

Aus dem Forschungszentrum Borstel
– Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften –
Abteilung für Immunologie und Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Untersuchungen zu Funktion und zellulärer Lokalisation des Ki-67-Proteins

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

Vorgelegt von
Jörn Bullwinkel
aus Bremerhaven

Lübeck, 2005

Aus dem Forschungszentrum Borstel
– Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften –
Abteilung für Immunologie und Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Untersuchungen zu Funktion und zellulärer Lokalisation des Ki-67-Proteins

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

Vorgelegt von
Jörn Bullwinkel
aus Bremerhaven

Lübeck, 2005

Was heißt wachsen? ist eine Frage, die jedes Kind schnell beantwortet: „wenn ich so groß werde wie Vater.“ Es liegt Wahrheit in dieser Antwort, aber dieses Wenige darf der Wissenschaft nicht genügen.

Matthias Jacob Schleiden, Beiträge zur Phyto-genesis

Dieses Zeug hat den Charakter eines Baumes, der sich unaufhörlich verzweigt, austreibt und weiterwächst, während ich gerade den Stamm zu finden versuche und die Stelle, an der er aus dem Boden wächst.

Harry Mulisch, Die Entdeckung des Himmels

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Entwicklung der Zellbiologie	1
1.2	Das proliferationsassoziierte Ki-67-Protein	3
1.3	Im Nucleolus werden die ribosomalen Untereinheiten synthetisiert	9
1.4	Die Synthese der Ribosomen ist mit der zellulären Proliferation gekoppelt	11
1.5	Fragestellung der Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Material	14
2.1.1	Feinchemikalien	14
2.1.2	Puffer, Medien und Lösungen	14
2.1.3	Oligonucleotide	20
2.1.4	Vektoren	21
2.1.5	Enzyme	21
2.1.6	Antikörper	21
2.1.7	Aufreinigung von Nucleinsäuren	24
2.1.8	Echtzeit-Quantifizierung von DNA	24
2.1.9	Markierung von Antikörpern	24
2.1.10	Proteinexpressionssystem	24
2.1.11	Zelllinien	25
2.2	Methoden	27
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.3	Zellbiologische Methoden	35
2.2.4	Gentechnische Methoden	37
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Herstellung neuer monoklonaler Antikörper gegen das Ki-67-Protein	38
3.1.1	Klonierung der cDNA von Exon 8-10 des Ki-67-Proteins in einen <i>E. coli</i> -Expressionsvektor	39
3.1.2	Expression des „His-Tag“-Fusionsproteins in <i>E. coli</i> und Aufreinigung des Fusionspeptids an Ni ²⁺ -NTA-Agarose (IMAC)	39
3.1.3	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das Fusionsprotein	40

3.2	Untersuchungen zu Lokalisation und Funktion des Ki-67-Proteins mit den Antikörpern MIB-1 und TuBB-9	43
3.2.1	Die intrazelluläre Lokalisation des Ki-67-Proteins – Vergleichende Analyse mit den Antikörpern MIB-1 und TuBB-9	43
3.2.2	Die intrazelluläre Lokalisation des Ki-67-Proteins – Kolo­kalisierung mit anderen nucleären Strukturen	48
3.2.3	Mikroinjektion von MIB-1 und TuBB-9 in HEp-2-Zellen	57
3.2.4	Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das Ki-67-Protein und Komponenten des rDNA-Transkriptionsapparates	67
4	DISKUSSION	73
4.1	Herstellung und Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers TuBB-9	73
4.2	Mögliche Funktionen des Ki-67-Proteins bei der Transkription und der Prozessierung von ribosomaler RNA	76
4.3	Die Lokalisation des Ki-67-Proteins in den <i>Cajal bodies</i>	81
4.4	Das Ki-67-Protein und die Regulierung der Genaktivität	82
4.5	Résumé	85
5	LITERATURVERZEICHNIS	87
6	ABKÜRZUNGEN	103
7	ANHANG	106
7.1	Alignment der durch Exon 8-10 kodierten Aminosäuresequenzen des Ki-67-Proteins von Mensch, Maus und Langschnauzen-Kaninchenkänguruh	106
7.2	Aminosäuresequenz des „His-Tag“-Fusionsproteins (Exon 8-10)	106
7.3	Biochemische Daten des „His-Tag“-Fusionsproteins (Exon 8-10)	107
	ZUSAMMENFASSUNG	108
	DANKSAGUNGEN	110
	LEBENS­LAUF	112
	EIGENE PUBLIKATIONEN	113

1 Einleitung

Wachstum und Teilung der Zellen sind für alle Lebewesen physiologische Prozesse von fundamentaler Bedeutung. Als Konsequenz hieraus ist die Deregulation dieser Vorgänge eminent gefährlich. Wird das zelluläre Gleichgewicht gestört, so drohen im Falle fehlgeleiteter oder mangelnder Proliferation Entwicklungsstörungen. Andererseits kann übermäßige Expansion bestimmter Zellen zu pathologischen Erscheinungen wie Neoplasien führen. Aus diesen Gründen ist ein verbessertes Verständnis der Regulation von Wachstum und Zellteilung für die Zellbiologie von zentraler Wichtigkeit. Welche Komponenten sind funktionell daran beteiligt, und wie werden sie gesteuert?

1.1 Die Entwicklung der Zellbiologie

Die frühe Entwicklung der Erforschung der Zellen lief zunächst weitestgehend mit der Fortentwicklung der Linsenschleiferei und Mikroskope in den großen Seefahrernationen parallel (Jahn, 2003, S.7). Am Anfang stand dabei die Beschreibung der im Mikroskop oder der Lupe gesehenen Strukturen im Vordergrund.

Der Begriff der ‚Zelle‘ (*cellula*) selbst wurde bereits 1665 von Robert Hooke geprägt. In der *Micrographia*, „dem ersten Werk der Cytologie“ (Mayr, 2000, S.22), beschreibt er die unter einem Mikroskop beobachteten (toten) Zellen bzw. deren Wände in Korkschnitten.

Hooke und seine Zeitgenossen – hervorzuheben sind hier besonders der Engländer Nehemia Grew, der Italiener Marcello Malpighi und Antoni van Leeuwenhoek aus Holland – hatten jedoch noch kein Verständnis vom tatsächlichen Wesen der Zelle. Zellen wurden am Ende des 17. Jahrhunderts vor allem als luftgefüllte Hohlräume oder Speicher für überschüssige Flüssigkeit angesehen. Weiterhin wurden sie nicht als Grundeinheiten aller Lebewesen begriffen. Dies hing im Wesentlichen damit zusammen, dass verschiedene Gewebe und insbesondere die Gefäße nicht als aus Zellen aufgebaute Organisationseinheiten erkannt wurden.

Das theoretische Fundament, auf dem unser heutiges Verständnis der Zellen, ihres Wachstums und ihrer Teilung aufbaut, wurde im 19. Jahrhundert gelegt. Ende der 1830er Jahre beschrieben Matthias Jacob Schleiden und Theodor Schwann in zwei epochalen Arbeiten die Universalität des Aufbaus aller Pflanzen und Tiere aus Zellen (Schleiden, 1838; Schwann, 1839). Die Zelle war somit zur Grundeinheit der Lebewesen geworden und die „Zellentheorie“ geboren. Allerdings irrten beide, was die Entstehung neuer Zellen

anbelangt. Beide schlugen – offenbar inspiriert von der Mineral-Kristallisation (Jahn, 2003, S.28 f.) – eine Bildung der Tochterzelle innerhalb oder gar außerhalb der Mutterzelle vor: Zunächst kristallisierte der Nucleolus. Um ihn herum lagerte sich anschließend der Nucleus ab, um den sich wiederum die neue Zelle bildete. Davon abgesehen bleibt es jedoch Schleidens und Schwanns Verdienst, dem Zellkern eine besondere „morphogenetische“ Bedeutung bei der Entstehung neuer Zellen zugemessen zu haben.

Die Zellentheorie wirkte sich allgemein sehr stimulierend auf die Forschungsgemeinde aus, diente sie doch als Grundlage für weitere Untersuchungen und Theorien. Während die Hypothese der Zelle als kleinste Einheit aller Lebewesen positiv aufgenommen und rasch verbreitet wurde, erfolgte schon nach wenigen Jahren die völlige Revision der Zellbildungstheorie zugunsten einer Zellteilungstheorie. Einen bedeutenden Beitrag hierzu leistete Robert Remak mit der Beschreibung der Zellteilungsstadien von Blutkörperchen der Hühnerembryonen (1841) und der Abhandlung *Ueber extracellulare Entstehung thierischer Zellen und über Vermehrung derselben durch Theilung* (1852), in der er die Zellvermehrung durch Teilung zum allgemeinen Prinzip bei tierischen Zellen erhebt (Harris, 1999, S.130). Remaks Arbeiten haben Rudolf Virchow sehr beeinflusst. Dieser kam ebenso zu dem Schluss, dass Zellen sich durch Zellteilung vermehren. Er prägte hierfür den plakativen Satz „Omnis cellula e cellula“ (Jede Zelle aus einer Zelle, 1855), der „auf ewig mit seinem Namen verbunden bleiben wird“ (Harris, 1999, S.135). Außerdem wandte Virchow die Zellentheorie konsequent auch auf die mikroskopische Untersuchung kranker Gewebe an und erntete dafür in seiner *Cellularpathologie* (1858) den Ruhm, der zumindest zum Teil auch Remak gebührte. Doch beide hatten noch keine Vorstellung vom tatsächlichen Mechanismus der Zellteilung und propagierten fälschlicherweise das Modell der direkten Teilung von Zelle, Zellkern und Nucleolus. Remak hielt mitotische Zellen gar für „verschrumpfte Kerne“ – also vermutlich anormale Zustände oder Artefakte (Harris, 1999, S.142).

Carl Nägeli und Wilhelm Hofmeister beschrieben – zunächst weitgehend unbeachtet – bereits 1844 bzw. 1848 verschiedene Stadien der Zellteilung, doch erst Walther Flemming etablierte diesen Prozess am Ende der 1870er Jahre, erkannte die Längsteilung der Chromosomen („indirekte Zellteilung“) und prägte den Begriff „Mitose“. Eduard Strasburger erklärte sie zum allgemeinen Prinzip bei Pflanzen und Tieren. Dass der Zellkern unverzichtbar ist und möglicherweise die Erbmerkmale trägt, vermutete Ernst Haeckel schon 1866, der endgültige Beweis dafür gelang jedoch erst Theodor Boveri (1888-1903).

Mit der Entdeckung des Nucleins durch Friedrich Miescher (1869) und der Wiederentdeckung von Gregor Mendels Vererbungsgesetzen am Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Richtung für die weitere Entwicklung der Zellbiologie vorgegeben. Die Fragen blieben aber – wenngleich ‚miniaturisiert‘ – immer noch dieselben: Welche Faktoren beeinflussen Zellteilung und Zellwachstum?

1.2 Das proliferationsassoziierte Ki-67-Protein

Neben der zellbiologischen, funktionalen Untersuchung der Proliferationsregulation bekam auch die diagnostische Analyse proliferierender Zellen mit dem verstärkten Auftreten von Krebserkrankungen immer größere Bedeutung. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde in Betracht gezogen, dass abnorme Mitosen bzw. Chromosomenformen als mögliches Kriterium der pathologisch-anatomischen Diagnostik von Tumoren dienen könnten (Übersicht bei Levine, 1931; Grundmann, 1971). 1925 teilte Greenough Mammatumoren nach zellulärem Aufbau, Grad an Hyperchromasie und Zahl an Mitosen in drei Malignitätsgruppen ein, die noch heute Verwendung finden (*grading*). Auch zellkinetische Untersuchungen wurden bei der diagnostischen Einschätzung maligner und benigner Gewebsveränderungen zunehmend wichtiger (Übersicht bei Oehlert, 1978). So kann die Bestimmung des Anteils proliferierender Zellen in einem Präparat – neben der oben angeführten Auszählung der Mitosen – zum Beispiel über die Messung der Inkorporierung von Basenanaloga in neusynthetisierte DNA erfolgen.

Die hier geschilderten Methoden haben jedoch den gravierenden Nachteil, dass sie jeweils nur Zellen in einer Zyklusphase erfassen – im ersten Fall in der Mitose, im zweiten in der S-Phase (Howard und Pelc, 1953). Ein idealer Parameter würde dagegen proliferierende Zellen in allen aktiven Phasen – in G₁-, S-, G₂-Phase und Mitose – im Gegensatz zu ruhenden Zellen (G₀) abbilden. Diese Population sich aktiv vermehrender Zellen wird als Wachstumsfraktion bezeichnet.

Im Jahr 1983 beschrieben Gerdes *et al.* erstmals den Antikörper Ki-67¹, der ein Epitop erkennt, das nur in den Kernen proliferierender Zellen auftritt und die oben aufgestellten

¹ Insbesondere in der älteren Literatur werden die Begriffe „Ki-67“ und „pKi-67“ häufig in verwirrender Weise synonym für das Ki-67-Protein benutzt. Dies hängt damit zusammen, dass ursprünglich der Antikörper Ki-67 als Proliferationsmarker von primärem Interesse war, während das durch den Antikörper erkannte Protein (und dessen Funktion) erst später in den Fokus der Forschung rückte, dann aber zunächst gleichfalls mit dem Namen des Antikörpers belegt wurde. In dieser Arbeit wird im Zusammenhang mit dem Protein nur von „pKi-67“ oder „Ki-67-Protein“ gesprochen, während der Prototyp-Antikörper gegen diese Struktur mit „Ki-67“ bezeichnet wird.

Bedingungen für einen Proliferationsmarker erfüllt (Gerdes *et al.*, 1984a und 1984b). Wie sich in der Folge herausstellte, eignet sich dieser Antikörper nicht nur zur ursprünglich avisierten Bestimmung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation von Hodgkin-Lymphomen sondern auch von einer Vielzahl anderer Tumorarten (Übersicht bei Scholzen und Gerdes, 2000; Brown und Gatter, 2002). Mittlerweile hat sich Ki-67 zu einem Standardmarker in der Routinediagnostik entwickelt. Die *Medline*, die elektronische Publikationsliste der *National Institutes of Health*, listet mehr als 9000 Publikationen auf, die Untersuchungen an pKi-67 oder mit Ki-67 bzw. äquivalenten Antikörpern zum Gegenstand haben. Bei der überwiegenden Mehrheit handelt es sich dabei um Artikel, die sich mit der Tumordiagnostik befassen; nur wenige untersuchen das erkannte Antigen und dessen zellbiologische Bedeutung.

