

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Direktor des Instituts: Prof. Dr. R. Müller



**Transduktion und Zellzyklusregulation
durch das rekombinante Tat-p27(KIP1)-
Fusionsprotein in Neuroblastomzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

In-Hee Shin

aus Seoul/Korea

Marburg, November 2003

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
02.12.2004.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich Medizin.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: Prof. Dr. Weihe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Der Zellzyklus
- 1.2. Cyclin / CDK-Komplexe
 - 1.2.1. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen der G1-Phase des Zellzyklus
- 1.3. Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen
 - 1.3.1. p27^{Kip1}
- 1.4. Das Tat-Protein
- 1.5. Das Neuroblastom
 - 1.5.1. Klinik
 - 1.5.2. Diagnostik
 - 1.5.3. Stadien
 - 1.5.4. Prognose
 - 1.5.5. Formale Pathogenese und klinisch-biologische Verlaufsformen
 - 1.5.6. Das Neuroblastom und p27^{Kip1}
- 1.6. Genterapie bei Tumoren
- 1.7. Fragestellung

2. Material

- 2.1. Chemikalien, Enzyme und Medien
- 2.2. Materialien für die Zellkultur
- 2.3. Säugetierzelllinien
- 2.4. Bakterienkultur
- 2.5. Proteinexpression in Bakterienkultur
- 2.6. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
- 2.7. Coomassie-Färbung
- 2.8. Proteinisolierung aus Bakterien
- 2.9. Proteinbestimmung nach Bradford
- 2.10. Immunfluoreszenzfärbung

- 2.11. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen
- 2.12. FACS-Analyse
- 2.13. Präparation von Plasmiden

3. Methoden

3.1. Zellkultur

- 3.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen
- 3.1.2. Passagieren von Zellen
- 3.1.3. Auftauen der Zellen
- 3.1.4. Einfrieren der Zellen
- 3.1.5. Bestimmung der Zellzahl
- 3.1.6. Arretieren von Zellen

3.2. Bakterienkultur

- 3.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen
- 3.2.2. Konservierung von Bakterienvorrat
- 3.2.3. Analytische Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien (MiniPräp)
- 3.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

3.3. Biochemische Methoden

- 3.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford
- 3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
- 3.3.3. Proteinexpression mit IPTG
- 3.3.4. Herstellung von Proteinlysaten aus Bakterien
- 3.3.5. Nickelsäulen-Reinigung von *His tag*-Protein (Ni-NTA)
- 3.3.6. Mono-S-Säule-Reinigung auf FPLC™
- 3.3.7. PD-10-Reinigung
- 3.3.8. Immunfluoreszenzfärbung
- 3.3.9. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen
- 3.3.10. FACS (*fluorescence activated cell sorting*)- Analyse

4. Ergebnisse

- 4.1. Isolierung von Tat-p27^{Kip1} aus BL21-Bakterien

- 4.1.1. Induktion von Proteinexpression durch IPTG
- 4.1.2. Proteinreinigung durch Ni-NTA
- 4.1.3. Mono-S-Reinigung auf FPLC
- 4.1.4. PD-10-Reinigung
- 4.2. Tat-p27^{Kip1}-Behandlung der Zellen
 - 4.2.1. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie
 - 4.2.2. Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie
 - 4.2.3. Konfokalmikroskopie
- 4.3. FACS-Analyse

5. Diskussion

- 5.1. p27^{Kip1} und das Neuroblastom
- 5.2. Immunfluoreszenzmikroskopie und der Nachweis der Transduktion
- 5.3. Biologische Wirkungen der p27^{Kip1}-Transduktion in Neuroblastomzellen
- 5.4. Tat-Fusionsproteine und ihre Bedeutung in der Medizin

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Danksagung

9. Ehrenwörtliche Erklärung

10. Tabellarischer Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Der Zellzyklus

Die Fähigkeit, sich zu teilen, ist ein Charakteristikum proliferierender Zellen. Dabei durchlaufen die Zellen einen umschriebenen Teilungszyklus, den sogenannten Zellzyklus. Ein solcher Zyklus dauert bei Säugetierzellen etwa 10 bis 24 Stunden. Über die Beobachtung des Chromosoms mit Hilfe der Lichtmikroskopie wurde der Zellzyklus in Zellteilungsphase (Mitose) und Ruhe-, bzw. Wachstumsphase (Interphase) unterteilt. Diese ursprüngliche Einteilung erfuhr in den letzten Jahren durch molekularbiologische und biochemische Methoden eine weitergehende Verfeinerung. Die Interphase lässt sich in G1-, G0-, S- und G2-Phase unterteilen. Nach einer abgeschlossenen Zellteilung treten die Zellen zunächst in die G1-Phase ein, in der sie zum Beispiel auf exogene Bedingungen wie Wachstumsfaktoren oder Nährstoffe reagieren können. Liegen ungünstige Bedingungen vor, folgt die G0-Phase, ein Ruhestadium der Zellen. Bei einer Umkehrung der Verhältnisse kann jedoch dieser Zustand rückgängig gemacht werden, indem die Zellen wieder in die G1-Phase eintreten und nach Überschreitung des Restriktionspunktes die weiteren Phasen durchlaufen. Während der G1-Phase kommt es zur RNA- und Proteinsynthese sowie zu einem Zellwachstum. Soll die Zellteilung fortschreiten, folgt nun die Synthesephase (S-Phase) mit DNA- Replikation und Chromosomenverdoppelung. Die nachfolgende Phase ist dann die G2-Phase. Hier befinden sich weitere Kontrollpunkte, die vor dem Eintritt in die Mitose sicherstellen, dass die DNA-Replikation tatsächlich erfolgt ist. Diesen sequenziellen Ablauf des Zellzyklus steuern bestimmte Proteine wie Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden soll.

Kommt es zur Fehlsteuerung solcher regulatorischen Faktoren, wird die komplexe Organisation der Zellen und Zellverbände gestört, so dass zum Beispiel die Entstehung eines Malignoms die Folge sein kann.

1.2. Cyclin / CDK-Komplexe

Die Cyclin-abhängigen (*d*ependent) Proteinkinasen (CDKs) sind Katalysatoren der Zellzyklusprogression, bei der sie den Übergang von einer Phase zur nächsten regulieren. CDKs sind jedoch alleine nicht in der Lage, die Zellzyklusprogression voranzutreiben. Erst durch die Bindung an die regulierende Einheit, die Cycline, wird die Kinaseaktivität gewährleistet. Solche Komplexe aus Cyclinen und CDKs werden auch MPF (*m*aturation *p*romoting *f*actor) genannt.

Bei Säugetierzellen sind bislang acht verschiedene CDKs beschrieben (Fang and Newport, 1991; Meyerson and Harlow, 1994). Jede CDK besitzt ein phasenspezifisches Aktivitätsprofil. So zum Beispiel sind CDK 2, 3, 4 und 6 G1-Phase spezifisch, während CDK 7 vermutlich eine modulierende Eigenschaft auf die CDK- Aktivierung besitzt (eine Übersicht geben Hunt und Sherr, 1991/1993).

Wird ein Komplex aus CDK und Cyclin gebildet, kann dieser bestimmte Schlüsselproteine phosphorylieren und so Zellzykluskontrollpunkte spezifisch regulieren. Ein entscheidender Kontrollpunkt ist hierbei der sogenannte Restriktionspunkt, der in der späten G1-Phase liegt. Der Zellzyklus ist bis zum Erreichen des Restriktionspunktes von exogenen Wachstumsfaktoren abhängig, während der weiterfolgende Abschnitt des Zellzyklus mitogenunabhängig ist (Pardee, 1989). Vor allem G1-Phase spezifische Cycline und ihre CDKs sind an der Regulierung dieser Kontrollstelle beteiligt.

Die Aktivität der Cyclin / CDK-Komplexe wird ihrerseits durch verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen kann transkriptionell die Menge an Cyclin-Proteinen variieren (siehe 1.2.1.), zum anderen werden Cyclin / CDK-Komplexe durch CDK-aktivierende-Kinasen (CAK) posttranskriptionell modifiziert, wobei Cyclin / CDK-Komplexe unter anderem an Threonin 160 phosphoryliert werden. Eine solche Modifikation führt zu einer Konformationsänderung des katalytischen Zentrums der Kinase sowie zu einer Stabilisierung des Komplexes (Jeffrey et al., 1995).

1.2.1. Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen der G1-Phase des Zellzyklus

Die meisten Cycline werden zellzyklusspezifisch exprimiert und bestimmen die Geschwindigkeit der Zellzyklusprogression. Besonders spezifisch für die G1-Phase sind die D-Typ Cycline, von denen drei Subtypen existieren (D1-3). Die D-Typ Cycline bilden Komplexe mit CDK 4 oder CDK 6, deren Kinaseaktivität während der frühen G1-Phase ihr Maximum erreichen. Die Expression der D-Typ Cycline ist von mitogenen Reizen wie *ras* oder *c-myc* abhängig (Roussel et al. 1995). Bei einigen Tumoren vermutet man ein onkogenes Potential der D-Typ Cycline (Matsushimi et al. 1991; Motokura et al. 1991). Für die G1-Progression ist auch Cyclin E notwendig. Cyclin E fungiert wahrscheinlich erst nach den D-Typ Cyclinen, da die höchste Konzentration an Cyclin E nach der der D-Typ Cycline erreicht wird (Dulic et al. 1992; Koff et al. 1991). CDK 2 ist ein spezifisches Substrat für Cyclin E. Vermutlich ist auch CDK 3 ein möglicher Partner für Cyclin E (eine Übersicht gibt Sherr 1993).

Cyclin D / CDK-, Cyclin E / CDK-Komplexe führen zur Phosphorylierung bestimmter Proteine, die u.a. für die Progression der G1-Phase von Bedeutung sind. Gut untersucht ist das Retinoblastomprotein, pRb. Im hyperphosphorylierten Zustand setzt pRb den inhibierten Transkriptionsfaktor E2F frei, der die Transkription von weiteren Genen veranlasst, die essentiell für die nachfolgende S-Phase sind.

1.3. Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

Es existieren zahlreiche Cycline und CDKs für die Zellzyklusprogression, ebenso gibt es deren Inhibitoren (CKI = **C**yclin-**K**inase-**I**nhibitor). Solche Kinaseinhibitoren sind kleine Proteine, die entweder direkt mit den Cyclinen, deren CDKs oder auch mit Cyclin / CDK-Komplexen interagieren (eine Übersicht geben Sherr und Roberts, 1995).

Es gibt zwei Genfamilien der Kinaseinhibitoren, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden; die INK 4-Familie, zu der die CDK 4

inhibierenden Proteine gehören und die Proteine der Cip / Kip-Familie, deren Substratbindung weniger spezifisch ist.

Zur ersteren gehören p15^{Ink4A}, p16^{Ink4B}, p18^{Ink4C} und p19^{Ink4D}. Die Kinaseinhibitoren der INK 4-Familie weisen vier repetitive Ankyrin-Motive auf, über die sie mit ihren Substraten Verbindungen eingehen. Die kinaseinhibierende Eigenschaft kommt einerseits durch die Bindung an die monomeren CDK 4 und CDK 6 zustande, indem die Komplexbildung mit D-Typ Cyclinen verhindert wird. Zum anderen sind die INK 4-Proteine in der Lage, sich direkt an die vorhandenen Cyclin / CDK-Komplexe zu binden und so deren Kinase zu inaktivieren. Obwohl die INK 4-Inhibitoren mit unterschiedlichen Substraten über verschiedene Mechanismen interagieren, bewirkt die Überexpression jedes einzelnen der INK 4-Inhibitoren einen Zellzyklusarrest. Es gibt Hinweise, dass es sich bei INK 4 um ein Tumorsuppressor-Gen handelt (Kamb, 1994). Wahrscheinlich regulieren die INK 4-Kinaseinhibitoren die pRb-Phosphorylierung über die Cyclin D-Kinaseaktivität. Dabei wird die Hyperphosphorylierung des Retinoblastomproteins, pRb, verhindert. Im hypophosphorylierten Zustand kann pRb den Transkriptionsfaktor E2F inhibieren, was letztendlich zu einem Zellzyklusarrest, also zu einem Proliferationsstopp führt.

Zur zweiten Kinaseinhibitorfamilie, Cip / Kip-Proteine, zählen p21^{Waf1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}. Die Mitglieder dieser Familie sind vermutlich in der Lage, mit D-, E-, A-, B-Typ Cyclinen und deren CDKs zu reagieren, wobei die Interaktion mit Cyclin / CDK-Komplexen wesentlich stärker ist als mit Einzelkomponenten der Komplexe. Die kinaseinhibierende Eigenschaft basiert zum Teil auf der Besetzung der ATP-bindenden Stellen des Cyclin / CDK-Komplexes (Sherr und Roberts, 1995). Interessant ist auch die Tatsache, dass Cip / Kip-Proteine eine ähnliche Substratbindungssequenz besitzen wie *Pocket Proteine*, zu denen unter anderem pRb gehört. Weiterhin kann die den Zellzyklus arretierende Eigenschaft der Cip / Kip-Proteine durch Ko-Expression von viralen Onkogenen gemildert werden (Mal et al., 1996). Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass Cip / Kip-

Proteine sowohl funktionell, als auch strukturell den *Pocket Proteinen* nahe stehen.

1.3.1 p27^{Kip1}

Der Kinaseinhibitor der Cip / Kip-Familie, p27^{Kip1}, wurde aus Lungenepithelzellen isoliert, die durch die Behandlung mit TGF- β in der G1-Phase arretiert worden sind. Bei den so arretierten Zellen war keine Cyclin E / CDK 2-Aktivität nachweisbar, obwohl sie einzelne Bestandteile des Komplexes exprimierten (Koff et al., 1993). Man konnte aus diesen Zellen Komplexe aus Cyclin E / CDK 2 mit einem 27 kD großen Protein isolieren. Dieses Protein, p27^{Kip1}, ging mit Cyclin E / CDK 2 eine spezifische Bindung ein, wodurch deren Kinaseaktivität inhibiert wurde. Eine Bindung von p27^{Kip1} an einzelne Bestandteile des Komplexes wurde im Gegensatz dazu nicht nachgewiesen (Polyak et al., 1994). Außerdem konnte mittels Immunpräzipitation die Bindung von p27^{Kip1} auch an Cyclin D / CDK 4 gezeigt werden (Hengst et al., 1994). Ferner war eine kinaseinhibierende Wirkung von p27^{Kip1} auch auf D-, E-, A- und B-Typ Cyclinen / CDKs, unter *in vitro* Bedingungen nachweisbar (Toyoshima and Hunter, 1994).

Das stöchiometrische Verhältnis solcher Bindungen lag bei 1:1:1 (Cyclin : CDK : p27), (Russo et al., 1996).

Das p27^{Kip1}-kodierende Gen ist mitogen-reaktiv und kommt ubiquitär in allen Zelltypen vor. In ruhenden oder kontaktinhibierten Zellen findet man einen hohen Gehalt an p27^{Kip1} (Robert et al., 1994). Antiproliferative Signale führen ebenfalls zur Kumulation von p27^{Kip1} (Sherr and Roberts, 1995). Des Weiteren können kontaktinhibierende Substanzen wie cAMP oder Rapamyzin die Herabregulierung von p27^{Kip1} verhindern (Nourse et al., 1994; Kato et al., 1994). p27^{Kip1} spielt demnach eine wichtige Rolle für den Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Bei einer Zellzyklusprogression von der G1- zur S-Phase bzw. auf mitogene Reize hin nimmt der hohe Gehalt an p27^{Kip1} ab. Hierfür ist wahrscheinlich der Ubiquitin-vermittelte Abbau von p27^{Kip1} verantwortlich (Pagano et al. 1995). Das p27^{Kip1}-Protein wird unmittelbar vor dem Abbau an Threonin 187 phosphoryliert und

dieser Schritt wiederum ist Cyclin E / CDK 2 abhängig (Sheaff et al., 1997; Müller et al., 1997). p27^{Kip1} ist demnach sowohl Inhibitor als auch Substrat der Cyclin E / CDK 2-Komplexe.

Eine über virale Vektoren eingeleitete Überexpression von p27^{Kip1} führte in Tumorzellkulturen zur Apoptose (Katayose et al., 1997; Wang et al., 1997). Anscheinend ist dieser Effekt von p27^{Kip1} vom funktionellen pRb abhängig, da in Zellen mit defizientem pRb eine Überexpression von p27^{Kip1} keine effiziente Apoptose zeigte (Schreiber et al., 1999).

Eine weitere funktionelle Eigenschaft von p27^{Kip1} ist die Fähigkeit, eine neuronale Differenzierung einzuleiten. In der Neuroblastomzelllinie N2 β wurde durch Triiodthyronin, T3, ein Wachstumsarrest induziert, infolgedessen man eine neuronale Differenzierung der Zellen und einen erhöhten Gehalt an p27^{Kip1} beobachten konnte. Vermutlich stellt p27^{Kip1} – möglicherweise zusammen mit anderen Faktoren wie p53^{Kip2} – einen wichtigen terminalen Effektor bei der Zelldifferenzierung dar (Perez-Juste and Arranda, 1999).

Zusätzliche Hinweise zur Funktion des p27^{Kip1}-Proteins geben p27^{Kip1}-*knock-out* Konstrukte. Mäuse, bei denen das p27^{Kip1}-Gen ausgeschaltet ist, zeigen eine Gewebshyperplasie mit einer generell erhöhten Anzahl von Zellen sowie ein gehäuftes Auftreten von Tumoren (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al. 1996; Fero et al., 1998). Interessanterweise entwickeln einige p27^{Kip1}-*knock out*- Mäuse Tumoren im Intermediärlappen der Hypophyse ebenso wie pRb-*knock out*-Mäuse. Dies könnte eventuell ein Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang des p27^{Kip1}-Proteins mit pRb bedeuten. Dabei ist die Tumorentwicklungsrate abhängig von der Anzahl der Genkopien (p27^{-/-} > p27^{-/+} > p27^{+/+}). Gegensätzlich hierzu ist die Inaktivierung anderer Tumorsuppressor-Gene (z.B. pRb), bei denen nur ein homozygoter Ausfall zum Funktionsverlust führt. Folglich lässt sich also vermuten, dass es sich bei p27^{Kip1} um einen haploinsuffizienten Tumorsuppressor handelt (Fero et al., 1998).

1.4. Das Tat-Protein

Tat-Proteine (*transactivator of transcription*) sind bislang nur bei Lentiviren identifiziert worden und werden durch zwei Exons kodiert. Sie werden als erste Virusproteine während des Infektionszyklus synthetisiert und entfalten ihre Funktion im Zellkern als Transaktivator von Gensequenzen, die im HIV-LTR (*long-terminal-repeat*) enthalten sind (Sodroski et al., 1985). Neben den von zwei Exons kodierten Tat-Proteinen (jeweils 72 und 14 Aminosäuren enthaltend) findet man verkürzte Versionen, denen die Sequenz des zweiten Exons fehlt und Tev-Proteine, die das erste Exon von Tat durch alternative Spleissmechanismen mit Abschnitten der env- und rev-Gene verbinden (Tev = tat, env, rev). Basierend auf Untersuchungen dieser verwandten Proteine vermutet man, dass der funktionelle Bereich im ersten Exon lokalisiert ist, welches wiederum in fünf Domänen unterteilt werden kann (Green and Loewenstein, 1988). Der aminoterminalen Bereich enthält konservierte Motive mit sauren Aminosäureresten, die wahrscheinlich eine amphipatische α -Helixstruktur ausbilden. Ihm folgt eine cysteinreiche, konservierte Domäne, die Zn^{2+} - und Cd^{2+} -Ionen bindet und etwa 15 Aminosäuren lang ist. Der nächste Abschnitt ist eine zehn Reste umfassende Kernregion. Veränderungen der Aminosäuresequenz oder Deletionen in diesen Bereichen beeinflussen die transaktivierende Wirkung der Tat-Proteine. Dann folgt eine Region mit einem hohen Gehalt an basischen Aminosäuren, die den Transport des Tat-Proteins in den Kern und seine Bindung an die RNA vermittelt. Die Sequenz am carboxyterminalen Ende des ersten Exons ist weitgehend ungeklärt. Man vermutet, dass in dieser Region Sequenzen vorliegen, die für die Interaktion mit zellulären Proteinen verantwortlich sind (eine Übersicht gibt Varmus et al., 1988).

1988 wurde das HIV-Tat-Protein von Green und Frankel unabhängig voneinander als ein die Lipiddoppelmembran durchdringendes Protein beschrieben (Green and Loewenstein, 1988; Frankel and Pabo, 1988). 1994 konstruierten Fawell und seine Mitarbeiter chemikalisch an *Tat* gekoppelte heterologe Proteine, die in Zellen transduziert wurden (Fawell et al., 1994).

Neben *Tat* sind auch andere Proteine bekannt, die ebenfalls in der Lage sind, die Lipiddoppelmembran zu durchdringen, zum Beispiel das Antennapedia-Protein

(Antp) der Drosophila oder das VP 22-Protein des Herpes simplex Virus (HSV). Ein Sequenzvergleich von Tat, VP 22 und Antp zeigt bei allen drei Komponenten einen arginin- und lysinreichen, basischen Bereich, der möglicherweise für den Kontakt an der negativ geladenen Zellmembran verantwortlich ist (Green et al., 1988; Elliott et al. 1997; Hawiger et al., 1999). Die genauen Mechanismen der Zellmembranpassage mit Hilfe solcher Proteine sind unklar. Es wird vermutet, dass die Zellmembranpassage rezeptorunabhängig geschieht (Fawell et al., 1994).

1998 beschrieben Dowdy und seine Mitarbeiter eine molekularbiologische Methode für die Herstellung der Tat-Fusionsproteine mit Hilfe von Bakterien sowie eine biochemische Methode für die Reinigung der rekombinanten Fusionsproteine (Nahagara et al., 1998). Die so transduzierten Proteine waren biologisch aktiv. Als wesentlich für den Transduktionsvorgang wurde der denaturierte Zustand der Fusionsproteine vermutet, wobei die Proteine nach der Transduktion in den Zellen wieder korrekt gefaltet werden sollen. Eins der beispielhaft aufgeführten Konstrukte ist das Tat- p27^{Kip1}-Fusionsprotein, das zunächst in hepatozelluläre Karzinomzellen transduziert wurde. Dabei verteilte sich das transduzierte Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Kernbereich. Des Weiteren bewirkte die Transduktion von p27^{Kip1} eine Zellausläuferbildung im Sinne einer Zelldifferenzierung sowie eine Kumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Nahagara et al., 1998).

Bislang konnten fast alle Zelltypen mit Ausnahme von Hefezellen durch die Tat-Fusionsproteine transduziert werden. Hierbei konnte die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden und die Größe der fusionierten Proteine war ebenfalls kein Hindernis für eine Transduktion (Schwarz et al., 1999; Schwarz et al., 2000).

1.5. Das Neuroblastom

Das Neuroblastom wurde 1865 erstmalig von Rudolph Virchow beschrieben und 1891 von Marchand als ein von sympathischen Zellen der Neuralleiste stammender Tumor erkannt. Der Begriff „Neuroblastom“ wurde dann 1910 durch Wright geprägt.

