *ras*, dessen Signal über MEK weitergeleitet wird (Chung et al., 1998). Schon seit den 70er Jahren ist bekannt, dass v-Src transformierend wirkt, (Bader, 1972; Kawai & Hanafusa, 1971; Martin, 1970; Stehelin et al., 1976), auch Ras wirkt transformierend (Barbacid, 1987) und MEK1/2 transformiert murine Fibroblasten (Campbell et al., 1998).

Deshalb ist es vorstellbar, dass Pip92 onkogene Eigenschaften besitzt, speziell wenn es konstitutiv exprimiert wird. In dieser Arbeit wurden Versuche durchgeführt, die dies untersuchen sollten.

Ein Hinweis auf das onkogene Potential eines Gens ist seine Fähigkeit Zellen soweit zu transformieren, dass sie in Zellkulturschalen dreidimensional wachsen. Untransformierte, adhätierende Zellen stellen das Zellwachstum ein, sobald sie in Zellkulturschalen eine Einzelzellschicht (*Monolayer*) gebildet haben, sie unterliegen der Kontaktinhibition. Transformierte Zellen hingegen proliferieren weiter und schieben sich übereinander, bilden sogenannten Foci (Abercrombie & Heaysman, 1954). Um festzustellen, ob Pip92 Focusbildung auslösen kann, wurden MEF-Zellen (*mouse embryonal fibroblasts*) auf Zellkulturschalen ausgesät und, nachdem sie eine Einzelzellschicht gebildet hatten, mit dem *pip92*-Expressionsvektor oder Kontrollvektor transfiziert. Parallel wurden die Zellen mit einem transformierenden, konstitutiv aktiven *ras*-Expressionskonstrukt und *pip92*-Expressionskonstrukt kotransfiziert, um zu sehen, ob sich die Anzahl sich bildender Foci in Abhängigkeit von Pip92 ändert. Es wurden jeweils Triplikate angesetzt. Die Quantifizierung der gebildeten Foci in Abbildung 32 zeigt, dass Pip92 keinen signifikanten Effekt auf die Focusbildung ausübt. Weder *pip92*-transfizierte, noch kontrolltransfizierte Zellen bilden Foci (Säule 1 und 2). Die Anzahl der durch konstitutiv aktives *ras* gebildeten Foci ändert sich durch *pip92* nicht wesentlich (vergl. Säule 3 mit 4).

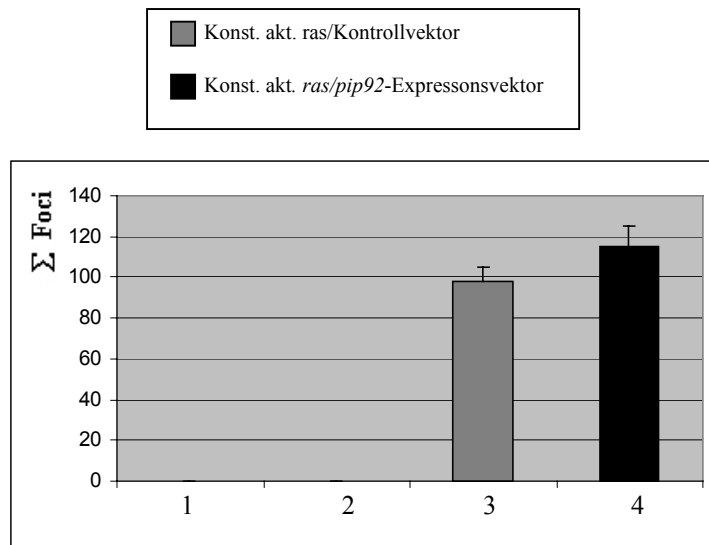


Abb. 32: Pip92 übt keinen Einfluss auf die Ras-vermittelte Focusbildung aus

In 10cm-Kulturschalen konfluent gewachsene MEF-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pCDNA3.1 (10µg, Säule 1) rPip92/V5/pcDNA3.1(10µg, Säule 2), oder mit der Kombination pCDNA3.1/Ras #66 (je 5µg, Säule 3) bzw. rPip92/V5/pcDNA3.1/Ras #66 (je 5µg, Säule 4) transfiziert, nach 14 Tagen fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und die Anzahl der Foci quantifiziert.

Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen.

Auch c-Myc kann zur Focusbildung führen, jedoch nur in Verbindung mit c-Ha-Ras (Makela et al., 1992). Ob Pip92 diesen Prozess beeinflusst, wurde anhand der Kotransfektion eines *pip92*-Expressionskonstrukts mit einem *c-myc*-Expressionskonstrukt und einem *c-Ha-ras*-Expressionskonstrukt getestet. Wie erwartet bilden sich Foci bei gleichzeitiger Expression von *c-myc* und *c-Ha-ras* (Abbildung 33, Säule 1). Die Anzahl der Foci wird jedoch durch zusätzliches Pip92 nicht signifikant verändert (Abbildung 33; vergl. Säule 2 und 3). Überexpression von *pip92* in Verbindung mit *c-Ha-ras* (Säule 4) oder *c-myc* (Säule 5) führt zu keiner Focusbildung. Auch Transfektion von Kontrollvektor mit *c-Ha-ras* oder *c-myc* übt keinen Einfluss auf die Focusbildung aus (Daten nicht gezeigt).

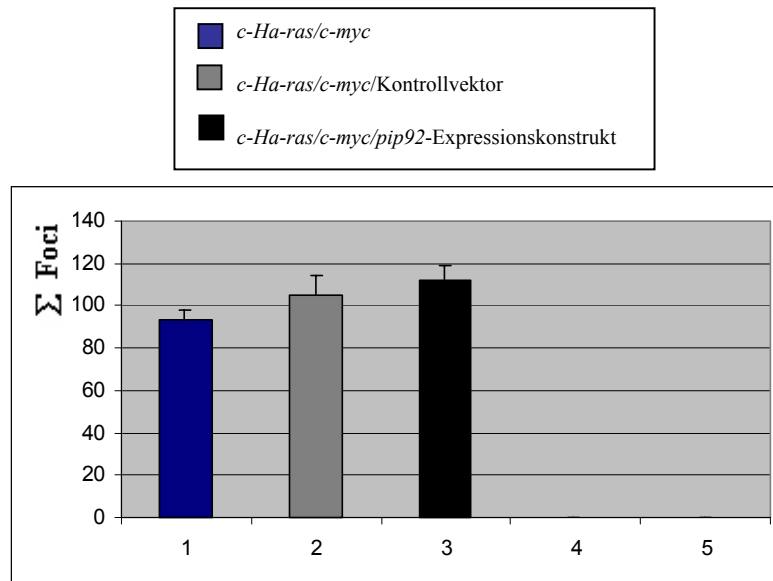


Abb. 33: Pip92 übt keinen Einfluss auf die c-Ha-Ras/c-Myc- vermittelte Focusbildung aus

In 10cm-Kulturschalen konfluent gewachsene MEF-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden pSVc-myc 1, PGEJ(6.6), pCDNA3.1 und rPip92/V5/pcDNA3.1 in unterschiedlichen Kombinationen transfiziert, nach 12 Tagen fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und die Anzahl der Foci quantifiziert.

Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen.

Säule1: jeweils 3 µg pSVc-myc1 und PGEJ(6.6)

Säule2: jeweils 3 µg pSVc-myc1 und PGEJ(6.6), zusätzlich 4µg pCDNA3.1

Säule3: jeweils 3 µg pSVc-myc1 und PGEJ(6.6), zusätzlich 4µg rPip92/V5/pcDNA3.1

Säule4: 3 µg pSVc-myc1 4 µg rPip92/V5/pcDNA3.1

Säule5: 3 µg PGEJ(6.6) 4 µg rPip92/V5/pcDNA3.1

Ein zweiter Hinweis auf das onkogene Potential eines Gens ist seine Fähigkeit Zellen so zu transformieren, dass sie die Fähigkeit erlangen ohne Adhäsion zu wachsen (*anchorage independent growth*). Die meisten primären oder immortalisierten Zellen, wie z.B. NIH 3T3-Fibroblasten sterben, wenn sie in Soft-Agar als Einzelzellen ausgesät werden. Viele transformierte Zellen sind jedoch in der Lage unter diesen Bedingungen zu proliferieren und Kolonien zu bilden.