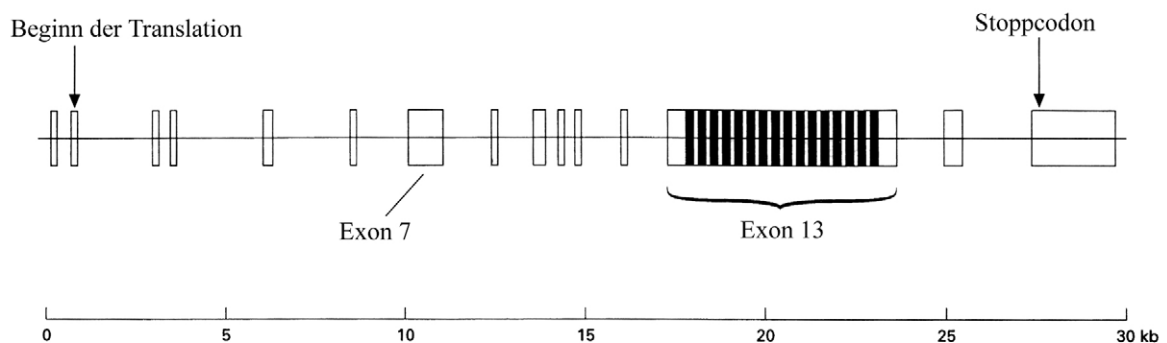


Abbildung 1: Die Struktur des pKi-67-kodierenden Gens auf Chromosom 10 (10q25-ter). Gezeigt sind die 15 Exons inklusive des alternativ gespleißten Exon 7 und des riesigen Exon 13 mit den 16 *Ki-67 repeats*. Weiterhin ist der für das Protein kodierende Bereich gekennzeichnet. Abbildung nach Duchrow *et al.* (1996).

Wie durch Untersuchung einer cDNA-Bank ermittelt werden konnte, erkennt Ki-67 ein Epitop in einem später pKi-67 (oder Ki-67-Protein) genannten Protein mit einzigartigem Aufbau und hohem Anteil an basischen Aminosäureresten (Gerdes *et al.*, 1991; Schlüter *et al.*, 1993). Das pKi-67-Gen umfasst insgesamt 15 Exons und kodiert für eine lange Protein-Isoform eines berechneten Molekulargewichts von 359 kDa und eine kurze Isoform von 320 kDa (siehe Abbildung 1). Letztere ist um das alternativ gespleißte Exon 7 reduziert (Schlüter *et al.*, 1993). Das Ki-67-Protein zeigt – abgesehen von kurzen Sequenzmotiven wie etwa 200 potentiellen Phosphorylierungsstellen, acht *bipartite nuclear targeting sites*, zwei *nuclear targeting sites* und einer ATP/GTP-Bindungsstelle – lediglich in dem durch die Exons 2-4 kodierten Bereich Ähnlichkeit mit anderen Proteinen. In dieser Region befindet sich eine sogenannte FHA-Domäne oder *forkhead-associated domain* (Hofmann und Bucher, 1995). Biochemische Untersuchungen ergaben, dass FHA-Domänen, die aus vielen nucleären Proteinen bekannt sind, Phosphoproteine erkennen und

so Wechselwirkungen zwischen Proteinen vermitteln (Durocher *et al.*, 1999). Interessanterweise konnten inzwischen zwei Proteine in *yeast two hybrid screenings* gefunden werden, die mit der FHA-Domäne von pKi-67 interagieren. Hklp2 (*human kinesin-like protein 2*) ist homolog zu Xklp2, welches für den korrekten Ablauf der Mitose im Krallenfrosch *Xenopus* benötigt wird (Sueishi *et al.*, 2000). Das potentiell RNA-bindende NIFK (*nucleolar protein interacting with the FHA domain of pKi-67*) bindet ebenfalls an pKi-67, jedoch ist dessen zelluläre Funktion nicht bekannt (Takagi *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004).

Das strukturell markanteste Merkmal des pKi-67-Gens ist das riesige zentrale Exon 13 (siehe Abbildung 1), das 16 Wiederholungen der homologen, 366 bp langen *Ki-67 repeats* enthält. Jedes dieser repetitiven Elemente enthält ein hochkonserviertes, 22 bp langes Ki-67-Motiv (Schlüter *et al.*, 1993). Bezogen auf die cDNA macht Exon 13 mit 6845 bp mehr als zwei Drittel der Gesamtlänge aus.

Die Funktion des Ki-67-Proteins konnte vor allem wegen nicht erkennbarer Homologien zu anderen Proteinen und des hohen Molekulargewichts, welches verschiedene Studien erschwerte, bis heute nicht aufgeklärt werden. Weiterhin erwies sich als hinderlich, dass das Protein offenbar fest in die nucleäre Matrix eingebunden ist und sich nur unter bestimmten Bedingungen daraus lösen lässt (MacCallum und Hall, 1999). Somit sind biochemische Analysen wie die Koimmunpräzipitation mit anderen Proteinen bisher weitgehend unmöglich gewesen.

Neben der vermuteten Involvierung in den Ablauf des Zellzyklus, die durch die beobachtete exklusive Expression in proliferierenden Zellen nahe liegt, konnten weitere Hinweise auf mögliche Funktionen gewonnen werden. So konnte etwa nach dem Einbringen von Antisense-Oligonucleotiden gegen die pKi-67-mRNA gezeigt werden, dass die zelluläre DNA-Synthese reduziert, der Zellzyklus verlangsamt, die Zellproliferation verringert (Schlüter *et al.*, 1993; Maeshima *et al.*, 1996; Duchrow *et al.*, 2001) und das Wachstum von Tumoren verlangsamt wird (Kausch *et al.*, 2003 und 2004).

In der Abfolge der Zellzyklusphasen färben Antikörper gegen pKi-67 distinkte Bereiche des Zellkerns: Während das Protein zu Beginn der G₁-Phase – neben einer diffusen Färbung des Nucleoplasmas – vor allem auf die sich bildenden Nucleoli sowie diskrete kleine Punkte im gesamten Kern verteilt ist, befindet es sich im weiteren Verlauf der Interphase hauptsächlich am Rand der Nucleoli (Braun *et al.*, 1988; Verheijen *et al.*, 1989a; van Dierendonck *et al.*, 1991; Kill, 1996). Die Intensität der Ki-67-Färbung nimmt insbesondere während der G₂- und S-Phase deutlich zu. Wie mit durchflusscytometrischen Methoden

bestimmt werden konnte, übersteigt diese Zunahme noch die Neusynthese an DNA (Bruno *et al.*, 1991). Zu Beginn der Mitose findet eine dramatische Umverteilung statt: Nachdem sich die Nucleoli aufgelöst haben und die DNA kondensiert wurde, findet man das gesamte Ki-67-Protein im Netzwerk der perichromosomalen Schicht (Verheijen *et al.*, 1989b). Manche Autoren berichten von einem Rückgang der Ki-67-Färbung in postmitotischen Zellen (Lopez *et al.*, 1991) bzw. nicht nachweisbarer Färbung zu Beginn der S-Phase (van Dierendonck *et al.*, 1991). Diese Beobachtung ist möglicherweise durch eine Hypothese von du Manoir *et al.* (1991) erklärbar. Demnach gibt es für postmitotische Zellen drei verschiedene Muster für pKi-67 (abnehmende, ansteigende oder stabile Expression), die jeweils mit einem individuell unterschiedlichen Proliferationsstatus der Zelle korrelieren.

Abgesehen von dieser rein deskriptiven Analyse der pKi-67-Lokalisation in der Zelle konnten weitergehende Studien zeigen, dass das granuläre Muster des Proteins in der frühen G₁-Phase mit Satelliten-DNA, heterochromatischen Blocks, sowie Telomer und Centromer von zwei untersuchten Chromosomen kolokalisiert. Die Kolokalisation nimmt zwar im Verlauf der Neubildung der Nucleoli ab, jedoch bleiben alle Centromere und Kurzarmregionen der akrozentrischen Chromosomen mit pKi-67 assoziiert (Bridger *et al.*, 1998).

Die innernucleoläre Lokalisation des Proteins in Interphase-Zellen ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion. Während Verheijen *et al.* (1989a) pKi-67 ursprünglich elektronenmikroskopisch auf den „nucleolären Cortex“ sowie das *dense fibrillar compartment* (DFC) des Nucleolus beschränkt beschrieben, postuliert Kill (1996) eine weitgehend fibrillarinfreie DFC-Region, in der sich das Ki-67-Protein befinden soll; auch MacCallum und Hall (2000a) sehen pKi-67 im DFC. Vielleicht sind die unterschiedlichen Befunde damit zu erklären, dass die Bestimmung der pKi-67-Lokalisation von verschiedenen experimentellen Parametern abhängig ist. Unter anderem spielt bei Immunfärbungen die Fixierungsmethode eine gravierende Rolle. So ist die Intensität der Färbung beispielsweise abhängig von der Ionenstärke (Bruno *et al.*, 1992) und der Konzentration an Calcium-Ionen (Shi *et al.*, 1999) in der Fixierungslösung. Des Weiteren konnten Lopez *et al.* (1994) nachweisen, dass die Färbung sowohl mit Ki-67 als auch mit dem pKi-67-spezifischen Antikörper MIB-1 (Cattoretti *et al.*, 1992; Key *et al.*, 1993) in Gegenwart von undegradierter DNA verstärkt ist. Offenbar moduliert DNA die Konformation des Proteins in einer Weise, die das Epitop der beiden Antikörper (es liegt jeweils im Exon 13) zugänglicher macht.

Dies ist insbesondere interessant, wenn man diese Daten in der Zusammenschau mit den Ergebnissen von MacCallum und Hall (1999 und 2000b) betrachtet. In zwei Artikeln beschreiben sie die Fähigkeit des C-Terminus' von pKi-67, DNA in Form eines Cellulose-

Addukts zu binden. Das Protein besitzt eine größere Affinität für superspiralisierte DNA im Vergleich mit doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA; außerdem bindet es präferentiell an AT-reiche Sequenzen. Es konnten jedoch keine Konsensussequenzen für die Bindung ermittelt werden. Umgekehrt ist die Bindungsaffinität einer phosphorylierten Form von pKi-67, die während der Mitose auftritt, geringer.

Die phosphorylierte Form des Ki-67-Proteins konnte auch von Endl und Gerdes (2000) nachgewiesen werden. Darüber hinaus stellten sie fest, dass die Phosphorylierung zellzyklusabhängig durch den CyclinB/cdc2-Komplex katalysiert wird. Die Phosphorylierung von pKi-67 geht offenbar in der Prophase vonstatten, während die Dephosphorylierung in der Anaphase erfolgt.

Der C-Terminus von pKi-67 bindet außer DNA noch Mitglieder der HP1-Familie (*heterochromatin protein 1*). Hierbei handelt es sich um Proteine, die in die epigenetische Kontrolle von Genaktivitäten involviert und mit methyliertem Lysin 9 in Histon H3, einer Markierung für transkriptionsreprimiertes Chromatin, assoziiert sind (Jones *et al.*, 2000; Lachner *et al.*, 2001). Es konnte über das *yeast two hybrid*-System, über *pull down*-Versuche und konfokale Mikroskopie ermittelt werden, dass alle drei Isoformen, HP1 α , HP1 β und HP1 γ , zweifelsfrei mit dem Ki-67-Protein interagieren bzw. teilweise mit ihm kolokalisieren (Scholzen *et al.*, 2002). Interessanterweise wird das endogene pKi-67 in HP1-transfizierten Zellen komplett umverteilt. Statt der vor allem auf den nucleolären Rand konzentrierten Verteilung findet man es vollständig in den nucleoplasmatischen Flecken, die auch HP1 enthalten.

Wenngleich wir verschiedene Anhaltspunkte für mögliche Funktionen einzelner Domänen haben, deren Weiterverfolgung sich als lohnend erweisen könnte, gibt uns das Ki-67-Protein weiterhin Rätsel auf. Mittlerweile konnten in verschiedenen Spezies relativ konservierte homologe Proteine nachgewiesen werden. Beispielsweise wurden für die Maus (Starborg *et al.*, 1996) und das Langschnauzen-Kaninchenkänguruh *Potorous tridactylus* (Takagi *et al.*, 1999) entsprechende Proteine beschrieben und deren Gene sequenziert. Im Pufferfisch *Fugu rubripes* existiert ein Gen mit gewisser Homologie, und Immunfärbungen von Ratten-, Kaninchen-, Rinder-, Hunde- und Schaf-Zellen deuten ebenso auf eine Präsenz von pKi-67 in diesen Spezies hin (Falini *et al.*, 1989). Eine vergleichende Analyse des Chromosoms 10 des Menschen und des Schimpansen ergab ungewöhnlich viele Unterschiede in einzelnen Basen des Ki-67-Gens (Deloukas *et al.*, 2004). Nach Interpretation der Autoren deutet dies auf eine schnelle Evolution des menschlichen Gens hin.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über biochemische Eigenschaften, räumliche Verteilung in der Zelle sowie zeitliche Umlagerung im Laufe des Zellzyklus lassen verschiedene Schlüsse über eine oder mehrere mögliche Funktionen des Proteins zu. Da in Zellen eingebrachte Antisense-Oligonucleotide (Schlüter *et al.*, 1993) bzw. mikroinjizierte pKi-67-spezifische Antikörper (Starborg *et al.*, 1996) den Zellzyklus verlangsamen und die Zellproliferation verringern, ist davon auszugehen, dass eine bedeutende Involvierung in diese Vorgänge besteht. Andererseits wurde pKi-67 lange Zeit als nicht für das Leben der Zelle essentielles Protein angesehen, da auch ruhende oder ausdifferenzierte Zellen lebensfähig sind. Weiterhin wurde die Vermutung geäußert, pKi-67 könne rein strukturelle Aufgaben bei der Aufrechterhaltung der Struktur höherer Ordnung der DNA erfüllen (Sawhney und Hall, 1992) oder mit anderen Proteinen der perichromosomalen Schicht als „Schutz“ der Chromosomen während der Mitose dienen (Yasuda und Maul, 1990; Hernandez-Verdun und Gautier, 1994). Eine Rolle im strukturellen Aufbau der Nucleoli ist zwar nicht unmöglich, allerdings sprechen dagegen der späte Einbau in die sich neubildenden Nucleoli in der G₁-Phase (Savino *et al.*, 1999) sowie der Befund von Kill (1996), dass sich der Nucleolus unter bestimmten wenn auch unphysiologischen Bedingungen ohne pKi-67 aufbauen kann.

Die besonders für die frühe G₁-Phase, aber auch den Rest der Interphase nachgewiesene Kolo-kalisation des extranucleolären Ki-67-Proteins mit regulatorischen Komponenten des Heterochromatins (Scholzen *et al.*, 2002) sowie in der Regel inaktiven genetischen Regionen (Centromere, Telomere und Satelliten-DNA; Bridger *et al.*, 1998) könnte eine Rolle in der Regulation der Chromatinstruktur oder -aktivität andeuten.