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor, dessen Zellen (Neuroblasten) von der primitiven Neuralleiste abstammen, und wird histologisch definiert (Brodeur et al., 1993, siehe **1.5.3.**). Das Neuroblastom gehört zu den häufigsten Tumoren im Kindesalter. Das durchschnittliche Diagnosealter liegt bei 1,5 Jahren, wobei mehr als 90 % der Erkrankten jünger als 5 Jahre alt sind. Die Inzidenz der Neuroblastomerkrankungen bei unter 15-jährigen liegt in der BRD bei 1,2 Fällen / 100 000 Kinder pro Jahr und die kumulative Inzidenz während der gesamten Kindheit bei 16,9 Fällen pro 100 000 (Kaatsch et al. , 1999). Auf Grund der in Japan durchgeführten Screeningprogramme (Bessho et al., 1991), sowie der durch die Sektionsserien der Neugeborenen gewonnenen Daten (Beckwith and Perrin, 1963) lässt sich vermuten, dass die eigentliche Inzidenzrate wesentlich höher liegen müsste, rechnete man die unbemerkt verlaufenden Spontanregressionen mit.

1.5.1 Klinik

Die Primärtumoren befinden sich entlang des Grenzstranges und im Nebennierenbereich. Metastasen sind überwiegend im Knochenmark (80%), in den Knochen (60%) sowie in den Lymphknoten (40%) und in Leber und Haut lokalisiert. Bei Säuglingen im 4S-Stadium sind überwiegend Metastasen in Leber, Knochenmark und Haut, jedoch selten in Knochen zu finden. Die häufigsten Symptome sind unspezifisch und äußern sich als Fieber, Schmerzen und Gewichtsverlust. Neuroblastome in frühen Stadien sind nicht selten asymptomatisch und werden per Zufall oder durch Früherkennungsuntersuchungen (Tastbefund, Röntgen-Abdomenübersicht etc.) entdeckt.

1.5.2. Diagnostik

Als Tumormarker dienen die Katecholaminmetaboliten, Vanillinmandelsäure (VMA), Homovanillinsäure (HVA) und Dopamin in Urin und Serum. Auch die neuronspezifische Enolase (NSE) gibt einen Hinweis auf das Vorliegen eines Neuroblastoms. Die endgültige Diagnose des Neuroblastoms wird allerdings durch histologische Untersuchungen von Tumorgewebe gestellt. Des Weiteren steht die Metajodbenzylguanidin-Szintigraphie (¹²³mIBG) als spezifisches Nachweisverfahren zur Verfügung. Zur Metastasensuche kann ein Technetium-Knochenszintigramm herangezogen werden. Auch Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographie können zur Feststellung von Tumorlokalisierung, -größe und -operabilität dienen.

1.5.2. Stadien

Das INSS (**I**nternationales **N**euroblastom-**S**tadien-**S**ystem) unterteilt das Neuroblastom in fünf Stadien (Brodeur et al., 1993):

Stadium 1: Lokalisierter Tumor, entfernbar bis auf mikroskopische Reste (19,2 % der Patienten).

Stadium 2: Lokalisierter Tumor, entfernbar unter Zurücklassen von makroskopischen Resten (12 % der Patienten).

Stadium 3: Lokalisierter Tumor mit infiltrativem Überschreiten der Mittellinie (Wirbelsäule) und makroskopisch nicht komplett entfernbar (18 % der Patienten).

Stadium 4: Fernmetastasen (39,9 % der Patienten).

Stadium 4S: Fernmetastasen beschränkt auf Leber, Knochenmark, Knochen und Alter < 1 Jahr (19,5 % der Patienten).

1.5.4. Prognose

Die 10-Jahresüberlebensrate für Kinder mit Neuroblastomen beträgt $61 \pm 1 \%$ (Berthold et al., 2000). Sie ist allerdings stark abhängig von den Stadien und dem Vorhandensein von Prognosefaktoren.

Die Prognose ist relativ gut im Stadium 1 und 2. Im Stadium 3 ist sie bedeutend ungünstiger und im Stadium 4 ist der Krankheitsverlauf fatal.

Interessanterweise ist Stadium 4S trotz Fernmetastasen mit einer günstigen Prognose behaftet. Die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit beträgt 99 % für Stadium 1, 98 % für Stadium 2, 80 % für Stadium 3, 31 % für Stadium 4 und bei Stadium 4S beträgt sie 77 % (Neuroblastomstudie NB, 1997).

Zu den gängigen Prognosefaktoren zählt das Alter der Patienten, wobei ein Alter von über einem Jahr als prognostisch günstig gilt. Auch die Amplifikationsrate von N-Myc ist ein wichtiger Prognosefaktor. Hierbei korreliert eine hohe Amplifikationsrate mit einer schlechteren Prognose (Berthold et al., 1997, Brodeur et al., 1984 und 1995).

Abhängig von histologischen Einteilungen unterscheidet man Malignitätsgrad I, II und III, wobei ein niedriger Malignitätsgrad mit einer fortgeschritteneren Differenzierung verknüpft ist. Je differenzierter der Tumor, desto günstiger ist die Prognose. Ferner gibt es eine Reihe von cytogenetischen und molekularbiologischen Parametern, die bei der Einschätzung der Prognose von Bedeutung sein können. So sind Parameter wie 1p-Deletion (Christiansen et al., 1988; Caron et al., 1996; Gehring et al., 1995), DNA-Euploidie (Carlsen et al., 1992; Look et al., 1991) und fehlende Expression von CD 44 (Trepe et al., 1994; Combaret et al., 1997), Trk A (Kogner et al., 1993; Nakagawara et al., 1993), p57 und N-Ras Zeichen eines ungünstigen Verlaufs von Neuroblastomerkrankungen (eine Übersicht gibt Joshi und Tongalis, 1997).

1.5.5. Formale Pathogenese und klinisch-biologische Verlaufsformen

Das biologische Verhalten von einzelnen Neuroblastomen ist sehr variabel. Nach derzeitigem Verständnis unterscheidet man drei biologisch-klinische Verlaufsformen.

Spontane Regression: Bei Säuglingen, die das 1. Lebensjahr noch nicht vollendet haben, können Neuroblastome, vor allem Tumore im Stadium 4S, spontan über mehrere Monate ohne therapeutische Eingriffe regredieren (Evans et al., 1981). Eine Neuroblastom-Screening-Studie in Kanada, die 3 Wochen und 6 Monate postnatal durchgeführt wurde, zeigt eine 2,4- bis 15,9- fach erhöhte Diagnoserate im Vergleich zu Gebieten, in denen keine Screeninguntersuchung durchgeführt wurde (Berthold et al., 1998). Aus diesen Daten kann vermutet werden, dass die erhöhte Diagnoserate in Screeninggebieten den Neuroblastomfällen entspricht, die im Gebiet ohne Screeninguntersuchung eine spontane Regression erfahren und sich so der Diagnose entziehen. Hierbei kann die Fähigkeit zu einer spontanen Regression wahrscheinlich nicht nur den Tumoren im Stadium 4S zugeschrieben werden. Vielmehr scheint die spontane Regression ein möglicher Verlauf von Neuroblastomen zu sein, wobei man Tumoren mit diesem Verlauf als späte embryonale Residuen verstehen könnte, die einen verzögerten Involutionsprozeß durchlaufen.

Progression: Patienten mit Neuroblastomen im Stadium 4 oder mit einer N-Myc-Amplifikation und anderen genetischen Prognosefaktoren weisen typischerweise einen progressiven Verlauf und eine hohe Therapieresistenz auf. Unklar ist derzeit, ob die Tumore mit einer raschen Progression regelmäßig aus zunächst prognostisch günstigen Neuroblastomen hervorgehen. Bei vielen Malignomen ist die schrittweise Ansammlung von genetischen Veränderungen bekannt, die mit einem ungünstigen Verlauf korrelieren. Auch bei Neuroblastomen könnte dies der Fall sein. So wurde im Rahmen einer sequenziellen Untersuchung bei ca. 10 % der Neuroblastome beobachtet, dass ein Primärtumor ohne Amplifikation von N-Myc mit progredientem Krankheitsverlauf eine Amplifikation von N-Myc

entwickelt hat (Christiansen, persönliche Mitteilung). Ca. 40 % aller Patienten mit Neuroblastomen gehören zu dieser Risikogruppe (Berthold et al. 2000).

Maturation: Ganglioneurome sind benigne neuronale Tumore. Primäre Ganglioneurome sind selten zu finden, meistens stellen sie einen sekundär durch eine Chemotherapie maturierten neuronalen Tumor dar. Auch Neuroblastome können zu Ganglioneuromen maturieren, wobei das Einwandern von Schwannzellen aus dem extratumorösen Gewebe in das Tumorgewebe eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Ambros et al., 1996).

1.5.6. Das Neuroblastom und p27^{Kip1}

Eine erhöhte Expressionsrate von p27^{Kip1} ist in vielen Tumoren als Zeichen günstiger Prognose bekannt (Esposito et al., 1997; Loda et al., 1997; Porter et al., 1997; Tan et al., 1997; Yang et al. 1998). Dies lässt sich auch auf Neuroblastomerkrankungen übertragen (Bergmann et al., 2001). Bei Neuroblastomen spielen unterschiedliche Parameter bei der Abschätzung der Prognose eine Rolle. Ein mehrfach bestätigter Prognosefaktor ist die Amplifikationsrate des N-Myc-Gens. Hierbei korreliert die schlechte Prognose mit der Amplifikationsrate des N-Myc-Gens (Brodeur et al., 1984; Schwab et al., 1984). Auch die Akkumulation von p27^{Kip1}, verursacht durch den verminderten Ubiquitin-Proteasomen-vermittelten Abbau, ist bekannt als ein günstiger prognostischer Faktor bei Neuroblastomen (Borriello et al., 2000; Matsuo et al., 1998).

Das c-Myc stimuliert die Transkription von Cyclin D2- und cul-1-Gene, wodurch es konsequent zu einer Degradation von p27^{Kip1} kommt (Bouchard et al., 1999; O'Hagan et al., 2000; Perez-Roger et al., 1999). Die Vermutung liegt nahe, dass sich diese Erkenntnis auch auf N-Myc und p27^{Kip1} übertragen lassen könnte. Es hat sich jedoch gezeigt, dass N-Myc und p27^{Kip1} zwei voneinander unabhängige prognostische Faktoren bei Neuroblastomen darstellen (Bergmann et al., 2001).

Des Weiteren zeigten Untersuchungen mit repräsentativen Tumorproben, die der tatsächlichen Stadienverteilung in der Bevölkerung weitgehend entsprechen,

folgende weitere Anhaltspunkte zur Bedeutung von p27^{Kip1} in Neuroblastomen: Neuroblastomproben, die eine erhöhte Expressionsrate an p27^{Kip1} aufweisen und mit einer hohen Proliferationsrate einhergehen, zeigen eine trotz Proliferation günstige Prognose. Obwohl p27^{Kip1} hierbei durch D-Typ Cycline – insbesondere Cycline D1 und D3 – sequestriert vorliegt, scheint allein die Verfügbarkeit an p27^{Kip1} zu einer besseren Prognose beizutragen. Das bedeutet, dass die Prognosebesserung durch p27^{Kip1} in Neuroblastomen nicht nur über den Zellzyklusarrest sondern über andere Funktionen von p27^{Kip1} wie Apoptose oder neuronale Differenzierung erfolgen muss (Bergmann et al., 2001).

1.6. Gentherapie bei Tumoren

Gentherapie kann definiert werden als das Einführen von genetischem Material in Zellen im Sinne eines therapeutischen Eingriffes. Ursprünglich entstand die Idee einer Gentherapie in Hinblick auf die Behandlung monogener Gendefekte, heute hofft man durch die Gentherapie ein breiteres Spektrum von Erkrankungen, vor allem Tumoren, behandeln zu können.

Seit 1990 ist die Gentherapie in klinische Studien aufgenommen worden. Eine statistisch signifikante Erfolgsquote liegt allerdings noch nicht vor, da einerseits der Beobachtungszeitraum noch nicht ausreichend ist und andererseits immer noch einige ungelöste Probleme existieren. Die hauptsächlichen Probleme sind hierbei die ungenügende Effizienz der Genübertragung in die Zellen, die Unspezifität der Zielzellen bzw. Zielorgane, eine oft zu kurze Expressionsdauer des eingeführten Genmaterials und technische Schwierigkeiten bei der Herstellung des Gentransportvehikels.

Als Vehikel für einen Gentransfer werden zurzeit virale und nicht virale Vektoren eingesetzt. Ist die Entscheidung für einen der in Frage kommenden Vektoren getroffen, gibt es zwei Möglichkeiten der weiteren Vorgehensweise: die *ex vivo* Therapie, bei der dem Patienten die eigenen Zellen entnommen werden, um sie nach der Behandlung mit Vektoren zu reimplantieren, und die *in vivo*

Therapie, die eine direkte Applikation der Vektoren beim Patienten erfordert. Da Viren die biologische Eigenschaft besitzen, ihr Genmaterial in Fremdorganismen einzuschleusen, lag es nahe, sie als Vektoren einzusetzen, wobei genterapeutisch im Allgemeinen vier Virustypen in Frage kommen.

Retroviren wie MuLV (**M**urine **L**eukaemia **V**irus) werden ca. in 60 % aller klinischen Studien eingesetzt. Sie transferieren Gene zum Wirtsgenom und ermöglichen so eine stabile Genexpression. Allerdings können Retroviren nur Genmaterial in die sich teilenden Zellen transduzieren. Da die meisten somatischen Zellen, die potenziell für eine Gentherapie zugänglich sein sollen, sich in einem sich nicht teilenden Stadium befinden – z.B. Nervenzellen – sind andere virale Vektoren erforderlich, die diesen Nachteil überwinden können.

Einen solchen Vektor stellen die Lentiviren dar. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist HIV (**H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus). Der Gentransfer mit Hilfe von HIV kann sowohl die sich teilenden als auch die ruhenden Zellen betreffen. Dabei beobachtet man eine längere Expressionsdauer des transduzierten Genmaterials als bei einem Gentransfer durch andere Retroviren. Jedoch wird diskutiert, dass Lentiviren wie HIV auf das Wirtsgenom einen mutagen Effekt ausüben könnten, der seinerseits zu einer Malignombildung führen kann.

Die dritte Klasse der in der Gentherapie eingesetzten Viren sind die Adenoviren. Sie sind humane DNA-Viren und in der Lage, große DNA-Sequenzen bis zu 35 Kilobasen zu transferieren. Die Transfereffizienz ist in *in vitro* Bedingungen fast 100 %, wobei sowohl die sich teilenden als auch die ruhenden Zellen ins Zielspektrum kommen. Der entscheidende Nachteil ist allerdings die heftige Immunreaktion des Wirtsorganismus nach der Behandlung, welche in einigen Fällen nicht nur die Behandlung an sich, sondern auch eine wiederholte Behandlung unmöglich macht.

Eine weitere Virusgruppe in der Gentherapie sind die sogenannten AAV, (**A**deno-**a**ssoziierte **V**iren). Sie sind nicht pathogene Einzelstrang-DNA-Viren. Zur eigenen Replikation benötigen sie Helferviren. AAV Vektoren transduzieren ruhende Zellen und führen zu einer stabilen Expression der übertragenen Gene.

Auf Grund fehlender Pathogenität gelten sie als sichere Vektoren. Jedoch können AAV Vektoren nur Gene in der Größe von 3,5 bis 5,0 Kilobasen übertragen. Ein weiterer Nachteil ist die weit verbreitete Antikörperpräsenz in der Bevölkerung. So besitzen etwa 80 % aller Erwachsenen Antikörper gegen AAV (Verma and Somia, 1997; Kay et al., 1997; Anderson, 1998).

Wie bereits oben erwähnt, sind virale Vektoren nicht das optimale Transportvehikel. Vor allem die potentielle Pathogenität der Viren und die Immunreaktion schränken den Einsatz viraler Vektoren ein. Prinzipiell ideal wären daher nicht virale Vektoren wie Liposomen, die auf kationischen Lipiden basieren. Im Gegensatz zu den viralen Vektoren sind DNA / Lipid-Komplexe leicht zu präparieren, weisen keine Einschränkung der zu übertragenden Gengrößen auf. Da sie keinen Proteinanteil besitzen, resultiert eine geringere Immunreaktionen. Auf der anderen Seite gibt es bislang keinen soliden Hinweis auf eine hinreichende Transduktionseffizienz *in vivo*. DNA / Lipid-Komplexe werden in den Zellen relativ rasch abgebaut. Zudem ist ein gezielter Einsatz wegen der fehlenden Zellspezifität nicht möglich.

Zurzeit sind über 300 klinische Gentherapieprotokolle in der Erprobungsphase, von denen sich nur die Studie von *Inc./Novartis* zur Behandlung des Glioblastoma multiforma in der Phase III befindet. Die übrigen Studien befinden sich noch in der Phase II bzw. I, sodass trotz bestehender Schwierigkeiten in naher Zukunft weitere nützliche Daten erwartet werden können. Nicht zuletzt werden auch auf dem Gebiet der Molekularbiologie zunehmend Erkenntnisse gewonnen, die zum besseren Verständnis und zu neuen technischen Möglichkeiten führen könnten.

1.7. Fragestellung

Das Fehlen von p27^{Kip1} bzw. eine mangelnde Expression von p27^{Kip1} scheint entscheidend zur Pathogenese und Progression des Neuroblastoms beizutragen (Bergmann et al., 2001). Folglich entsteht die Frage, ob eine externe Substitution

des fehlenden Proteins in den malignen Prozess reparativ eingreifen und somit zur Verhinderung der Tumorprogression führen würde.

Eine technische Möglichkeit zu einer solchen Substitution bieten Tat-Fusionsproteine. Das kürzlich beschriebene Tat- p27^{Kip1}-Fusionsprotein soll in der Lage sein, Zellmembranen zu überwinden und so das an ihm fusionierte Protein zu transduzieren (Schwarz et al., 2000; Nahagara et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob sich diese neue biotechnische Möglichkeit auf Neuroblastomzelllinien übertragen lässt. Zunächst ist die beschriebene Fähigkeit des Tat- p27^{Kip1}-Proteins, Lipiddoppelmembran zu passieren, nachzuvollziehen, indem das transduzierte p27^{Kip1}-Protein in behandelten Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen wird.

Unter der Voraussetzung, dass das Tat- p27^{Kip1}-Fusionsprotein von den Zellen aufgenommen wird, sind die funktionellen Auswirkungen des intrazellulär eingeschleusten p27^{Kip1} zu untersuchen.

Es wurde berichtet, dass eine Überexpression von p27^{Kip1} zu einem Zellzyklusarrest führen kann (Nourse et al., 1994; Kato et al., 1994). Dies wird mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht. Des Weiteren ist bekannt, dass ein Wachstumsarrest, induziert durch die Zugabe von Trijodthyronin, mit einem erhöhten Gehalt an p27^{Kip1} und einer neuronalen Differenzierung der behandelten Neuroblastomzellen einhergeht (Perez-Juste und Aranda, 1999).

Nach einer erfolgten Transduktion von p27^{Kip1} werden daher mikroskopisch die Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet.

2. Material

2.1. Chemikalien, Enzyme und Medien

Soweit nicht besonders aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysequalität von den Firmen Sigma, Merck und Serva verwendet. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad, sowie Zellkulturmedien, Trypsin-EDTA-Lösung und Penicillin/Streptomycinlösung wurden von der Firma GIBCO geliefert. Andere Liferanten werden in Klammern nach dem jeweiligen Material aufgeführt.

2.2. Materialien für die Zellkultur

Vollmedium	500 ml RPMI-1640 Medium 50 ml FCS (PAA Laboratories), wärmeinaktiviert (30 min bei +56°C), 5,5 ml Penicillin/Streptomycin Stammlösung (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), 5,5 ml L-Glutamin (200 mM).
Hungermedium	wie Vollmedium, anstelle von 50 ml FCS nur 2,5 ml.
Trypsin-EDTA	1x EDTA-Trypsin.
PBS pH 7,5	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ HPO ₄ , pH 7,4 mit HCL einstellen.
DMSO	Dimethylsulfoxid 100% (Merck).

2.3. Säugetierzelllinien

SH-SY5Y Humane Neuroblastom-Zelllinie,
Spender : Kaukasisch, weiblich, 4 Jahre alt, aus
Knochenmark.

2.4. Bakterienkultur

Agarmedium LB-Medium
1,5 % (v/v) Bacto-Agar

LB-Medium 10 g Bacto Tryptone (DIFCO),
5 g Yeast Extrakt (DIFCO),
10 g NaCl,
in 1 l Aqua dest.

Ampicillin Stammlösung ; 100 mg/ml

2.5. Proteinexpression in Bakterienkultur

IPTG Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid
(AppliChem), für 1 M Stammlösung ;
2,383 g IPTG in 10 ml Aqua dest.

2.6. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

	0,4 % (w/v) SDS
Laufpuffer pH 8,3	25 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Acrylamidstammlösung	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in H ₂ O, Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt.
3x SDS Probenpuffer	4,8 ml 4 x Trenngelpuffer, 0,6 g SDS (6 % SDS), 0,420 g DTT (0,3 M DTT), kleine Spatelspitze Bromphenolblau, 3,5 ml Glycerin, ad 10 ml in H ₂ O
APS	Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) in H ₂ O
TEMED	Tetramethylathylendiamin
Isopropanol	(Roth) 100 %
Molekulargewichtsmarker	Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham) Low Range Rainbowmarker RPN 755 (Amersham) Benchmark (Gibco)

2.7. Coomassie-Färbung

Färbelösung	2 g Coomassie brilliant blue R250 (Sigma), 450 ml Aqua bidest.,
-------------	--

	450 ml Methanol (J.T.Baker), 100 ml Eisessig.
Entfärbelösung	100 ml Eisessig, 250 ml Methanol, 650 ml Aqua bidest..
2.8. Proteinisolierung aus Bakterien	
HEPES	Für 0,1 M Stammlösung; 23,83 g HEPES/l, entsprechender pH-Wert mit KOH eingestellt.
Puffer Z	200 ml 0,1 M HEPES (20 mM) pH 8,0, 4 g NaCl (0,1 M), 480,48 g Urea (8 M), ad 1 l mit Aqua dest.
Imidazol	1,3- Daza-2,4-Cyclopentadin
Puffer A	2,9 g/l NaCl (50 mM NaCl), 200 ml 0,1M HEPES pH 6,5 (20 mM HEPES).
Puffer B	58,44 g/l NaCl (1M), 200 ml 0,1M HEPES pH 6,5.
Ni-NTA	QIAGEN, Hilden
PD-10	Amersham Pharmarcia
Proteaseninhibitoren	Aprotinin (Boehringer Mannheim) 5 mg/ml in PBS, Leupeptin (B.M.) 5 mg/ml in H ₂ O,

Pepstatin (B.M.) 1 mg/ml in Methanol PMSF
(Phenylmethylsulfonylfluorid) 0,2 M in Ethanol,

Glycerol

2.9. Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-25, 4,75 % (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Orthophosphorsäure in H ₂ O, filtrieren, lichtgeschützt lagern.
Referenz Stocklösung	BSA (Fraktion V, AppliChem) 1 mg/ml in Lysepuffer.
Sonstiges	0,15 M NaCl-Lösung.