Ein solcher Versuch wurde mit 3T3-Zellenklonen, die *pip92*-Expressionsvektor bzw. Kontrollvektor stabil im Genom integriert hatten, durchgeführt:

Es wurden Einzelzellen der verschiedenen Klone in Soft-Agar eingebettet und für 14 Tage im Zellkulturbrutschrank belassen. Transformierte Fibroblasten wachsen unter diesen Bedingungen und bilden Kolonien, wie die als Positivkontrolle eingesetzte *Ha-ras*-transformierte Fibrosarkoma Zelllinie 3J1 (Hofmann et al., 1998) zeigt (Abbildung 34A). Es ist zu sehen, dass die stabil transfizierten Zelllinien keine Kolonien bilden, ebenso wenig die untransfizierten NIH 3T3-Fibroblasten (vergl. Abbildung 34 B-D).

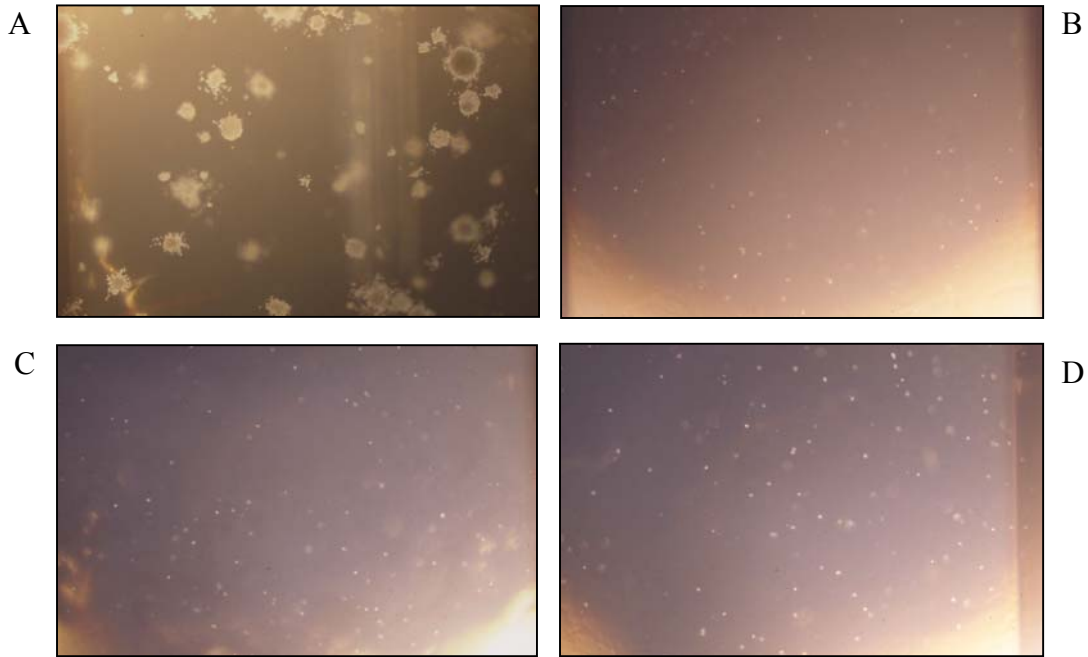


Abb. 34: konstitutive *pip92*-Überexpression befähigt NIH 3T3-Zellen nicht kontaktunabhängig zu wachsen

Die im Versuch eingesetzten Fibroblastenzelllinien wurden Zell-Zell-kontaktlos in ein Softagar/Kulturmedium-Gel eingebettet und für 14 Tage kultiviert. Nach 14 Tagen wurden Lichtbilder angefertigt.

A) Fibrosarkoma-Linie 3J1

B) NIH 3T3-Fibroblasten

C) konstitutiv *pip92*-überexprimierender NIH 3T3-Klon

D) Kontrollvektor-transfizierter NIH 3T3-Klon

Aus allen Versuchen, die das onkogene Potential von Pip92 betrafen, ist zu ersehen, dass exogen zugeführtes Wildtyp-Pip92 keinen transformierenden Effekt auf Fibroblasten hat.

4 Diskussion

Das Wissen über die Funktion von Pip92 konnte mit dieser Arbeit erheblich erweitert werden:

1.) Es konnte zum einen die Förderung der Motilität durch Pip92 in Bsp 73 1AS-Zellen im Wundheilungsversuch bestätigt und zum anderen auch in NIH 3T3-Fibroblasten gezeigt werden. Folgende Versuche, die dies in den Fibroblasten belegen, sind:

a) Wundheilungsversuch,

b) Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten und

c) invasive Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten.

2.) Pip92 ändert seine subzelluläre Lokalisation in NIH 3T3-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Zelldichte. In kontaktinhibierten Zellen ist es im Zytoplasma, in subkonfluenten Zellen im Kern lokalisiert. Dieser Effekt bezieht sich auf das konstitutiv schwach exprimierte endogene, das seruminduzierte, das exogen exprimierte und in Teilen auch auf das anisomycininduzierte Pip92. In konfluenten Fibroblasten wird durch Anisomycinbehandlung kein Pip92 induziert.

3.) Pip92 fördert einerseits die Apoptose in ruhenden Fibroblasten, andererseits scheint es den durch Serumentzug ausgelösten Eintritt in die Ruhephase zu inhibieren. Zum Auslösen dieser Wirkung dürfen die Zellen nicht kontaktinhibiert sein.

4.1 Subzelluläre Lokalisation von Pip92

Pip92 transloziert zwischen Zytoplasma und Nukleus. Ich konnte zeigen, dass sich das Protein bei geringer Zelldichte im Kern befindet, bei konfluenten Zellen im Zytoplasma. Dies gilt sowohl für das endogene, konstitutiv exprimierte Pip92 als auch für das seruminduzierte. Das ektopisch exprimierte Protein folgt demselben Mechanismus. Anisomycininduziertes Pip92 liegt in subkonfluenten Fibroblasten ebenfalls im Kern vor (siehe Abbildung 12, 10, 11, 25/26). Die Regulation der Lokalisation scheint eng verbunden mit der Kontaktinhibition zu sein, da die Brechung der Kontaktinhibition zur Akkumulation des Proteins im Kern führt (siehe Abbildung 13).

Das Protein könnte bei der Vermittlung der durch Zell-Zell- bzw. Zell-ECM-Kontakte ausgelösten Signalkaskade in den Kern eine Rolle spielen. Es wurde z.B. in 3T3-Fibroblasten

ein System aus den Proteinen contactinhibin und seines Rezeptors gefunden, das wachstumshemmende Signale aussendet, wenn die Zellen in engem Kontakt miteinander stehen (Gradl et al., 1995). Diese hemmenden Signale müssen bei subkonfluenten Zellen unterbunden sein. In Schwann-Zellen konnte ein weiteres, die Kontaktinhibition vermittelndes Protein identifiziert werden: CD44. In konfluenten Zellen ist der Tumorsuppressor Merlin dephosphoryliert, bindet ohne die Proteine Ezrin und Myosin an den zytoplasmatischen Teil von CD44 und inhibiert das Zellwachstum. In logarithmisch wachsenden Zellen ist Merlin phosphoryliert und bindet über einen Komplex mit Ezrin und Moesin an den zytoplasmatischen Teil von CD44. Wachstumsfördernde Signale werden über Signalketten bis in den Kern weitergeleitet, wo sie zu einer veränderten Genexpression führen (Morrison et al., 2001). Pip92 könnte möglicherweise in beide zitierten Zellsystemen eingreifen, indem es durch Translokation in den Kern die Expression von Genen reguliert.

Mit Hilfe von Microarray-Analysen wurde versucht Zielgene von Pip92 in Fibroblasten zu identifizieren. Meine vorläufigen Ergebnisse zeigen, dass in konfluent ausgesäten Fibroblasten wenig Gene beeinflusst waren. Unter der Annahme, dass es seine Funktion im Kern ausübt, kann diese Überexpression von *pip92* in konfluenten Fibroblasten zu keiner Veränderungen in Genexpression führen, da das Protein unter diesen Bedingungen zytoplasmatisch ist (siehe Abbildung 11). In subkonfluenten Fibroblasten wird endogenes *pip92* konstitutiv exprimiert und kann im Kern lokalisiert werden (siehe Abbildung 12). Da schon geringe Mengen an Transkriptionsfaktoren im Nukleus für eine starke Genexpression ausreichend sein könnten, ist es möglich, dass zusätzliches exogenes Pip92 die Genexpression nicht beeinflusst. Bessere Systeme wären z.B. Fibroblasten, die defizient für Pip92 wären; z.B. durch gezielte Gendeletion oder durch posttranskriptionelles *silencing* (RNAi). Die Herstellung einer *pip92*^{-/-}-Maus ist in Arbeit. Eine weitere Möglichkeit ist die schon erwähnte NES-Pip92-Mutante, die –sofern in ihrem Kernexport blockiert- aufgrund der Mutation auch bei konfluenten Fibroblasten im Kern lokalisiert werden könnte und dort zu einer veränderten Genexpression führen könnte.