Interessant ist auch eine Hypothese von MacCallum und Hall (2000a), die pKi-67 eine Aufgabe bei der rRNA-Prozessierung oder dem Aufbau der ribosomalen Untereinheiten zuschreibt. Demnach könnte das Ki-67-Protein die Produktion von Ribosomen als eine Art „Effizienzfaktor“ in Zeiten großen Bedarfs steigern. Wenngleich hierfür noch keine umfassenden experimentellen Befunde vorliegen, so ist dies angesichts der Kolo-kalisation mit vielen an der rRNA-Prozessierung beteiligten Proteinen wie Nucleolin oder p120 in bestimmten Bereichen der Nucleoli nicht unmöglich. Die Funktion des Ki-67-Proteins ist allerdings weiterhin ungeklärt.

1.3 Im Nucleolus werden die ribosomalen Untereinheiten synthetisiert

Die anfängliche Erforschung der Nucleoli – insbesondere ihr Auftreten in unterschiedlicher Zahl und das Verschwinden vor sowie die Neubildung nach der Zellteilung – wurde vor allem durch die stark lichtbrechenden Eigenschaften im Vergleich zum umgebenden Nucleo- und Cytoplasma begünstigt. Erstmals beschrieb Rudolph Wagner 1835 den Nucleolus in Oocyten-Nuclei verschiedener Spezies und bezeichnete ihn als *Keimfleck* oder *macula germinativa* (Franke, 1988). Dass es sich hierbei nicht nur um einen Sonderfall in Keimzellen handelt, wurde schon im Folgejahr immer klarer: Dem zur Schule Jan Evangelista Purkyněs gehörenden Gabriel Gustav Valentin gelang die erste zweifelsfreie Identifizierung von Nucleoli in verschiedenen somatischen Zellen. Im ersten Band des *Repertorium für Anatomie und Physiologie* (1836) schildert er seine Beobachtungen – er benennt den Nucleolus als *zweiten Nucleus* – wie folgt (zitiert nach Harris, 1999, S.192):

... – in jeder Zelle ohne Ausnahme befindet sich ein etwas dunklerer und kompakter Nucleus von runder oder länglich runder Form. Er nimmt grösstentheils die Mitte einer jeden Zelle ein, besteht aus einem feinkörnigen Wesen, enthält aber in seinem Inneren ein genau rundes Körperchen, welches auf diese Weise in ihm selbst wiederum eine Art von zweitem Nucleus bildet.

Doch erst in den 30er und 40er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde dieses Wissen durch biochemische und cytogenetische Analysen erweitert. In den 60er Jahren machte die Funktionsuntersuchung des Nucleolus mit der Entwicklung molekulargenetischer Methoden einen weiteren Sprung. Zunächst konnte das nucleoläre Vorkommen einer zur RNA aus den Ribosomen (rRNA) komplementären DNA (rDNA) und später von rRNA selbst gezeigt werden (Birnstiel *et al.*, 1963; McConkey und Hopkins, 1964; Ritossa und Spiegelman, 1965). Bald stand fest, dass in den Nucleoli die ribosomale RNA gebildet und die beiden ribosomalen Untereinheiten zusammengesetzt werden.

In der Folge konnte der genaue Ablauf dieses Vorganges weiter beleuchtet werden. Heute unterscheidet man morphologisch drei nucleoläre Kompartimente, die aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen definiert wurden. Dabei handelt es sich um die *fibrillar centres* (FC), welche von der *dense fibrillar component* (DFC) umgeben sind. Beide bilden die fibrilläre Komponente und sind wiederum in die *granular component* (GC) eingebettet (siehe Abbildung 2). Dieser Aufbau spiegelt die Abfolge der

Reifungsstadien der rRNA und der ribosomalen Untereinheiten wider. Da verschiedene nucleoläre Proteine auf einzelne dieser Kompartimente beschränkt sind, geht man davon aus, dass deren räumliche Trennung funktionell verschiedene Bereiche schafft, die in der rRNA-Reifung eine distinkte Rolle spielen (Kill, 1996). Die Meinungen über den tatsächlichen Transkriptionsort der rRNA-Gene sind geteilt. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transkription im Außenbereich der FC erfolgt und die Primärtranskripte sehr schnell in die DFC transportiert werden (Cheutin *et al.*, 2002); andere Autoren sehen diesen Prozess allerdings an der Grenze zwischen FC und DFC oder direkt in der DFC (Übersicht bei Hernandez-Verdun *et al.*, 2002). Weitgehende Übereinstimmung herrscht in Bezug auf die Reifung der Primärtranskripte, also deren Spaltung in kleinere Fragmente und der Modifikation zahlreicher Basen der rRNAs (Übersicht bei Leary und Huang, 2001; Hernandez-Verdun und Louvet, 2004): Die frühen Prozesse laufen in der DFC ab, während die späte Reifung in der GC erfolgt. Dort findet dann auch der Aufbau der ribosomalen Untereinheiten aus ribosomalen RNAs und ribosomalen Proteinen statt. Die vollständigen Untereinheiten werden aus dem Nucleolus und dem Nucleus exportiert und stehen anschließend im Cytoplasma bereit, um Proteine zu synthetisieren.

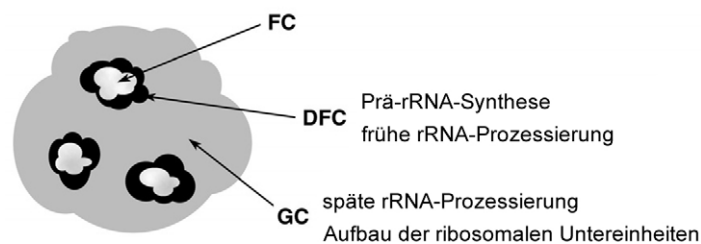


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Nucleolus-Aufbaus. Der Nucleolus ist strukturell in drei Komponenten untergliedert, die jeweils bestimmte Aufgaben bei der Produktion der ribosomalen Untereinheiten übernehmen (siehe Text). Abbildung modifiziert nach Hernandez-Verdun und Roussel (2003).

Neben dieser Hauptaufgabe konnten dem Nucleolus in den letzten Jahren noch zahlreiche weitere Funktionen zugeordnet werden. So spielt der Nucleolus eine Rolle bei der Synthese von nichtribosomalen RNAs. Beispielsweise werden bestimmte mRNAs sowie die Ribonucleinsäuren einiger Ribonucleoprotein- (RNP-) Komplexe dort synthetisiert und/oder prozessiert. Bei Letzteren handelt es sich um RNAs der Telomerase, des Signalerkennungspartikels (SRP) und verschiedener katalytisch aktiver kleiner RNAs (Übersicht bei Pederson, 1998). Des Weiteren werden im Nucleolus offenbar einige den Zellzyklus regulierende Proteine zurückgehalten und abgebaut, wenn ihre Aktivität unterdrückt werden soll (Visintin und Amon, 2000).

Der Nucleolus ist eine „membranlose Zellorganelle“ (Comai, 1999) von enormer Komplexität: In Analysen des nucleolären Proteoms konnten knapp 400 Proteine bestimmt werden, die sich zumindest zeitweise dort aufhalten (Andersen *et al.*, 2002; Scherl *et al.*, 2002). 30 % Prozent von ihnen sind immer noch uncharakterisiert (Leung *et al.*, 2003). Somit erscheint es möglich, dass noch weitere bisher unbekannte Funktionen mit dem Nucleolus in Verbindung gebracht werden bzw. unser Bild der rDNA-Transkription sich noch wesentlich verfeinert.

1.4 Die Synthese der Ribosomen ist mit der zellulären Proliferation gekoppelt

Säugetiere besitzen mehrere Hundert Kopien ihrer rRNA-Gene. Beim Menschen liegen die für 28 S-, 18 S- und 5,8 S-RNA kodierenden Sequenzen gruppiert auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen vor und werden einschließlich zweier externer und zweier interner Spacer von der RNA Polymerase I (Pol I) als etwa 13 kb langes Primärtranskript (Prä-rRNA, s.o.) abgeschrieben (siehe Abbildung 3). Zusammen mit dem sogenannten intergenischen Spacer (IGS) bilden sie 43 kb lange Einheiten, die tandemartig in Clustern auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen angeordnet sind (Henderson *et al.*, 1972). Diese Bereiche wurden schon relativ früh identifiziert und als *nucleolar organizer regions* (NORs) bezeichnet, da sie als „Kristallisationskeim“ für den Neuaufbau der Nucleoli nach der Mitose dienen (Ochs *et al.*, 1985).

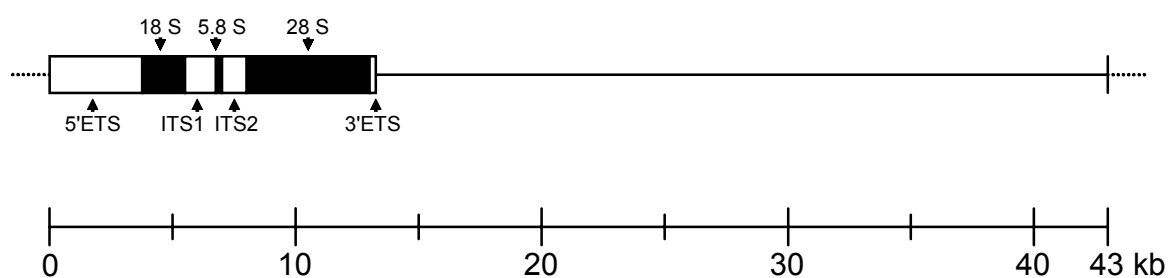


Abbildung 3: Anordnung der humanen rRNA-Gene. Dargestellt sind der transkribierte Bereich (Kasten) mit dem rRNA-kodierenden Bereich (schwarz) und den Spacerregionen (weiß) sowie der untranskribierte intergenische Spacer (IGS, Linie). ETS: *external transcribed spacer*, ITS: *internal transcribed spacer*.

Die Zellteilung erfordert nicht nur eine Duplikation des Genoms, sondern vielmehr eine Verdoppelung der gesamten Zellbestandteile. Daher haben proliferierende Zellen eine hohe Proteinsyntheserate und somit auch einen großen Bedarf an Ribosomen, die diese Proteine synthetisieren. In aktiven Zellen kann die Produktion an rRNA aus diesem Grund bis zu 80 % der totalen RNA-Synthese ausmachen (Jacob und Ghosh, 1999).

Die Korrelation von Zellproliferation, Protein- und rRNA-Synthese konnte vielfach nachgewiesen werden (Übersicht bei Ruggero und Pandolfi, 2003). Beispielsweise wird die rRNA-Synthese bei Entzug von essentiellen Aminosäuren reduziert (Grummt *et al.*, 1976), in Gegenwart von Wachstumsfaktoren wie Insulin dagegen verstärkt (Übersicht bei Hannan *et al.*, 1998b). Proliferativ aktive Tumorzellen zeigen oftmals hochaktive Nucleoli, während differenzierte Zellen nur sehr wenig bis gar keine rRNA mehr synthetisieren. Außerdem scheinen im Falle mancher Neoplasien solche Zellen selektiert zu werden, in denen Suppressoren der rRNA-Synthese deaktiviert sind (Ruggero und Pandolfi, 2003) oder die vervielfachte rDNA-Loci besitzen (MacLeod *et al.*, 2000; Fonatsch *et al.*, 2001). Zwar wird der Bedarf an Ribosomen auch durch die Gesamtzahl transkriptionsaktiver rRNA-Gene gesteuert, doch erreicht deren Anteil selbst in Phasen höchster Proliferation maximal 60 % (Conconi *et al.*, 1989). Es wird angenommen, dass die Regulation der Genaktivität tatsächlich zu einem großen Teil über die Beeinflussung der Bildung des Initiationskomplexes mit Pol I am Promotor zustande kommt (Hernandez-Verdun und Roussel, 2003). Eine strikte Regulation der rRNA-Synthese ist in jedem Fall unbedingt notwendig, da sie zum einen den Anforderungen des zellulären Wachstums und der Zellproliferation gerecht werden muss, zum anderen aber auch immense Mengen an Energie und Ressourcen verbraucht.

1.5 Fragestellung der Arbeit

In den vergangenen 20 Jahren wurden zahlreiche Antikörper gegen das nucleoläre Ki-67-Protein hergestellt, die zu weit verbreiteten Hilfsmitteln bei der diagnostischen Aufklärung proliferativer Vorgänge geworden sind. Die meisten dieser Antikörper (z. B. Ki-67 und MIB-1) erkennen das repetitive Ki-67-Motiv, das durch Exon 13 kodiert wird und sich als sehr immunogen erwiesen hat.

Der durch die Exons 8-10 kodierte Bereich ist (wie die N-terminale FHA-Domäne und Abschnitte aus den *Ki-67 repeats*) zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert (siehe Anhang). Dies deutet auf eine wichtige Funktion dieser Region innerhalb des gesamten Ki-67-Proteins hin. Daher sollte ein entsprechendes Proteinfragment produziert und darauf aufbauend monoklonale Antikörper dagegen hergestellt werden. Diese Antikörper sollten unter anderem in Immunlokalisations-, Mikroinjektions- und Funktionsstudien zur weiteren Charakterisierung von pKi-67 verwendet werden.

Im Folgenden sollte dabei insbesondere ein Chromatin-Immunpräzipitationsassay etabliert werden, der eine Beantwortung der Frage ermöglicht, inwieweit pKi-67 nicht nur allgemein mit DNA wechselwirken kann (MacCallum und Hall, 1999 und 2000b), sondern auch spezifisch mit Chromatin assoziiert ist. Hierfür sollten ebenfalls die neuen Antikörper eingesetzt werden.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten dazu beitragen, die Funktionsanalyse des Ki-67-Proteins voranzutreiben.

Die enge Kopplung zwischen der Expression des Ki-67-Proteins und der zellulären Proliferation deutet eine Involvierung in einen für Zellteilung oder -wachstum wichtigen Prozess hin. Ein besseres Verständnis der Funktion von pKi-67 ist daher – auch aufgrund der Bedeutung für die Tumordiagnostik – nicht nur aus zellbiologischer sondern sicherlich auch aus medizinischer Sicht interessant.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Feinchemikalien

Ampicillin	Sigma (München, Dtl.)
Bacto-Agar	Difco (Detroit/MI, USA)
Bromphenolblau	Sigma (München, Dtl.)
Coomassie Brilliant Blue	Bio-Rad (Hercules/CA, USA)
Dabco	Sigma (München, Dtl.)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg, Dtl.)
dNTPs	Amersham (Piscataway/NJ, USA)
DTT	Sigma (München, Dtl.)
EDTA	Sigma (München, Dtl.)
FITC	Sigma (München, Dtl.)
Fischgelatine	Sigma (München, Dtl.)
Glucose	Sigma (München, Dtl.)
L-Glutamin	PAA (Cölbe, Dtl.)
Hefe-Extrakt	Difco (Detroit/MI, USA)
Kanamycin	Sigma (München, Dtl.)
Lachshoden-DNA	Sigma (München, Dtl.)
Natriumdesoxycholat	Sigma (München, Dtl.)
NBT/BCIP-Reagenz	Promega (Madison/WI, USA)
Penicillin/Streptomycin	PAA (Cölbe, Dtl.)
Ponceau S	Sigma (München, Dtl.)
Protease-Inhibitor (Complete Mini, EDTA-free)	Roche (Mannheim, Dtl.)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham (Uppsala, Schweden)
RNA (aus Bäckerhefe)	Sigma (München, Dtl.)
TEMED	Sigma (München, Dtl.)
Toto-3-jodid	Molecular Probes (Eugene/OR, USA)
Trypton	Difco (Detroit/MI, USA)
Xylencyanol	Sigma (München, Dtl.)