2.10. Immunfluoreszenzfärbung

Fixierlösung	Paraformaldehyd 3,7 % (w/v), frisch angesetzt und filtriert.
Waschlösungen	1x PBS pH 7,4, 1x PBS / 0,1 M Glycin pH 7,4, 1x PBS / 0,1 % (v/v) NP-40 pH 7,4, 1x PBS / 0,5 % NP-40 / 5% (v/v) FCS.
Antikörper	□-p27 ^{Kip1} , IgG monoklonal-Maus (Transduction Laboratories),

□-Maus, Chromophor (Cy3)-Konjugat (Jackson ImmunoResearch Laboratories), alle Antikörper in 1:50 Verdünnung in PBS/ 0,5 % NP-40/ 5 % FCS.

DAPI 4,6-Diamino-2-Phenylindol (Sigma),
Stocklösung 5 mg/ml.

Entsiegelungsmedium PBS pH 7,4,
40 % (v/v) Glycerin,
0,1 % (v/v) Na-Azid.

2.11. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Puffer A 143,9 g Guanidin-HCl (6 M),
3,5 g NaH₂PO₄ (0,1 M),
ad 250 ml Aqua dest., pH auf 8,0 mit 5 M NaOH.

Puffer B mit 5 M Urea ; 75 g Urea,
3,44 g NaH₂PO₄ (0,1 M),
ad 250 ml Aqua dest., pH auf 8,0
mit 10 M NaOH.
mit 1 M Urea ; 15 g Urea,
sonst wie oben.

Puffer C 1,9 g KCl (100 mM),
3,45 g Na₂HPO₄ (0,1 M),
0,05 g MgCl₂ (1 mM),
ad 259 ml Aqua dest.,
jeweils ohne pH-Einstellung (pH 8,6) und mit pH-Einstellung auf 7,0.

G-50 Säule 10 g Sephadex® G-50 Fine (Pharmacia Biotech),

100 ml 1x PBS, 1h bei 90°C im Wasserbad,
entgasen, aufladen des Säulenmaterials, mit PBS
waschen.

FluoroLink[®] Cy3[®] Amersham LIFE SCIENCE

2.12. FACS-Analyse

1x PBS Siehe 2.2.

Trypsin-EDTA Siehe 2.2.

Eiskaltes Ethanol Riedel-de Hæn

0,1% NP40 in 1x PBS Siehe 2.10.

RNase A 10 mg/ml Stammlösung

Propidiumiodid 2 mg/ml Stammlösung (Sigma)

2.13. Präparation von Plasmid

STET-Puffer 8 % (w/v) Saccharose,
0,5 % (v/v) Triton X-10,
50 mM EDTA,
50 mM Tris-HCl,
pH 8,0.

Lysozym 50 mg/ml in H₂O

Natrium-Azetat 3 M in H₂O

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden im Wesentlichen nach Standardmethoden durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Adhäsionskultur gehalten. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden Säugetierzellen im Allgemeinen auf 6 cm, 10 cm oder 15 cm Polystyrol Zellkulturschalen (Nunc, Greiner) kultiviert.

Entsprechend den jeweiligen Versuchsbedingungen wurden ein RPMI-1640 Medium mit Zusatz von 10 % FCS (v/v), 1 % L-Glutamin (v/v) und 1 % Penicillin / Streptomycin (v/v) Stammlösung verwendet. In das Hungermedium wurde statt 10 % FCS nur 0,5 % FCS zugegeben. Die Inkubation der Zellen geschah in einem Heraeus Brutschrank (B5060 EC-CO₂) bei 37°C, 96 % relativer Feuchte und 5 % CO₂.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus HeraSafe) durchgeführt.

3.1.2. Passagieren von Zellen

Um einen Wachstumsstopp durch eine Kontaktinhibierung zu vermeiden, wurden die Zellen abhängig von ihrer Wachstumsdichte, alle 2-4 Tage zwischen 1:5 und 1:20 verdünnt und neu ausplattiert bzw. passagiert. Da die verwendeten Zelllinien adhärent wuchsen, wurden sie zunächst durch die Behandlung mit Trypsin-EDTA von der Kulturschale abgelöst.

Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit sterilem PBS pH 7,4 gewaschen, um die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen.

Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA Lösung überschichtet und zwischen 2 und 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sie sich vollständig von der Kulturschale gelöst hatten.

Die Zellen wurden entsprechend der erwünschten Endverdünnung in Zellkulturschalen, die mit frischem Medium vorbereitet worden waren, ausplattiert.

3.1.3. Auftauen der Zellen

Um Zellschädigungen während des Auftauens zu vermeiden, wurde dieser Prozess möglichst schnell durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen (1 ml in 1,8 ml Cyro-Tubes) wurden hierzu bei 37°C im Wasserbad soweit erwärmt, dass das Medium gerade wieder flüssig wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 10 ml vorgewärmtem Medium gemischt und in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß für 5 Min. bei 1000 rpm in einer Heraeus Minifuge abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Je nach Zelldichte wurden die Zellen dann auf 10 oder 15 cm Zellkulturschalen ausgesät.

3.1.4. Einfrieren von Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden die eukaryotischen Zellen in flüssigem Stickstoff bei -190°C aufbewahrt. Um die schädliche Bildung von Eiskristallen beim Einfriervorgang zu vermeiden, wurden die Zellen in einem speziellen Einfriermedium langsam auf die Lagertemperatur gebracht. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in **3.1.3.** beschrieben, in Suspension gebracht.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 Min. in einer Heraeus Minifuge in Raumtemperatur bei 1000 rpm vom Kulturmedium isoliert. Das Zellpellet wurde dann in eiskaltem RPMI Medium mit 25 % FCS (v/v) DMSO (1 ml pro konfluenter 15 cm Platte) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Nunc Cyrovials (2 ml) abgekühlt und für einige Minuten in einem Eisbad auf 0°C

gebracht. Dann wurde die Zellsuspension für drei Tage bei -80°C gelagert und schließlich in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

Die Zellen wurden üblicherweise in einer Dichte von 5×10^6 bis 1×10^7 eingefroren.

3.1.5. Bestimmungen der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Auf dem Zählgitter der Kammer wurde ein Deckglas so angebracht, dass die Newton'schen Ringe erkennbar wurden. Frisch trypsinisierte und in einem definierten Volumen Medium resuspendierte Zellen wurden dann auf die Zählkammer unter das Deckglas pipetiert. Anschließend wurde die Zellzahl in 25 Feldern ausgezählt und hieraus der Mittelwert ermittelt.

Durch Multiplikation des Mittelwertes mit 1×10^4 erhält man die Zellzahl pro ml.

3.1.6. Arretieren von Zellen

Um ein definiertes Ausgangsstadium des Zellzyklus herzustellen, kann man Zellen arretieren, d.h. Zellen durch bestimmte Kulturbedingungen in die G1 / G0 Phase des Zellzyklus versetzen.

Zu diesem Zwecke wurden die Zellen nach Erreichen eines konfluenten Zustandes nicht passagiert, sondern einmal mit frischem Vollmedium versorgt und anschließend für 72 Stunden in diesem Zustand belassen. Die Zellen befinden sich dann nach Ablauf dieser Inkubationszeit in der G1 / G0 Phase.

3.2. Bakterienkultur

3.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich BL 21-Bakterien kultiviert, die von S.F. Dowdy Lab., bereits mit Tat-p27^{Kip1} Wildtyp transformiert, zur Verfügung gestellt wurden. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit 100 μ l/ml Ampicillin bei 37°C in Schüttelinkubatoren.

3.2.2. Konservierung von Bakteriovorrat

1 ml 0,1% Ampicillin/LB-Medium wurde in ein Glasröhrchen gegeben und mit einer Kolonie der BL 21-Bakterien geimpft. Diese Bakterienkultur wurde bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeweils 1 ml der Übernachtskultur 1 ml Glycerol zugegeben und bei -80°C in einem Kyroröhrchen aufbewahrt.

3.2.3. Analytische Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien (Mini-Präp)

1 ml der „Übernachtskultur“ von transformierten E. coli wurde für 1 Min. bei 7000 rpm in der Heraeus Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 110 μ l STET Puffer mit Lysozym (0,5 mg/ml) aufgenommen und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension für 1 Min. bei 95°C inkubiert und anschließend für 15 Min. bei 13000 rpm in der Heraeus Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und der Überstand mit 110 μ l Isopropanol versetzt und erneut bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge für 15 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend kurz getrocknet und in 30 μ l TE Puffer aufgenommen.

3.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung wurde diese in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Reinheit einer DNA-Präparation kann durch die Messung der DNA-haltigen Lösung bei 280 nm und des Quotienten A_{260}/A_{280} abgeschätzt werden. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A_{260}/A_{280} von $1,8 \pm 0,2$ aufweisen.

3.3. Biochemische Methoden

3.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde die von *Bradford* beschriebene Methode (1976) benutzt. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie Brilliant-Blau G-250 von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn Proteinbindungen auftreten. Dabei ist die Extinktionszunahme einer Zunahme der Proteinkonzentration annähernd proportional. Mit Hilfe einer BSA-Referenzkurve kann der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt werden. Hierzu wurden 1, 2, 4, 6 und 8 μ l der BSA-Lösung (1 mg/ml) mit einer 150 mM NaCl Lösung auf 100 μ l aufgefüllt und mit je 1 ml Bradford-Lösung versetzt. In der gleichen Weise wurden 1 μ l und 2 μ l des Proteinlysates eingesetzt. Nach 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD_{595} der Proben gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde dann an der erstellten BSA-Referenzkurve abgelesen.

3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine lassen sich entsprechend ihrer Molekülmasse in einem Acrylamidgel auftrennen. Je nach gewählten Pufferbedingungen können native und

denaturierende Acrylamidgele verwendet werden. Im Allgemeinen wurden in der vorliegenden Arbeit denaturierende, diskontinuierliche Acrylamidgele verwendet. SDS denaturiert Proteine und geht nicht kovalente Wechselwirkungen mit dem hydrophobem Bereich ein. Dabei ist das Verhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäure annähernd konstant. Durch die komplette Entfaltung der Proteine und deren Verbindung mit SDS werden Ladungsunterschiede ausgeglichen. Alle Proteine erhalten negative Ladung und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Da die spezifische Ladung gleich ist, hängt die Wanderung neben der Durchlässigkeit der Matrix nur vom Molekulargewicht der Proteine ab. Verwendet wurden vertikale Gelapparaturen, die ein kurzes, niedrigprozentiges Sammelgel enthalten, in dem zunächst eine schmale Proteinfront aufgebaut wird. Diese wird nach dem Erreichen des Trenngels, in dem andere Pufferbedingungen herrschen, entsprechend der Molekülgröße der enthaltenen Proteine aufgetrennt. Sowohl Sammel- als auch Trenngel wurden durch Mischen der jeweiligen Gelpuffer mit Acrylamid-/Bisacrylamid Stammlösung und H₂O hergestellt. Dem Trenngel wurde zusätzlich 1 % lineares Polyacrylamid gegeben, um eine bessere mechanische Festigkeit des Gels zu erreichen. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von TEMED (0,08 % v/v) und APS (1 % v/v) gestartet. Die Gele wurden in einer Dicke von 0,8 oder 1 mm zwischen Glasscheiben der Größe 12 x 10 cm, 20 x 20 cm oder 20 x 36 cm gegossen. Um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erreichen, wurden die Gele bis zum Abschluss der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Danach wurde das Sammelgel aufgegossen. Je nach Volumen der aufzutrennenden Proben wurden unterschiedlich große Ladetaschen zwischen 50 und 200 mm² im Sammelgel durch Einsetzen eines Kammes gebildet. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Min. bei 100 °C inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen.

Für das rekombinante Tat-p27^{Kip1} wurden ausschließlich 12 %ige SDS Trenngele verwendet. Bei einer angelegten Spannung von 10 V/cm ergibt sich je nach Länge des Gels nach 1 bis 2 Stunden eine Auftrennung nach Molekülgröße mit einer Auflösung von ca. 1 kD, welches etwa 10 Aminosäureresten entspricht.

3.3.3. Proteinexpression mit IPTG

Die verwendeten BL21(DE3)pLysS-Bakterien enthalten die pRSET-Vektor, der die gewünschte Sequenz für Tat-p27^{Kip1}-Protein enthält. Wichtig für die Expressionskontrolle ist die zweifach vorhandene *lac*-Repressor Bindungsstelle, die eine effiziente Repression des T7-Promotors garantiert. Durch die Bindung an die Operatorregion blockieren *lac*-Repressor-Proteine den T7-Promotor. Wird der Bakterienkultur IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid; Studier und Moffat, 1986) zugesetzt, bindet sich dieser an *lac*-Repressor-Proteine, sodass die T7-Promotorregion freiliegt. Nun können die RNA-Polymerasen, beginnend am Promotor, die Sequenz translatieren.

Eine Kolonie der für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellten (SF Dowdy Lab, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA) BL21-Bakterien wurde in 1 L 0,1 % Ampicillin-LB-Medium geimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 200 ml dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag mit 800 ml 0,1 % Ampicillin-LB Medium gemischt und auf 1 mM IPTG eingestellt. Anschließend wurde die Bakterienkultur fünf Stunden lang bei 37 °C geschüttelt, wobei zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h der Inkubation jeweils 1 ml Kulturprobe zum Nachweis der Induktion entnommen wurde. Diese Proben wurden bei 13000 rpm 5 Min. zentrifugiert und die Zellpellets mit 50 μ l 3 x SDS gemischt. Mit Hilfe von 12 % SDS-PAGE wurden die Proteinproben aufgetrennt und anschließend nach der Coomassie-Methode gefärbt.

3.3.4. Herstellung von Proteinlysaten aus Bakterien

Die Gesamtkultur wurde in Puffer Z aufgenommen und die Bakterien durch dreimalige Behandlung mit einem Zellhomogenisator Typ Art-Micra D8 aufgebrochen. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert. Das Bakterienlysat wurde für die nachfolgende Ni-NTA Reinigung auf 10 mM Imidazol eingestellt.

3.3.5. Nickelsäulen-Reinigung von *His tag*-Protein (Ni-NTA)

Das NTA (**N**itrilo**t**ri**a**cetic) ist ein teträrer Komplexbildner. Es besetzt vier von sechs Ligand-Bindungsstellen von einem Nickel-Ion, wobei zwei Stellen für die Interaktion mit 6x*His tag* freigelassen werden. Die Imidazoldomäne von *His tag* bindet sich an Nickel-Ionen. Zur Vermeidung von Kontaminanten an der Nickelsäule wird 10 mM Imidazol hinzugefügt. Auf Grund der Strukturähnlichkeit bindet sich Imidazol an die Nickel-Ione und verhindert so die Bindung von diversen Histidindomänen verschiedener nicht markierter (“untagged”) Hintergrundproteine.

Die Nickel-NTA-Agarose wurde mit 2 ml Puffer Z / 30 mM Imidazol äquilibriert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der Nickel-NTA-Agarose dem zuvor auf 10 mM Imidazol gebrachte Bakterienlysate gegeben und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der Überstand aufgehoben und die Nickel-NTA-Säule mit 10fachem Säulenvolumen Puffer Z / 30 mM Imidazol gewaschen. Dann begannen die eigentlichen Elutionsschritte mit Puffer Z / 250 mM Imidazol, Puffer Z / 500 mM Imidazol und Puffer Z / 1 M Imidazol, wobei die Inkubationszeit jeweils 30 Min. bei 4°C betrug. Der Überstand während der einzelnen Schritte wurde gesondert gesammelt.

Alle Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft.

3.3.6. Mono-S-Säule-Reinigung auf FPLC™

FPLC (*f*ast *p*rotein, *p*eptide and *p*olynucleotide *l*iquid *c*hromatography) wurde für die Separation von Biomolekülen entwickelt. Diese Technik basiert auf Ladungsunterschieden verschiedener Biomoleküle, wobei für den Anionenaustausch eine Mono Q- oder Mono P-Säule verwendet wird und für einen Kationenaustausch eine Mono S-Säule zum Einsatz kommt. Eine ausreichend hohe Selektivität wird garantiert durch verschiedene Variablen wie Medium, pH, Puffer, Salzkonzentration und die Biomoleküle selbst. Der

besondere Zweck der Verwendung von FPLC in der vorliegenden Arbeit ist vor allem, die hohe Konzentration des Harnstoffs im Eluat nach der Ni-NTA Reinigung zu eliminieren und durch einen HEPES-haltigen Puffer (PufferB) zu ersetzen.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Mono S-Säule auf FPLC (Pharmacia) verwendet. Die Mono S-Säule trägt auf der Matrix Sulphonate (SO_3^-), die zunächst mit Puffer A (50 mM NaCl, 20 mM HEPES) äquilibriert werden. Danach fließt die Probe, die die gewünschten Fraktionen von Schritt **3.3.5.** enthält, durch die Säule. Hierbei binden sich die positiv geladenen Proteine an die Matrix. Im nächsten Schritt werden die gebundenen Proteine systematisch von der Matrix gelöst und aufgefangen, indem man die Mono S-Säule mit Puffer B (1 M NaCl, 20 mM HEPES) in steigender Beimengung zu Puffer A wäscht. Während dieses Prozesses wird ständig die Absorption der aufgefangenen Lösungen gemessen und in einer Kurve aufgetragen, wobei die jeweils entsprechende Fraktion des Eluats zu 1 ml in einer Eppendorfer Tube gesammelt wird. Die Fraktionen des Eluats mit höchster Absorption enthalten in der Regel das separierte Protein. Jeweils 10 μ l solcher Fraktionen werden auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Färbung auf das Vorhandensein des gewünschten Proteins hin überprüft.

3.3.7. PD-10-Reinigung

Für den Austausch von NaCl in Proteinproben durch PBS/Proteaseinhibitoren wurde eine PD 10-Säule von der Firma *amersham pharmacia biotech* verwendet. Die Trägersubstanz der PD 10-Säule ist Sephadex G-25 M, welche zunächst mit 25 ml PBS/Proteaseinhibitoren äquilibriert wird. Danach wird die Säule mit 2,5 ml der Proteinproben geladen. Die so vorbereitete Säule wird mit 5 ml PBS/Proteaseinhibitoren eluiert und die Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Hierbei werden proteinhaltige Fraktionen auf Grund der höheren Molekülmasse zuerst zusammen mit PBS/Proteaseinhibitoren eluiert. Diesen folgt dann die NaCl-haltige Fraktion ohne Proteine.

Je 10 μ l der Fraktionen wurden auf 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein durch Coomassie Färbung nachgewiesen. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden in 5 %iges Glycerol aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

3.3.8. Immunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis der subzellulären Verteilung eines Proteins kann man das zu beobachtende Protein direkt oder indirekt immunfluoreszent markieren, um es dann mikroskopisch sichtbar zu machen.

Hierfür wurden Zellen auf mikroskopischen Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden zum gewünschten Zeitpunkt mit PBS pH 7,4 gewaschen und mit Formaldehydlösung (3,8 % in PBS pH 7,4) fixiert. Nach zweimaliger Inkubation in 0,1 M Glycin für jeweils 5 Minuten und 0,1 % (v/v) NP-40 für 10 Min., beide gelöst in PBS pH 7,4, wurden die Zellen für 30 Min. bei Raumtemperatur in IF-Blocklösung (0,1 % v/v NP-40, 5 % v/v FCS in PBS pH 7,4) behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen 60 Min. in IF-Blocklösung inkubiert, welche den primären, gegen das zu untersuchende Protein gerichteten Antikörper enthielt. Die verwendeten Antikörper wurden üblicherweise in einer Verdünnung von 1:50 angesetzt. Dann wurden die Zellen dreimal für 5 Min. mit IF-Blocklösungen gewaschen.

Danach erfolgte die Inkubation für 60 Min. mit sekundärem Antikörper, der an ein Chromophor gekoppelt ist. Dieser Inkubationslösung wurde zusätzlich zur Gegenfärbung der DNA DAPI (50 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:50 beigegeben.

Schließlich wurden die Zellen dreimal 5 Min. mit PBS pH 7,4 / 0,1 % (v/v) NP-40 und je einmal mit PBS pH 7,4 und H_2O gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann mit Hilfe von Entsiegelungsmedium auf Objektträgern fixiert.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem DMIRB Mikroskop.

3.3.9. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Um die rekombinanten Tat-p27^{Kip1} Proteine spezifisch markieren zu können, wurden die rekombinanten Proteine mit Hilfe des FluoroLinkTM Cy3TM (Amersham) kovalent markiert. Die Trennung der markierten Proteine von überschüssigen Chromophor Cy3 erfolgte durch die G-50 Sepharose-Säulen. Die Elutionen wurden gesammelt und mit SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft.

3.3.10. FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse

Die menschlichen Chromosomen lassen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Größen und Basenzusammensetzungen mit Hilfe einer Durchflusssortierung auftrennen (daher auch **Durchfluss-Cytometrie** genannt; Bartholdi et al. 1987). Bei diesem Verfahren färbt man Chromosomenpräparate mit einem DNA-bindenden Farbstoff, der in einem Laserstrahl fluoresziert. Die Fluoreszenzstärke eines Chromosoms ist proportional zur gebundenen Farbstoffmenge und dadurch weitgehend proportional zum DNA-Gehalt und zur Größe des Chromosoms.

Da die einzelnen Chromosomen unterschiedliche Mengen fluoreszierender Farbstoffe binden, kann man sie in einem Durchfluss-Cytometer auftrennen. Ein kontinuierlicher Strom von Tropfen, die die gefärbten Chromosomen enthalten, wandert mit einer Geschwindigkeit von 1000 bis 2000 Chromosomen pro Sekunde durch einen genau fokussierten Laserstrahl. Ein Lichtdetektor (Photomultiplier) misst die Fluoreszenzintensitäten der Chromosomen, die jeweils einzeln in den Tropfen vorliegen.

Anhand dieser Tatsachen kann man den DNA- und Proteingehalt in jeder Zelle bestimmen. Da in jeder Zellzyklus-Phase ein unterschiedlicher DNA- und Proteingehalt vorliegt, ist es möglich, die Zellzyklus-Situation der zu untersuchenden Proben durch FACS zu analysieren.

Als DNA-Farbstoff können **Propidiumiodid** (PI) und DAPI verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich PI verwendet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit ca. 2 ml Trypsin behandelt. Die von der Kulturplatte gelösten Zellen wurden in 5 ml PBS aufgenommen und in ein 15 ml Falcongefäß überführt. Die Zellsuspension wurde dann 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 300 μ l PBS und 900 μ l eiskaltes Ethanol aufgenommen, gut gemischt und entweder zur sofortigen Färbung weiter verarbeitet oder bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

Zur Färbung wurden Zellen in PBS und Ethanol 5 Min. bei 1500 rpm abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 μ l PBS/0,1 % NP40 resuspendiert. Das Resuspensat wurde dann 10 Min. auf Eis inkubiert und anschließend nochmals 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Dem entstandenen Zellpellet wurde 1 ml PBS, 20 μ l RNase A (10 mg/ml) und 30 μ l Propidiumiodid (2 mg/ml in PBS) zugesetzt. Dieses Gemisch wurde mindestens 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Bis zur tatsächlichen Messung wurden die Proben dunkel auf Eis gehalten.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Die Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden im Wesentlichen nach Standardmethoden durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Adhäsionskultur gehalten. Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden Säugetierzellen im Allgemeinen auf 6 cm, 10 cm oder 15 cm Polystyrol Zellkulturschalen (Nunc, Greiner) kultiviert.