Auch eine zytoplasmatische Funktion ist für das Protein denkbar, da es ja in konfluenten Zellen nach Serumstimulation in diesem Zellkompartiment lokalisiert werden kann (Abbildung 10). Allgemein sind Protein-Protein-Interaktionen vorstellbar, die z.B. die Vermittlung des kontaktinhibierenden Signals ermöglichen. Yeast-2-Hybrid-Versuche werden momentan durchgeführt, um Protein-Interaktionspartner von Pip92 zu identifizieren.

4.2 Block des nukleären Exports durch Leptomycin B

Die Lokalisation von Pip92 nach Leptomycin B-Behandlung im Kern konfluenter Zellen (siehe Abbildung 14) beweist, dass der nukleäre Export durch CRM1 reguliert wird (Fornerod et al., 1997).

Viele Proteine werden durch Translokation in unterschiedliche Zellkompartimente reguliert. Ein Beispiel hierfür ist p53, das nach Stresseinwirkung im Kern zu finden ist, wo es transkriptionell aktiv ist und nach Translokation ins Zytoplasma dort degradiert werden kann (Übersichtsartikel: (Woods & Vousden, 2001)). Die Fehlsteuerung der subzellulären Lokalisation steht in Verbindung mit der Entstehung mancher Krebsarten und dem Voranschreiten der Krankheit. So kann zum Beispiel das durch den Tumorsuppressor APC regulierte Protein β -Catenin in der frühen Phase der Dickdarmkrebsentstehung im Zytoplasma nachgewiesen werden, im weiteren Verlauf ist es eher im Kern vorzufinden (Henderson & Fagotto, 2002). Auch manche Tumorsuppressoren zeigen eine Translokation zwischen Kern und Zytoplasma. Von großem Interesse sind hierbei die Tumorsuppressoren APC und VHL, da beide ebenso wie Pip92 abhängig von der Subkonfluenz der Zellen im Kern zu finden sind. In konfluenten Zellen sind beide Proteine zytoplasmatisch (Zhang et al., 2001) (Lee et al., 1996).

Gezieltes Mutieren der Pip92-NES-Sequenz könnte somit zu einer konstitutiv im Kern vorliegenden Pip92-Mutante führen. Falls Pip92 nukleäre Prozesse beeinflusst, könnte solche Mutationen zu einem konstitutiv aktiven Protein führen. Auf der anderen Seite ist es vorstellbar, dass Mutationen in den NLS zu einem Pip92-Protein führen, das nicht mehr in den Kern transloziert und eventuell eine inaktive Mutante des Proteins darstellt. Die Versuche, die das onkogene Potential des Pip92 untersuchen, zeigen, dass das Wildtyp-Protein infolge von Überexpression auf Fibroblasten nicht transformierend wirkt (Abbildung 32-34). Dennoch kann ein onkogenes Potential nicht abschließend negiert werden. Es könnte sein, dass Pip92 seine onkogene Wirkung erst offenbart, wenn durch Mutationen, die seine subzelluläre Lokalisation beeinflussen, seine hypothetische nukleäre Funktion beeinflusst wurde.

Natürlich können auch Mutationen in anderen Proteindomänen zu funktionellen Mutanten führen. Denkbar sind z.B. die potentiellen Phosphorylierungsstellen oder die potentielle N-Glykosylierungsstelle.

Herstellung solcher Mutanten könnte dem Protein einige seiner funktionellen Geheimnisse entreißen.

4.3 Pip92 und Zellmigration

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ektopisch überexprimiertes Pip92 sowohl die Zellmigration von Bsp73 1AS-Zellen als auch die von NIH 3T3-Zellen in mehreren Versuchsanordnungen positiv beeinflusst:

- in Wundheilungsexperimenten in beiden Zellsystemen (siehe Abbildung 7 und 28)
- bei chemotaktisch beeinflussten Wanderungen entlang eines Wachstumsfaktorgradienten in NIH 3T3-Zellen (siehe Abbildung 29)
- bei invasiven Wanderungen entlang eines Wachstumsfaktorgradienten in NIH 3T3-Zellen (siehe Abbildung 30).

N.Novac (2001) konnte feststellen, dass *pip92*-überexprimierende 1AS-Zellen eine erhöhte Expression des Osteopontingens zeigen. Das Protein begünstigt *in vivo* die Wanderung von Makrophagen und ist korreliert mit erhöhter Invasivität und mit verstärktem Metastasierungspotential von Tumorzellen (Weber, 2001) (Senger et al., 1983). *In vitro*-Versuche von mir und N.Novac (2001) zeigen, dass Pip92 die chemotaktische Wanderung durch Matigel in NIH 3T3-(Abbildung 30) und Bsp73 1AS-Zellen fördert (N.Novac, 2001).

Falls Osteopontin für die erhöhte Migration verantwortlich ist, sollte Blockierung des Osteopontins mit einem spezifischen Antikörper die durch *pip92*-Überexpression verstärkte Migration von Bsp73-1AS-Zellen im Wundheilungsversuch unterdrücken. Diese Versuche werden momentan durchgeführt.

Die Erhöhung der Zellmigration durch Pip92 in Bsp73 1AS-Zellen korreliert mit einer erhöhten Metastasierungsrate solcher Zellen. Nichtpublizierte Daten der Arbeitsgruppe Sleeman zeigen, dass konstitutiv *pip92*-überexprimierende Bsp73 1AS-Zellen eher zur Bildung von Lymphknotenmetastasen neigen als kontrolltransfizierte.

Ob Osteopontin auch in NIH 3T3-Fibroblasten infolge von *pip92*-Überexpression verstärkt exprimiert wird, kann momentan nicht genau geklärt werden.

Die Ergebnisse bei den Migrationsversuchen lassen vermuten, dass Pip92 die Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten fördert. Dies gilt für die von mir untersuchten NIH 3T3-Fibroblasten sowie für die Bsp73 1AS-Zellen (Novac, 2001). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch Pip92 im Kontext mit den Wachstumsfaktoren im konditionierten Medium die allgemeine, nicht zielgerichtete Zellmotilität erhöht wird. Die

erhöhte Anzahl von Zellen an der Unterseite des Filters wäre somit durch die erhöhte zufällige Wanderung in diese Richtung zu erklären. Ob dies der Fall ist, soll ein momentan in Arbeit befindlicher Versuch zeigen, bei dem in der oberen und unteren Kammer konditioniertes Medium vorhanden ist. Adhärenzen - im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen - mehr *pip92*-überexprimierende Zellen an der Unterseite des Filters, so ist die erhöhte Migrationsrate durch Erhöhung der allgemeinen Motilität zu erklären. Gibt es keine Unterschiede zwischen den Zellen, so ist die zielgerichtete Wanderung entlang eines Wachstumsfaktorgradienten die Erklärung.

4.4 Einfluss von Pip92 auf den Zellzyklus und die Apoptose

In Bezug auf die Regulation der Apoptose bzw. des Zellzyklus in Fibroblasten sieht unser Arbeitsmodell wie folgt aus:

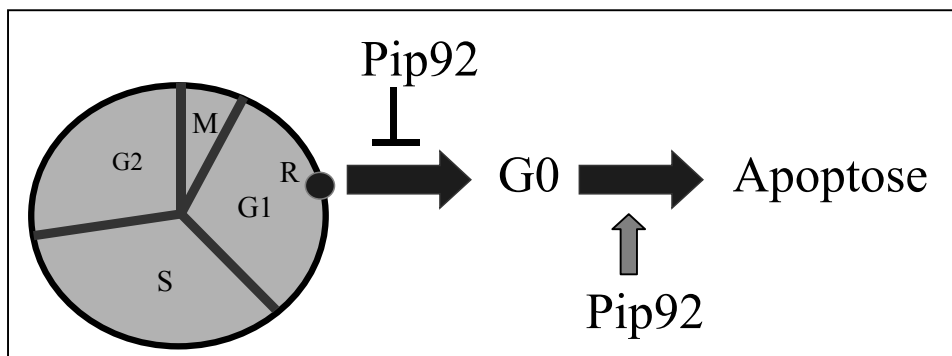


Abb.:35 Arbeitsmodell: Pip92 beeinflusst den Zellzyklus in Fibroblasten auf zweierlei Weise: Block beim durch Serumentzug ausgelösten G1/G0-Übergang; Förderung der Apoptose bei ruhenden Fibroblasten. G0: Ruhephase G1: G1-Phase G2: G2-Phase R: Restriktionspunkt