Weitere Chemikalien wurden – soweit nicht anders vermerkt – von Merck (Darmstadt, Dtl.) bezogen.

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Für molekularbiologische Arbeiten verwendete Lösungen wurden in der Regel 30 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck in reiner Wasserdampf-atmosphäre autoklaviert oder sterilfiltriert. Medien für die Bakterienkultivierung wurden 20 Minuten autoklaviert; Kulturmedien für Säugerezellen wurden sterilfiltriert.

Alle Reagenzien wurden – soweit nicht anders angegeben – bei Raumtemperatur gelagert. Die Lösungen wurden mit Wasser zu Injektionszwecken („Aqua ad iniectionabilia“) von B. Braun (Melsungen, Dtl.) angesetzt.

2.1.2.1 Lösungen für die Chromatin-Immunpräzipitation

1 % Fixierlösung zur Quervernetzung	1 % (w/v) Formaldehyd (aus 37 % (w/v) Formaldehyd in DMEM, Nr. D5671 (Sigma, München, Dtl.)); frisch angesetzt.
20/2 TE-Puffer	2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl (pH 8); Lagerung bei 4 °C.
ChIP-Verdünnungspuffer	0,01 % (w/v) SDS, 1,1 % (v/v) Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris/HCl (pH 8), 167 mM NaCl; kurz vor Verwendung wurde in je 10 ml Puffer eine Proteaseinhibitortablette (Complete Mini, EDTA-free) aufgelöst; Lagerung bei 4 °C.
Elutionspuffer	0,1 M NaHCO ₃ , 1 % SDS; frisch angesetzt.
Hochsalzwaschpuffer	0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl (pH 8), 500 mM NaCl; Lagerung bei 4 °C.
Lithiumchlorid-Waschpuffer	0,25 M LiCl, 1 % (v/v) NP-40, 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8); Lagerung bei 4 °C.
Niedrigsalzwaschpuffer	0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl (pH 8), 150 mM NaCl; Lagerung bei 4 °C.
PBS für ChIP	150 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5 mit HCl eingestellt;

kurz vor Verwendung wurde in je 10 ml Puffer eine Proteaseinhibitortablette (Complete Mini, EDTA-free) aufgelöst;
Lagerung bei 4 °C.

SDS-Lysepuffer

1 % (w/v) SDS,
10 mM EDTA,
50 mM Tris/HCl (pH 8);
kurz vor Verwendung wurde in je 10 ml Puffer eine Proteaseinhibitortablette (Complete Mini, EDTA-free) aufgelöst.

2.1.2.2 Puffer für die Proteinaufreinigung (frisch angesetzt)

Puffer A

100 mM NaH₂PO₄,
10 mM Tris/HCl,
6 M Guanidium/HCl;
pH 8 mit HCl eingestellt.

Puffer B

100 mM NaH₂PO₄,
10 mM Tris/HCl,
8 M Harnstoff;
pH 8 mit HCl eingestellt.

Puffer C

100 mM NaH₂PO₄,
10 mM Tris/HCl,
8 M Harnstoff;
pH 6,3 mit HCl eingestellt.

Puffer D

100 mM NaH₂PO₄,
10 mM Tris/HCl,
8 M Harnstoff;
pH 5,9 mit HCl eingestellt.

Puffer E

100 mM NaH₂PO₄,
10 mM Tris/HCl,
8 M Harnstoff;
pH 4,5 mit HCl eingestellt.

2.1.2.3 Nährmedien und Zellkulturreagenzien

DMEM, komplett

Rohmedium, flüssig, Nr. D5671 (Sigma, München, Dtl.), Zusätze: 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin, 0,5 % Glucose;
Lagerung bei 4 °C.

Einfriermedium für Säugerzellen

10 % (v/v) DMSO in FCS;
frisch angesetzt.

Einfriermedium für Bakterien	15 % (v/v) Glycerin in Kulturmedium; frisch angesetzt.
FCS	Biochrom (Berlin, Dtl.); 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert; Lagerung bei 4 °C.
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) NaCl; pH 7,5 eingestellt; Lagerung bei 4 °C.
LB/Amp-Medium	100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium; Zugabe des Antibiotikums kurz vor Verwendung.
LB/Amp/Kan-Medium	100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin in LB-Medium; Zugabe der Antibiotika kurz vor Verwendung.
LB/Kan-Medium	30 µg/ml Kanamycin in LB-Medium; Zugabe des Antibiotikums kurz vor Verwendung.
LB/Amp-Agar-Platten	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar autokla- vieren und vor der Zugabe von Ampicillin (End- konzentration: 100 µg/ml) bis auf etwa 50 °C ab- kühlen lassen; Lagerung bei 4 °C.
LB/Kan-Agar-Platten	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto-Agar autokla- vieren und vor der Zugabe von Kanamycin (End- konzentration: 25 µg/ml) bis auf etwa 50 °C ab- kühlen lassen; Lagerung bei 4 °C.
RPMI-1640, komplett	Rohmedium, flüssig, Nr. R0883 (Sigma, Mün- chen, Dtl.), Zusätze: 20 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM L- Glutamin, 0,5 % (w/v) Glucose; Lagerung bei 4 °C.
SOC-Medium	Invitrogen (Carlsbad/CA, USA); Lagerung bei 4 °C.
Trypsin/EDTA (10 x)	Fertigprodukt von PAA (Cölbe, Dtl.), enthält: 0,5 % (w/v) Trypsin, 0,2 % (w/v) EDTA; Lagerung bei -20 °C, verdünnt bei 4 °C.

2.1.2.4 Sonstige Puffer und Lösungen

1 kb DNA-Leiter	Invitrogen (Carlsbad/CA, USA); Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese; Lagerung bei 4 °C.
10 x TAE	0,4 M Tris/HCl, 20 mM EDTA; pH 8,0 mit Essigsäure eingestellt.
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen (Carlsbad/CA, USA); Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese; Lagerung bei 4 °C.
40 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (1:29)	Sigma (München, Dtl.); Lagerung bei 4 °C.
AP 9,5-Puffer	1 M Tris/HCl (pH 9,5), 1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ .
Citratpuffer	1 % (v/v) NP-40, 100 mM Na-Citrat; pH 7,5 eingestellt; vor Verwendung DTT (Endkonzentration: 1mM) und Proteaseinhibitor (Complete Mini, EDTA-free) zugegeben.
Coomassie-Lösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure.
Dabco-Lösung	0,25 % (w/v) Diazabicyclo[2.2.2]octan, 15 mM NaCl, 0,8 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,2 mM KH ₂ PO ₄ , in 90 % (v/v) Glycerin; pH 8,6 mit HCl eingestellt.
DNA-Beladungspuffer mit BPB (10x)	50 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) Bromphenolblau, 10 x TAE-Puffer.
DNA-Beladungspuffer mit XC (10x)	50 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) Xylencyanol, 10 x TAE-Puffer.
Elektrophoresepuffer für Tris/Glycin-Gele	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS.

Entfärber für Coomassie-Färbung	10 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Methanol.
IP-Puffer	Puffer nach Kaeser und Iggo (2002); 1 % (v/v) NP-40, 350 mM NaCl, 100 mg/ml per Ultraschall fragmentierte Lachshoden-DNA.
Konservierungslösung	20 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Glycerin.
„Lower Tris“-Puffer	0,4 % SDS, 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8).
„Low Molecular Weight Marker“	Bio-Rad (Hercules/CA, USA); Größenstandard für die SDS-PAGE; Lagerung bei -20 °C.
Natriumcarbonatpuffer	160 mM Na ₂ CO ₃ , 333 mM NaHCO ₃ .
PBS	150 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5 mit HCl eingestellt.
Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S, 0,2 % (v/v) Essigsäure.
„Precision Plus Protein Standard All Blue“	Bio-Rad (Hercules/CA, USA); Größenstandard für die SDS-PAGE; Lagerung bei -20 °C.
„Prestained SDS-PAGE Standard, High Range“	Bio-Rad (Hercules/CA, USA); Größenstandard für die SDS-PAGE; Lagerung bei -20 °C.
SDS-Probenpuffer	25 mM Tris/HCl, 50 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, ca. 0,02 % (w/v) BPB, pH 6,8.
TBS (pH 7,5)	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5). Für TBS-Puffer anderer pH-Werte wurden dementsprechend gepufferte Tris/HCl-Lösungen verwendet.

TBS/BSA	10 % (w/v) BSA in TBS (pH 7,5); filtriert und anschließend bei -20 °C gelagert.
TBST	0,1 M Tris/HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20.
TE	1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8).
Transferpuffer	20 mM Tris, 15 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3 eingestellt.
„Upper Tris“-Puffer	0,4 % (v/v) SDS, 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8).

2.1.3 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide wurden von Sigma (München, Dtl.) und Qiagen (Hilden, Dtl.) bezogen.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primerpaare

Bezeichnung	Sequenz	Verwendete Annealing-Temperatur (in °C)	Amplifikationslänge (in bp)
<i>Primer für die Klonierung der Exons 8-10 von pKi-67</i>			
HsaEx8sS	ATATGTCGACAATGAGAGTGAGGGAATACCTTTG	55	629
HsaEx10asH	ATATAAGCTTCTTTGGAGTAGCAGGTCTTCTTTG		
<i>Sequenzierprimer für den Vektor pQE-31</i>			
pQE-3	GTTCTGAGGTCATTACTGG	52	777
pQE-5	CGGATAACAATTCACACAG		
<i>Primer gegen Abschnitte des humanen rDNA-Clusters nach O'Sullivan et al., 2002</i>			
H0 s	GGTATATCTTTCGCTCCGAG	50	80
H0 as	GACGACAGGTCGCCAGAGGA		
H4 s	CGACGACCCATTTCGAACGTCT	50	103
H4 as	CTCTCCGGAATCGAACCCTGA		
H13 s	ACCTGGCGCTAAACCATTTCGT	50	115
H13 as	GGACAAACCCTTGTGTCGAGG		
H18 s	GTTGACGTACAGGGTGGACTG	50	125
H18 as	GGAAGTTGTCTTCACGCCTGA		
H23/27 s	CCTTCCACGAGAGTGAGAAGC	50	111
H23/27 as	TCGACCTCCCGAAATCGTACA		
H42 s	AGAGGGGCTGCGTTTTTCGGCC	60	94
H42 as	CGAGACAGATCCGGCTGGCAG		
<i>Kontrollprimer für die Chromatin-Immunpräzipitation</i>			
H4 Struk F	CATCACCAAGCCTGCCATTTCGG	55	162
H4 Struk Rev	CACATCCATGGCTGTGACGGTC		
LINE-3	GCAGGCCTGGTGGTGAC	51	101
LINE-5	CAGAATTCATATCCAGCCA		

2.1.4 Vektoren

pCR-Script Amp SK(+) (Stratagene, La Jolla/CA, USA)

pQE-31 (Qiagen, Hilden, Dtl.)

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (AP)	Boehringer (Mannheim, Dtl.)
Cloned <i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla/CA, USA)
Proteinase K	Sigma (München, Dtl.)
RNase A	Sigma (München, Dtl.)
<i>SalI</i> , <i>HindIII</i> (Restriktionsendonucleasen)	Invitrogen (Carlsbad/CA, USA)
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen (Carlsbad/CA, USA)
<i>SrfI</i> (Restriktionsendonuclease)	Stratagene (La Jolla/CA, USA)
T4 DNA Ligase	Stratagene (La Jolla/CA, USA)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen (Carlsbad/CA, USA)

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

anti-BrdU-Antikörper	Monoklonaler Ratte-Antikörper, Subklasse IgG2 (ab6326 von Abcam, Cambridge, UK), der kreuzreaktiv mit 5-Fluoruridin ist. Konzentration: 1 mg/ml in 50 % Glycerin/PBS mit 0,02 % Natriumazid, verwendete Verdünnung für die Immunfluoreszenz: 1:200.
anti-Dimethyl-Histon H3 (Lysin 9)	Aufgereinigter IgG-Kaninchen-Antikörper, # 07-212, Charge # 23424, Upstate Biotechnology (Lake Placid/NY, USA), Konzentration: 0,1 - 0,5 µg/ml laut Vertrieb (Biomol, Hamburg, Dtl.).
anti-HP1 α	Antikörper gegen das <i>heterochromatin protein 1α</i> , # 2HP-2G9-AS, Euromedex (Souffelweyheim, Frankreich), für die Immunfluoreszenz mittels „Zenon Labeling“-Kit mit „Alexa Fluor 488“ gekoppelt (siehe 2.2.2.5.1), effektiv verwendete Verdünnung in der Immunfluoreszenz: 1:75.
anti-MCM3	Monoklonaler IgG1-Antikörper gegen das <i>Minichromosome maintenance protein 3</i> , Herstellung siehe Endl <i>et al.</i> (2001).
anti-Nucleolin	Aufgereinigter IgG1-Antikörper aus Maus-Aszites-Flüssigkeit, Klon 4E2, MBL (Nagoya, Japan), Konzentration: 1 mg/ml. Verwendete Verdünnung für die Immunfluoreszenz: 10 µg/ml.

anti-p80-Coilin (5P10 - π)	Monoklonaler IgG2a-Maus-Antikörper (Hybridomüberstand) gegen das humane Coilin (Almeida <i>et al.</i> , 1998), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. Maria Carmo-Fonseca (Universität Lissabon, Portugal), verwendete Verdünnung für die Immunfluoreszenz: 1:100.
anti-RNA Polymerase I	Kaninchen-Serum gegen die größte Untereinheit der RNA Polymerase I (RPA 116), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ingrid Grummt (DKFZ, Heidelberg, Dtl.).
anti-UBF (6'2)	Kaninchen-Serum gegen den <i>upstream binding factor</i> , UBF (Bolivar <i>et al.</i> , 1999), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Manuel M. Valdivia (Universität Cádiz, Spanien), Verdünnung für die Immunfluoreszenz: 1:500 bis 1:1000.
BO-7	Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG1) gegen IL-2 (Brandt <i>et al.</i> , 1986), zur Verfügung gestellt von PD Dr. Ernst Brandt (FZB, Borstel, Dtl.), Konzentration: 8 mg/ml in PBS, verwendete Konzentration für den Western Blot: 10 μ g/ml.
MIB-1	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Ki-67-Motiv aus Exon 13 von pKi-67, Herstellung nach Cattoretti <i>et al.</i> (1992) und Key <i>et al.</i> (1993), Konzentration: 9,3 mg/ml in PBS, verwendete Konzentration für die Immunfluoreszenz: 2 μ g/ml, verwendete Konzentration für den Western Blot: 1,5 μ g/ml.
RGS·His ₆	Maus-Antikörper gegen ein Hexahistidin-Peptid (Qiagen, Hilden, Dtl.), Konzentration: 0,2 mg/ml, Verdünnung für den Western Blot: 1:1500.
TuBB-9	Monoklonaler Maus-Antikörper (Subklasse IgG1, κ -L-Kette) gegen Exon 9 von pKi-67, Herstellung siehe 3.1, Konzentration: 5 mg/ml in PBS, verwendete Konzentration für Western Blot und Immunfluoreszenz: 40 μ g/ml.
TuBB-9-FITC	Mit dem Farbstoff Fluorescein-Isothiocyant markierter TuBB-9, Konzentration: 3 mg/ml, Verdünnung für die Immunfluoreszenz: 1:50.