Entsprechend den jeweiligen Versuchsbedingungen wurden ein RPMI-1640 Medium mit Zusatz von 10 % FCS (v/v), 1 % L-Glutamin (v/v) und 1 % Penicillin / Streptomycin (v/v) Stammlösung verwendet. In das Hungermedium wurde statt 10 % FCS nur 0,5 % FCS zugegeben. Die Inkubation der Zellen geschah in einem Heraeus Brutschrank (B5060 EC-CO₂) bei 37°C, 96 % relativer Feuchte und 5 % CO₂.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus HeraSafe) durchgeführt.

3.1.2. Passagieren von Zellen

Um einen Wachstumsstopp durch eine Kontaktinhibierung zu vermeiden, wurden die Zellen abhängig von ihrer Wachstumsdichte, alle 2-4 Tage zwischen 1:5 und 1:20 verdünnt und neu ausplattiert bzw. passagiert. Da die verwendeten Zelllinien adhärent wuchsen, wurden sie zunächst durch die Behandlung mit Trypsin-EDTA von der Kulturschale abgelöst.

Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit sterilem PBS pH 7,4 gewaschen, um die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen.

Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA Lösung überschichtet und zwischen 2 und 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sie sich vollständig von der Kulturschale gelöst hatten.

Die Zellen wurden entsprechend der erwünschten Endverdünnung in Zellkulturschalen, die mit frischem Medium vorbereitet worden waren, ausplattiert.

3.1.3. Auftauen der Zellen

Um Zellschädigungen während des Auftauens zu vermeiden, wurde dieser Prozess möglichst schnell durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen (1 ml in 1,8 ml Cyro-Tubes) wurden hierzu bei 37°C im Wasserbad soweit erwärmt, dass das Medium gerade wieder flüssig wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 10 ml vorgewärmtem Medium gemischt und in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß für 5 Min. bei 1000 rpm in einer Heraeus Minifuge abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Je nach Zelldichte wurden die Zellen dann auf 10 oder 15 cm Zellkulturschalen ausgesät.

3.1.4. Einfrieren von Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden die eukaryotischen Zellen in flüssigem Stickstoff bei -190°C aufbewahrt. Um die schädliche Bildung von Eiskristallen beim Einfriervorgang zu vermeiden, wurden die Zellen in einem speziellen Einfriermedium langsam auf die Lagertemperatur gebracht. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in **3.1.3.** beschrieben, in Suspension gebracht.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 Min. in einer Heraeus Minifuge in Raumtemperatur bei 1000 rpm vom Kulturmedium isoliert. Das Zellpellet wurde dann in eiskaltem RPMI Medium mit 25 % FCS (v/v) DMSO (1 ml pro konfluenter 15 cm Platte) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Nunc Cyrovials (2 ml) abgekühlt und für einige Minuten in einem Eisbad auf 0°C

gebracht. Dann wurde die Zellsuspension für drei Tage bei -80°C gelagert und schließlich in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

Die Zellen wurden üblicherweise in einer Dichte von 5×10^6 bis 1×10^7 eingefroren.

3.1.5. Bestimmungen der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Auf dem Zählgitter der Kammer wurde ein Deckglas so angebracht, dass die Newton'schen Ringe erkennbar wurden. Frisch trypsinisierte und in einem definierten Volumen Medium resuspendierte Zellen wurden dann auf die Zählkammer unter das Deckglas pipetiert. Anschließend wurde die Zellzahl in 25 Feldern ausgezählt und hieraus der Mittelwert ermittelt.

Durch Multiplikation des Mittelwertes mit 1×10^4 erhält man die Zellzahl pro ml.

3.1.6. Arretieren von Zellen

Um ein definiertes Ausgangsstadium des Zellzyklus herzustellen, kann man Zellen arretieren, d.h. Zellen durch bestimmte Kulturbedingungen in die G1 / G0 Phase des Zellzyklus versetzen.

Zu diesem Zwecke wurden die Zellen nach Erreichen eines konfluenten Zustandes nicht passagiert, sondern einmal mit frischem Vollmedium versorgt und anschließend für 72 Stunden in diesem Zustand belassen. Die Zellen befinden sich dann nach Ablauf dieser Inkubationszeit in der G1 / G0 Phase.

3.2. Bakterienkultur

3.2.1. Allgemeine Kulturbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich BL 21-Bakterien kultiviert, die von S.F. Dowdy Lab., bereits mit Tat-p27^{Kip1} Wildtyp transformiert, zur Verfügung gestellt wurden. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit 100 µl/ml Ampicillin bei 37°C in Schüttelinkubatoren.

3.2.2. Konservierung von Bakteriovorrat

1 ml 0,1% Ampicillin/LB-Medium wurde in ein Glasröhrchen gegeben und mit einer Kolonie der BL 21-Bakterien geimpft. Diese Bakterienkultur wurde bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeweils 1 ml der Übernachtskultur 1 ml Glycerol zugegeben und bei -80°C in einem Kyroröhrchen aufbewahrt.

3.2.3. Analytische Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien (Mini-Präp)

1 ml der „Übernachtskultur“ von transformierten E. coli wurde für 1 Min. bei 7000 rpm in der Heraeus Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 110 µl STET Puffer mit Lysozym (0,5 mg/ml) aufgenommen und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension für 1 Min. bei 95°C inkubiert und anschließend für 15 Min. bei 13000 rpm in der Heraeus Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde entfernt und der Überstand mit 110 µl Isopropanol versetzt und erneut bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge für 15 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend kurz getrocknet und in 30 µl TE Puffer aufgenommen.

3.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung wurde diese in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Reinheit einer DNA-Präparation kann durch die Messung der DNA-haltigen Lösung bei 280 nm und des Quotienten A_{260}/A_{280} abgeschätzt werden. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A_{260}/A_{280} von $1,8 \pm 0,2$ aufweisen.

3.3. Biochemische Methoden

3.3.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde die von *Bradford* beschriebene Methode (1976) benutzt. Die Methode beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie Brilliant-Blau G-250 von 465 nm zu 595 nm verschiebt, wenn Proteinbindungen auftreten. Dabei ist die Extinktionszunahme einer Zunahme der Proteinkonzentration annähernd proportional. Mit Hilfe einer BSA-Referenzkurve kann der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt werden. Hierzu wurden 1, 2, 4, 6 und 8 μ l der BSA-Lösung (1 mg/ml) mit einer 150 mM NaCl Lösung auf 100 μ l aufgefüllt und mit je 1 ml Bradford-Lösung versetzt. In der gleichen Weise wurden 1 μ l und 2 μ l des Proteinlysates eingesetzt. Nach 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD_{595} der Proben gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde dann an der erstellten BSA-Referenzkurve abgelesen.

3.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine lassen sich entsprechend ihrer Molekülmasse in einem Acrylamidgel auftrennen. Je nach gewählten Pufferbedingungen können native und

denaturierende Acrylamidgele verwendet werden. Im Allgemeinen wurden in der vorliegenden Arbeit denaturierende, diskontinuierliche Acrylamidgele verwendet. SDS denaturiert Proteine und geht nicht kovalente Wechselwirkungen mit dem hydrophobem Bereich ein. Dabei ist das Verhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäure annähernd konstant. Durch die komplette Entfaltung der Proteine und deren Verbindung mit SDS werden Ladungsunterschiede ausgeglichen. Alle Proteine erhalten negative Ladung und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Da die spezifische Ladung gleich ist, hängt die Wanderung neben der Durchlässigkeit der Matrix nur vom Molekulargewicht der Proteine ab. Verwendet wurden vertikale Gelapparaturen, die ein kurzes, niedrigprozentiges Sammelgel enthalten, in dem zunächst eine schmale Proteinfront aufgebaut wird. Diese wird nach dem Erreichen des Trenngels, in dem andere Pufferbedingungen herrschen, entsprechend der Molekülgröße der enthaltenen Proteine aufgetrennt. Sowohl Sammel- als auch Trenngel wurden durch Mischen der jeweiligen Gelpuffer mit Acrylamid-/Bisacrylamid Stammlösung und H₂O hergestellt. Dem Trenngel wurde zusätzlich 1 % lineares Polyacrylamid gegeben, um eine bessere mechanische Festigkeit des Gels zu erreichen. Die Polymerisation der Gele wurde durch Zugabe von TEMED (0,08 % v/v) und APS (1 % v/v) gestartet.

Die Gele wurden in einer Dicke von 0,8 oder 1 mm zwischen Glasscheiben der Größe 12 x 10 cm, 20 x 20 cm oder 20 x 36 cm gegossen. Um eine glatte Oberfläche des Trenngels zu erreichen, wurden die Gele bis zum Abschluss der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Danach wurde das Sammelgel aufgegossen. Je nach Volumen der aufzutrennenden Proben wurden unterschiedlich große Ladetaschen zwischen 50 und 200 mm² im Sammelgel durch Einsetzen eines Kammes gebildet.

Die aufzutrennenden Proteinproben wurden mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Min. bei 100 °C inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen.

Für das rekombinante Tat-p27^{Kip1} wurden ausschließlich 12 %ige SDS Trenngele verwendet. Bei einer angelegten Spannung von 10 V/cm ergibt sich je nach Länge des Gels nach 1 bis 2 Stunden eine Auftrennung nach Molekülgröße mit einer Auflösung von ca. 1 kD, welches etwa 10 Aminosäureresten entspricht.

3.3.3. Proteinexpression mit IPTG

Die verwendeten BL21(DE3)pLysS-Bakterien enthalten die pRSET-Vektor, der die gewünschte Sequenz für Tat-p27^{Kip1}-Protein enthält. Wichtig für die Expressionskontrolle ist die zweifach vorhandene *lac*-Repressor Bindungsstelle, die eine effiziente Repression des T7-Promotors garantiert. Durch die Bindung an die Operatorregion blockieren *lac*-Repressor-Proteine den T7-Promotor. Wird der Bakterienkultur IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid; Studier und Moffat, 1986) zugesetzt, bindet sich dieser an *lac*-Repressor-Proteine, sodass die T7-Promotorregion freiliegt. Nun können die RNA-Polymerasen, beginnend am Promotor, die Sequenz translatieren.

Eine Kolonie der für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellten (SF Dowdy Lab, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA) BL21-Bakterien wurde in 1 L 0,1 % Ampicillin-LB-Medium geimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 200 ml dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag mit 800 ml 0,1 % Ampicillin-LB Medium gemischt und auf 1 mM IPTG eingestellt. Anschließend wurde die Bakterienkultur fünf Stunden lang bei 37 °C geschüttelt, wobei zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h der Inkubation jeweils 1 ml Kulturprobe zum Nachweis der Induktion entnommen wurde. Diese Proben wurden bei 13000 rpm 5 Min. zentrifugiert und die Zellpellets mit 50 μ l 3 x SDS gemischt. Mit Hilfe von 12 % SDS-PAGE wurden die Proteinproben aufgetrennt und anschließend nach der Coomassie-Methode gefärbt.

3.3.4. Herstellung von Proteinlysaten aus Bakterien

Die Gesamtkultur wurde in Puffer Z aufgenommen und die Bakterien durch dreimalige Behandlung mit einem Zellhomogenisator Typ Art-Micra D8 aufgebrochen. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert. Das Bakterienlysat wurde für die nachfolgende Ni-NTA Reinigung auf 10 mM Imidazol eingestellt.

3.3.5. Nickelsäulen-Reinigung von *His tag*-Protein (Ni-NTA)

Das NTA (**N**itrilo**t**ri**a**cetic) ist ein teträrer Komplexbildner. Es besetzt vier von sechs Ligand-Bindungsstellen von einem Nickel-Ion, wobei zwei Stellen für die Interaktion mit 6x*His tag* freigelassen werden. Die Imidazoldomäne von *His tag* bindet sich an Nickel-Ionen. Zur Vermeidung von Kontaminanten an der Nickelsäule wird 10 mM Imidazol hinzugefügt. Auf Grund der Strukturähnlichkeit bindet sich Imidazol an die Nickel-Ione und verhindert so die Bindung von diversen Histidindomänen verschiedener nicht markierter (“untagged”) Hintergrundproteine.

Die Nickel-NTA-Agarose wurde mit 2 ml Puffer Z / 30 mM Imidazol äquilibriert. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der Nickel-NTA-Agarose dem zuvor auf 10 mM Imidazol gebrachte Bakterienlysat gegeben und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde der Überstand aufgehoben und die Nickel-NTA-Säule mit 10fachem Säulenvolumen Puffer Z / 30 mM Imidazol gewaschen. Dann begannen die eigentlichen Elutionsschritte mit Puffer Z / 250 mM Imidazol, Puffer Z / 500 mM Imidazol und Puffer Z / 1 M Imidazol, wobei die Inkubationszeit jeweils 30 Min. bei 4°C betrug. Der Überstand während der einzelnen Schritte wurde gesondert gesammelt.

Alle Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft.

3.3.6. Mono-S-Säule-Reinigung auf FPLCTM

FPLC (*f*ast *p*rotein, *p*eptide and *p*olynucleotide *l*iquid *c*hromatography) wurde für die Separation von Biomolekülen entwickelt. Diese Technik basiert auf Ladungsunterschieden verschiedener Biomoleküle, wobei für den Anionenaustausch eine Mono Q- oder Mono P-Säule verwendet wird und für einen Kationenaustausch eine Mono S-Säule zum Einsatz kommt. Eine ausreichend hohe Selektivität wird garantiert durch verschiedene Variablen wie Medium, pH, Puffer, Salzkonzentration und die Biomoleküle selbst. Der

besondere Zweck der Verwendung von FPLC in der vorliegenden Arbeit ist vor allem, die hohe Konzentration des Harnstoffs im Eluat nach der Ni-NTA Reinigung zu eliminieren und durch einen HEPES-haltigen Puffer (PufferB) zu ersetzen.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Mono S-Säule auf FPLC (Pharmacia) verwendet. Die Mono S-Säule trägt auf der Matrix Sulphonate (SO_3^-), die zunächst mit Puffer A (50 mM NaCl, 20 mM HEPES) äquilibriert werden. Danach fließt die Probe, die die gewünschten Fraktionen von Schritt **3.3.5.** enthält, durch die Säule. Hierbei binden sich die positiv geladenen Proteine an die Matrix. Im nächsten Schritt werden die gebundenen Proteine systematisch von der Matrix gelöst und aufgefangen, indem man die Mono S-Säule mit Puffer B (1 M NaCl, 20 mM HEPES) in steigender Beimengung zu Puffer A wäscht. Während dieses Prozesses wird ständig die Absorption der aufgefangenen Lösungen gemessen und in einer Kurve aufgetragen, wobei die jeweils entsprechende Fraktion des Eluats zu 1 ml in einer Eppendorfer Tube gesammelt wird. Die Fraktionen des Eluats mit höchster Absorption enthalten in der Regel das separierte Protein. Jeweils 10 μ l solcher Fraktionen werden auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Färbung auf das Vorhandensein des gewünschten Proteins hin überprüft.

3.3.7. PD-10-Reinigung

Für den Austausch von NaCl in Proteinproben durch PBS/Proteaseinhibitoren wurde eine PD 10-Säule von der Firma *amersham pharmacia biotech* verwendet. Die Trägersubstanz der PD 10-Säule ist Sephadex G-25 M, welche zunächst mit 25 ml PBS/Proteaseinhibitoren äquilibriert wird. Danach wird die Säule mit 2,5 ml der Proteinproben geladen. Die so vorbereitete Säule wird mit 5 ml PBS/Proteaseinhibitoren eluiert und die Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Hierbei werden proteinhaltige Fraktionen auf Grund der höheren Molekülmasse zuerst zusammen mit PBS/Proteaseinhibitoren eluiert. Diesen folgt dann die NaCl-haltige Fraktion ohne Proteine.

Je 10 μ l der Fraktionen wurden auf 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und das Protein durch Coomassie Färbung nachgewiesen. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden in 5 %iges Glycerol aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

3.3.8. Immunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis der subzellulären Verteilung eines Proteins kann man das zu beobachtende Protein direkt oder indirekt immunfluoreszent markieren, um es dann mikroskopisch sichtbar zu machen.

Hierfür wurden Zellen auf mikroskopischen Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden zum gewünschten Zeitpunkt mit PBS pH 7,4 gewaschen und mit Formaldehydlösung (3,8 % in PBS pH 7,4) fixiert. Nach zweimaliger Inkubation in 0,1 M Glycin für jeweils 5 Minuten und 0,1 % (v/v) NP-40 für 10 Min., beide gelöst in PBS pH 7,4, wurden die Zellen für 30 Min. bei Raumtemperatur in IF-Blocklösung (0,1 % v/v NP-40, 5 % v/v FCS in PBS pH 7,4) behandelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen 60 Min. in IF-Blocklösung inkubiert, welche den primären, gegen das zu untersuchende Protein gerichteten Antikörper enthielt. Die verwendeten Antikörper wurden üblicherweise in einer Verdünnung von 1:50 angesetzt. Dann wurden die Zellen dreimal für 5 Min. mit IF-Blocklösungen gewaschen.

Danach erfolgte die Inkubation für 60 Min. mit sekundärem Antikörper, der an ein Chromophor gekoppelt ist. Dieser Inkubationslösung wurde zusätzlich zur Gegenfärbung der DNA DAPI (50 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:50 beigegeben.

Schließlich wurden die Zellen dreimal 5 Min. mit PBS pH 7,4 / 0,1 % (v/v) NP-40 und je einmal mit PBS pH 7,4 und H_2O gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann mit Hilfe von Entsiegelungsmedium auf Objektträgern fixiert.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem DMIRB Mikroskop.

3.3.9. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Um die rekombinanten Tat-p27^{Kip1} Proteine spezifisch markieren zu können, wurden die rekombinanten Proteine mit Hilfe des FluoroLinkTM Cy3TM (Amersham) kovalent markiert. Die Trennung der markierten Proteine von überschüssigen Chromophor Cy3 erfolgte durch die G-50 Sepharose-Säulen. Die Elutionen wurden gesammelt und mit SDS-PAGE und Coomassie Färbung überprüft.

3.3.10. FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse

Die menschlichen Chromosomen lassen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Größen und Basenzusammensetzungen mit Hilfe einer Durchflusssortierung auftrennen (daher auch **Durchfluss-Cytometrie** genannt; Bartholdi et al. 1987). Bei diesem Verfahren färbt man Chromosomenpräparate mit einem DNA-bindenden Farbstoff, der in einem Laserstrahl fluoresziert. Die Fluoreszenzstärke eines Chromosoms ist proportional zur gebundenen Farbstoffmenge und dadurch weitgehend proportional zum DNA-Gehalt und zur Größe des Chromosoms.

Da die einzelnen Chromosomen unterschiedliche Mengen fluoreszierender Farbstoffe binden, kann man sie in einem Durchfluss-Cytometer auftrennen. Ein kontinuierlicher Strom von Tropfen, die die gefärbten Chromosomen enthalten, wandert mit einer Geschwindigkeit von 1000 bis 2000 Chromosomen pro Sekunde durch einen genau fokussierten Laserstrahl. Ein Lichtdetektor (Photomultiplier) misst die Fluoreszenzintensitäten der Chromosomen, die jeweils einzeln in den Tropfen vorliegen.

Anhand dieser Tatsachen kann man den DNA- und Proteingehalt in jeder Zelle bestimmen. Da in jeder Zellzyklus-Phase ein unterschiedlicher DNA- und Proteingehalt vorliegt, ist es möglich, die Zellzyklus-Situation der zu untersuchenden Proben durch FACS zu analysieren.

Als DNA-Farbstoff können **Propidiumiodid** (PI) und DAPI verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich PI verwendet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit ca. 2 ml Trypsin behandelt. Die von der Kulturplatte gelösten Zellen wurden in 5 ml PBS aufgenommen und in ein 15 ml Falcongefäß überführt. Die Zellsuspension wurde dann 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 300 μ l PBS und 900 μ l eiskaltes Ethanol aufgenommen, gut gemischt und entweder zur sofortigen Färbung weiter verarbeitet oder bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

Zur Färbung wurden Zellen in PBS und Ethanol 5 Min. bei 1500 rpm abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 μ l PBS/0,1 % NP40 resuspendiert. Das Resuspensat wurde dann 10 Min. auf Eis inkubiert und anschließend nochmals 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Dem entstandenen Zellpellet wurde 1 ml PBS, 20 μ l RNase A (10 mg/ml) und 30 μ l Propidiumiodid (2 mg/ml in PBS) zugesetzt. Dieses Gemisch wurde mindestens 30 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Bis zur tatsächlichen Messung wurden die Proben dunkel auf Eis gehalten.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung von Tat-p27^{Kip1} aus BL21-Bakterien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten BL21-Bakterien enthielten einen pTat-HA Expressionsvektor, der das Tat-p27^{Kip1} Fusionsprotein kodiert. Der pTat-HA Expressionsvektor besitzt eine N-terminale 6x Histidin-Region, der 11 Aminosäuren folgen, die die Tat-Protein Transduktionsdomäne (PTD) codieren (Green et al., 1988). Dabei folgt der Tat-Sequenz der N-Terminus des p27^{Kip1}-Proteins (Abb.1(a) und 1(b)).

Die Bakterien mit pTat-HA Expressionsvektor wurden freundlicherweise von S.F. Dowdy (Howard Hughes Medical Institute, Depts of Pathology and Barnes-Jewish Hospital, Washington University School of Medicine) zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle wurden außer Bakterien, die pTat-p27-Wildtyp enthielten, auch Bakterien mit pTat-p27^{KK} in Kultur gehalten, die auf Grund einer Punktmutation im CDK-Bindungsbereich von p27^{Kip1} funktionell inaktiv waren.

4.1.1. Induktion von Proteinexpression durch IPTG

Die zu jeder Stunde während der 6-stündigen Inkubation entnommenen Kulturproben zeigen eine zunehmende Expression eines ca. 26-39 kD großen Proteins (siehe Abb.2), welches dem Tat-p27^{Kip1}, einen 27 kD großen und zusätzlich die Tat-Sequenz enthaltenden Protein, entspricht (Nahagara et al., 1998). Die übrigen Proteinfractionen, die zwar ebenfalls exprimiert werden, jedoch durch das IPTG während der Inkubation nicht induziert werden, zeigen keine Zunahme der Expression.

Sowohl Tat-p27^{WT} als auch Tat-p27^{KK} ließen sich bei ca. 26-39 kD detektieren. Daher werden bei weiteren Proteinreinigungsschritten repräsentative Bilder von Tat-p27^{WT} gezeigt. Außer der erwarteten Proteinfraction zeigt sich eine weitere Fraktion, die ebenfalls durch das IPTG induziert wird, bei ca. 21-26 kD.