Der Effekt von Pip92 auf die Zelle ist in ruhenden und proliferierenden Fibroblasten unterschiedlich:

Einerseits scheint es, dass das Protein den Eintritt durch Serumentzug in die Ruhephase blockt und andererseits in ruhenden Fibroblasten die Apoptose fördert.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl von *pip92*-überexprimierenden Fibroblasten nach Entzug des Serums höher ist als bei kontrolltransfizierten (Abbildung 19). Diese Beobachtung kann nur bei subkonfluent ausgesäten Fibroblasten gemacht werden, was mit einer Kernlokalisierung von Pip92 korreliert. Konfluent ausgesäte Fibroblasten zeigen diesen Effekt nicht (vergl. Abbildung 19 A+B). Im Folgeversuch konnte ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte Apoptoserate in kontrolltransfizierten Zellen dafür verantwortlich ist (siehe Abbildung 21 A+B). Pip92 muss demnach den Zellzyklus beeinflussen. Wir vermuten, dass der Übergang in die Ruhephase, bzw. der Arrest am Restriktionspunkt durch eine nukleäre Funktion von Pip92 beeinflusst wird.

Zellen gehen in Abwesenheit von mitogenen Stimuli von einem proliferierenden Status in einen ruhenden Status über. Sie sind am Restriktionspunkt arretiert (Pardee, 1974). Die Überwindung des Restriktionspunkts wird von mehreren Faktoren im Zusammenspiel geregelt: zum einen durch den Phosphorylierungsstatus des Retinoblastom-Proteins (pRB), zum anderen durch die Cyklin-abhängigen Kinasen und deren Inhibitoren (Sherr, 1994).

Tumorsuppressorgene und Onkogene können den Eintritt in die Ruhephase verhindern. Z.B. gelangen Fibroblasten, die das humane Proto-Onkogen *c-myc* überexprimieren, durch Serumentzug nicht mehr in die G₀-Phase (Karn et al., 1989). Man nimmt an, dass das Protein direkt an der Replikation von DNA beteiligt ist (Heikkila et al., 1987; Studzinski et al., 1986) (Iguchi-Arigo et al., 1987). Ein weiteres Beispiel sind durch SV40 transformierte NIH 3T3-Fibroblasten. Das Virusgenom kodiert für das T-Antigen, das mit den Tumorsuppressoren pRB und p53 interagiert, was für die transformierende Wirkung verantwortlich ist. Solche Fibroblasten sind ebenfalls insensitiv auf Serumentzug (Hoffman & Jacobsen, 1980).

Auch der mutierte Tumorsuppressor VHL ist in der Lage Zellen in serumarmem Medium konstitutiv im Zellzyklus zurückzuhalten. Das wird bewiesen durch die Beobachtung, dass in Nierenkarzinomen, welche mutiertes, inaktives VHL exprimieren, die Einbringung von wt-VHL die Zellen nach Serumentzug wieder in die G₀-Phase bringen kann (Pause et al., 1998). Interessant ist, dass in NIH 3T3-Fibroblasten die subzelluläre Lokalisation des

Tumorsuppressors abhängig von der Zelldichte ist: in subkonfluenten Zellen ist VHL nukleär, in konfluenten Zellen zytoplasmatisch (Lee et al., 1996). Dies sind zwei bemerkenswerte Ähnlichkeiten zu Pip92.

Der den Restriktionspunkt mitregulierende CDK-Inhibitor p27 konnte mit der durch Mitogenentzug vermittelten Zellzyklusarretierung in Verbindung gebracht werden (Coats et al., 1996).

Coats konnte zeigen, dass subkonfluente Balb/c-3T3-Fibroblasten nach 24-stündigem Entzug von Serum in G1 arretieren. Dies korreliert mit einem achtfachen Anstieg der zellulären Proteinmenge des CDK-Inhibitors p27. Die Reduktion der p27-Proteinmenge durch p27-antisense-RNA-Behandlung führte nach Serumentzug zu einer deutlich erhöhten Anzahl von Zellen in der S-Phase, während kontrollbehandelte Zellen wie erwartet in der G1-Phase akkumulierten (Coats et al., 1996). In Einklang zu diesen Beobachtungen ist, dass Überexpression von p27 in Lungenepithelzellen den Eintritt in die S-Phase blockiert (Polyak et al., 1994). Es ist denkbar, dass Pip92 die Funktionen von p27 beeinflusst. So könnte zum Beispiel die Expression des CDK-Inhibitors durch Pip92 negativ beeinflusst werden, was infolge der nicht ausreichenden p27-Menge eine Arretierung am Restriktionspunkt durch Serumentzug verhindern und so zum Vollenden des Zellzyklus führen könnte. Experimente, die hierüber Auskunft geben, könnten helfen die molekularen Mechanismen der Pip92-Funktion aufzuklären und scheinen vielversprechend.

Ein weiterer Ansatzpunkt für Pip92 könnte die Familie der Rb-Proteine sein. Diese Proteine werden am Restriktionspunkt phosphoryliert und der gebundene Transkriptionsfaktor, ein Protein der E2F-Familie, löst sich. Dieser aktiviert die Expression verschiedener Gene, die für das Fortschreiten des Zellzyklus nötig sind. In der M-Phase wird pRb dephosphoryliert, kann E2F nicht mehr freisetzen (Harbour & Dean, 2000). Sage et al. erwähnt unpublizierte Versuche, in denen MEF-Zellen, mit ausgeschalteten Genen für alle drei Rb-Familienmitglieder ($Rb^{-/-}$, $p107^{-/-}$, $p130^{-/-}$), unter subkonfluenten Bedingungen nach Entfernung des Serums nicht in die G0-Phase eintreten (Sage et al., 2000). Solches vermuten wir auch bei *pip92*-überexprimierenden 3T3-Fibroblasten. Allerdings zeigen solche Zellen auch eine erhöhte Apoptoserate nach Entfernung des Serums, was bei subkonfluenten, *pip92*-überexprimierenden Fibroblasten nur der Fall ist, wenn sie sich schon in der G0-Phase befinden (Abbildung 21). MEF-Zellen, die nur defizient für das Familienmitglied pRb sind, können durch Serumentzug immer noch aus dem Zellzyklus ausscheren (Herrera et al., 1996).

Ein zusätzlicher Ansatzpunkt für Pip92 könnten die Cycline sein. Überexpression von Cyclin D1 und D2 bzw. E in Fibroblasten erschwert es den Zellen aus dem Zellzyklus auszuscheren. Umgekehrt ist diese Überexpression nicht in der Lage ruhende Zellen zur Proliferation zu zwingen, reduziert allerdings die Abhängigkeit der Proliferation von Serum (Quelle et al., 1993) (Ohtsubo & Roberts, 1993).

4.5 Proapoptotische Wirkung von Pip92

Neben dem inhibierenden Effekt auf den Eintritt in die Ruhephase hat Pip92 auch einen proapoptotischen Effekt. Eine subkonfluente durch 72 h Serumentzug aus dem Zellzyklus ausgescherte Fibroblastenpopulation besitzt eine Subpopulation von apoptotischen Zellen (siehe Abbildung 21C). Der Anteil dieser Subpopulation wird vergrößert, wenn den ruhenden Fibroblasten exogenes Pip92 zugeführt wird (siehe Abbildung 21D). Dieser Einfluss ist in konfluenten Fibroblasten nicht zu sehen. Auch Überexpression von *pip92* vergrößert die Anzahl der apoptotischen Zellen nicht (siehe Abbildung 21 G und H). Wieder ist ein Pip92-vermittelter Effekt abhängig von der Zelldichte, was zeigt, dass auch der apoptoseverstärkende Effekt von der Kernlokalisierung des Proteins abhängt. Ob die proapoptotische Wirkung von Pip92 in primären Neuronen und Cos1-Zellen (Schneider et al., 2004) auch von der Zelldichte und der nukleären Lokalisation des Proteins abhängt, ist nicht bekannt.