2.1.6.2 Sekundärantikörper

„Alexa Fluor 488“-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)

Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenz von Molecular Probes (Eugene/OR,

USA), nicht kreuzreaktiv mit Rind-IgG, Ziege-IgG, Kaninchen-IgG, Ratte-IgG, humanem IgG und humanem Serum, Konzentration: 2 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M NaCl (pH 7,5) mit 5 mM Natriumazid, verwendete Verdünnungen: 1:300 bis 1:1000.

„Alexa Fluor 488“-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)

Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenz von Molecular Probes (Eugene/OR, USA), nicht kreuzreaktiv mit Rind-IgG, Ziege-IgG, Maus-IgG, Ratte-IgG und humanem IgG, Konzentration: 2 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M NaCl (pH 7,5) mit 5 mM Natriumazid, verwendete Verdünnungen: 1:300 bis 1:1000.

„Alexa Fluor 546“-gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)

Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenz von Molecular Probes (Eugene/OR, USA), nicht kreuzreaktiv mit Rind-IgG, Ziege-IgG, Kaninchen-IgG, Ratte-IgG, humanem IgG und humanem Serum, Konzentration: 2 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M NaCl (pH 7,5) mit 5 mM Natriumazid, verwendete Verdünnungen: 1:300 bis 1:1000.

„Alexa Fluor 546“-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)

Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenz von Molecular Probes (Eugene/OR, USA), nicht kreuzreaktiv mit Rind-IgG, Ziege-IgG, Maus-IgG, Ratte-IgG und humanem IgG, Konzentration: 2 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M NaCl (pH 7,5) mit 5 mM Natriumazid, verwendete Verdünnungen: 1:300 bis 1:1000.

„Alexa Fluor 546“-gekoppelter Ziege-anti-Ratte-IgG (H+L)

Sekundärantikörper für die indirekte Immunfluoreszenz von Molecular Probes (Eugene/OR, USA), nicht kreuzreaktiv mit Maus-IgG, Maus-Serum und humanem Serum, Konzentration: 2 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M NaCl (pH 7,5) mit 5 mM Natriumazid, verwendete Verdünnungen: 1:300 bis 1:1000.

AP-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)

0,6 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, 0,25 M NaCl (pH 8) mit 0,05 % Natriumazid (Dianova, Hamburg, Dtl.), verwendete Verdünnung: 1:10000.

2.1.6.3 Normalseren

Kaninchen-Normalserum	Präimmunserum 12/12/97 (Eurogentec, Seraing, Belgien).
Maus-Normalserum	Proteinkonzentration 50 mg/ml in 10 mM Natriumphosphat, 0,25 M NaCl (pH 7,6) mit 0,05 % Natriumazid (Dianova, Hamburg, Dtl.).
Ziege-Normalserum	Proteinkonzentration 60 mg/ml in 10 mM Natriumphosphat, 0,25 M NaCl (pH 7,6) mit 0,05 % Natriumazid (Dianova, Hamburg, Dtl.).

2.1.7 Aufreinigung von Nucleinsäuren

Die aufgeführten Kits wurden von Qiagen (Hilden, Dtl.) bezogen.

Plasmid Midi Kit	Präparation von Plasmiden aus Bakterien im mittleren Maßstab
QiaEx II Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen
QiaPrepSpin Miniprep Kit	Präparation von Plasmiden aus Bakterien im kleinen Maßstab
QiaQuick PCR Purification Kit	Aufreinigung von DNA aus Lösungen
RNeasy Mini Kit	Präparation von RNA aus Kulturzellen

2.1.8 Echtzeit-Quantifizierung von DNA

FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche, Mannheim, Dtl.)

2.1.9 Markierung von Antikörpern

Die aufgeführten Kits wurden von Molecular Probes (Eugene/OR, USA) bezogen.

Protein Labeling Kit	Markierung größerer Antikörpermengen
Zenon Mouse IgG Labeling Kit	Markierung kleinerer Antikörpermengen

2.1.10 Proteinexpressionssystem

QiaExpressionist Kit (Qiagen)	Expression von „His-Tag“-Fusionsproteinen
-------------------------------	---

2.1.11 Zelllinien

2.1.11.1 Säugetierzellen

HDLM-2 (DSMZ-Nr.: ACC-17)

Humane Hodgkin-Lymphom-Zelle mit außergewöhnlichen Chromosomenaberrationen (MacLeod *et al.*, 2000). Bis auf Chromosom 10 weisen alle Chromosomen Veränderungen auf. Interessanterweise sind dabei besonders die Abschnitte der akrozentrischen Chromosomen multipliziert, die die Gene für die ribosomale RNA tragen. Suspensionskulturen dieser Zelllinie sind bei einer Zelldichte von $0,5\text{-}2\cdot 10^6$ Zellen/ml in komplettem RPMI-Medium bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ zu kultivieren. Die Teilung erfolgt einmal wöchentlich unter Zugabe von neuem Medium im Verhältnis von 1:2.

HeLa S3 (ATCC-Nr.: CCL-2.2)

Adhärenz wachsende humane Cervixkarzinomlinie (Puck *et al.*, 1956), die aufgrund ihrer Zellmorphologie besonders gut zum Studium des Kerns und des Nucleolus geeignet ist. HeLa S3-Zellen besitzen durchschnittlich einen hypotriploiden Chromosomensatz. Die Kultivierung erfolgt in komplettem DMEM-Medium bei 37 °C und 7,5 % (v/v) CO₂. Zur Subkultivierung wurden die Zellen zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 – 1:15 geteilt.

HEp-2 (ATCC-Nr.: CCL-23)

Adhärenz wachsende humane Zelllinie, die ursprünglich für eine Epidermalkarzinom-Zelle gehalten, dann aber als Sublinie von HeLa S3 (Moore *et al.*, 1955) charakterisiert wurde. HEp-2-Zellen zeigen im Vergleich zu HeLa-Zellen eine noch höhere Lichtbrechung des Zellkerns und wurden daher in der vorliegenden Arbeit für Mikroinjektionsstudien verwendet. Die Kultivierung erfolgt in komplettem DMEM-Medium bei 37 °C und 7,5 % (v/v) CO₂. Zur Subkultivierung wurden die Zellen zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 geteilt.

L-428 (DSMZ-Nr.: ACC 197)

Humane Hodgkin-Lymphom-Zelle, deren Morphologie und Muster an Oberflächenmarkern Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen gleicht (Schaadt *et al.*, 1979 und 1980). Suspensionskulturen dieser Zelllinie sind in komplettem RPMI-Medium bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂ zu kultivieren. Die Teilung erfolgt zweimal wöchentlich unter Zugabe von neuem Medium im Verhältnis von 1:10.

2.1.11.2 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Stratagene, La Jolla/CA, USA)

Verwendet zur Plasmid-Vermehrung, Genotyp: F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1.

Escherichia coli DH5 α F'IQ (Stratagene, La Jolla/CA, USA)

Verwendet zur Proteinexpression, Genotyp: F['] 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1/F['] proAB⁺ lacIqZ Δ M15 zzf::Tn5 [KmR].

Escherichia coli XL10-Gold Kan^r (Stratagene, La Jolla/CA, USA)

Kompetente Zellen, verwendet zur Plasmid-Vermehrung ausgehend von SrfI-gespaltenem pCR-Script, Genotyp: Tet^r Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F['] proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r) Tn5 Kan^r Amy].

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 *Isolierung von Nucleinsäuren*

2.2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Kleinere DNA-Mengen wurden unter Verwendung des „QiaPrepSpin Miniprep“-Kits aus 2 ml einer Übernachtskultur gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in ca. 50 µl Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Größere DNA-Mengen wurden unter Verwendung des „Plasmid Midi“-Kits aus 100 ml einer Übernachtskultur gewonnen. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in ca. 50 µl Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.1.1.2 Isolierung von RNA aus Säugetierzellen

Zur Isolierung von RNA wurden $5\text{-}6 \cdot 10^6$ Zellen mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und nach dem Protokoll des „RNeasy Mini“-Kits verarbeitet. Die gewonnene RNA wurde mit 30 µl Wasser eluiert.

2.2.1.2 *Reverse Transkription (RT) von RNA*

Für die Reverse Transkription von RNA wurden 3 µg frisch isolierte Gesamt-RNA mit 1 µg Oligo-dT₁₈-Primer in 10 µl Wasser verdünnt, 10 Minuten bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt (Annealing). Anschließend wurden nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) RNase-Inhibitor, RT-Puffer, DTT, dNTPs und 200 U Reverse Transkriptase Superscript II hinzugegeben und eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurde das Enzym für 3 Minuten bei 95 °C deaktiviert, der Ansatz 1:10 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.1.3 *Polymerasekettenreaktion (PCR)*

2.2.1.3.1 Präparative PCR

PCR-Reaktionen wurden in den Geräten GeneAmp 2400 und GeneAmp 9600 (Perkin Elmer, Boston/MA, USA) durchgeführt. Die verwendeten Primer, die jeweiligen Annealing-Temperaturen (T_a) und die Größe der Amplifikate sind tabellarisch unter 2.1.3 zu finden. Die Zahl der Zyklen (x) richtete sich nach der Effizienz der Reaktion und der Qualität des Templates.

Zusätzlich zu den Proben wurde ein Kontrollansatz ohne Template zur Überprüfung auf Kontaminationen angesetzt.

Die DNA-Amplifikation zu präparativen Zwecken (Klonierung) wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Programm:

5 Minuten	94 °C	} x Zyklen
1 Minute	94 °C	
1 Minute	T _a	
1 Minute	72 °C	
15 Minuten	72 °C	
anschließend	4 °C	

Zusammensetzung der Reaktionsansätze (100 µl):

5'-Primer:	1 µM
3'-Primer:	1 µM
dNTPs:	jeweils 0,2 mM
<i>Pfu</i> Polymerase:	2,5 U
Reaktionspuffer für <i>Pfu</i> Polymerase	

+ 1-10 ng Template

2.2.1.3.2 Semiquantitative und qualitativ analytische PCR

Mit PCR-Ansätzen zur Analyse (qualitativ und semiquantitativ) wurde genauso verfahren wie mit den Ansätzen zu präparativen Zwecken. Allerdings wurden hier 1,25 U *Taq*-DNA-Polymerase (sowie dazugehöriger Puffer) verwendet und im Reaktionsansatz (hier 50 µl) zusätzlich eine MgCl₂-Konzentration von 2 mM eingestellt.

2.2.1.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung von rDNA-Fragmenten in ChIP-Proben wurde der Light Cycler1.0 (Roche, Mannheim, Dtl.) zusammen mit dem „FastStart DNA Master SYBR Green I“-Kit verwendet. Um die Spezifität der Reaktion zu optimieren, wurden die jeweiligen Läufe als sogenannte „Touch-down“-PCR ausgeführt.

Im folgenden Schema sind der prinzipielle Ablauf einer solchen PCR und die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes dargestellt. Auch hier wurde jeweils eine Kontrolle ohne Template zur Überprüfung auf Kontamination der verwendeten Reagenzien angesetzt. Zudem wurde im Anschluss an jeden PCR-Lauf eine Schmelzkurve der Proben zwischen 63 und 95 °C aufgenommen, die Auskunft über die Identität der Amplifikate gibt. Ausgehend vom jeweiligen Schmelzpunkt des Amplifikats wurde die Temperatur zur Messung der Fluoreszenz (T_b) bestimmt. Die Annealing-Temperatur wurde in zehn Zyklen in 0,5 °C-Schritten auf die in Tabelle 1 (siehe 2.1.3) angegebenen Werte abgesenkt.

Programm:

10 Minuten	95 °C	} x Zyklen
10 Sekunden	95 °C	
10 Sekunden	T _a	
10 Sekunden	72 °C	
1 Sekunde	T _b	
15 Minuten	72 °C	

Zusammensetzung der Reaktionsansätze (10 µl):

5'-Primer:	0,6 µl (Endkonzentration: 1,2 µM)
3'-Primer:	0,6 µl (Endkonzentration: 1,2 µM)
MgCl ₂ :	1,2 µl (4 mM)
SYBR-Mix:	1 µl
Wasser:	4,6 µl

+ 2 µl Template

Die Auswertung der Messwerte erfolgte unter Zuhilfenahme der Software LightCycler Run 5.3.2 und LightCycler3 Front Version 3.5.17 (Idaho Technology, Salt Lake City/UT, USA).

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäure-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Optischen Dichte (OD) bei 260 nm mit dem Spektralphotometer Ultrospec 1000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).

Eine Optische Dichte OD₂₆₀ von 1 entspricht einer DNA-Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration an RNA von 40 µg/ml.

Zur Abschätzung der Verunreinigung der Lösung mit Proteinen wurde die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gebildet. Dieser liegt für reine DNA bei 1,8; für RNA liegt er bei 2,0.

2.2.1.5 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonucleasen (nach Fuchs und Blakesley, 1983)

Es wurden in der Regel 250 ng bis 1 µg gelöste DNA mit 4-10 U einer Restriktionsendonuclease in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer für 1-2 Stunden bei 37 °C hydrolysiert.

2.2.1.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Dephosphorylierung des 5'-Endes von linearisierter Vektor-DNA wurde der Reaktionsansatz bei 37 °C für 45 Minuten mit 1 U Alkalischer Phosphatase inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte unter Zugabe von EDTA-Lösung eines pH-Werts von 8 (Endkonzentration: 25 mM) durch zehnmünütige Inkubation bei 65 °C.

2.2.1.7 Agarosegelelektrophorese (nach McDonell et al., 1977)

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in Agarosegelen auf Basis von TAE-Puffer durchgeführt. Die Gele enthielten 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung der DNA auf einem UV-Transilluminator (INTAS, Göttingen, Dtl.). Die Proben wurden mit 10 % (v/v) DNA-Probenpuffer (10x) versetzt, aufgetragen und bei 5 V/cm in einem horizontalen Elektrophoresesystem (Bio-Rad, München, Dtl.) aufgetrennt. Als Größenstandards wurden „100 bp Leiter“ und „1 kb Leiter“ benutzt.