4.1.2. Proteinreinigung durch Ni-NTA

6x Histidin markiertes Tat-p27^{Kip1} Fusionsprotein wurde in höchster Quantität und in seiner qualitativ reinsten Form durch 500 mM Imidazol/PufferZ eluiert (siehe Abb.3). Das Eluat mit 250 mM Imidazol/PufferZ enthält noch andere Proteine neben dem gewünschten Fusionsprotein. Das Eluat mit 1 M Imidazol/Puffer Z weist zwar am wenigsten Verunreinigungen auf, enthält jedoch ebenso wenig Tat-p27^{Kip1}, sodass sich das Protein in SDS-PAGE kaum darstellen lässt.

4.1.3. Mono-S-Reinigung auf FPLC

Die vier initialen Balken in der Abbildung 4(a) markieren die viermalige Injektion der Probe zur Mono S-Säule. Danach beginnt die Absorptionsmessung der einzelnen Fraktionen des Eluats, das nach dem Durchlauf durch die Mono S-Säule zu je 1 ml gesammelt wird. Die einzelnen Fraktionen des Eluats sind im Kurvenverlauf (Abb. 4(a)) erkennbar an den negativen Spitzen.

Man sieht ab der dritten Fraktion positive Absorptionsspitzen, die dem Tat-p27^{Kip1}-Protein entsprechen, wobei das Absorptionsmaximum zwischen der vierten und der fünften Fraktion erreicht wird. Die ersten sieben Fraktionen wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf das Vorhandensein von Tat-p27^{Kip1} hin überprüft (Abb.4(b)). Die Hauptmenge an Tat-p27^{Kip1} befindet sich in den 3., 4. und 5. Fraktionen.

4.1.4. PD-10-Reinigung (*desalting*)

In einem sehr hohen Reinheitsgrad wurde das Tat-p27^{Kip1} Fusionsprotein ohne andere in SDS-PAGE nachweisbare Proteine durch die PD-10-Reinigung eluiert (Abb.5). Die ersten sieben Fraktionen des Eluates, in dem das Tat-p27^{Kip1}-Protein enthalten ist, ergaben ein Gesamtvolumen von 3,5 ml. Diesem wurde zur Aufbewahrung 0,5 % Glycerol zugefügt. Die anschließende

Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford ergab eine Proteinkonzentration zwischen 0,17 - 0,4 μ g pro ml Puffer, je nach Versuchsserie.

4.2. Tat-p27^{Kip1}-Behandlung der Zellen

4.2.1. Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die SH-SY5Y Neuroblastomzellen wurden mit rekombinantem Tat-p27^{Kip1/WT} in unterschiedlicher Konzentration und Behandlungsdauer inkubiert. Die transduzierten Proteine wurden anschließend mit Chromophor(Cy3)-Konjugat markiert und mikroskopiert. Dabei wurden α -p27^{Kip1}-Antikörper und α -mouse-Cy3-Antikörper (Chromophor-Konjugat) eingesetzt.

Zunächst sieht man in den Abbildungen 6(a)-(c) die Konzentrationsabhängigkeit der inkubierten Tat-p27^{Kip1} Proteine bei zweistündiger Inkubationsdauer. Hierbei wurden jeweils 50, 100 und 200 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein eingesetzt. Die Quantifizierung der Transduktion durch das Auszählen der mit Cy3 markierten Zellen war nicht möglich, da fast alle Zellen nach der Behandlung Fluoreszenzen zeigten, die sich in ihrer Intensität unterschieden.

In Abb.6 (a), nach zweistündiger Behandlung mit 50 nM Tat-p27^{Kip1}, ist die Fluoreszenz nicht nur an den Zellrändern, sondern auch spärlich über die gesamte Zellfläche zu beobachten. Abb.6 (b) zeigt Zellen nach der Behandlung mit 100 nM Tat-p27^{Kip1} bei gleicher Behandlungsdauer. Die beobachtete Fluoreszenz ist fast nur an den Zellrändern zu sehen. In Abb. 6 (c) ist die Fluoreszenz nach zweistündiger Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1} über die gesamte Zellfläche verteilt.

Die Intensität der Immunfluoreszenz der mit Tat-p27^{Kip1} behandelten Zellen korreliert tendenziell positiv mit steigender Tat-p27^{Kip1}-Konzentration bei gleicher Inkubationsdauer.

Für die Versuche, die die Abhängigkeit der Tat-p27^{Kip1}-Behandlung von der Inkubationsdauer zeigen sollen, wurde die Proteinkonzentration von 200 nM gewählt. In dieser Konzentration wurden die Zellen jeweils für eine, zwei und drei Stunden inkubiert und anschließend das p27^{Kip1}-Protein mit Cy3 markiert.

In Abb.7 (a) kann man die Fluoreszenz nur an den Zellrändern beobachten, während sie nach zweistündiger Inkubation (Abb.7 (b)) bereits über die gesamte Zellfläche verteilt ist. Nach dreistündiger Inkubation weisen die Zellen sowohl an den Zellrändern als auch spärlich über die gesamte Zellfläche verteilt Fluoreszenz auf (Abb., 7 (c)).

Die Fluoreszenzintensität der mit Tat-p27^{Kip1} behandelten Zellen korreliert tendenziell positiv mit steigender Inkubationsdauer bei gleicher Tat-p27^{Kip1}-Konzentration.

4.2.2. Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie

Im Kapitel **4.2.1.** wurde mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung das transduzierte Tat-p27^{Kip1}-Protein in den Zellen detektiert. Es stellt sich allerdings die Frage, ob die durch die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesenen Proteine in den Zellen tatsächlich das rekombinante Tat-p27^{Kip1} darstellen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass es sich nicht um das rekombinante Tat-p27^{Kip1} handelt, sondern um endogenes p27^{Kip1} der SH-SY5Y-Zellen (im Vorfeld wurde das Vorhandensein des endogenen p27^{Kip1} im Westernblot nachgewiesen; Ergebnis nicht gezeigt). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das rekombinante Tat-p27^{Kip1}-Protein direkt mit FluoroLinkTMCy3TM kovalent markiert.

In der Abbildung 8 sieht man die Reinigungsschritte des Reaktionsgemisches, das aus Tat-p27^{Kip1} und FluoroLinkTMCy3TM besteht, mit Hilfe der G-50-Säule. In der fünften Fraktion des Eluates wird das markierte Protein bei 26-39 kD gezeigt. Diese Fraktion enthält noch zwei schwach nachweisbare Verunreinigungen, die ca. 21-26 kD und 15-21 kD groß sind.

Analog zu den Versuchen im Kapitel **4.2.1.**, sollte auch mit Hilfe von direkter Immunfluoreszenzmikroskopie die Transduktionseffizienz in Abhängigkeit von Proteinkonzentration und Inkubationsdauer gezeigt werden.

In Abb. 9 wird die Transduktionseffizienz bei einer einstündigen Inkubationsdauer gezeigt. So weisen die Zellen bereits bei der Inkubation mit 50 nM Tat-p27^{Kip1} eine deutlich sichtbare Fluoreszenz auf, wobei diese die Zellränder umrandet (Abb. 9(a)). Die mit 100 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein inkubierten Zellen zeigen punktförmig über die gesamte Zellfläche verteilte Fluoreszenz (Abb.9(b)). Bei der Inkubation mit 200 nM Tat-p27^{Kip1} ist die Fluoreszenz homogen über die gesamte Zellfläche zu beobachten (Abb.9(c)).

Die Fluoreszenzintensität der behandelten Zellen korreliert positiv mit steigender Proteinkonzentration von Tat-p27^{Kip1} bei gleicher Inkubationsdauer.

Um die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Inkubationsdauer zu zeigen, wurde eine Tat-p27^{Kip1}-Proteinkonzentration von 200 nM ausgewählt. SH-SY5Y-Zellen wurden in dieser Konzentration mit Tat-p27^{Kip1} jeweils 10, 30 und 60 Minuten lang inkubiert.

Wurden die Zellen 10 Minuten lang inkubiert, ist die Fluoreszenz nur an den Zellrändern zu sehen (Abb.10 (a)). Bei 30-minütiger Inkubationsdauer nahm die Fluoreszenzintensität zu und ist punktförmig über die gesamte Zellfläche zu beobachten (Abb.10(b)). Bei einer Inkubationsdauer von 60 Minuten konnte die Fluoreszenz homogen über die gesamte Zellfläche registriert werden (Abb.10(c)). Die Fluoreszenzintensität der behandelten Zellen korreliert positiv mit steigender Inkubationsdauer bei gleich bleibender Tat-p27^{Kip1}-Proteinkonzentration.

4.2.3. Konfokalmikroskopie

Physiologischerweise zeigen exogen zugeführte Proteine auf Grund ihrer Ladungsverhältnisse eine Adhäsionstendenz zur Zellmembran. Daher sollte untersucht werden, ob die durch die Immunfluoreszenz detektierten Proteine möglicherweise nur eine Anlagerung an der Zelloberfläche oder tatsächlich eine

intrazelluläre Lokalisation darstellen. Zu diesem Zwecke wurden die Präparate von **4.2.1.** konfokal mikroskopiert.

Abb.11(a) zeigt ein repräsentatives Präparat in konfokalmikroskopischen Schnittaufnahmen. Die ursprünglich rote Cy3-Färbung wurde im Rahmen der elektronischen Bildaufnahme zur Verdeutlichung blau dargestellt. Die Linie in der Präparatmitte ist ein Artefakt, das durch den Bruch des Deckglases zustande kam. Der Schnitt führt von der unteren zur oberen Präparatseite. Die höchste Intensität der Cy3-Färbung ließ sich im mittleren Bereich des Präparates, also im intrazellulären Bereich, finden. Die Tat-p27^{Kip1/WT} Fusionsproteine sind nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch intrazellulär vorhanden.

Zur präziseren Unterscheidung von intrazellulärer Lokalisation von Tat-p27^{Kip1/WT} wurde eine Zelle in 1000-facher Vergrößerung aufgenommen (Abb.11(b)). Auch hier verläuft die Schnittführung von unten nach oben. Die fluoreszent markierten Proteine sind sowohl im Zellplasma als auch im Zellkernbereich zu finden, wobei der Zellkern eine besonders hohe Fluoreszenz aufweist und deutlich in seiner rundlichen Gestalt zu erkennen ist.

Rekombinante Tat-p27^{Kip1/WT} Fusionsproteine sind in der Lage, Zellmembranen zu überwinden, wobei die Verteilung der Proteine besonders das Zellkernkompartiment bevorzugt.

4.3. FACS-Analyse

SH-SY5Y Zellen wurden mit fluoreszent markiertem Tat-p27^{Kip1/WT} Fusionsprotein und als Kontrolle mit Tat-p27^{Kip1/KK}, das auf Grund einer Punktmutation biologisch inaktiv ist, behandelt. Dadurch sollten eventuelle Effekte, die auf das Tat-Konstrukt zurückzuführen sind und nicht auf das p27^{Kip1/WT}-Protein, ausgeschlossen werden.

Jeweils mit 5, 25, 50 und 150 nM Tat-p27^{WT} bzw. Tat-p27^{KK} wurden die Zellen bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert und anschließend mittels FACS-Analyse in ihrem Zellzykluszustand untersucht.

Abb.12 stellt zum einen die Daten aus der FACS-Analyse (Abb. 12 (a)-(i)) und zum anderen den prozentualen Anteil der sich in der G1-Phase befindlichen Zellen innerhalb der untersuchten Proben auf einem Diagramm (Abb.12 (j)) dar.

Hierbei traten 45,8% der Kontrollzellen, die durch die Kontaktinhibition arretiert wurden, ohne Behandlung mit Tat-p27^{Kip1} in die G1-Phase. Wurden die Zellen mit 5 nM Tat-p27^{Kip1/WT} behandelt, traten 48,4 % der Zellen in die G1-Phase. Bei 25 nM Konzentration waren es 51,4 % der Zellen, bei 50 nM 49,8 % und bei 150 nM-Behandlung des Wildtyp-Proteins ließen sich 51,8 % der Zellen die G1-Phase bringen.

Ähnliche Verhältnisse wurden auch bei der Behandlung von Tat-p27^{Kip1/KK} beobachtet. Bei der 5 nM-Behandlung befanden sich 50,4 % der behandelten Zellen in der G1-Phase, 48,6 % der Zellen waren bei 25 nM, 41,3 % bei 50 nM und 45,94 % bei der 150 nM-Behandlung in der G1-Phase vorzufinden.

Die mit Tat-p27^{Kip1/WT} behandelten Neuroblastomzellen zeigten keine signifikante Erhöhung des G1-Phaseanteils im Vergleich zu den Zellen, die mit biologisch inaktivem Tat-p27^{Kip1/KK} behandelt wurden. Auch der G1-Phaseanteil der kontaktinhibierten Zellen und der behandelten Zellen unterschied sich nicht signifikant.

Abb. 1 (a) pTAT-Hämagglutinin-Expressionsvektor

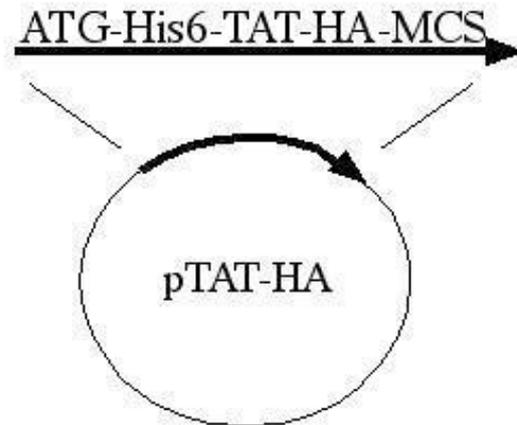


Abb. 1 (b) TAT-Fusionsproteine

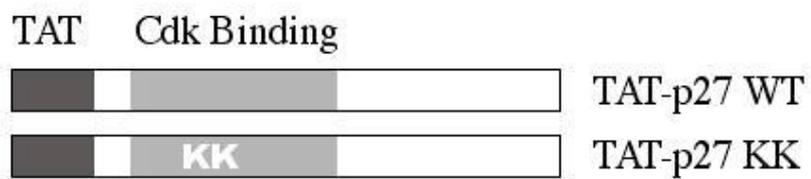
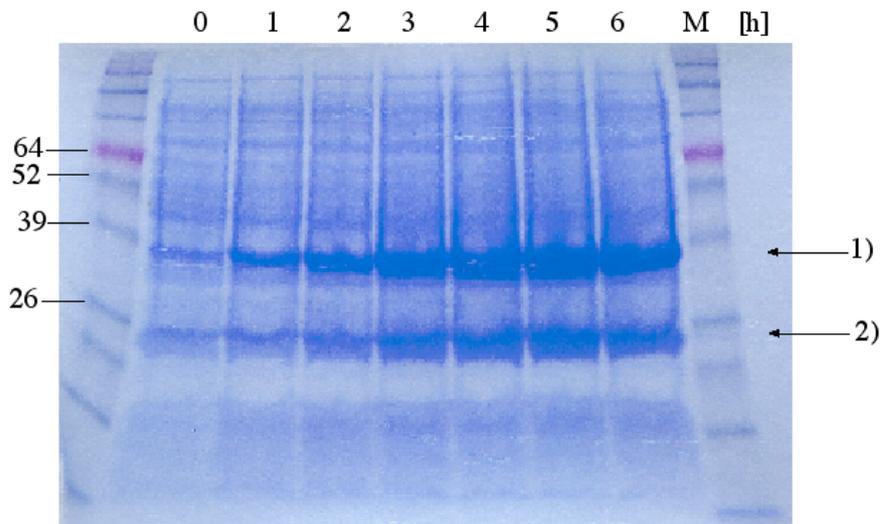


Abb.2 SDS-PAGE/Coomassie-Färbung, IPTG-Induktion

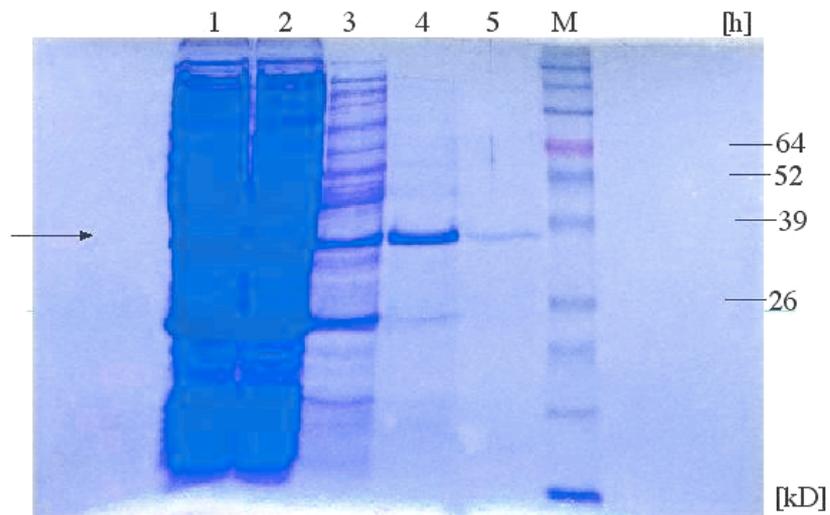


Je 1 ml der Kulturproben wurden zu jeder Stunde der IPTG-Induktion entnommen und in einem 12%igen SDS-Gel bei 150 V aufgetrennt.

← 1) Tat-p27 Fusionsprotein

← 2) Vermutliches Abbauprodukt von Fusionsprotein

Abb.3 SDS-PAGE/Coomassie-Färbung, Ni-NTA Reinigung



1 : Supernatant (Bakterienlysat in 10mM Imidazol)

2 : Wascheluat mit 30mM Imidazol in Puffer Z

3 : Eluat mit 250mM Imidazol in Puffer Z

4 : Eluat mit 500mM Imidazol in Puffer Z

5 : Eluat mit 1M Imidazol in Puffer Z

Abb.4 (a) Absorptionskurve bei Mono-S-Reinigung auf FPLC

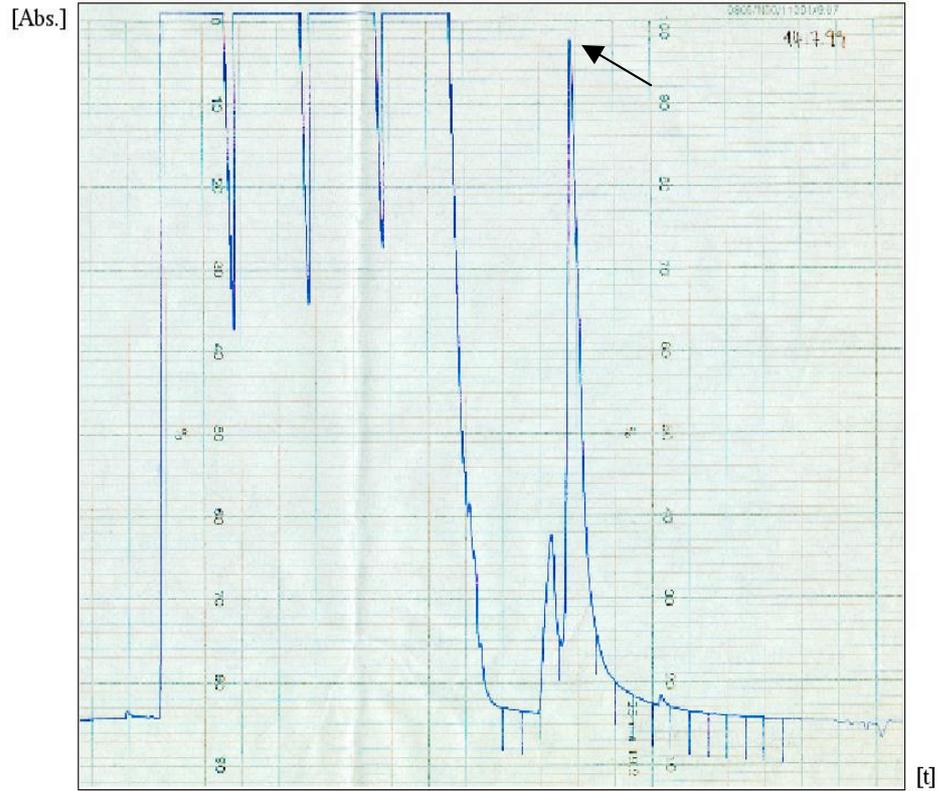
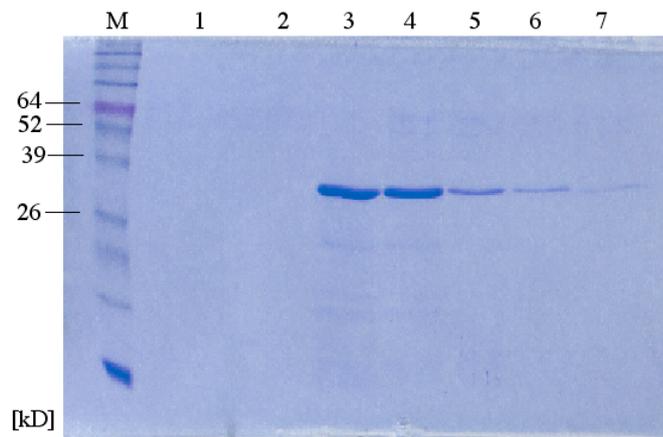
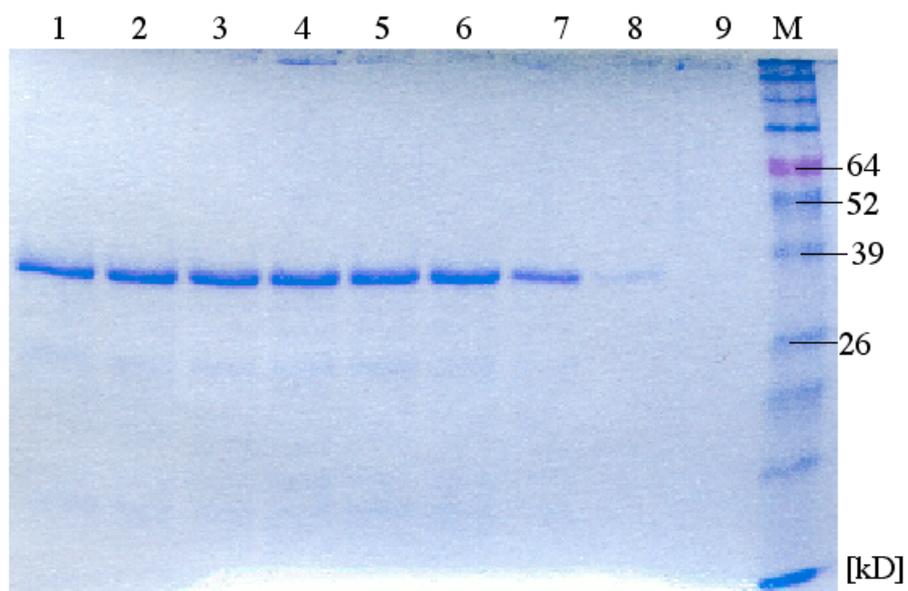


Abb.4 (b) SDS-PAGE/Coomassie-Färbung, Mono-S-Reinigung



Je 10 μ l der zu 1 ml gesammelten Fraktionen wurden mit 15 μ l 3xSDS gemischt und auf 12%igem SDS-Gel bei 150 V aufgetrennt.