Wie kann Pip92 die Apoptose einleiten? Hier gibt es viele Möglichkeiten, die am Ende immer den extrinsischen oder intrinsischen apoptoseauslösenden Signalweg betreffen, sei es durch negative Beeinflussung der antiapoptotischen Faktoren oder durch Förderung der proapoptotischen Faktoren. Eine Aussage über die Art, wie dies geschehen kann, ist sehr spekulativ. Die Kernlokalisierung könnte ein Hinweis auf eine transkriptionelle Regulierungsfunktion sein, eventuell durch eine direkte Interaktion mit der DNA, was die Sequenzähnlichkeit zu den DNA-bindenden Domänen der Proteine Jun D und HIV-Integrase vermuten lässt. Pip92 könnte so proapoptotische Gene exprimieren oder anti-apoptotische reprimieren. Aber auch Protein-Protein-Interaktionen sind denkbar.

Weitere Versuche werden möglicherweise die proapoptotische Wirkung von Pip92 näher charakterisieren.

Es ist möglich, dass die konfluenten Fibroblasten Faktoren sezernieren, welche die Apoptose unterdrücken. Ist dies der Fall, so könnte konditioniertes Medium von konfluenten Fibroblasten die ruhenden, subkonfluenten Zellen vor der Apoptose bewahren.

Eine weitere interessante Frage ist, ob der proapoptotische Effekt von Pip92 nur in der Ruhephase zu sehen ist und vom Entzug des Serums abhängig ist. Die Beantwortung dieser Frage soll folgender Versuch liefern: Subkonfluente logarithmisch wachsende Fibroblasten werden durch Mitomycin oder ähnlich wirkende Substanzen in ihrem serumabhängigen Wachstum geblockt. Leiten so behandelte Fibroblasten die Apoptose ein und verstärkt Pip92 diesen Effekt? Diese Versuche werden momentan durchgeführt.

4.6 Hypothetische Wechselwirkungen von Pip92 mit pRb

Neben der von mir gezeigten funktionellen Beeinflussung der Apoptose und des Zellzyklus wird Pip92 auch mit Differenzierungsvorgängen assoziiert (Shimizu et al., 1991). Wie ist es möglich, dass Pip92 alle diese drei unterschiedlichen Prozesse beeinflussen kann?

Das den Restriktionspunkt kontrollierende Rb-Protein ist möglicherweise der Schlüssel, der zur Beantwortung der Frage führt.

Die Entscheidung, welcher, der drei Wege eingeschlagen wird, fällt am Restriktionspunkt, der gleichsam eine Weiche darstellt. Je nach Stellung wird die Zelle gezwungen einen anderen Weg einzuschlagen. Einerseits können Zellen den Zellzyklus beenden und somit sich vermehren, andererseits können Zellen hier im Zyklus gestoppt werden und ausdifferenzieren, bzw. die Apoptose einleiten. Die Funktion von pRb bei diesen Prozessen ist sehr detailliert beschrieben worden und ein umfassender Überblick an dieser Stelle ist nicht möglich. Dennoch sollen hier die wichtigsten Punkte angesprochen werden:

4.6.1 Regulation der Apoptose durch pRb

Das Verständnis dieses Prozesses ist in vielen Artikeln dokumentiert.

Die wichtigsten Fakten sind hierbei, dass der Tumorsuppressor pRb durch Verlust oder Inaktivierung sich vom Transkriptionsfaktor E2F ablöst und dieser dadurch in die Lage versetzt wird seine Zielgene zu aktivieren. Unter diesen befinden sich ARF, p73 und APAF-1. Allen dreien konnte ein proapoptotischer Effekt nachgewiesen werden. (siehe Übersichtsartikel (Hickman et al., 2002; Sears & Nevins, 2002)).

4.6.2 Regulation der Differenzierung durch pRb

Es werden zwei sich ergänzende Mechanismen postuliert, wie pRb Differenzierungsvorgänge steuert: zum einen durch die Repression der transkriptionellen Aktivität von E2F und zum anderen durch Interaktion mit transkriptionellen Repressoren sowie Steigerung ihrer reprimierenden Aktivität.

Mehrere Differenzierungssysteme zeigen, dass pRb beim irreversiblen Austritt nach der Mitose in dephosphorylierter Form vorliegt. Ein interessantes Beispiel hierfür ist die Leukämie-Zelllinie HL-60, die nach Stimulation mit TPA in makrophagenähnliche Zellen ausdifferenziert. Hierbei wird nicht nur *ETR101* exprimiert (Shimizu et al., 1991), sondern auch pRb dephosphoryliert (Chen et al., 1989). Bei Differenzierungsvorgängen kommt es einerseits zur vermehrten Ausbildung von pRb-E2F-Komplexen, andererseits akkumuliert freies dephosphoryliertes pRb. Dieses kann nun an transkriptionelle Repressoren binden und deren Aktivität steigern. (siehe Übersichtsartikel (Lipinski & Jacks, 1999))

4.6.3 Regulation des Zellzyklus durch pRb

Dieser Mechanismus ist sehr detailliert beschrieben worden (z.B. Übersichtsartikel (Ho & Dowdy, 2002)). Die entscheidenden Punkte sind hierbei, dass der Tumorsuppressor pRb am Ende der M-Phase dephosphoryliert wird und so die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie bindet. Durch wachstumsfördernde Signale kommt es zur Phosphorylierung von pRb und die Transkriptionsfaktoren werden wieder freigesetzt. Sie aktivieren Gene, die den Eintritt in den Zellzyklus fördern.

Weitere funktionelle Analysen, die nicht nur den Einfluss von Pip92 auf pRb untersuchen, sondern auch den Einfluss auf die Zellmigration charakterisieren, sollten durchgeführt werden, um Pip92 seine noch versteckten Geheimnisse zu entreißen. Dienlich hierfür werden sicherlich die in der Herstellung befindlichen bzw. bereits vorhandenen *in vivo*-Maus-Modelle sein: eine *pip92*^{-/-}-Maus und transgene *pip92*-Maus-Linien.

4.7 Mögliche physiologische Bedeutung von Pip92 in Fibroblasten

Wie können meine Ergebnisse im physiologischen Kontext interpretiert werden? Pip92 erhöht die Zellmotilität, hemmt den Eintritt in die G0-Phase des Zellzyklus und fördert in ruhenden Fibroblasten die Apoptose. Ein physiologischer Vorgang, bei dem alle drei Prozesse eine Rolle spielen könnten, ist die Wundheilung. Nach Verletzung muss die Wunde durch migrierende Fibroblasten wieder geschlossen werden. In dieser Situation gibt es nur wenige Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte, die Fibroblasten sind nicht mehr kontaktinhibiert, Pip92 ist nukleär.

Dadurch wird verhindert, dass die Fibroblasten in die Ruhephase eintreten. Sie müssen sich teilen, um die Wunde zu schließen. Nach Abschluss der Heilung gibt es genügend Zell-Zell- bzw. Zell-ECM-Kontakte, so dass das Protein ins Zytoplasma transloziert und die Zellen aufgrund der Kontaktinhibition in die Ruhephase eintreten. Löst sich eine solche Zelle aus dem Zellverband, transloziert Pip92 in den Kern und die Zelle wird durch Apoptose eliminiert.

In metastasierenden Krebszellen könnte es sein, dass hier die migrationsfördernde Wirkung des Pip92 zum Tragen kommt und die proapoptotische Wirkung durch Mutationen in apoptoseregulierenden Genen unterdrückt wird.

Das Ziel der Arbeit sollte sein durch funktionelle Analysen einen tieferen Einblick in die Funktion von Pip92 bei folgenden miteinander verknüpften Prozessen zu bekommen: Tumorprogression, Metastasierung, Zellzykluskontrolle, Apoptose und Zellmigration.

Die von mir vorgelegte Arbeit beinhaltet Erkenntnisse über die Funktion von Pip92 in allen diesen Punkten und erweitert dadurch das Verständnis der *pip92*-Expression wesentlich. Basierend auf meinen Erkenntnissen sollte es durch weiterführende Versuche möglich sein die molekularen Mechanismen von Pip92 zu ergründen, um letztendlich die physiologische Relevanz der *pip92*-Expression zu verstehen.