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten (nach Maniatis et al., 1989)

Die Ligation von 50-100 ng dephosphoryliertem Vektor und 10-50 ng Insert erfolgte in einem 10 µl-Ansatz (mit 0,5 mM ATP und Reaktionspuffer) durch 4 U T4 Ligase als Übernachtreaktion bei 4 °C (für *blunt end*-Klonierungen) bzw. 1 Stunde bei Raumtemperatur (für *sticky end*-Klonierungen). Anschließend wurde das Enzym für 10 Minuten bei 65 °C deaktiviert.

Im Falle von Klonierungen in pCR-Script wurden zu dem vom Hersteller (Invitrogen) gelieferten, mit *SrfI*-Endonuclease linearisierten Vektor 5 U *SrfI*-Endonuclease in den Ligationansatz gegeben.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zellysaten

Für die Lyse wurden Zellen geerntet und in PBS aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden sie in der Dichte $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Zellysate wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Zur Auftrennung von Protein-Gemischen wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit diskontinuierlichem Tris/Glycin-Puffersystem verwendet.

Grundlage des Sammelgels ist ein Tris-Puffer niedrigen pH-Werts („Upper Tris“, siehe 2.1.2.4), Grundlage des Trenngels ein Tris-Puffer hohen pH-Werts („Lower Tris“, siehe 2.1.2.4).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Trenngele mit einem Polyacrylamidgehalt zwischen 5 und 15 % benutzt. Die Zusammensetzung ist im Einzelnen in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 10-15 mA (Sammelgel) bzw. 20-25 mA (Trenngel) und wurde in einem vertikalen System (Bio-Rad, München, Dtl.) durchgeführt.

Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte durch Coomassie-Färbung des Gels (siehe 2.2.2.3) oder durch spezifische Antikörper nach Western Blotting (siehe 2.2.2.4) des Gels.

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele

	Sammelgel: 3,3 % (w/v) Polyacrylamid	Trenngel: 5-15 % (w/v) Polyacrylamid
40 % Acrylamid/ Bisacrylamid (1:29)	8,35 % (v/v)	12,38 - 37,16 % (v/v)
„Lower Tris“-Puffer	-	24,8 % (v/v)
„Upper Tris“-Puffer	26,1 % (v/v)	-
Ammoniumperoxodisulfat	0,42 % (w/v)	0,82 % (w/v)
TEMED	0,42 % (v/v)	0,08 % (v/v)

2.2.2.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen erfolgte durch 20-minütige Inkubation in Coomassie-Lösung und anschließend – über Nacht – in Entfärber-Lösung. Die Gele wurden dann wiederum über Nacht in Konservierungslösung inkubiert und zur Trocknung in Cellophanfolie (Bio-Rad, München, Dtl.) eingespannt.

2.2.2.4 Western Blot und immunologische Detektion von Proteinen

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden über Nacht bei einer Stromstärke von 50 mA in einer mit Transferpuffer gefüllten Mini Protean II-Blotapparatur (Bio-Rad, München, Dtl.) auf „Protran“-Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell, Dassel, Dtl.) geblottet. Der Proteintransfer wurde durch Inkubation mit Ponceau S-Lösung überprüft. Anschließend wurde der Farbstoff mit destilliertem Wasser von der Membran gewaschen und für eine Stunde in 4 % Fischgelatine (in TBST) inkubiert. Danach wurde für eine Stunde mit Primärantikörper (Verdünnung in 0,5 % Fischgelatine/TBST) und nach dreimaligem Waschen mit 0,5 % Fischgelatine/TBST eine Stunde mit einem AP-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (1:10000 verdünnt) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST und einmaligem Waschen mit AP 9,5-Puffer wurde gebundener Antikörper mit NBT/BCIP-Reagenz (363 µg/ml bzw. 181,5 µg/ml in AP 9,5-Puffer) nachgewiesen. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Reagenz abgegossen und der Blot mit destilliertem Wasser gespült.

2.2.2.5 Markierung von Antikörpern mit Fluoreszenzfarbstoffen

2.2.2.5.1 Markierung von Antikörpern im Mikrogramm-Maßstab mit dem „Zenon Mouse IgG Labeling“-Kit von Molecular Probes

Mit Hilfe des „Zenon Labeling“-Kits wurden kleine Antikörpermengen (1-5 µg) mit „Alexa Fluor 488“-gekoppelten F_{ab}-Fragmenten markiert und direkt für die Immunfluoreszenz eingesetzt. Bei der Durchführung wurden die Hinweise des Herstellers befolgt.

2.2.2.5.2 Markierung von Antikörpern im Milligramm-Maßstab mit dem „Protein Labeling“-Kit von Molecular Probes

Mit dem „Protein Labeling“-Kit wurden Antikörper mit den Farbstoffen „Alexa Fluor 488“ und „Alexa Fluor 546“ direktmarkiert. Dazu wurde 1 mg Antikörper eingesetzt und im Weiteren nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.2.5.3 Markierung von Antikörpern im Milligramm-Maßstab mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)

100 µl Antikörper-Lösung (1 mg Antikörper/ml in Natriumcarbonat-Puffer) wurden mit 5 µl FITC-Lösung (1mg FITC/ml in DMSO) versetzt und auf einem Rollinkubator für 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Verdünnung dieser Lösung mit 400 µl TBS (pH 7,4) und die Auftragung auf eine mit 3 ml TBS (pH 8,2) äquilibrierte NAP-5 Sephadex-Gelfiltrationssäule (Amersham, Uppsala, Schweden). Der FITC-gekoppelte Antikörper wurde mit 1 ml TBS (pH 8,2) eluiert und in einem Microcon YM-30-Konzentrator (Millipore, Bedford/MA, USA) durch 20-minütige

Zentrifugation bei 400 g eingengt. Das Antikörper-FITC-Konjugat wurde danach mit 100 µl TBS (pH 8,2) während einer Inkubation von 15 Minuten bei 4 °C von der Membran des Konzentrators gelöst und anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.2.2.6 Nachweis der Proteinlokalisierung durch Immunfluoreszenzmarkierung

Adhärenente Zellen für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden entweder auf „Superfrost Plus“-Glasobjektträgern (R. Langenbrinck, Emmendingen, Dtl.) oder im Fall der Mikroinjektionsstudien auf Glasbodenschälchen (MatTek, Ashland/MA, USA) kultiviert. Suspensionszellen wurden als Cytozentrifugenpräparate vorbereitet und Gefrierschnitte humaner Tonsillen auf Glasobjektträger überführt.

Zuerst wurden die Präparate einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte für jeweils 10 Minuten eine Inkubation mit frisch angesetztem 2 %igen Formalin (in PBS) und 0,25 % Triton X-100 (in PBS). Nach zweimaligem Waschen mit TBS (pH 7,5) wurde 30 Minuten mit Primärantikörper (in 10 % BSA/TBS) inkubiert. Die verwendeten Antikörper-Konzentrationen und -Verdünnungen sind unter 2.1.6.1 verzeichnet.

Sollte die Verteilung eines weiteren Proteins studiert werden, so wurde nach zweimaligem Waschen mit TBS (pH 7,5) 30 Minuten mit einem zweiten Primärantikörper (in 10 % BSA/TBS) inkubiert.

Nach erneutem zweimaligen Waschen mit TBS (pH 7,5) erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Sekundärantikörpern entsprechender Spezifität. Hierbei kamen mit den Fluoreszenzfarbstoffen „Alexa Fluor 488“ und „Alexa Fluor 546“ gekoppelte Ziege-anti-Maus-, Ziege-anti-Ratte- und Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper von Molecular Probes zum Einsatz. Davon wurden Verdünnungen zwischen 1:300 und 1:1000 benutzt. Danach wurde nochmals mit TBS (pH 7,5) gewaschen und 20 Minuten mit dem Nucleinsäurefarbstoff Toto-3-jodid (2 µM verdünnt in 10 % BSA/TBS) gefärbt. Als nächstes wurden die Präparate für 10 Minuten mit 2 % Formalin (in PBS) nachfixiert und mit Dabco-Lösung überschichtet. Die Objektträger wurden abschließend mit einem Deckgläschen versehen.

Alle Inkubationen erfolgten in einer „feuchten Kammer“ und, wenn lichtempfindliche Farbstoffe benutzt wurden, in abgedunkelten Räumen.

In einigen Fällen wurde im Anschluss an eine indirekte Färbung (mit Primär- und entsprechendem Sekundärantikörper) mit einem zweiten, dieses mal direktmarkierten Primärantikörper derselben Spezies gefärbt. Um eine Reaktion des Sekundärantikörpers mit dem direktmarkierten Primärantikörper zu verhindern, wurde zwischen beiden Färbungen für 30 Minuten mit 1 % Normalserum (in 10 % BSA/TBS) inkubiert.

Die Präparate wurden mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Leica (Modell DM IRBE/TCS SP) untersucht. Dabei wurden die eingesetzten Farbstoffe jeweils separat angeregt und bei den spezifischen Emissionswellenlängen separat aufgenommen. Die Bearbeitung der erstellten Aufnahmen erfolgte unter Verwendung der Software Adobe Photoshop (Version 6.0).

Aufnahmen von Antikörpern, die mit „Alexa Fluor 488“ gekoppelt wurden, sind im Ergebnisteil dieser Arbeit grün dargestellt, mit „Alexa Fluor 546“ gekoppelte Antikörper dagegen rot. In der Bildunterschrift ist jeweils angegeben, ob ein direktmarkierter Antikörper eingesetzt wurde oder eine indirekte Färbung unter Einsatz eines entsprechend markierten Sekundärantikörpers erfolgte.

Wurde abweichend hiervon ein FITC-markierter oder durch den „Zenon Labeling“-Kit mit „Alexa Fluor 488“ gekoppelter Antikörper verwendet, so ist dies gesondert ausgewiesen.

2.2.2.7 Immunpräzipitation

Für jede Immunpräzipitation wurden $4 \cdot 10^5$ HeLa S3-Zellen eingesetzt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden sie mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und unter gelegentlichem Schütteln 20 Minuten in 3 ml Citratpuffer auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten bei 3500 g zentrifugiert, der Überstand isoliert und mit 10 µg Antikörper 4 Stunden bei 4 °C auf einem Rollinkubator inkubiert. Es wurden dann 50 µl Protein-G-Sepharose (angesetzt in IP-Puffer) zur Übernachtinkubation (unter Rollen) hinzuge-
setzt. Am Folgetag wurde einmal mit Citratpuffer gewaschen und das gebundene Protein sequentiell zweimal 10 Minuten mit 20/2 TE-Puffer (mit 2 % SDS) bei 37 °C von der Sepharose eluiert. Der Überstand wurde isoliert, mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf einem SDS-Gel analysiert.

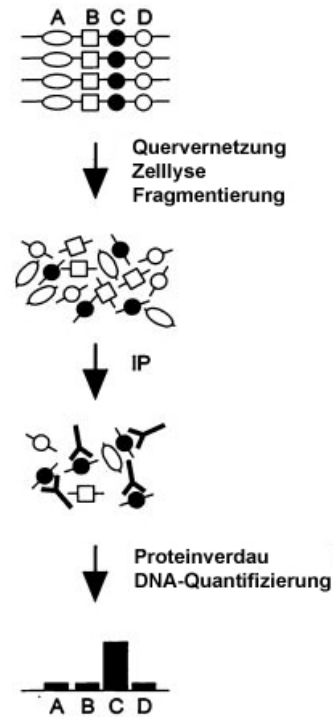


Abbildung 4: ChIP-Verlaufs-
schema für ein Protein (aus-
gefüllter Kreis), das an die
DNA-Sequenz C bindet. Mod-
ifiziert nach Marzio *et al.*,
1998.

2.2.2.8 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Durchführung der ChIP orientiert sich im Wesentlichen an dem von Upstate (Lake Placid/NY, USA) für den H3/K9-Dimethyl-Antikörper bereitgestellten Pro-
tokoll (siehe auch El-Osta *et al.*, 2002). Sie ist in
Abbildung 4 kurz schematisch dargestellt.

Für die ChIP wurden jeweils $8 \cdot 10^5$ HeLa S3-Zellen in zwei Zellkulturflaschen (80 cm²) ausgesät und für drei Tage kultiviert. Zur Quervernetzung von Proteinen mit Nucleinsäuren erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 1 % Formaldehyd in 15 ml serumfreiem Rohmedium für 10 Minuten. Die Reaktion wurde durch Herunterwaschen des Formaldehyds mit eiskaltem PBS (mit Proteaseinhibitor) gestoppt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst, für 5 Mi-
nuten bei 4 °C und 300 g zen-
trifugiert und in SDS-Lyse-
puffer (mit Proteaseinhibitor)
aufgenommen.

Zum Fragmentieren der DNA wurde ein mit einer Mikro-
spitze ausgerüsteter Ultra-
schall-Desintegrator (Modell
Sonifier 250 mit Regeleinheit
TM 2, Branson, Danbury/CT,
USA) benutzt. Hiermit wurde
die Zellsuspension (auf Eis
gekühlt) sechs mal für 10 Se-
kunden in zweiminütigen In-
tervallen beschallt. In zwei
Zentrifugationsschritten –
1000 g bzw. 16000 g, jeweils

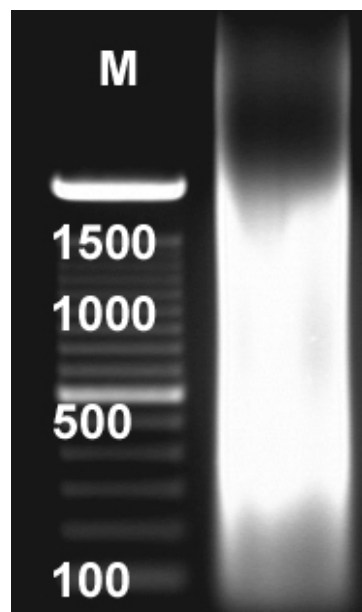


Abbildung 5: Die zur ChIP
eingesetzte Chromatin-Lö-
sung enthält vorwiegend
DNA-Fragmente zwischen
300 und 1300 bp. Die Grö-
ßenbestimmung erfolgte
nach Verdau von RNA mit
RNase A. 100 bp-Leiter
(M) in bp.

für 10 Minuten bei 4 °C – wurde unlösliches Material abgetrennt; der Überstand, welcher das gelöste Chromatin enthält, wurde weiter verwendet. Die darin enthaltenen DNA-Fragmente haben vorwiegend Längen von 300 bis 1300 bp (siehe Abbildung 5).

Je ChIP-Ansatz wurden 100 µl der Chromatin-Lösung eingesetzt, was einer ursprünglichen Zellzahl von $4\text{-}6\cdot 10^5$ Zellen entspricht. Die Lösung wurde 1:10 mit ChIP-Verdünnungspuffer verdünnt und mit 60 µl 1:4 vorverdünnter Protein G-Sepharose (in PBS mit 0,1 % BSA und 100 µg/ml Bäckerhefe-RNA) behandelt. Dies dient dem Abfangen unspezifisch an Protein G-Sepharose bindender DNA. Die Sepharose wurde nach zwei Stunden wieder abzentrifugiert (5 Minuten bei 2000 g und 4 °C). Der Überstand wurde weiterverwendet und über Nacht bei 4 °C auf einem Rollinkubator mit Antikörper (siehe Tabelle 3) inkubiert.