Abb.5 SDS-PAGE/Coomassie-Färbung, PD-10-Reinigung



Je 10 μ l der zu 0,5 ml gesammelten Fraktionen wurden mit 15 μ l 3xSDS gemischt und auf 12%igem SDS-Gel bei 150 V aufgetrennt.

Abb. 6 . Indirekte Immunfluoreszenzfärbung Konzentrationsabhängigkeit

Abb. 6 (a) Behandlung mit 50 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein, 2 h.

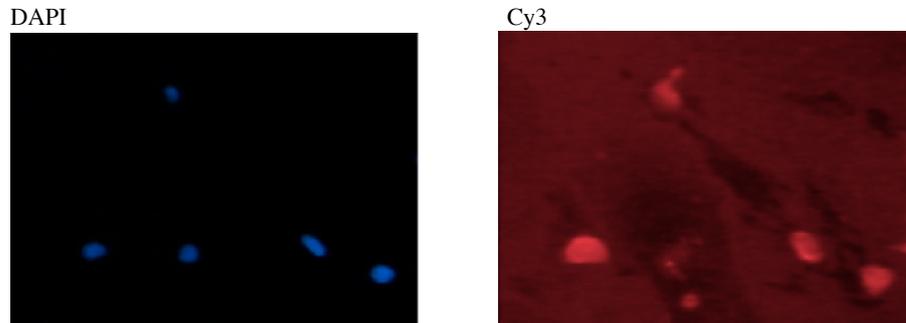


Abb. 6 (b) Behandlung mit 100 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein, 2 h.

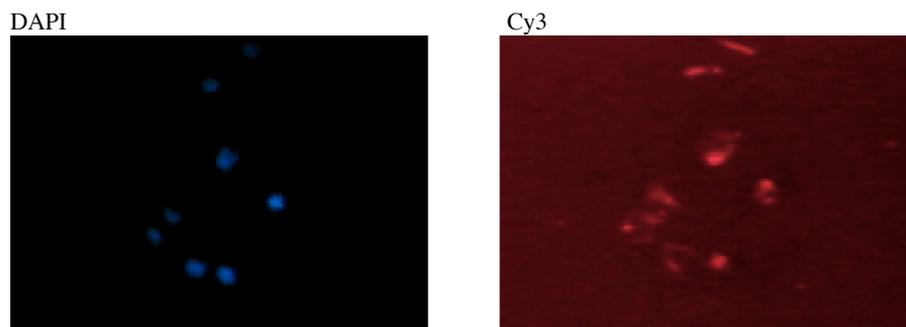
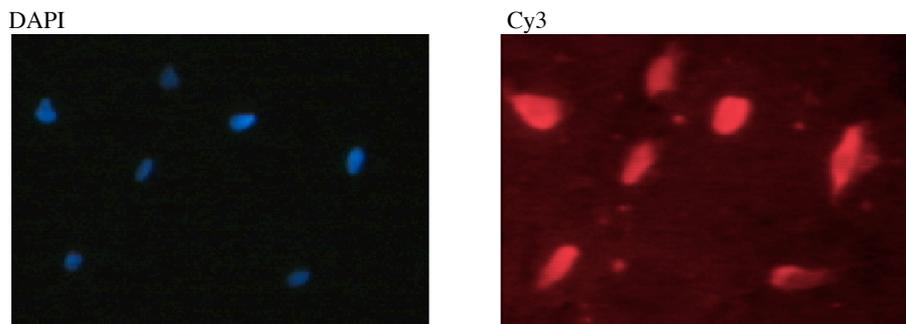


Abb. 6 (c) Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein, 2 h.



1. Antikörper : α -p27^{Kip1}, IgG monoklonal-Maus
2. Antikörper : α -Maus, Chromophor (Cy3)-Konjugat

**Abb. 7. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung
Abhängigkeit von Inkubationsdauer**

Abb. 7 (a) 1-stündige Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein

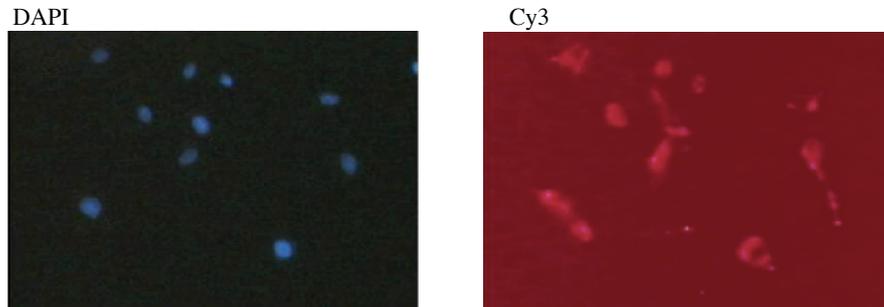


Abb. 7(b) 2-stündige Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein

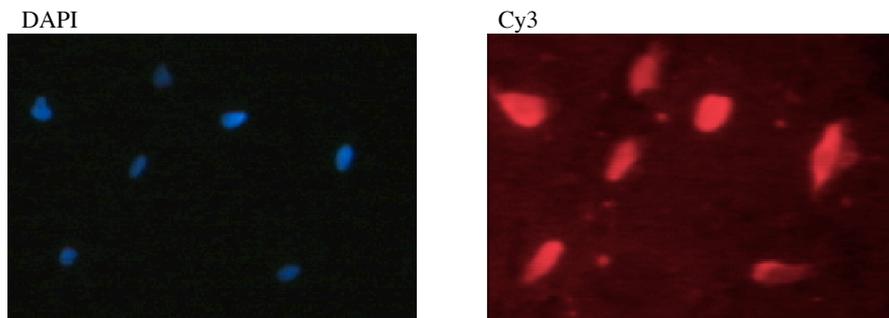
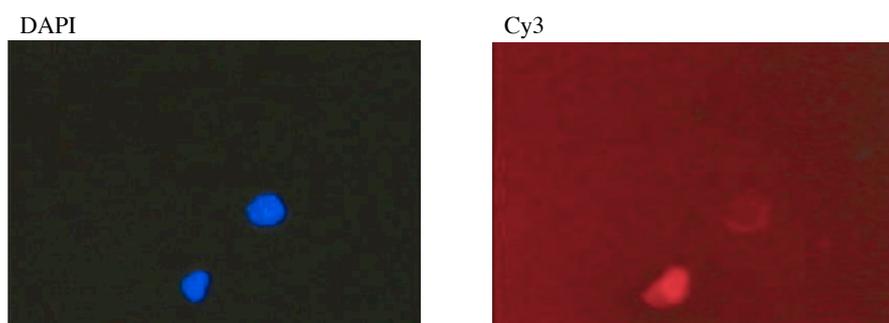
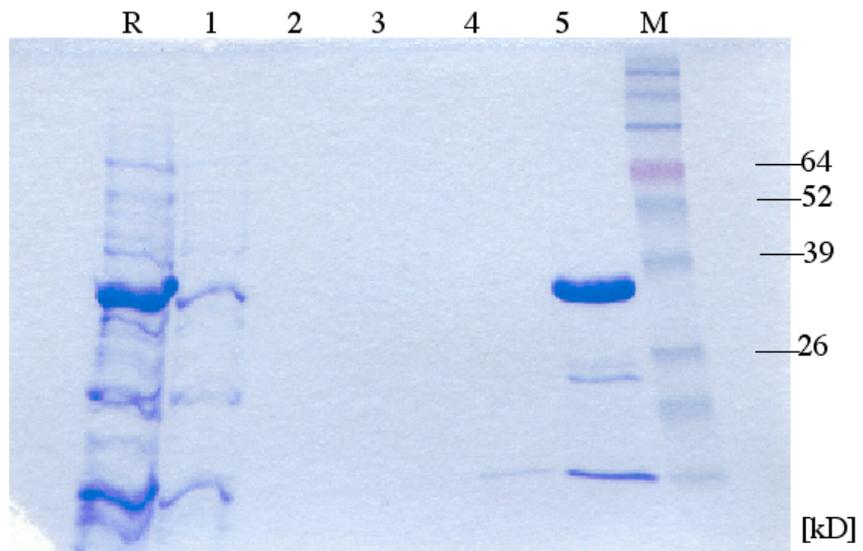


Abb. 7(c) 3- stündige Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein



1. Antikörper : \square -p27Kip1, IgG monoklonal-Maus
2. Antikörper : \square -Maus, Chromophor (Cy3)-Konjugat

Abb.8 SDS-PAGE/Coomassie-Färbung, Markierung von Tat-p27^{WT} mit FluoroLinkTM Cy3TM



R : Reaktionsgemisch aus Tat-p27^{WT} und FluoroLinkTMCy3TM vor der Trennung durch G-50 Säule.

1-5 : Elutionen des Reaktionsgemisches durch G-50 Säule.

**Abb. 9. Direkte Immunfluoreszenzfärbung mit Tat-p27^{Kip1}-Cy3TM
Konzentrationsabhängigkeit**

Abb. 9 (a) Behandlung mit 50 nM Tat-p27^{Kip1}, 1 h

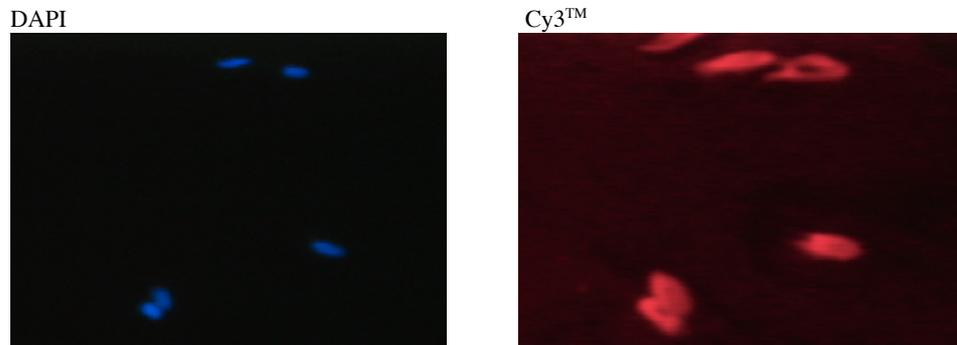


Abb. 9 (b) Behandlung mit 100 nM Tat-p27^{Kip1}, 1 h

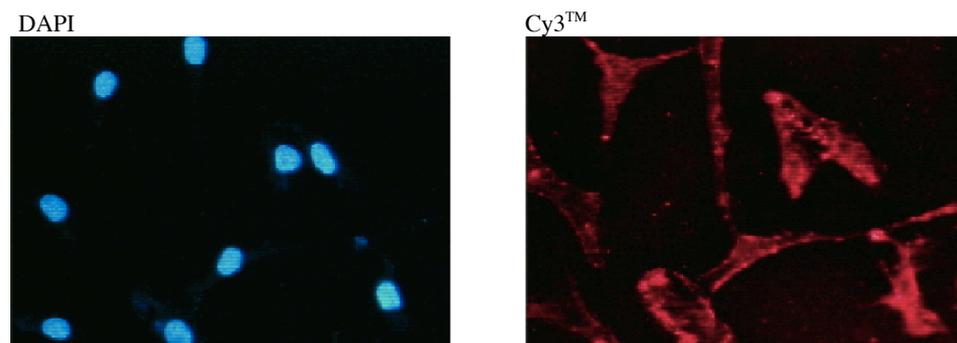
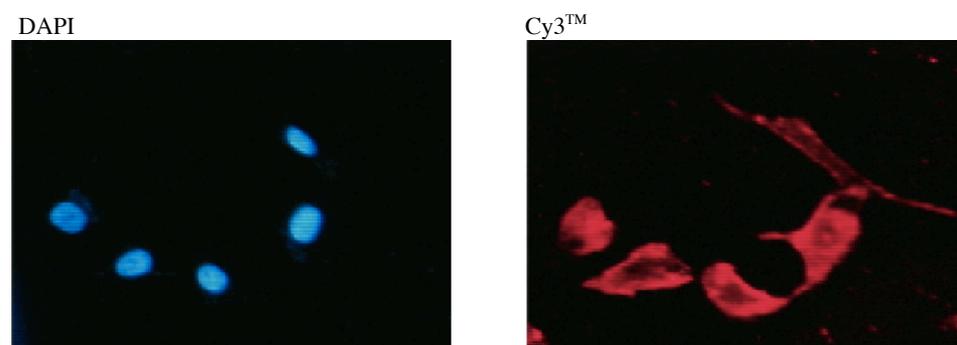


Abb. 9 (c) Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}, 1 h



**Abb. 10 Direkte Immunfluoreszenzfärbung mit Tat-p27^{Kip1}-Cy3TM
Abhängigkeit von Inkubationsdauer**

Abb. 10 (a) Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}, 10 Min..

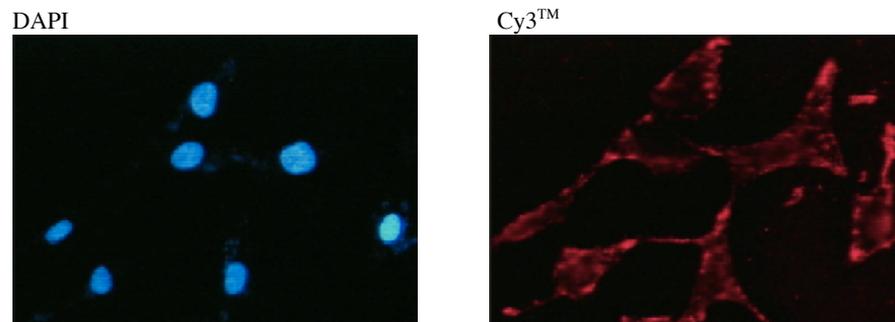


Abb. 10 (b) Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}, 30 Min..

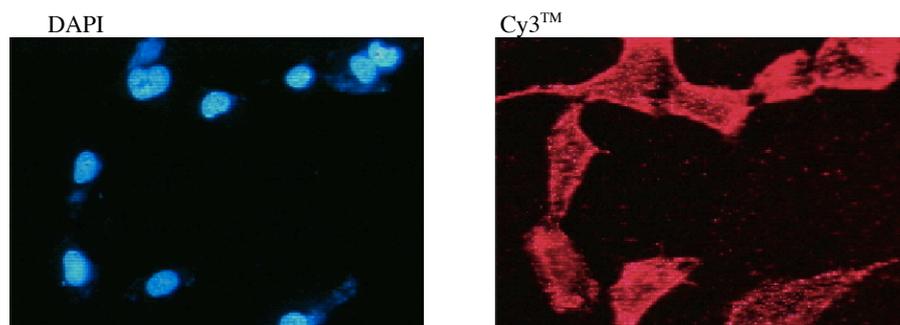


Abb. 10 (c) Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}, 60 Min..

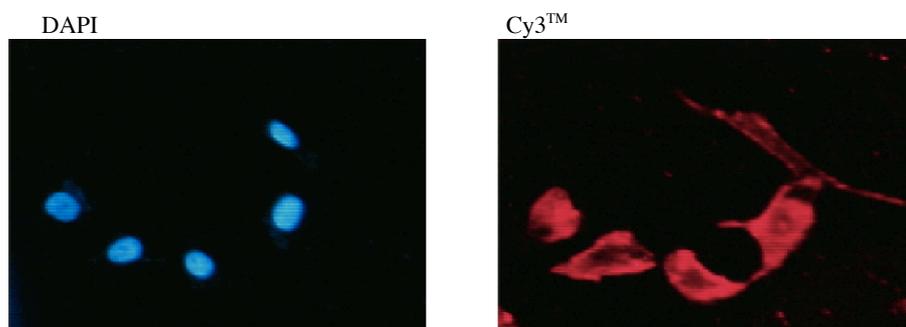
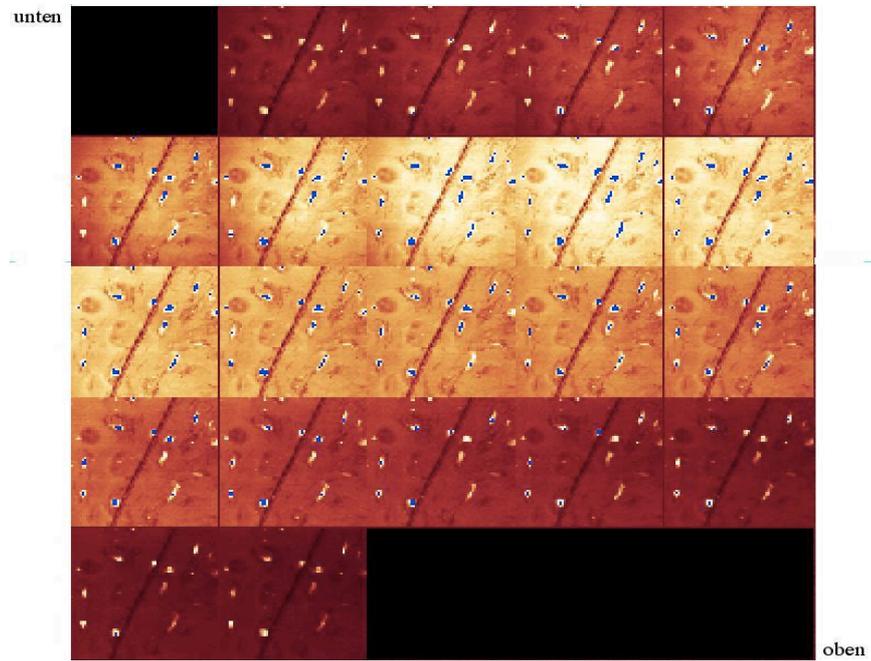
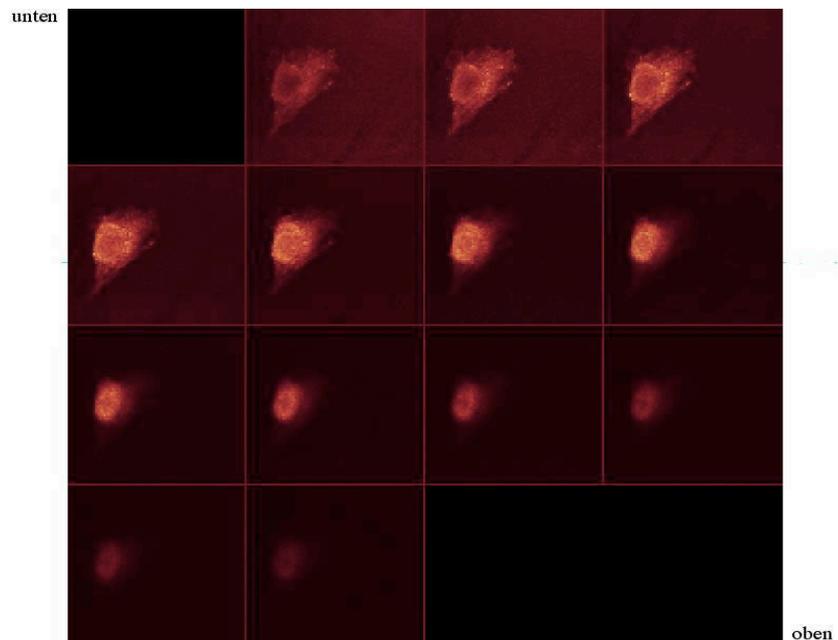


Abb. 11 (a). Konfokalmikroskopie



Indirekte Cy3-Markierung nach 2-stündiger Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein
Zur Verdeutlichung der Lokalisation wurde das Zellkernkompartiment blau dargestellt.
Der Schnitt in der Mitte des Präparates ist ein Artefakt.