5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azido-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACF	engl. <i>aberrant crypt foci</i>
AGS	gastritische Adenokarzinoma-Zellen
AK	Antikörper
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BH	BCL-2 <i>homology</i>
BSA	engl.: <i>bovine serum albumine</i> = Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C'	Carboxy-Terminus
cAMP	zyklisches AMP
CAMs	engl. <i>cell adhesion molecules</i>
CARD	engl. <i>caspase-associated recruitment domains</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CDK	engl. <i>cyclin-dependent-kinases</i>
CDKI	CDK-Inhibitoren
Chx1	Cycloheximid
CRE	engl. <i>cAMP responsive element</i>
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DD	engl. <i>death domains</i>
DED	engl. <i>death effector domains</i>
dest. Wasser	destilliertem Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungen

DTT	Dithiothreitol
ECL	engl. <i>enhanced chemofluorescence</i>
ECM	engl. <i>extra cellular matrix</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGF	Epidermis-Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylen Glycol-bis(β -Aminoethyl- ether)-N,N,N,N-Tetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
et al.	und andere (lateinisch et alii)
ETR 101	engl. <i>early TPA responsive</i>
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FAK	engl. <i>focal adhesion kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluorezeinisothiozyanat
FN	Fibronektin
FZK	Forschungszentrum Karlsruhe
G418	Geneticin-Sulfat
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	engl. <i>green fluorecence protein</i>
GTP	Guanosin-Triphosphat
HA	Hyaluronsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HRP	Meerretich Peroxidase
HTLV-I	human T-cell leukaemia virus type I
IAP	<i>baculovirus inhibitor of apoptosis proteins</i>
ICAMs	interzelluläre Adhäsionsmoleküle
IEG	engl. <i>immediate early gene</i>

Abkürzungen

IER2	engl. <i>immediate early response</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	membranständiges Immunglobulin
INK4	<i>Inhibitor of kinase 4-Familie</i>
JNK	engl. <i>jun-N-terminal kinase</i>
Konz.	Konzentration
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LFA-1	engl. <i>Lymphocyte function associated Antigen 1</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	engl. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MEK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MT-MMTs	Membran-gebundene MMPs
N´	Amino-Terminus
NB-ARC	<i>nucleotide binding oligomerisation</i>
NES	Nukleäres Exportsignal
NFκB	engl. <i>nuclear factor</i> κ <i>B</i>
NGF	engl. <i>nerve growth factor</i>
NLS	engl. <i>nuclear-localisation-signal</i>
NMDA	N-methyl D-aspartate
NPC	engl. <i>nuclear pore complexes</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid Gelelektrophorese
PA_s	Plasminogen Aktivatoren
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	engl. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGF	engl. <i>platelet derived growth factor</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Pip92	engl. <i>proline-rich induced protein</i>

Abkürzungen

PKA	Protinkinase A
PKC	Protinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
POD	Peroxidase
RB	Retinoblastom
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
siRNA	eng. <i>small interfering RNA</i>
SRE	engl. <i>serum response element</i>
SRF	engl. <i>serum response factor</i>
SSH	engl. <i>suppression subtractive hybridisation</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	engl. <i>Tris buffered saline/ Tween</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin
TGF	Tumor Growth Factor
TIMB	engl. <i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF	engl. <i>tumor necrosis factor</i>
tPA	engl. <i>tissue Plasminogen-Aktivator</i>
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRE	engl. <i>TPA responsive element</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
UV	Ultraviolett

Abkürzungen

VCAMs	vaskuläre Adhäsionsmoleküle
VIP	engl. <i>vasoactive intestinal peptide</i>
v/v	Volumenprozent, engl. <i>volume per volume</i>
w/v	Masse pro Volumen, engl. <i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-Indoyl- β -Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
z.T	zum Teil

Einheiten

°C	Grad Celcius
cm	Zentimeter
g	Faktor der Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
l	Liter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
M	Mol
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
pH	pH-Wert
U	Unit Maß für Restikionsendunukleasenaktivität
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
μCi	MikroCurie
μl	Mikroliter

Aminosäuren

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

6 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M. & Heaysman, J.E. (1954). *Exp Cell Res*, **6**, 293-306.
- Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Wang, L., Talanian, R.V., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. (1997). *Cancer Res*, **57**, 615-9.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. & Yuan, J. (1996). *Cell*, **87**, 171.
- Apte, S.S., Olsen, B.R. & Murphy, G. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 14313-8.
- Arao, Y., Kikuchi, A., Kishida, M., Yonekura, M., Inoue, A., Yasuda, S., Wada, S., Ikeda, K. & Kayama, F. (2004). *Mol Endocrinol*, **18**, 2255-67.
- Bader, J.P. (1972). *J Virol*, **10**, 267-76.
- Baghdassarian, N. & Ffrench, M. (1996). *Hematol Cell Ther*, **38**, 313-23.
- Barbacid, M. (1987). *Annu Rev Biochem*, **56**, 779-827.
- Basset, P., Okada, A., Chenard, M.P., Kannan, R., Stoll, I., Anglard, P., Bellocq, J.P. & Rio, M.C. (1997). *Matrix Biol*, **15**, 535-41.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S. & Giri, A.K. (2001). *Mutat Res*, **488**, 171-94.
- Bautz, F., Denzlinger, C., Kanz, L. & Mohle, R. (2001). *Blood*, **97**, 3433-40
- Bebien, M., Salinas, S., Becamel, C., Richard, V., Linares, L. & Hipskind, R.A. (2003). *Oncogene*, **22**, 1836-47.
- Billstrom, A., Lecander, I., Dagnaes-Hansen, F., Dahllof, B., Stenram, U. & Hartley-Asp, B. (1995). *Prostate*, **26**, 94-104.
- Boden, C. (2002). *Diplomarbeit*.
- Bortoff, K.D., Zhu, C.C., Hrywna, Y. & Messina, J.L. (1997). *Endocrine*, **7**, 199-207.
- Burnichon, V., Jean, S., Bellon, L., Maraninchi, M., Bideau, C., Orsiere, T., Margotat, A., Gerolami, V., Botta, A. & Berge-LeFranc, J.L. (2003). *Toxicol Lett*, **143**, 155-62.

- Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossman, K.L., Clark, G.J. & Der, C.J. (1998). *Oncogene*, **17**, 1395-413.
- Cavallaro, U., Schaffhauser, B. & Christofori, G. (2002). *Cancer Lett*, **176**, 123-8.
- Chambers, A.F. & Matrisian, L.M. (1997). *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1260-70.
- Charles, C.H., Simske, J.S., O'Brien, T.P. & Lau, L.F. (1990). *Mol Cell Biol*, **10**, 6769-74.
- Chen, C.Y. & Shyu, A.B. (1995). *Trends Biochem Sci*, **20**, 465-70.
- Chen, L., Ma, S., Li, B., Fink, T., Zachar, V., Takahashi, M., Cuttichia, J., Tsui, L.C., Ebbesen, P. & Liu, X. (2003). *J Gen Virol*, **84**, 3203-14.
- Chen, P.L., Scully, P., Shew, J.Y., Wang, J.Y. & Lee, W.H. (1989). *Cell*, **58**, 1193-8.
- Chiou, C.C., Chan, C.C., Sheu, D.L., Chen, K.T., Li, Y.S. & Chan, E.C. (2001). *Gut*, **48**, 598-604.
- Chung, K.C., Gomes, I., Wang, D., Lau, L.F. & Rosner, M.R. (1998). *Mol Cell Biol*, **18**, 2272-81.
- Chung, K.C., Kim, S.M., Rhang, S., Lau, L.F., Gomes, I. & Ahn, Y.S. (2000a). *Eur J Biochem*, **267**, 4676-84.
- Chung, K.C., Shin, S.W., Yoo, M., Lee, M.Y., Lee, H.W., Choe, B.K. & Ahn, Y.S. (2000b). *J Neurochem*, **75**, 9-17.
- Chung, K.C., Sung, J.Y., Ahn, W., Rhim, H., Oh, T.H., Lee, M.G. & Ahn, Y.S. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 2132-8.
- Coats, S., Flanagan, W.M., Nourse, J. & Roberts, J.M. (1996). *Science*, **272**, 877-80.
- Coleclough, C., Kuhn, L. & Lefkovits, I. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1753-7.
- Conese, M. & Blasi, F. (1995). *Baillieres Clin Haematol*, **8**, 365-89.
- Coussens, L.M. & Werb, Z. (1996). *Chem Biol*, **3**, 895-904.
- Cryns, V. & Yuan, J. (1998). *Genes Dev*, **12**, 1551-70.
- Curran, S. & Murray, G.I. (2000). *Eur J Cancer*, **36**, 1621-30.
- Dalton, S. & Treisman, R. (1992). *Cell*, **68**, 597-612.
- Denhardt, D.T. & Guo, X. (1993). *Faseb J*, **7**, 1475-82.

- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. & Siebert, P.D. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6025-30.
- Donjerkovic, D. & Scott, D.W. (2000). *Cell Res*, **10**, 1-16.
- Duan, H. & Dixit, V.M. (1997). *Nature*, **385**, 86-9.
- Dulbecco, R. (1970). *Nature*, **227**, 802-6.
- Ebrahimzadeh, P.R., Hogfors, C. & Braide, M. (2000). *J Leukoc Biol*, **67**, 651-61.
- Eschelbach, A., Hunziker, A. & Klimaschewski, L. (1998). *Ann N Y Acad Sci*, **865**, 181-8.
- Fagotto, F. & Gumbiner, B.M. (1996). *Dev Biol*, **180**, 445-54.
- Feldner, J.C. & Brandt, B.H. (2002). *Exp Cell Res*, **272**, 93-108.
- Ferri, K.F. & Kroemer, G. (2001). *Nat Cell Biol*, **3**, E255-63.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I.W. (1997). *Cell*, **90**, 1051-60.
- Frisch, S.M. & Francis, H. (1994). *J Cell Biol*, **124**, 619-26.
- Frolov, M.V. & Dyson, N.J. (2004). *J Cell Sci*, **117**, 2173-81.
- Goldberg, G.I., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., Wilhelm, S. & He, C.S. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8207-11.
- Gorlich, D. (1997). *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 412-9.
- Gorlich, D. & Kutay, U. (1999). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 607-60.
- Gottesman, M. (1990). *Seminars in Cancer Biology*, **1**, 97-100.
- Gradl, G., Faust, D., Oesch, F. & Wieser, R.J. (1995). *Curr Biol*, **5**, 526-35.
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998). *Science*, **281**, 1309-12.
- Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J. (1999). *Genes Dev*, **13**, 1899-911.
- Guilford, P. (1999). *Mol Med Today*, **5**, 172-7.
- Guirguis, R., Margulies, I., Taraboletti, G., Schiffmann, E. & Liotta, L. (1987). *Nature*, **329**, 261-3.

- Gunthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. & Herrlich, P. (1991). *Cell*, **65**, 13-24.
- Guo, Y., Ma, J., Wang, J., Che, X., Narula, J., Bigby, M., Wu, M. & Sy, M.S. (1994). *Cancer Res*, **54**, 1561-5.
- Harbour, J.W. & Dean, D.C. (2000). *Genes Dev*, **14**, 2393-409.
- Heikkila, R., Schwab, G., Wickstrom, E., Loke, S.L., Pluznik, D.H., Watt, R. & Neckers, L.M. (1987). *Nature*, **328**, 445-9.
- Heiss, M.M., Allgayer, H., Gruetzner, K.U., Funke, I., Babic, R., Jauch, K.W. & Schildberg, F.W. (1995). *Nat Med*, **1**, 1035-9.
- Henderson, B.R. & Fagotto, F. (2002). *EMBO Rep*, **3**, 834-9.
- Herrera, R.E., Sah, V.P., Williams, B.O., Makela, T.P., Weinberg, R.A. & Jacks, T. (1996). *Mol Cell Biol*, **16**, 2402-7.
- Herrlich, P., Sleeman, J., Wainwright, D., Konig, H., Sherman, L., Hilberg, F. & Ponta, H. (1998). *Cell Adhes Commun*, **6**, 141-7.
- Hickman, E.S., Moroni, M.C. & Helin, K. (2002). *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 60-6.
- Hipskind, R.A., Rao, V.N., Mueller, C.G., Reddy, E.S. & Nordheim, A. (1991). *Nature*, **354**, 531-4.
- Ho, A. & Dowdy, S.F. (2002). *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 47-52.
- Hoffman, R.M. & Jacobsen, S.J. (1980). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 7306-10.
- Hofmann, M., Fieber, C., Assmann, V., Gottlicher, M., Sleeman, J., Plug, R., Howells, N., von Stein, O., Ponta, H. & Herrlich, P. (1998). *J Cell Sci*, **111** (Pt 12), 1673-84.
- Holley, R.W. & Kiernan, J.A. (1968). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **60**, 300-4.
- Iguchi-Ariga, S.M., Itani, T., Kiji, Y. & Ariga, H. (1987). *Embo J*, **6**, 2365-71.
- Jainchill, J.L. & Todaro, G.J. (1970). *Exp Cell Res*, **59**, 137-46.
- Karn, J., Watson, J.V., Lowe, A.D., Green, S.M. & Vedeckis, W. (1989). *Oncogene*, **4**, 773-87.
- Kassis, J., Lauffenburger, D.A., Turner, T. & Wells, A. (2001). *Semin Cancer Biol*, **11**, 105-17.

- Kawai, S. & Hanafusa, H. (1971). *Virology*, **46**, 470-9.
- Keeton, A.B., Amsler, M.O., Venable, D.Y. & Messina, J.L. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 48565-73.
- Kelly, T., Yan, Y., Osborne, R.L., Athota, A.B., Rozypal, T.L., Colclasure, J.C. & Chu, W.S. (1998). *Clin Exp Metastasis*, **16**, 501-12.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). *Br J Cancer*, **26**, 239-57.
- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996). *Cell*, **87**, 159-70.
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W. & Martin, G.R. (1986). *Biochemistry*, **25**, 312-8.
- Kochi, S.K. & Collier, R.J. (1993). *Exp Cell Res*, **208**, 296-302.
- Koyama, T., Yashiro, M., Inoue, T., Nishimura, S. & Hirakawa, Y.S.C.K. (2000). *Int J Oncol*, **16**, 355-62.
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E.P., Wolff, B., Yoshida, M. & Horinouchi, S. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9112-7.
- Kuhn, W., Pache, L., Schmalfeldt, B., Dettmar, P., Schmitt, M., Janicke, F. & Graeff, H. (1994). *Gynecol Oncol*, **55**, 401-9.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R. & Gorlich, D. (1997). *Cell*, **90**, 1061-71.
- Latinkic, B.V. & Lau, L.F. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 23163-70.
- Latinkic, B.V., Zeremski, M. & Lau, L.F. (1996). *Nucleic Acids Res*, **24**, 1345-51.
- Lau, L.F. & Nathans, D. (1985). *Embo J*, **4**, 3145-51.
- Lau, L.F. & Nathans, D. (1987). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1182-6.
- Leco, K.J., Apte, S.S., Taniguchi, G.T., Hawkes, S.P., Khokha, R., Schultz, G.A. & Edwards, D.R. (1997). *FEBS Lett*, **401**, 213-7.
- Lee, J., Ishihara, A., Theriot, J.A. & Jacobson, K. (1993). *Nature*, **362**, 167-71.
- Lee, S., Chen, D.Y., Humphrey, J.S., Gnarra, J.R., Linehan, W.M. & Klausner, R.D. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1770-5.
- Lim, R.W., Varnum, B.C., O'Brien, T.G. & Herschman, H.R. (1989). *Mol Cell Biol*, **9**, 1790-3.

- Liotta, L.A., Sidel, M.G. & Kleinerman, J. (1976). *Cancer Res*, **36**, 889-94.
- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M. & Shafie, S. (1980). *Nature*, **284**, 67-8.
- Lipinski, M.M. & Jacks, T. (1999). *Oncogene*, **18**, 7873-82.
- Liu, G., Grant, W.M., Persky, D., Latham, V.M., Jr., Singer, R.H. & Condeelis, J. (2002). *Mol Biol Cell*, **13**, 579-92.
- Macara, I.G. (2001). *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 570-94, table of contents.
- Machesky, L.M. & Hall, A. (1997). *J Cell Biol*, **138**, 913-26.
- Mahoney, P.A., Weber, U., Onofrechuk, P., Biessmann, H., Bryant, P.J. & Goodman, C.S. (1991). *Cell*, **67**, 853-68.
- Makela, T.P., Koskinen, P.J., Vastrik, I. & Alitalo, K. (1992). *Science*, **256**, 373-7.
- Manabe, R., Ohe, N., Maeda, T., Fukuda, T. & Sekiguchi, K. (1997). *J Cell Biol*, **139**, 295-307.
- Marais, R., Wynne, J. & Treisman, R. (1993). *Cell*, **73**, 381-93.
- Martin, G.S. (1970). *Nature*, **227**, 1021-3.
- Matsumoto, K., Ziober, B.L., Yao, C.C. & Kramer, R.H. (1995). *Cancer Metastasis Rev*, **14**, 205-17.
- Mattaj, I.W. & Englmeier, L. (1998). *Annu Rev Biochem*, **67**, 265-306.
- Meier, R., Rouse, J., Cuenda, A., Nebreda, A.R. & Cohen, P. (1996). *Eur J Biochem*, **236**, 796-805.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J. & Gerace, L. (1993). *J Cell Biol*, **123**, 1649-59.
- Meredith, J.E., Jr., Fazeli, B. & Schwartz, M.A. (1993). *Mol Biol Cell*, **4**, 953-61.
- Mittelstadt, P.R. & DeFranco, A.L. (1993). *J Immunol*, **150**, 4822-32.
- Montrucchio, G., Lupia, E., Battaglia, E., Del Sorbo, L., Boccellino, M., Biancone, L., Emanuelli, G. & Camussi, G. (2000). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 80-8.
- Moore, M.S. & Blobel, G. (1993). *Nature*, **365**, 661-3.
- Morgan, D.O. (1997). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-91.

- Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H. & Herrlich, P. (2001). *Genes Dev*, **15**, 968-80.
- Nabi, I.R., Watanabe, H. & Raz, A. (1992). *Cancer Metastasis Rev*, **11**, 5-20.
- Nakielny, S. & Dreyfuss, G. (1999). *Cell*, **99**, 677-90.
- Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F. & Comoglio, P.M. (1992). *Embo J*, **11**, 4825-33.
- Nilsson, J.A. & Cleveland, J.L. (2003). *Oncogene*, **22**, 9007-21.
- Nobes, C.D. & Hall, A. (1995). *Biochem Soc Trans*, **23**, 456-9.
- Novac, N. (2001).
- Odekon, L.E., Blasi, F. & Rifkin, D.B. (1994). *J Cell Physiol*, **158**, 398-407.
- Ohtsubo, M. & Roberts, J.M. (1993). *Science*, **259**, 1908-12.
- Ortega, S., Malumbres, M. & Barbacid, M. (2002). *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 73-87.
- Paik, J.H., Chae, S., Lee, M.J., Thangada, S. & Hla, T. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 11830-7.
- Pardee, A.B. (1974). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**, 1286-90.
- Pause, A., Lee, S., Lonergan, K.M. & Klausner, R.D. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 993-8.
- Pencil, S.D., Toh, Y. & Nicolson, G.L. (1993). *Breast Cancer Res Treat*, **25**, 165-74.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. & Massague, J. (1994). *Cell*, **78**, 59-66.
- Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P.A. (2003). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 33-45.
- Ponta, H., Wainwright, D. & Herrlich, P. (1998). *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 299-305.
- Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Shurtleff, S.A., Kato, J.Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. (1993). *Genes Dev*, **7**, 1559-71.
- Rabinovich, G.A., Rubinstein, N. & Toscano, M.A. (2002). *Biochim Biophys Acta*, **1572**, 274-84.
- Reed, J.C. (1997). *Cell*, **91**, 559-62.
- Reed, J.C. (1998). *Oncogene*, **17**, 3225-36.

- Reed, J.C. (2000). *Am J Pathol*, **157**, 1415-30.
- Richardson, A. & Parsons, T. (1996). *Nature*, **380**, 538-40.
- Ridley, A.J. & Hall, A. (1992). *Cell*, **70**, 389-99.
- Rossi, D. & Zlotnik, A. (2000). *Annu Rev Immunol*, **18**, 217-42.
- Ruddon, R. (1995). *Cancer biology 3rd ed.*, 196-207.
- Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M.D. (1987). *Science*, **238**, 491-7.
- Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E. & Jacks, T. (2000). *Genes Dev*, **14**, 3037-50.
- Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1997). *Cell*, **91**, 443-6.
- Sato, S., Yokozaki, H., Yasui, W., Nikai, H. & Tahara, E. (1999). *Jpn J Cancer Res*, **90**, 485-9.
- Schmitt, M., Wilhelm, O., Janicke, F., Magdolen, V., Reuning, U., Ohi, H., Moniwa, N., Kobayashi, H., Weidle, U. & Graeff, H. (1995). *J Obstet Gynaecol*, **21**, 151-65.
- Schneider, A., Fischer, A., Weber, D., von Ahsen, O., Scheek, S., Kruger, C., Rossner, M., Klaussner, B., Faucheron, N., Kammandel, B., Goetz, B., Herrmann, O., Bach, A. & Schwaninger, M. (2004). *J Cereb Blood Flow Metab*, **24**, 224-36.
- Scott, J.L., Dunn, S.M., Zeng, T., Baker, E., Sutherland, G.R. & Burns, G.F. (1994). *J Cell Biochem*, **54**, 135-44.
- Sears, R.C. & Nevins, J.R. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 11617-20.
- Senger, D.R., Asch, B.B., Smith, B.D., Perruzzi, C.A. & Dvorak, H.F. (1983). *Nature*, **302**, 714-5.
- Shanmugathan, M. & Jothy, S. (2000). *Pathol Int*, **50**, 273-9.
- Shaw, P.E., Schroter, H. & Nordheim, A. (1989). *Cell*, **56**, 563-72.
- Shen, Y. & White, E. (2001). *Adv Cancer Res*, **82**, 55-84.
- Sherr, C.J. (1994). *Cell*, **79**, 551-5.
- Shimizu, N., Ohta, M., Fujiwara, C., Sagara, J., Mochizuki, N., Oda, T. & Utiyama, H. (1991). *J Biol Chem*, **266**, 12157-61.

- Sleeman, J.P. (2000). *Recent Results Cancer Res*, **157**, 55-81.
- Smith, H.S., Scher, C.D. & Todaro, G.J. (1971). *Virology*, **44**, 359-70.
- Soussi, T., Legros, Y., Lubin, R., Ory, K. & Schlichtholz, B. (1994). *Int J Cancer*, **57**, 1-9.
- Springer, T.A. & Lasky, L.A. (1991). *Nature*, **349**, 196-7.
- Steeg, P.S. & Zhou, Q. (1998). *Breast Cancer Res Treat*, **52**, 17-28.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.K. (1976). *Nature*, **260**, 170-3.
- Stetler-Stevenson, W.G., Kruttsch, H.C. & Liotta, L.A. (1989). *J Biol Chem*, **264**, 17374-8.
- Stevens, C. & La Thangue, N.B. (2003). *Arch Biochem Biophys*, **412**, 157-69.
- Stewart, D.B. & Nelson, W.J. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 29652-62.
- Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V.M. (2000). *Annu Rev Biochem*, **69**, 217-45.
- Studzinski, G.P., Brelvi, Z.S., Feldman, S.C. & Watt, R.A. (1986). *Science*, **234**, 467-70.
- Taniguchi, S., Miyamoto, S., Sadano, H. & Kobayashi, H. (1991). *Nucleic Acids Res*, **19**, 6949.
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998). *Science*, **281**, 1312-6.
- Uemura, T. (1998). *Cell*, **93**, 1095-8.
- Valentijn, A.J., Zouq, N. & Gilmore, A.P. (2004). *Biochem Soc Trans*, **32**, 421-5.
- Vermeulen, S.J., Bruyneel, E.A., Bracke, M.E., De Bruyne, G.K., Vennekens, K.M., Vleminckx, K.L., Berx, G.J., van Roy, F.M. & Mareel, M.M. (1995). *Cancer Res*, **55**, 4722-8.
- von Stein, O.D., Thies, W.G. & Hofmann, M. (1997). *Nucleic Acids Res*, **25**, 2598-602.
- Wai, P.Y. & Kuo, P.C. (2004). *J Surg Res*, **121**, 228-41.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. & Boldin, M.P. (1999). *Annu Rev Immunol*, **17**, 331-67.
- Weber, G.F. (2001). *Biochim Biophys Acta*, **1552**, 61-85.
- Woods, D.B. & Vousden, K.H. (2001). *Exp Cell Res*, **264**, 56-66.
- Woods, D.F. & Bryant, P.J. (1991). *Cell*, **66**, 451-64.

Yawata, A., Adachi, M., Okuda, H., Naishiro, Y., Takamura, T., Hareyama, M., Takayama, S., Reed, J.C. & Imai, K. (1998). *Oncogene*, **16**, 2681-6.

Yuan, J. (1997). *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 247-51.

Zhang, F., White, R.L. & Neufeld, K.L. (2001). *Mol Cell Biol*, **21**, 8143-56.

Zhao, L.J. & Giam, C.Z. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7070-4.

Zinck, R., Cahill, M.A., Kracht, M., Sachsenmaier, C., Hipskind, R.A. & Nordheim, A. (1995). *Mol Cell Biol*, **15**, 4930-8.

Zinck, R., Hipskind, R.A., Pingoud, V. & Nordheim, A. (1993). *Embo J*, **12**, 2377-87.