Die Präzipitation der DNA-Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte durch einstündige Inkubation bei 4 °C auf einem Rollinkubator mit 60 µl 1:4 vorverdünnter Protein G-Sepharose (in PBS mit 0,1 % BSA und 100 µg/ml Bäckerhefe-RNA). Um unspezifisch gebundene DNA von der Sepharose zu entfernen, wurde einmal mit Niedrigsalzwaschpuffer, einmal mit Hochsalzwaschpuffer, einmal mit Lithiumchlorid-Waschpuffer und zum Abschluss zweimal mit 20/2 TE-Puffer gewaschen. Verwendet wurden dabei jeweils 750 µl Puffer, gewaschen wurde für 3 bis 5 Minuten auf dem Rollinkubator (4 °C), und die Zentrifugation erfolgte bei 100 g für eine Minute (4 °C). Die spezifisch gebundenen Komplexe wurden schließlich sequentiell mit 2 x 100 µl frisch angesetztem Elutionspuffer in einem Schüttelinkubator, Modell Thermomixer comfort, (Eppendorf, Hamburg, Dtl.) bei 1000 Upm, und Raumtemperatur für 15 Minuten eluiert.

Das vereinigte Eluat (200 µl) wurde zur endgültigen Entfernung der Protein G-Sepharose bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 16000 g zentrifugiert; 150 µl des Überstandes wurden abgenommen und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. 100 µl des daraus resultierenden Überstandes wurden weiterverwendet. Die Auflösung der Quervernetzung erfolgte unter Zugabe von 4 µl 5 M Natriumchlorid-Lösung durch eine vierstündige Inkubation bei 65 °C auf dem Schüttelinkubator (500 Upm). Der Protein-Anteil der Probe wurde danach mit Proteinase K verdaut. Hierzu wurde der ChIP-Ansatz durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA und 4 µl 1 M Tris/HCl (pH 6,5) umgepuffert und mit 1 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 45 °C auf dem Schüttelinkubator erfolgte die Aufreinigung der DNA-Fragmente über eine „QiaQuick“-Aufreinigungssäule gemäß Protokoll des Herstellers (Qiagen). Die Elution wurde mit 50 µl des mitgelieferten Elutionspuffers durchgeführt.

Die Untersuchung der gewonnenen DNA-Fragmente erfolgte mittels quantitativer PCR. Die Proben für die polyklonalen Kaninchenseren wurden zuvor 1:50 vorverdünnt. Zur Quantifizierung der präzipitierten DNA wurde ein Ansatz verarbeitet, der weder mit Antikörper noch mit Protein G-Sepharose und Elutionspuffer behandelt wurde (Input).

Der Input wurde in vier Verdünnungsstufen eingesetzt. Die daraus mittels linearer Regression berechnete Standardkurve wurde zur Quantifizierung der anderen Proben verwendet und die Standardabweichung (ausgehend von einer Stichprobe) ermittelt.

Tabelle 3: Für die ChIP verwendete Antikörper

Antikörper	
BO-7	15 µg
MIB-1	15 µg
TuBB-9	15 µg
α-RNA Polymerase I	1,5 µl
α-UBF	1,5 µl
Kaninchen-Serum	1,5 µl
α-Dimethyl-Histon H3 (Lysin9)	1,5 µl

2.2.2.9 *Aufreinigung von Fusionsproteinen mit Hexahistidin-Peptid an Ni²⁺-Agarose*

Die Aufreinigung des Proteins aus dem isolierten Bakterienpellet durch IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) wurde gemäß Protokoll des „Qia-Expressionist“-Kits durchgeführt. Die dafür erforderlichen Puffer A - E wurden frisch angesetzt (Zusammensetzung siehe 2.1.2).

Für die denaturierende Aufarbeitung wurde das Zellpellet zunächst im guanidiniumchloridhaltigen Puffer A aufgelöst. Anschließend wurden 8 ml 50 %ige Ni²⁺-NTA-Agarose (in Puffer A gewaschen und equilibriert) hinzugegeben und unter Rühren für 45 Minuten inkubiert. Dann wurde die Suspension aus Zellfragmenten, Agarose und Puffer A in eine bereitgestellte Säule gefüllt und – nachdem der Puffer vollständig eingelaufen war – mit 80 ml Puffer A und 40 ml Puffer B gewaschen. Abschließend wurde solange mit Puffer C gewaschen, bis die Absorption (A_{280}) des Durchlaufs unter 0,01 lag.

Die Elution erfolgte im sauren Bereich mit 20 ml Puffer D und 20 ml Puffer E. Der Durchlauf wurde in 5 ml-Fractionen aufgefangen und spektralphotometrisch (A_{280}) sowie auch proteinbiochemisch (Western Blot, Untersuchung mit RGS·His₆-Antikörper) analysiert.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 100 mM Tris (pH 8,5) dialysiert. Schließlich wurde das Dialysat mit dem Zentrifugalkonzentrator Vivaspin20 (Ausschlussvolumen 10 kDa) von Vivascience (Hannover, Dtl.) eingengt und die Konzentration der Lösung durch eine Verdünnungsreihe auf einem Polyacrylamid-Gel bestimmt (Coomassie-Färbung).

Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung des Proteins unter Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin bei -70 °C.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 *Kultivierung von Säugetierzellen*

Säugetierzellen wurden in der Regel in T25-Kulturflaschen in 7 ml Kulturmedium im Brutschrank kultiviert (siehe dazu 2.1.2.3).

Zur Subkultivierung wurden die Zellen vom Medium befreit, mit PBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Adhärenente Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst.

2.2.3.2 *Kultivierung von transformierten E. coli-Zellen*

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen in einer Übernachtskultur erfolgte im Schüttelinkubator bei 37 °C über Nacht in 3,5 ml LB-Medium. Die dafür benötigten Zellen wurden mit einer Impföse oder einer Pipettenspitze von Agar-Platten entnommen.

Um Bakterien für eine Plasmid-Präparation in größerem Maßstab zu kultivieren, wurden 100 ml Medium mit ca. 1 ml der Vorkultur angeimpft und unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkultur selbst über Nacht inkubiert. Je nach Resistenz der zu präparierenden Plasmide wurde eine Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 30 µg/ml Kanamycin eingestellt.

Für die Proteinexpression in transformierten *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5αF'IQ wurden 500 ml LB-Medium mit einer Vorkultur inokuliert (Verdünnung: 1:20 – 1:50). Die Expression wurde nach 30 Minuten für 4 Stunden mit 1 mM IPTG induziert. Danach waren die Bakterien bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 bis 0,7 gewachsen. Dann wurden sie bei 4000 g abzentrifugiert, das Medium dekantiert und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Bestimmung von Zellzahlen

Zellzahlen von Säugetierzellen wurden unter Verwendung einer 0,0025 mm²-Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Dtl.) ermittelt.

2.2.3.4 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Säugetierzellen

Zum Einfrieren wurden etwa 10⁷ Zellen isoliert, in 1 ml eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen und in vorgekühlte Einfrierröhrchen überführt. Danach wurden die Zellen zunächst für 16 Stunden bei -70 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Zellen wurden langsam durch Zugabe von gekühltem Medium aufgetaut und anschließend in einer Verdünnungsreihe auf einer 48-well-Platte ausgesät. Die äußeren Vertiefungen der Platte wurden mit PBS gefüllt.

2.2.3.5 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Bakterien

Transformierte Bakterien wurden in Form von Glycerinkulturen konserviert. Dazu wurde Bakterienkultur mit 15 % (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Zum Auftauen wurde die Glycerinkultur zügig im Wasserbad (37 °C) erwärmt und in frischem, vorgewärmten Medium aufgenommen.

2.2.3.6 Herstellung von Cytozentrifugenpräparaten

Cytozentrifugenpräparate wurden mit der Cytospin 3-Zentrifuge (Shandon, Pittsburgh/PA, USA) hergestellt. Die zu präparierenden Zellen wurden geerntet und in sterilfiltriertem PBS/10 % BSA aufgenommen. Dabei wurde eine Zelldichte von 5·10⁵/ml eingestellt. Je Präparat wurden 100 µl Zellsuspension bei 800 Upm (75 g) für 4 Minuten auf einen Objektträger zentrifugiert.

Anschließend wurden die Zellen vier Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann entweder direkt weiterverwendet oder bei -70 °C eingefroren.

2.2.3.7 Mikromanipulation von HEp-2-Zellen

Für Mikroinjektionsstudien wurden jeweils 3-4·10⁵ HEp-2-Zellen auf ein Glasbodenschälchen mit 35 mm Durchmesser (MatTek, Ashland/MA, USA) ausgesät und über Nacht kultiviert.

Die Versuche wurden mit der Mikroinjektionsanlage (Modell Micromanipulator 5171 und Transjector 5246) von Eppendorf (Hamburg, Dtl.) unter Verwendung von Glasinjektionsspitzen (Femtotips II von Eppendorf, Hamburg, Dtl.) durchgeführt. Je Schälchen wurden 50 Zellen mit Antikörperlösung (2 mg/ml in PBS) bei einem Kompensationsdruck von etwa 60 hPa injiziert.

2.2.4 Gentechnische Methoden

2.2.4.1 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen (Stämme XL10-Gold-Kan und DH5 α F'IQ)

Die bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten kompetenten Zellen wurden langsam im Eisbad aufgetaut und schließlich für 10 Minuten mit 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol versetzt, während die DNA, mit der transformiert werden sollte, 5 Minuten bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurde.

Anschließend wurden je Ansatz 40 μl Bakteriensuspension vorgelegt, mit 2 μl DNA (z. B. Ligationsansatz) gemischt und zur DNA-Anlagerung 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA in die kompetenten Zellen wurde ein Hitzeschock für 30 Sekunden (Stamm XL10-Gold-Kan) bzw. 2 Minuten (Stamm DH5 α F'IQ) bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Nach kurzem Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden 0,45 ml auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und weitere 60 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ schüttelnd inkubiert. Danach wurde das komplette Volumen an Zellsuspension auf mehrere LB-Agar-Platten mit gewünschtem Antibiotikum plattiert, die zur Blau/Weiß-Selektion mit 100 μl 2 % (w/v) X-Gal und 10 μl 0,1 M IPTG vorinkubiert wurden. Die Platten wurden über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert.

Zusätzlich zu jeder Transformation wurde eine Vektorkontrolle (Ansatz ohne Insert-DNA) angesetzt.

Die Transformationen wurden durch Restriktionsspaltungen, spezifische PCR, partielle Sequenzierung mit dem A.L.F. DNA Sequencer (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) oder Gesamtsequenzierung bei GATC Biotech (Konstanz, Dtl.) geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung neuer monoklonaler Antikörper gegen das Ki-67-Protein

Die zelluläre Funktion des Ki-67-Proteins ist bisher größtenteils unverstanden. Ausgehend von vorherigen experimentellen Befunden sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Antikörper gegen eine zum Teil hochkonservierte Proteinregion hergestellt werden, die in der Folge als Untersuchungswerkzeug für neue Funktionsanalysen dienen können.

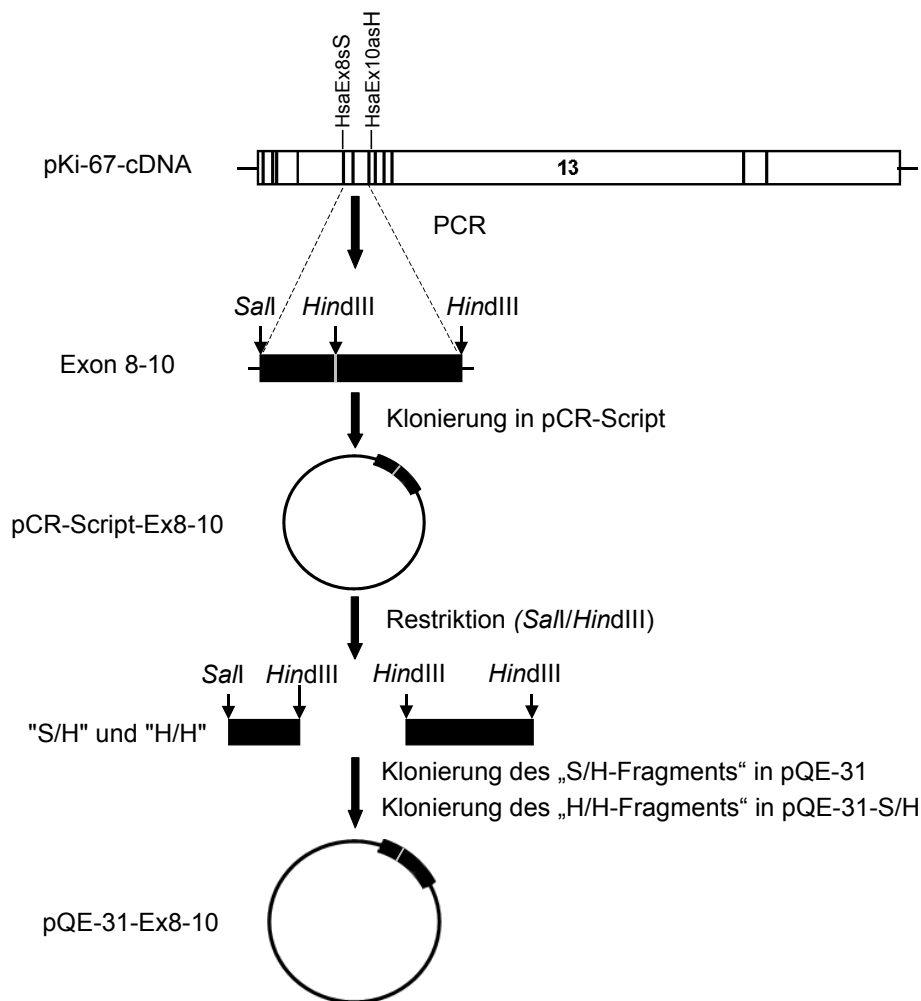


Abbildung 6: Schema der Klonierung der Exons 8-10 in pQE-31. Die Exons 8-10 aus der pKi-67-cDNA wurden mit zwei Primern amplifiziert, die am Ende Restriktionsschnittstellen für *SalI* und *HindIII* einführen. Zunächst wurde das PCR-Produkt in pCR-Script kloniert. Die anschließende Umklonierung in pQE-31 erfolgte in zwei Schritten: pCR-Script wurde mit *SalI* und *HindIII* gespalten. Die resultierenden Fragmente wurden aufgetrennt und sequentiell in pQE-31 kloniert.