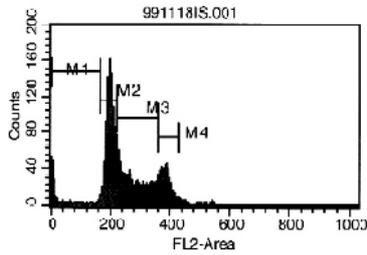
Abb. 11 (b). Konfokalmikroskopie, x 1000 Vergrößerung



Indirekte Cy3-Markierung nach 2-stündiger Behandlung mit 200 nM Tat-p27^{Kip1}-Protein

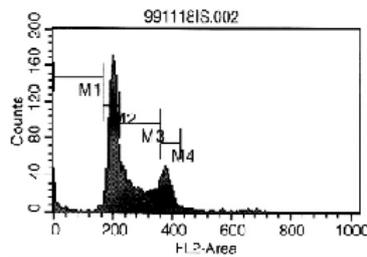
Abb. 12. (a)-(e) FACS-Analyse nach der Behandlung mit Tat-p27^{Kip1}-WT

Abb. 12 (a) Kontrollzellen ohne Tat-p27^{Kip1}-Behandlung



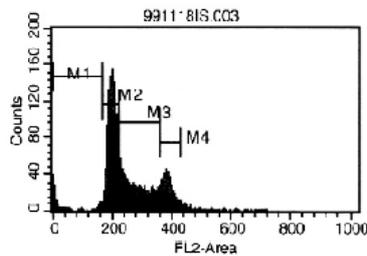
Marker	Left	Right	Events	% Gated	CV
All	0	1023	9356	100.00	37.62
M1	0	164	512	5.47	150.87
M2	164	222	4284	45.79	5.86
M3	222	359	3037	32.46	15.00
M4	359	424	1428	15.26	4.01

Abb. 12 (b) Behandlung mit 5 nM Tat-p27^{Kip1}-WT



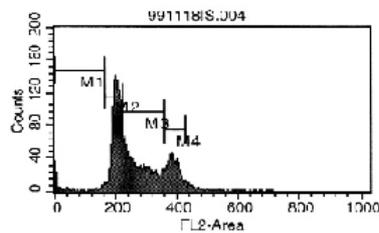
Marker	Left	Right	Events	% Gated	CV
All	0	1023	9306	100.00	33.33
M1	0	164	296	3.17	124.73
M2	164	222	4690	50.40	5.76
M3	222	359	2996	32.19	15.08
M4	359	424	1287	13.83	3.88

Abb. 12 (c) Behandlung mit 25 nM Tat-p27^{Kip1}-WT



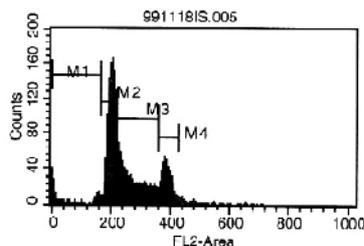
Marker	Left	Right	Events	% Gated	CV
All	0	1023	9263	100.00	33.97
M1	0	164	274	2.96	139.59
M2	164	222	4503	48.61	6.04
M3	222	359	3011	32.51	15.25
M4	359	424	1395	15.06	4.08

Abb. 12 (d) Behandlung mit 50 nM Tat-p27^{Kip1}-WT



Marker	Left	Right	Events	% Gated	CV
All	0	1023	9148	100.00	31.95
M1	0	164	239	2.61	106.20
M2	164	222	3778	41.30	5.60
M3	222	359	3488	38.13	14.76
M4	359	424	1544	16.88	4.08

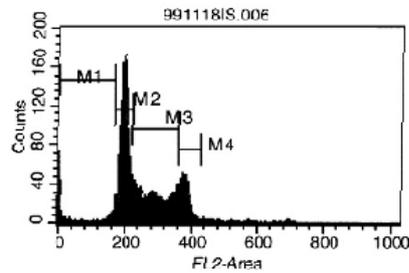
Abb. 12 (e) Behandlung mit 150 nM Tat-p27^{Kip1}-WT



Marker	Left	Right	Events	% Gated	CV
All	0	1023	9195	100.00	33.11
M1	0	164	337	3.67	109.81
M2	164	222	4224	45.94	5.37
M3	222	359	3165	34.42	14.93
M4	359	424	1410	15.33	3.87

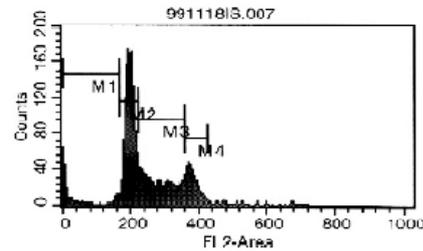
Abb. 12 (f)-(i) FACS-Analyse nach der Behandlung mit Tat-p27^{Kip1}-KK

Abb. 12 (f) Behandlung mit 5 nM Tat-p27^{Kip1}-KK



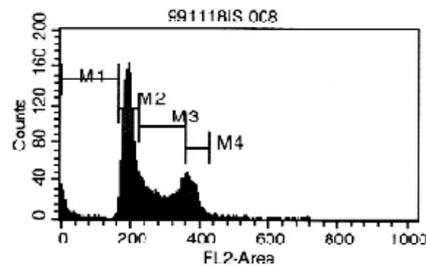
Marker	Left, Right	Events	% Gated	CV
All	0, 1023	9175	100.00	34.89
M1	0, 164	366	3.99	131.68
M2	164, 222	4439	48.38	5.81
M3	222, 359	3081	33.58	14.71
M4	359, 424	1248	13.60	3.40

Abb. 12 (g) Behandlung mit 25 nM Tat-p27^{Kip1}-KK



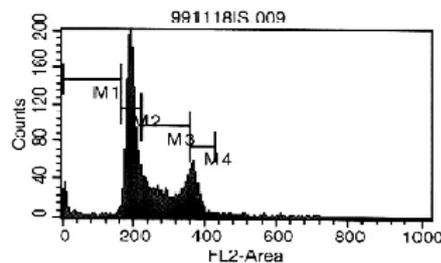
Marker	Left, Right	Events	% Gated	CV
All	0, 1023	9310	100.00	35.72
M1	0, 164	411	4.41	148.05
M2	164, 222	4789	51.44	5.85
M3	222, 359	2869	30.82	15.03
M4	359, 424	1219	13.09	3.65

Abb. 12 (h) Behandlung mit 50 nM Tat-p27^{Kip1}-KK



Marker	Left, Right	Events	% Gated	CV
All	0, 1023	9235	100.00	36.08
M1	0, 164	400	4.33	146.17
M2	164, 222	4595	49.76	6.46
M3	222, 359	3118	33.76	15.23
M4	359, 424	1109	12.01	3.71

Abb. 12 (i) Behandlung mit 150 nM Tat-p27^{Kip1}-KK



Marker	Left, Right	Events	% Gated	CV
All	0, 1023	9057	100.00	34.98
M1	0, 164	413	4.56	134.66
M2	164, 222	4691	51.79	5.77
M3	222, 359	3041	33.58	15.26
M4	359, 424	925	10.21	3.42

Abb. 12 (j) Zusammenfassende Kurve, FACS-Analyse

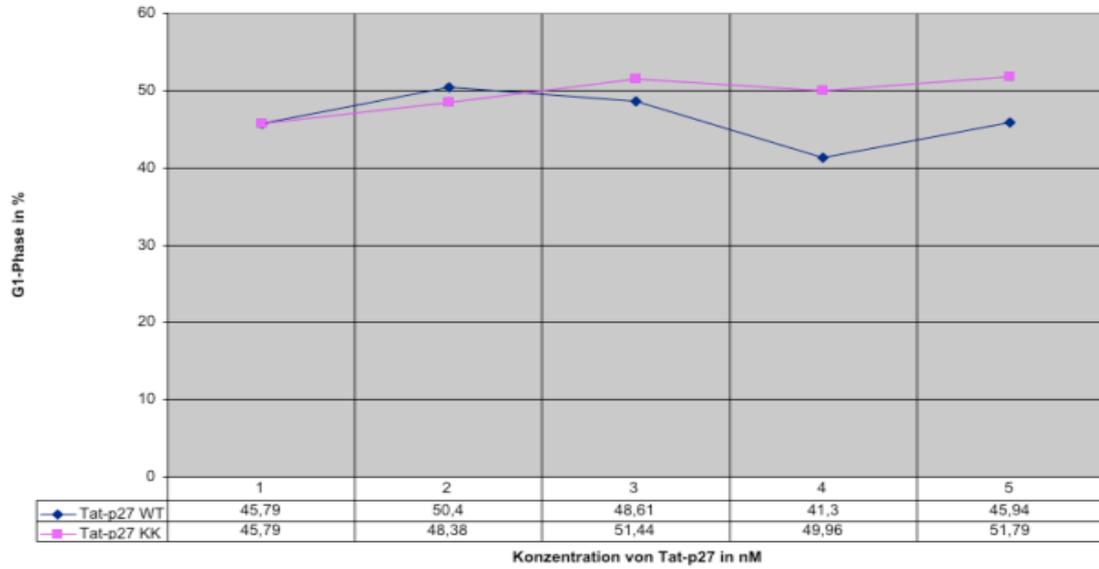


Abb. 12 (j). Prozentualer Anteil der sich in der G1-Phase befindlichen SH-SY5Y-Zellen.

- Probe 1 : Unbehandelte Kontrollzellen.
- Probe 2 : Behandlung mit 5 nM Tat-p27^{Kip1}-WT bzw. -KK.
- Probe 3 : Behandlung mit 25 nM Tat-p27^{Kip1}-WT bzw. -KK.
- Probe 4 : Behandlung mit 50 nM Tat-p27^{Kip1}-WT bzw. -KK.
- Probe 5 : Behandlung mit 150 nM Tat-p27^{Kip1}-WT bzw. -KK.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde Tat-p27^{Kip1} in die Neuroblastomzelllinie SHSY5Y transduziert und dies mit Hilfe von indirekter und direkter Immunfluoreszenzmikroskopie und von Konfokalmikroskopie nachgewiesen. Anschließend wurde die daraus resultierende zelluläre Antwort mittels FACS analysiert.

Im ersten Schritt erfolgte die molekularbiologische und biochemische Präparation des Tat-Fusionsproteins aus BL 21-Bakterien. Danach wurden Neuroblastomzellen mit dem isolierten Tat-p27^{Kip1} bzw. Cy3-markierten Tat-p27^{Kip1} behandelt. Die mit Tat-p27^{Kip1} behandelten Zellen wurden mit Hilfe von α -p27^{Kip1}-Maus-Antikörper und α -Maus-Cy3-Antikörper immunfluoreszent markiert. Dann erfolgte das Mikroskopieren der Präparate.

Obwohl immunfluoreszenzmikroskopisch die transduzierten Fusionsproteine intrazellulär erkennbar waren, konnte der vermutete Zellzyklusarrest als Konsequenz der erfolgten Transduktion von Tat-p27^{Kip1} durch die FACS-Analyse nicht festgestellt werden.

5.1. p27^{Kip1} und das Neuroblastom

Nach dem pathogenetischen Verständnis der Neuroblastomerkrankungen sind einige molekularbiologische Marker als Prognosefaktoren bekannt (siehe Einleitung). So ist auch das p27^{Kip1}-Protein, ein von anderen Prognosefaktoren, v.a. von N-myc, unabhängiger Prognosefaktor bei Neuroblastomen (Bergmann et al., 2001). Dies ist insofern überraschend, als eine der Myc-Wirkungen in der Inhibition des p27^{Kip1}-vermittelten Zellzyklusarrests liegt (Müller et al., 1997). Die Vorstellung über die Interaktion von Myc und p27^{Kip1} geht davon aus, dass Myc mit Hilfe der Cycline D1 und D3 die Sequestration von p27^{Kip1} aus dem Komplex mit Cyclin E / CDK 2 bewirkt (Bouchard et al., 1999; Munoz et al., 2003). Die Folge ist ein Überwiegen des proliferativen Myc-Einflusses. Dabei wird die Zellzyklus-arretierende Eigenschaft von p27^{Kip1} inhibiert.

Es gibt Neuroblastomproben, in denen zwar ein hoher Anteil an p27^{Kip1}-Protein gefunden wird, das Protein jedoch durch die Cyclin D1-Aktivierung sequestriert von dem Cyclin E / CDK 2-Komplex vorliegt. Da diese Tumorproben trotz vorliegender p27^{Kip1}-Sequestration mit einer günstigen Prognose einhergehen, lässt sich vermuten, dass die prognostische Aussagekraft von p27^{Kip1} nicht allein über die Interaktion mit Cyclin E / CDK 2, sondern über andere Wirkmechanismen erklärt werden muss (Bergmann et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit ließen sich die Neuroblastomzellen nicht in der G1-Phase arretieren, obwohl eine weit über die physiologisch vorkommende Menge an p27^{Kip1}-Protein in den Zellen transduziert wurde. Dies unterstützt die durch Untersuchungen an primären Tumorproben gewonnene Erkenntnis, dass die prognosebestimmende Wirkung von p27^{Kip1} nicht oder nicht suffizient über die Induktion des Zellzyklusarrests gegeben ist.

Eine andere Wirkung von p27^{Kip1} könnte durch die Induktion der Apoptose erklärt werden. Es gibt Publikationen, in denen berichtet wird, dass eine über die viralen Vektoren eingeleitete p27^{Kip1}-Expression eine Apoptose der Tumorzellen bewirkte (Katayose et al., 1997; Schreiber et al., 1999). Die Untersuchungen an primären Neuroblastomproben zeigen jedoch keine Korrelation zwischen der p27^{Kip1}-Expression und der Apoptoserate (persönliche Mitteilung, cand. med. C. Hüskén). Eine durch das p27^{Kip1} eingeleitete Apoptose setzt intaktes pRb voraus. So sind Zellen mit defizientem pRb nicht in der Lage, eine effektive Apoptose durchzuführen (Schreiber et al., 1999). Das Apoptoseverhalten der mit Tat-p27^{Kip1} behandelten Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. In einem erweiterten Rahmen könnten daher Untersuchungen des Apoptoseverhaltens sowie der pRB-E2F-Kaskade der mit Tat-p27^{Kip1} behandelten Neuroblastomzellen unternommen werden.

Eine weitere Wirkung von p27^{Kip1} bei Neuroblastomen ist die Beteiligung an der neuronalen Differenzierung. So wurden Neuroblastomzelllinien mit BMP2 (= ***B**one **M**orphogenetic **P**rotein*) behandelt, das als ein Mitglied der TGF (=

transforming Tumor Growth Factor)- β Superfamilie in der Lage ist, eine neuronale Differenzierung einzuleiten. Die so behandelten Zellen zeigten ein deutliches Neuritenwachstum im Sinne einer neuronalen Differenzierung der Zellen und gleichzeitig eine Überexpression von p27^{Kip1} (Nakamura et al., 2003). Ebenso induziert die Behandlung mit cAMP, die eine neuronale Differenzierung der behandelten Neuroblastomzellen einleitet, die Überexpression von p27^{Kip1} (Munoz et al., 2003).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine schwache Zellausläuferbildung beobachtet, wenn die SHSY5Y-Zellen für die FACS-Analyse mit Tat-p27^{Kip1}-Protein über 24 Stunden inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Daher kann die Induktion einer neuronalen Differenzierung durch die Behandlung mit Tat-p27^{Kip1} ein mögliches Beobachtungsziel in zukünftigen Forschungsprojekten sein.

5.2. Immunfluoreszenzmikroskopie und der Nachweis der Transduktion

Nahagara und seine Mitarbeiter berichten, dass annähernd 100% der mit Tat-Fusionsproteinen behandelten Osteoklasten und peripheren Blutmonozyten nach weniger als 15 Minuten Inkubationsdauer und in einer Tat-Fusionsproteinkonzentration von 25 – 200 nM eine durch die direkte Immunfluoreszenzmikroskopie homogen darstellbare Transduktion aufweisen (Nahagara et al., 1998; Schwarz et al., 2000).

Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden. Die SHSY5Y-Zellen, die mit Cy3-markiertem Tat-p27^{Kip1}-Proteinen behandelt wurden, zeigten eine mikroskopisch sichtbare Fluoreszenz ab einer Mindestinkubationszeit von 30 Minuten mit einer Proteinkonzentration von 100 – 200 nM.

Bei kürzerer Behandlungsdauer und niedrigeren Proteinkonzentrationen waren zunächst nur zellrandständige Fluoreszenzen zu beobachten, die sich mit steigender Inkubationsdauer und Proteinkonzentration über die gesamte Zelle nachweisen ließen.

Dies unterstützt die kürzlich publizierten Ergebnisse, die unterschiedliche experimentelle Konditionen bei verschiedenen Zelltypen zeigen (Ferrari et al., 2003; Ziegler et al., 2003). So zum Beispiel konnten Ferrari und seine Mitarbeiter bei HL3T1 (HeLa-Abkömmling) und CHO (*Chinese Hamster Ovary*)- Zellen eine erfolgreiche Transduktion mit Tat-GFP (*Green Fluoreszenz Protein*) bei erheblich unterschiedlicher Inkubationszeit und Proteinkonzentration zeigen (Ferrari et al., 2003).

Es ist anzunehmen, dass eine direkte Übertragung der experimentellen Konditionen bei Transduktionen von unterschiedlichen Tat-Fusionskonstrukten nicht sinnvoll ist.

Des Weiteren könnten die in der vorliegenden Arbeit beobachteten morphologischen Erscheinungen Hinweise auf einen möglichen Transduktionsmechanismus der Tat-Fusionsproteine geben. Dieser ist bislang trotz intensiver Bemühungen noch nicht vollständig verstanden.

Eine Endosomen/Lysosomen-vermittelte Transduktion von HIV-1 Tat wurde von Arbeitsgruppen vermutet, die eine mehrfache Steigerung der Tat-induzierten Transduktionsraten durch Chloroquinzusatz -einer lysosomotropen Substanz- und Heparansulfatproteoglycan erzielen konnten (Frankel et al., 1988; Green et al., 1988; Hakansson et al., 2003).

Einen morphologischen Hinweis auf einen Endosomen/Lysosomen-vermittelte Transduktionsmechanismus liefern mikroskopische Aufnahmen von Zellen, die mit fluoreszent markierten Tat-Fusionsproteinen behandelt wurden. In diesen Aufnahmen konnten punktförmige Verteilungen des Fluoreszenzfarbstoffes in den behandelten Zellen gesehen werden, wie sie normalerweise bei einem Transportvorgang mit Hilfe von Endosomen beobachtet werden können (Fawell et al., 1994; Ferrari et al., 2003). Auch die vorliegenden Beobachtungen der mit Tat-p27^{Kip1} behandelten Zellen unterstützen diese Theorie.

Die Immunfluoreszenzfärbung hat den methodischen Nachteil, dass es durch die unspezifischen Proteinanlagerungen an Zellmembranen und an sonstigen auf den Präparaten befindlichen Partikeln zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann.

Um dieses Problem zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine direkte Immunfluoreszenzfärbung angewandt. Anschließend wurden die Präparate konfokalmikroskopiert. Im Prinzip sind auch bei dieser Methode falsch positive Ergebnisse möglich, da eine intensive Fluoreszenz über die markierten Areale hinaus sichtbar werden kann, die in der mikroskopischen Auswertung als positiv eingestuft wird.

Einen sicheren Beweis für eine erfolgreiche Transduktion von Tat-p27^{Kip1} würde eine biologische Antwort liefern. In der vorliegenden Arbeit konnte ein biologischer Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher sind die erhobenen Ergebnisse zunächst unter dem Vorbehalt zu interpretieren, dass der Nachweis einer erfolgreichen Transduktion mittels Immunfluoreszenzfärbung möglicherweise falsch positive Ergebnisse einschließen kann.

5.3. Biologische Wirkungen der p27^{Kip1}-Transduktion in Neuroblastomzellen

Die Transduktion von Tat-p27^{Kip1} in die Zellen wurde durch die Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Eine nachfolgende biologische Antwort im Sinne eines Zellzyklusarrests konnte jedoch durch die FACS – Analyse nicht gezeigt werden. Es lassen sich hierfür zwei mögliche Ursachen in Erwägung ziehen:

1. In einer Hypothese zur Tat-vermittelten Transduktion wird vermutet, dass ein hoch energetischer, denaturierter Zustand der zu transduzierenden Proteine eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Transduktion darstellt (Nagahara et al., 1998). Die sich im denaturierten Zustand befindenden Proteine sollten nach der Transduktion in den Zellen durch Chaperone wieder korrekt gefaltet werden, so dass sie ihre biologische Aktivität entfalten können (Schneider et al., 1996; Nagahara et al., 1998). Die Faltung einer neusynthetisierten Polypeptidkette zu einer definierten Raumstruktur ist die Voraussetzung für die Übernahme spezifischer Funktionen innerhalb der Zelle. Chaperone, die aus einer Reihe von Enzymen und Proteinen bestehen,

übernehmen diese spezifische Aufgabe. Zudem ist dieser Schritt ein energieabhängiger Prozess (Ferrari et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden denaturierte Proteine in ihrer tertiären Struktur in die Zellen transduziert. Diese Proteine enthielten außerdem eine zusätzliche, nicht physiologische Struktur, nämlich die Tat-Sequenz. Es wäre vorstellbar, dass die so transduzierten Proteine von den Chaperonen nicht erkannt wurden und / oder die dafür erforderliche Energie von den Zellen nicht aufgebracht wurde, so dass die Proteine ihre biologischen Funktionen nicht wahrnehmen können.

2. Die auf Zellkulturen basierenden Beobachtungen zeigen einen engen Zusammenhang der mitogenen Funktion von c-Myc und der Regulierung von p27^{KIP1} (Shaeff et al., 1997; Mueller et al. 1997). Durch die Aktivierung von Myc werden Cyclin D2 und Cu1-1 hochreguliert, wodurch die Sequestration von p27^{KIP1} aus dem Komplex mit Cyclin E / CDK 2 und folglich die Degradation von p27^{KIP1} eingeleitet wird (Bouchard et al., 1999; O'Hagen et al., 2000; Perez-Roger et al., 1999).

Die oben geschilderte Kaskade zwischen Myc und p27^{KIP1} konnte jedoch in Arbeiten mit primären Neuroblastomen nicht verifiziert werden. Es wird vermutet, dass die prädiktive Funktion von p27^{KIP1} bei Neuroblastomen nicht nur über seine Beteiligung am Zellzyklus erklärt werden kann (Bergmann et al., 2001). Die Transduktion von Tat-p27^{KIP1}-Fusionsproteinen in die Neuroblastomzelllinie SHSY5Y, die von einer Patientin im Stadium 4 abgeleitet sind, zeigte keine signifikante zelluläre Antwort im Sinne eines Zellzyklusarrestes. Dies könnte, analog zu den Ergebnissen mit den primären Neuroblastomen, bedeuten, dass die biologische Wirkung von p27^{KIP1} nicht über die Einleitung des Zellzyklusarrestes die Prognose von Neuroblastomen beeinflusst.

Mögliche Aspekte, nämlich die Apoptose und die neuronale Differenzierung als weitere Funktionen von p27^{KIP1}, sind bereits in Kapitel 5.1. diskutiert worden.

5.4. Tat-Fusionsproteine und ihre Bedeutung in der Medizin

Die Fähigkeit des HIV-1-Tat, Zellmembranen zu überwinden, ist seit längerem bekannt (Frankel et al., 1988; Green et al., 1988; Fawell et al., 1994; Vivès et al., 1997). Auch die an HIV-1 Tat gekoppelten Proteine lassen sich unabhängig von der Größe in alle untersuchten Zelltypen transduzieren (Fawell et al., 1994; Nahagara et al., 1998; Schwarze et al., 2000). Im Gegensatz zu Antp oder VP22, von denen ebenfalls bekannt ist, dass sie eine transduzierende Wirkung besitzen, kann Tat anscheinend Fusionsproteine jeglicher Größe und auch das Genmaterial DNA transduzieren (Dowdy et al., 2000). Die vorstellbaren medizinischen Anwendungen von solchen Tat-Fusionsproteinen sind daher sehr vielfältig. So wäre beispielsweise denkbar, dass eine Gentherapie oder eine Substitutionstherapie bestimmter Krebserkrankungen mit Hilfe von Tat-Konstrukten möglich ist. Jedoch ist zurzeit Vieles über das molekularbiologische und biochemische Verhalten von HIV-1 Tat und seiner Fusionskonstrukte unerforscht, so dass bezüglich der medizinischen Anwendung zunächst Zurückhaltung geboten ist.

Eine der wichtigen Fragen stellt der Transduktionsmechanismus von Tat-Konstrukten dar. In Kapitel 5.2. wurde bereits die Hypothese der Endosomen/Lysosomen-vermittelten Transduktion erwähnt. Eine weitere Hypothese geht von einem hochenergetischen Zustand (hohes ΔG) der Tat-Fusionsproteine aus, die ein kurzfristiges, reversibles Öffnen der Lipiddoppelmembran der Zellwände zur Folge haben soll (Nahagara et al., 1998). Da bislang keine Klarheit über den Wirkmechanismus besteht, sind auch Begleitumstände, die möglicherweise Kontraindikationen einer medizinischen Anwendung sein könnten, nicht auszuschließen. Offen bleibt auch die Frage, wie ein gezielter Angriff der Tat-Konstrukte auf Tumorzellen in einem Organismus gewährleistet werden kann. Dabei wäre zum Beispiel auch die Halbwertszeit der transduzierten Proteine zu bestimmen, um so die für eine suffiziente biologische Antwort erforderliche Konzentration derselben festzustellen.

6. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen im Kindesalter. Parameter wie 1p-Deletion, DNA-Euploidie, N-Myc-Amplifikation und Expressionsrate von p27^{Kip1}-Protein sind u.a. als prognostisch relevante Faktoren bei Neuroblastomerkrankungen bekannt.

Das p27^{Kip1} ist ein bekannter Tumorsuppressor, dessen zellzyklusarretierende Wirkung durch Myc-Aktivierung über die Expression von D-Typ-Cyclinen inhibiert werden kann. In Neuroblastomen korreliert die Expressionsrate von p27^{Kip1} mit einer günstigen Prognose der Erkrankung.

Die Tat-Sequenz ist ein Teil des bekannten HIV-Tat-Proteins. An dem N-Terminus der Tat-Sequenz lassen sich sowohl DNA, RNA als auch Proteine molekulargenetisch fusionieren, die so in der Lage sind, Zellmembranen im Sinne einer Transduktion zu überwinden. In Anlehnung daran wurde von S. Dowdy und seiner Arbeitsgruppe das Tat-p27^{Kip1}-Gen in einem kompetenten Bakterium, BL21, kloniert. Die so klonierten Bakterien wurden für die vorliegende Arbeit von S. Dowdy freundlicherweise zur Verfügung gestellt .

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht :

1. Das rekombinante Tat-p27^{Kip1}-Fusionsprotein aus klonierten Bakterien in einer transduzierbaren Form zu isolieren.
2. Das so isolierte Fusionsprotein in die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zu transduzieren.
- 3 . Die Transduktion mit verschiedenen Methoden der Immunfluoreszenzfärbung und –mikroskopie nachzuweisen.
4. Nach erfolgter Transduktion die erwartete zelluläre Antwort im Sinne eines Zellzyklusarrestes mittels FACS-Analyse zu überprüfen.

Die Isolierung des Fusionsproteins in einer transduzierbaren Form erfolgte durch mehrere spezielle Entsalzungs- und Denaturierungsverfahren.

Im Anschluß daran wurde das Fusionsprotein in einem hohen Reinheitsgrad gewonnen. Das so isolierte Tat-p27^{Kip1}-Fusionsprotein ließ sich Inkubationsdauer- und Proteinkonzentrationsabhängig in SH-SY5Y-Zellen transduzieren. Hierbei betrug die optimale Konzentration des Fusionsproteins zwischen 200 und 250 nM bei einer Inkubationszeit von 0,5 - 2 Stunden. Der Nachweis einer Transduktion konnte durch das Konfokalmikroskopieren der Zellen, die direkt mit Cy3-markierten Tat-p27^{Kip1}-Fusionsproteinen behandelt wurden, erbracht werden.

In der anschließenden FACS-Analyse der mit Tat-p27^{Kip1}-Fusionsprotein behandelten Zellen konnte kein Zellzyklusarrest im Sinne eines G1-Arrestes beobachtet werden. Kürzlich wurde in der Arbeit von Bergmann et al., 2001, gezeigt, dass der bislang vermutete Zusammenhang zwischen N-Myc und p27^{Kip1} über die Expressionsregulation von D-Typ-Cyclinen bei primären Neuroblastomproben nicht besteht. Die Hypothese, dass p27^{Kip1} seine antiproliferative Wirkung, die im Gegensatz zu bisherigen Annahmen, nicht über den Zellzyklus, sondern über einen anderen Mechanismus, beispielsweise über die Beeinflussung der Apoptose- und/oder die neuronale Differenzierungskaskade entfaltet, wäre denkbar. Dass in der vorliegenden Arbeit kein Zellzyklusarrest durch die Behandlung mit Tat-p27^{Kip1}-Fusionsprotein erreicht wurde, könnte eine derartige Hypothese unterstützen.

Die Transduktionsmethode mit Tat-Fusionsproteinen konnte von einigen Gruppen weltweit reproduziert werden. Dennoch fehlt bis dato das genaue Verständnis über die biologische Grundlage der Tat-vermittelten Transduktion. Das Verfahren zur Gewinnung von Fusionsproteinen erfordert sensible chromatographische Schritte (z. B. FPLC), die potentiell Veränderungen der Proteinstruktur zur Folge haben können, wobei das Denaturieren von Fusionsproteinen als ein entscheidender Schritt für eine erfolgreiche Transduktion von S. Dowdy und seiner Arbeitsgruppe angenommen wird. Folglich wäre ebenfalls denkbar, dass die Fusionsproteine zwar in der Lage sind, Zellmembranen zu überwinden, eine biologische Antwort jedoch aufgrund der veränderten Proteinstruktur und der damit verbundenen Inaktivität des Proteins nicht erfolgen kann.

7. Literaturverzeichnis

Ambros I.M., Zellner A., Roald B. (1996). Role of ploidy, chromosome 1p and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med* 334, 1505-1511.

Anderson (1998). Human gene therapy. *Nature Supp* 392, A25-30.

Bartholdi M., Meyne J., Albright K., Luedemann M., Campbell E., Chritton D., Deaven LL., Cram L. S. (1987). Chromosome sorting by flow cytometry. *Methods Enzymol* 151; 252-67.

Becker-Hapak, M., McAllister, SS. und Dowdy, SF. (2001). TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 24(3): 247-256.

Beckwith J. and Perrin E., (1963). In situ neuroblastoma: a contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol* 43, 1089-1104.

Bergmann, E., Wanzel, M., Weber, A., Shin, I., Christiansen, H. and Eilers, M. (2001). Expression of p27^{Kip1} is prognostic and independent of MYCN amplification in human neuroblastoma. *Int J Cancer* 20; 95(3): 176-83.

Bernwanger B., Hartmann O., Bergmann E., Bernard S., Nielsen D., Krause M., Kartal A., Flynn D., Wiedemeyer R., Schwab M., Schäfer H., Christiansen H. and Eilers M. (2002). Loss of FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell*. Nov. 2002 Vol 2, 377-386.

Berthold, F., Burdach, S., Kremens, B., Lampert, F., Niethammer, D., Riehm, H., Ritter, J., Treuner, J., Utsch, S., and Zieschang, J. (1990). The role of chemotherapy in the treatment of children with neuroblastoma stage IV: the GPO (German Pediatric Oncology Society) experience, *Klin Padiatr* 202, 262-9.

Berthold F. and Hero B. (1998). Sind Spontanregressionen beim Neuroblastom verspätete embryonale Involutionen? In Heim ME, Schwarz R. editors. Spontanremissionen bei Krebserkrankungen. Stuttgart: Schattauer Verlag, 84-94.

Berthold F. and Hero B. (2000). Current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drug* 59(6), 1261-1277.

Berthold F., Kassenböhrer R., Zischang J. (1994). Multivariate evaluation of prognostic factors in localized neuroblastoma. *Pediatr Heratol Oncol* 16, 107-115.

Berthold F., Sahin K. and Christiansen H. (1997). The current contribution of molecular factors in risk estimation in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer* 33, 2092-7.

Berthold, F., Treuner, J., Brandeis, W.E., Evers, G., Haas, R.J., Harms, D., Jurgens, H., Kaatsch, P., Michaelis, J., Niethammer, D., Prindull, G., Riehm, H., Winkler, K. and Lampert, F.(1982). [Neuroblastoma study NBL 79 of the German Society for Pediatric Oncology. Report after 2 years]. *Kli Pediatr* 194, 262-9.

Bessho, F., Hashizume, K., Nakajo, T. and Kamoshita, S.(1991). Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. *J Pediatr* 119, 237-41.

Borriello A., Pietra VD., Criscuolo M., Oliva A., Tonini GP., Iolascon A. (1998). p27KIP1 accumulation is associated with retinoic - induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasom-dependent degradation. *Oncogene* 19, 51-60.

Bosari, S., Viale, G., Roncalli, M., Graziani, D., Borsani, G., Lee, A.K. and Coggi,G. (1995). P53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 147, 790-798.

Bouchard C., Thiele K., Maier A., Saffrich R., Hanley-Hyde J., Ansorge W., Eilers M. (1999). Direct induction of D2 by Myc contributes to cell cycle induction and sequestration of p27. *EMBO J* 18, 5321-33.

Brodeur, G.M. (1995). Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur J Cancer* 31A, 505-10.

Brodeur, G.M., Prichard J., Berthold F. (1993). Revision of the international criteria of neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol* 11, 1466-77.

Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. and Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224, 1121-1124.

Carlsen N., Ørnvold K., Christensen I.J. (1992). Prognostic importance of DNA flow cytometrical, histopathological and immunohistological parameters in neuroblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 420,411-8.

Caron H., van Sluis P. and de Kraker J. (1996). Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334, 225-30.

Christiansen H., Lampert F. (1988). Tumors karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer* 57, 121-6.

Combaret V., Gross N. and Lasset C. (1997). Clinical relevance of CD 44 cell surface expression and MYCN gene amplification in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33, 2101-5.

Craig, C., Wersto, R., Kim, M., Ohri, E., Li, Z., Katayose, D., Lee, S.J., Trepel, J., Cowan, K, and Seth, P. (1997). A recombinant adenovirus expressing p27KIP1

induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene 14(19)*, 2283-9.

Crook, T., Marston, N.J., Sara, E.A. and Vousden, K.H. (1994). Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation. *Cell*, 79, 817-827.

Dilic, V., Lees, E. and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a Periodic G1-phase protein kinase. *Science* 257, 1958-1961.

Elliot G., O'Hare P (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpes virus structural protein. *Cell* 88, 223-233.

Espito, V. et al. (1997). Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer research* 57. 3381-3385.

Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-96.

Fang, F., Newport, J.W. (1991). Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* 66, 731-742.

Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Ling, L.C., Pepinsky, B. and Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 664-668.

Ferrari, A., Pellegrini V., Arcangeli C., Fittipaldi A., Giacca M. and Beltram F. (2003). Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 Tat fusion proteins visualized in real time. *Molecular Therapy* 8, Vol.2 284-294.

Fero, M.L., Randel, E., Gurly, K.E., Roberts, J.M. and Kemp, C.J. (1998). The murine gene p27^{Kip1} is a haplo-insufficient for tumor suppression. *Nature* 396, 177-80.

Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Borudy, V., Perlmutter, R.M., Kaushansky, K. and Roberts, J.M. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis and female sterility in p27Kip1-deficient mice. *Cell* 85, 733-744.

Frankel and Pabo (1988). Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.

Gehring M., Berthold F. and Edler L. (1995). The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res* 55, 5366-9.

Green, M. and Loewenstein, P.M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat *Trans*-Activator protein. *Cell* 55, 1179-1188.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387, 296-299.

Hawiger, J. (1999). Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins. *Curr Opin Chem Biol* 3(1), 89-94.

Hengst, L., Dilic, V., Slingerland, J.M., Lees, E. and Reed, S.I. (1994). A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 5291-5295.

Hunt, T. (1991). Cell cycle gets more cyclins. *Nature* 350, 462-463.

Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, K., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-20.

Joshi, V.V. and Tongalis, G.J. (1997). Correlation between morphologic and nonmorphologic prognostic markers of neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci* 824, 71-83.

Kaatsch P., Kaletsch U., Spix C. (1999). Annual report 1998 /1999. German childhood cancer registry. Mainz. 1998, 1999, 72-88

Kamb, A., Gruis, N.A., Weaverfeldhaus, J., Liu, Q.Y., Harshman, K., Tavitgian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., Johnson, B.E. and Skolnik, M.H. (1994). A cell-cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.

Katayose, Y., Kim, M., Rakkar, A.N., Li, Z., Cowan, K.H. and Seth, P. (1997). Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 57(24), 5441-5.

Kato, J.Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J. and Sherr, C.J. (1994). Cyclin AMP-induced G1 arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79, 487-96.

Kawamata, N., Seriu, T., Koeffler, HP. und Bartram, CR. (1996). Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor family: p16 (CDKN2/MTS1/INK4A), p18 (INK4C) and p27 (Kip1) genes in neuroblastomas. *Cancer* 77(3), 570-575.

Kay, M.A., Liu, D. and Hoogerbrugge, P.M. (1997). Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12744-12746.

Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A. and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell* 85, 721-732.

Koff, A., Cross, F., Fischer, A., Schumacher, J., Leguellec, K., Philippe, M. and Roberts, J.M. (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66, 1217-28.

Koff, A., Ohtsuki, M., Polyak, K., Roberts, J.M. and Massague, J. (1993). Negative regulation of G1 in mammalian cells: inhibition of cyclin E-dependent kinase by TGF-beta. *Science* 260, 536-9 Issn:0036-8075.

Kogner P., Barbany G. and Dominici C. (1993). Coexpression of messenger RNA for TRK proto-oncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 53, 2044-50.

Kranenburg O., Scharnhorst V., van der Eb AJ., Zantema A. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinase triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol*, 131; 227-234.

Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387, 299-303.

Loda, M., Cukor, B., Tam, S.W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G.F., Jrssup, J.M. and Pagano, M. (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med.*, 3, 231-234.

Look A.T., Hayes A. and Schuster J.J. (1991). Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 9, 581-91.

Lou, M.A. et al., (1997). Novel patterns of p53 abnormality in breast cancer from Taiwan: experience from a low-incidence area. *Br. J. Cancer*, 75, 746-751.

Lu, W., Pochampally, R., Chen, L., Traidej, M., Wang, Y. and Chen, J. (2000). Nuclear exclusion of p53 in a subset of tumors requires MDM2 function, *Oncogene*, 19(2), 232-40.

Mal, A., Poon, R.Y., Howe, P.H., Toyoshima, H., Hunter, T. and Harter, M.L. (1996). Inactivation of p27KIP1 by the viral E1A oncoprotein in TGF beta-treated cells. *Nature* 380, 262-5.

Matsuo T., Thiele C.J. (1998). p27KIP1: a key mediator of retinoic-acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 16, 3337-43.

Matsushime, H., Roussel, M.F., Ashmum, R.A. and Sherr, C.J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phases of the cell cycle. *Cell* 65, 701-713.

Moll, U.M., Riou, G. and Levine, A.J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7262-7266.

Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. and Niland, J. (1998). The Mdm2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.*, 26, 3453-3459.

Motokura, T., Bloom, T., Kim, H.G., Jüppner, H., Ruderman, J.V., Kronenberg, H.M. and Arnold, A. (1991). A novel cyclin encoded by a *bc/1*-linked candidate oncogene. *Nature* 359, 512-515.

Muller, D., Bouchard, C., Bayer, R., Steiner, P., Stuckmann, I., Saffrich, R., Ansorge, W., Huttner, W. and Eilers, M. (1997). Cdk 2-dependent

phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk 2 complexes. *Oncogene* 15, 2561-76.

Munoz J.P., Sanchez J.R., Maccioni R.B. (2003). Regulation of p27 in the process of neuroblastoma N2A differentiation. *J of Cellular Biochemistry* 89: 539-549.

Nahagara, H., Vocero-Akbani, A.M., Snyder, E.L., Ho, A., Latham, D.G., Lissy, N.A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S.A. and Dowdy, S.F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27^{Kip1} induces cell migration. *Nature Med* 4, 1449-52.

Nakamura Y., Ozaki T., Koseki H., Nakagawara A. and Sakiyama S. (2003) *Bioch. And Biophy Research Comm* 307, 206-231.

Nakagawara A., Nakagawara M. and Scavarda N. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328, 847-54.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I. and Loh, D.Y. (1996). Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-720.

Neuroblastomstudie der Deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie. 1997.

Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massague, J., Crabtree, G.R. and Roberts, J.M. (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27KIP1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570-3.

O'Hagan RC., Oh M., David G., Alboran IM., Alt FW., Kaelin WG. (2000). Myc enhanced expression of cul-1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev.* *14*, 2185-91.

Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumor suppressor p53. *Nature*, *362*, 857-860.

Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F. and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* *269*, 682-685.

Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* *246*, 613-8.

Perez-Juste, G. and Aranda, A. (1999). The cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} is involved in thyroid hormone-mediated neuronal differentiation. *J Biol Chem* *274*, 5126-31.

Perez-Roger I., Kim SH., Griffiths B., Sewing A., Land H. (1999). Cyclin D1 and D2 mediate Myc-induced proliferation via sequestration of p27^{KIP1} and p21^{CIP1}. *EMBO J*, *18*, 5310-20.

Pietenpol, J.A., Tokino, T., Thiagalingam, S., El-Deiry, W.S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1994). Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*, 1998-2002.

Polyak, K., Kato, J., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. and Koff, A. (1994). p27^{Kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* *8*, 9-22.

Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. and Massague, J. (1994). Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.

Porter, P.L., Malone, K.E., Heagerty, P.J., Alexander, G.M., Gatti, L.A., Firpo, E.J., Daling, J.R. and Roberts, J.M. (1997). Expression of cell-cycle regulators p27^{Kip1} and cyclin E alone and in combination correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature Med.*, 3, 222-225.

Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T. and Stehelin, D.. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* 281, 452-455.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1996). Crystal structure of the p27^{Kip1} cyclin-dependent kinase inhibitor bound to the cyclinA-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-31.

Schlamp, C.L., Poulsen, G.L., Nork, T.M. and Nickells, R.W. (1997). Nuclear exclusion of wild-type p53 in immortalized human retinoblastoma cells. *J. Natl Cancer Inst.*, 89, 1530-1536.

Schneider C., Sepp-Lorenzino L., Minnergem E., Querfelli O., Danishefsky S., Rosen N., Hartl F.U. (1996). Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by HSP90. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25), 14536-14541.

Schreiber, M., Mueller, W.J., Singh, G. and Graham, F.L. (1999). Comparison of the effectiveness of adenovirus vectors expressing cyclin kinase inhibitors p16^{INK4A}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}, p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1} in inducing cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of tumorigenicity. *Oncogene* 18, 1663-76.

Schwab M., Ellison J., Busch M., Rosenow W., Varmus HE., Bishop JM. (1984). Enhanced expression of the human gene n-Myc consequent of amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. Proc Natl Acad Sci USA, 81, 4940-4.

Schwarze, S.R. and Dowdy, S.F. (2000). *In vivo* transduction: intracellular delivery of biological active proteins, compounds and DNA. Tren in Pharm Sci 21, 45-48.

Schwarze, S.R., Hruska, K.A., Dowdy, S.F. (2000). Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? Trendc in Cell Biol 10, 290-295.

Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. and Clurman, B.E. (1997). CyclinE-CDK2 is a regulator of p27^{Kip1}. Genes Dev 11, 1464-1478.

Sherr, C.J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. Cell 79, 551-555.

Sherr, C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. Cell 73, 1059-1065.

Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1995). Inhibitor of mammalian G1 cyclin dependent kinases. Genes Dev 9, 1149-63.

Shimada, H., Chatten, J., Newton, W.A., Jr., Sachs, N., Hamoudi, A.B., Chiba, T., Marsden, H.B. and Misugi, K. (1984). Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. J Natl Cancer Inst 73, 405-16.

Sodroski J., Rosen C., Wong-Staal F., Salahuddin S.Z., Popovic M., Arya S., Galle R.C. and Haseltine W.A. (1985). Transacting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. Science 227, 171-173.

Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking, *EMBO*, *18*, 1660-1672.

Sun, X.F., Carstensen, J.M., Zhang, H., Stal, O., Wingren, S., Hatschek, T. and Nordenskjold, B. (1992). Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet*, *340*, 1369-1373.

Tan, P., Cady, B., Wanner, M., Worland, P., Cukor, B., Magi, G.C., Lavin, P., Draetta, G., Pagano, M. and Loda, M. (1997). The cell-cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a, b) invasive breast carcinomas. *Cancer Research*, *57*, 1259-1263.

Terpe H.J., Christiansen H. and Berthold F. (1994). Absence of CD44 standard in human neuroblastoma correlates with histological differentiation, M-myc amplification and reduced survival probability. *Cell Death Differ* *1*, 123-8.

Toyoshima, H. and Hunter, T. (1994). P27, a novel inhibitor of G1 cyclin Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* *78*, 67-74.

Ueda, H., Ullrich, S.J., Gangemi, J.D., Kappel, C.A., Ngo, L., Feitelson, M.A. and Jay, G. (1995). Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nature Genet.*, *9*, 41-47.

Varmus H. (1988). Regulation of HIV and HTLV gene expression. *Genes Dev* *2*, 1055-1062.

Verma, M. and Somia, N. (1997). Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* *389*, 239-242.

Vivès E., Brodin, P. and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272(25), 16010-7.

Vocero-Akbani, A., Lissy, NA. and Dowdy S.F. (2000). Transduction of full-length tat fusion proteins directly into mammalian cells: analysis of the T cell receptor activation-induced cell death. *Methods Enzymol* 322, 508-21.

Wang, Q.M., Luo, X. and Studzinski (1997). Cyclin-dependent kinase 6 is the principal target of p27/Kip1 regulation of the G1-phase traverse in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated HL60 cells. *Cancer Res* 57, 2851-5.

Yang, R.M., Naitoh, J., Murphy, M., Wang, H.J., Phillipson, J., deKernion, J.B., Loda, M and Reiter, R.E. (1998). Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J. Urol.*, 159, 941-945.

Ziegler A., Blatter X. L., Seelig A., Seelig J. (2003). Protein Transduction of HIV-1 and SIV Tat interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry*. 42, 9185-9194.

8. Danksagung

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern und meinem Bruder Sang-Hun. Ich danke ihnen für die familiäre und finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

Ich danke auch meinem Ehemann, Henning Horst, für seine Liebe und Aufmunterung.

Ich danke meinen Schwiegereltern, Ulla und Dr. med. Hartmut Horst für die Unterstützung und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit haben mein Doktorvater Prof. Dr. M. Eilers und PD Dr. med. H. Christiansen beigetragen, die das notwendige Umfeld zur Verfügung gestellt und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat beigestanden haben. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Dr. med. Eckard Bergmann und Dr. rer. nat. Michael Wanzel haben mir als Laborkollegen und freundschaftliche Korrektoren bei meiner Arbeit sehr geholfen. Mit ihrer tatkräftigen Unterstützung haben auch sie die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht, dafür danke ich ihnen herzlich.

Für die fachmännische Beratung und Unterstützung zu den Graphiken dieser Arbeit danke ich Philip Horst.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *Transduktion und Zellzyklusregulation durch das rekombinante Tat-p27(KIP1)-Fusionsprotein in Neuroblastomzellen* im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Eilers mit Unterstützung durch Herrn PD Dr. H. Christiansen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmitteln benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan, *Internal Journal of Medicine 05/2001 20; 95(3): 176-83*, veröffentlicht.

Berlin, den 12.11.2003

In-Hee Shin

10. Tabellarischer Lebenslauf

Name :	In-Hee Shin
Geboren am	19.05.1973
In	Seoul / Korea
01.1980 – 09.1988	Grund- und Mittelschule in In-Chon, Korea
09.1988	Umzug nach Deutschland mit der Familie
09.1988 – 09.1989	Privater Sprachunterricht in Deutsch
09.1989 – 06.1994	Gymnasium, Marienschule in Limburg a.d. Lahn
06.1994	Abitur mit der Gesamtnote 1,7
09.1994 – 09.2000	Studium der Humanmedizin a.d. Philipps-Universität, Marburg
09.1996	Ärztliche Vorprüfung mit der Note 2,6
09.1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0
06.2000	Heirat mit Henning Horst, Jurist
10.2000	Studienortswechsel nach Humboldt-Universität, Berlin
11.2000 – 09.2001	Praktisches Jahr in Berlin Chirurgie in Jüdisches Krankenhaus Innere Medizin in Klinikum Buch Neurologie in Campus Virchow, Charité
11.2002	Ärztliche Prüfung mit der Note 2,1
04.2002 – 09.2003	Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der Abt. f. Hämatologie / Onkologie, Campus Virchow, Charité, Berlin

Publikation : *Expression of p27 (KIP1) is prognostic and independent of MYCN amplification in human neuroblastoma*, Int J Cancer, 05/2001 20; 95(3):176-83

Sprachkenntnisse : Koreanisch – Muttersprache
Deutsch – wie Muttersprache
Englisch – fließend
Latein – großes Latinum
Französisch - Grundkenntnisse