Hierfür sollte zunächst die cDNA des von den Exons 8-10 kodierten Bereichs kloniert und als „His-Tag“-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden. Mit dem aufgereinigten Protein

sollten dann Mäuse immunisiert werden, um unter Anwendung der Hybridomtechnik spezifische Antikörper gewinnen zu können.

3.1.1 Klonierung der cDNA von Exon 8-10 des Ki-67-Proteins in einen *E. coli*-Expressionsvektor

Für die Klonierung der cDNA der Exons 8-10 wurde RNA aus HeLa-Zellen gewonnen und revers transkribiert. Unter Verwendung der beiden Primer HsaEx8sS und HsaEx10asH konnte in einer PCR mit *Pfu* DNA Polymerase ein den Exons 8-10 entsprechendes cDNA-Fragment amplifiziert werden. Dabei wurden zur Erleichterung der nachfolgenden Klonierung die jeweiligen Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen *SalI* und *HindIII* eingeführt (siehe Abbildung 6). Das PCR-Produkt wurde *blunt end* in den mit *SrfI* linearisierten Klonierungsvektor pCR-Script kloniert und die Richtigkeit der Sequenzen durch eine DNA-Sequenzierung überprüft.

Aufgrund einer endogenen *HindIII*-Schnittstelle musste die folgende Umklonierung in den Expressionsvektor pQE-31 in zwei Schritten durchgeführt werden. Dazu wurde der Vektor pCR-Script-Ex8-10 mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *HindIII* geschnitten. Die Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und isoliert: erstens eine 246 bp lange DNA, die Exon 8 sowie einen Teil von Exon 9 umfasst und zwischen den Erkennungssequenzen von *SalI* und *HindIII* liegt („S/H-Fragment“), zweitens der 367 bp lange in 3'-Richtung liegende Abschnitt, der den Rest von Exon 9 sowie Exon 10 umfasst und zwischen den beiden *HindIII*-Stellen liegt („H/H-Fragment“).

Das S/H-Fragment wurde in den Expressionsvektor pQE-31 kloniert; in das daraus resultierende Konstrukt pQE-31-S/H wurde das H/H-Fragment insertiert (Produkt: pQE-31-Ex8-10). Die richtige Orientierung der Fragmente wurde mittels Hydrolyse durch Restriktionsenzyme belegt.

3.1.2 Expression des „His-Tag“-Fusionsproteins in *E. coli* und Aufreinigung des Fusionspeptids an Ni²⁺-NTA-Agarose (IMAC)

Das durch den Vektor pQE-31-Ex8-10 kodierte „His-Tag“-Fusionsprotein (Gesamtsequenz siehe Anhang) wurde in *E. coli*-Bakterien (Stamm DH5αF'IQ) exprimiert und mittels IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) an Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte durch einen Western Blot (siehe

Abbildung 7). Konzentrationsbestimmungen ergaben, dass aus einem Liter Kultur durchschnittlich etwa 0,6 mg Protein gewonnen werden konnten.

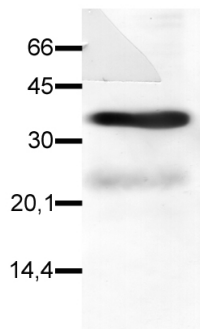


Abbildung 7: Der für das Hexahistidin-Peptid spezifische Antikörper RGS-Anti-His₆ erkennt das „His-Tag“-Fusionsprotein. Aufgereinigtes Protein wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Antikörper detektiert ein Hauptprodukt eines scheinbaren Molekulargewichts von 34 kDa und ein Nebenprodukt von 24 kDa. Größenmarkierungen in kDa.

3.1.3 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen das Fusionsprotein

Unter Verwendung des aufgereinigten Fusionsproteins konnten mittels Hybridomtechnik monoklonale Antikörper gewonnen werden. Diese Arbeiten wurden in der Laborgruppe Tumorbio­logie (FZB, Borstel, Dtl.) von Frau Bettina Baron-Lühr und Herrn Dr. Thomas Scholzen nach einem Standardprotokoll (Key *et al.*, 1993) durchgeführt.

Ausgewählte Hybridomzelllinien wurden bis zur klonalen Reinheit subkultiviert und deren Kulturüberstände auf Antikörperspezifität getestet. Dies geschah im Wesentlichen durch Untersuchung des Färbemusters auf Gefrierschnitten humaner Tonsillen im Vergleich mit MIB-1, dem Standard-Antikörper gegen das Ki-67-Protein.

Mit diesem Auswahlverfahren konnten mehrere Zellklone identifiziert werden, die Antikörper gegen das Ki-67-Protein sezernieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der gegen die durch Exon 9 kodierte Region gerichtete Antikörper TuBB-9 (kurz für: *Tumorbio­logie Borstel*) verwendet und weiter charakterisiert.

Die Spezifität des Antikörpers TuBB-9 wurde im Western Blot eines HeLa-Zelllysats untersucht. Wie in Abbildung 8 dargestellt, erkannten sowohl MIB-1 als auch TuBB-9 die charakteristische pKi-67-Doppelbande bei ca. 315/350 kDa

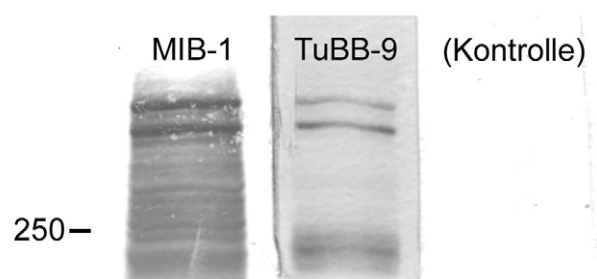


Abbildung 8: MIB-1 und TuBB-9 erkennen die pKi-67-spezifische Doppelbande bei 315/350 kDa. Analyse im Western Blot von HeLa-Zelllysate. Je ein Streifen wurde mit den angegebenen bzw. keinem Primärantikörper inkubiert. Größenmarkierung in kDa.

(Gerlach *et al.*, 1998) sowie eine unterschiedliche Anzahl schwächerer Banden, die vermutlich durch proteolytische Spaltprodukte hervorgerufen werden. Dagegen war auf Blots, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurden, keinerlei Reaktivität erkennbar. Dies zeigt, dass mit dem neuen Antikörper TuBB-9 pKi-67 im Blot detektiert werden kann.

Des Weiteren wurde überprüft, inwieweit TuBB-9 auch natives Ki-67-Protein zu erkennen vermag. Hierfür wurde eine Immunpräzipitation aus HeLa-Zelllysate mit den Antikörpern BO-7 (Isotypkontrolle), MIB-1 und TuBB-9 durchgeführt. Der Proteinnachweis auf dem anschließenden Blot erfolgte unter Verwendung von MIB-1. Wie in Abbildung 9 gezeigt ist, ließ sich natives Ki-67-Protein mit dem Antikörper TuBB-9 ebenso wie mit dem Standardantikörper MIB-1 präzipitieren, während mit dem für IL-2 spezifischen Antikörper BO-7 erwartungsgemäß keine mit MIB-1 darstellbaren Proteine präzipitiert wurden.

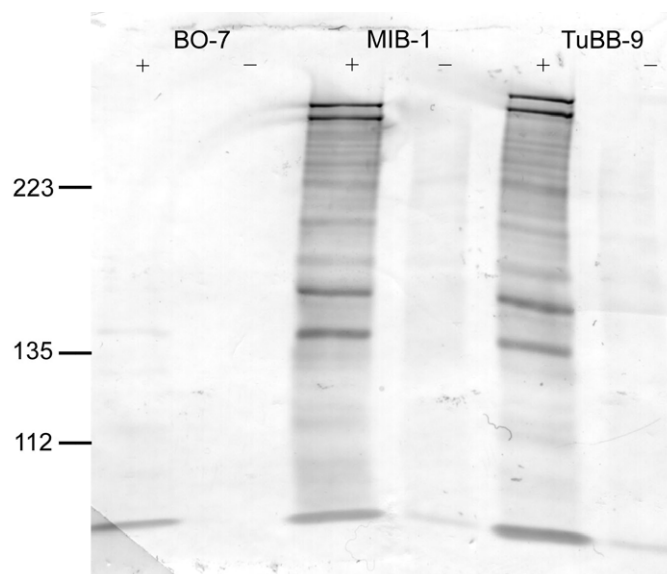


Abbildung 9: MIB-1 und TuBB-9 präzipitieren pKi-67 aus HeLa-Zelllysate. Die verwendeten Antikörper sind angegeben. Nachweis von pKi-67 auf dem Blot mit MIB-1. „+“ : Elution der IP-Komplexe von der Protein G-Sepharose mit Elutionspuffer. „-“ : Protein G-Sepharose wurde statt mit Elutionspuffer mit der gleichen Menge Citratpuffer gewaschen. Größenmarkierungen in kDa.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Antikörper TuBB-9 sowohl denaturiertes pKi-67 auf dem Western Blot nachweisen als auch natives Protein aus einem Zelllysate binden kann, sollte – wieder im Vergleich mit MIB-1 – untersucht werden, inwieweit er sich eignet, die Fraktion an proliferierenden Zellen im immunocytochemischen Nachweis zu bestimmen. Eine hierzu gut geeignete Technik ist die Färbung von formaldehydfixierten Gefrierschnitten humaner Tonsillen, da diese (neben Bereichen geringerer proliferativer Aktivität) Keimzentren enthalten, in denen B-Zellen proliferieren.

In Abbildung 10 ist ein solcher Schnitt gezeigt, der mit den Antikörpern MIB-1 und TuBB-9 gefärbt und daraufhin mit konfokaler Laserrastermikroskopie dokumentiert

wurde. Zur Sichtbarmachung der Zellkerne erfolgte eine Gegenfärbung mit dem Nucleinsäure-Farbstoff Toto-3-jodid. Beide Antikörper färbten dieselben Zellen im Keimzentrum im oberen Teil des gezeigten Tonsillenschnittes, während die Zellen der so genannten Mantelzone weitgehend ungefärbt blieben (siehe Nucleinsäure-Färbung).

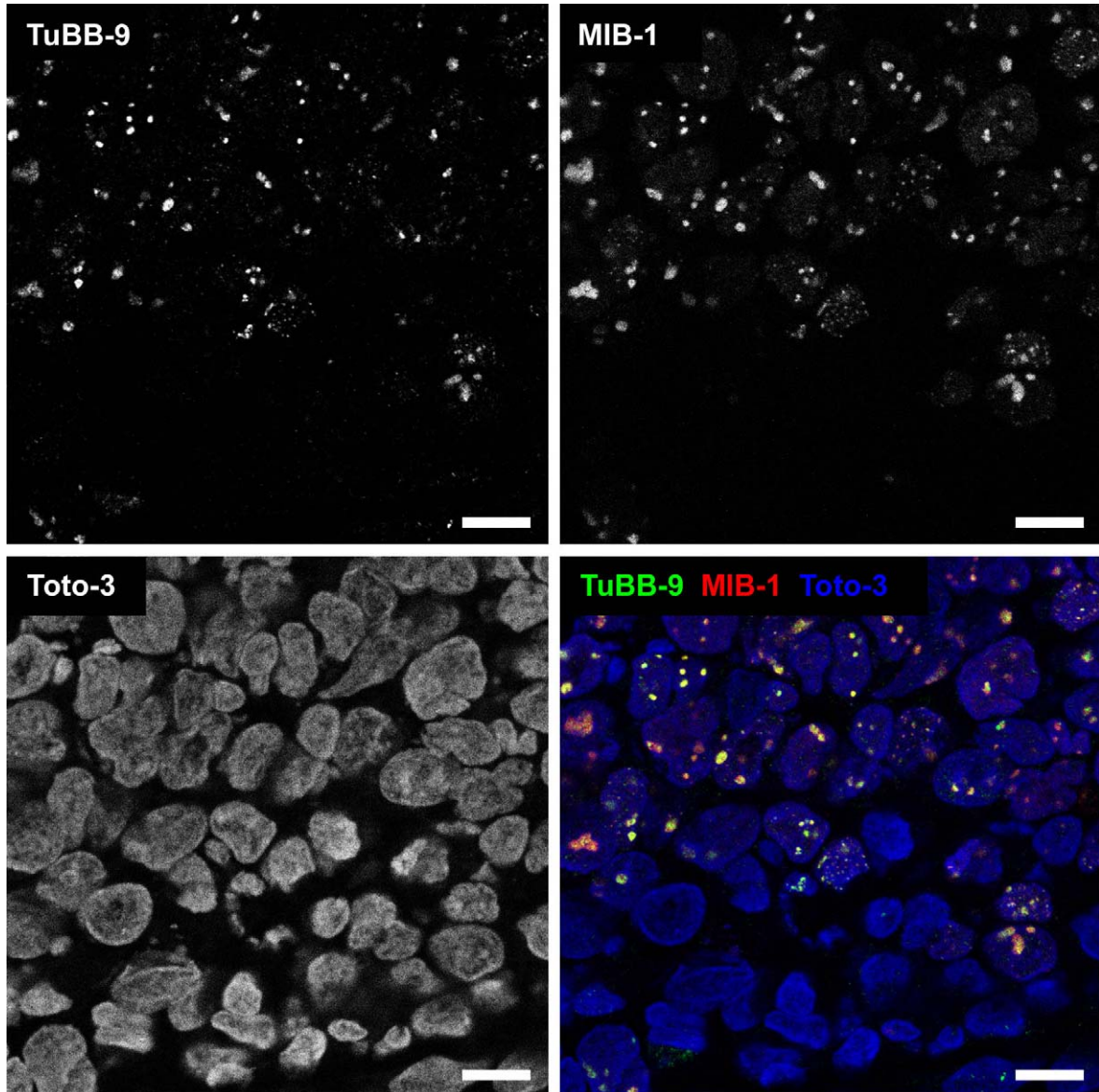


Abbildung 10: TuBB-9 (indirekter Nachweis, grün) und MIB-1 (direktmarkiert, rot) färben dieselbe Zellpopulation in einem Gefrierschnitt einer humanen Tonsille. Die großkernigen, pKi-67-positiven Zellen (oberer Bereich des Bildausschnitts) befinden sich im proliferativ aktiven Keimzentrum, während die Population kleinkerniger Zellen in der Mantelzone (unterer Bildausschnitt) weniger stark proliferiert. Färbung gegen Nucleinsäuren mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

3.2 Untersuchungen zu Lokalisation und Funktion des Ki-67-Proteins mit den Antikörpern MIB-1 und TuBB-9

3.2.1 Die intrazelluläre Lokalisation des Ki-67-Proteins – Vergleichende Analyse mit den Antikörpern MIB-1 und TuBB-9

Ein Ansatz zur Untersuchung der zellulären Funktion eines Proteins stellt die Einordnung in einen Funktionszusammenhang durch die Bestimmung der Lokalisation innerhalb der Zelle dar. Daher sollte – nachdem gezeigt werden konnte, dass MIB-1 und TuBB-9 dieselbe Zellpopulation eines Gefrierschnitts einer humanen Tonsille färben – die intrazelluläre Färbung beider Antikörper verglichen werden.

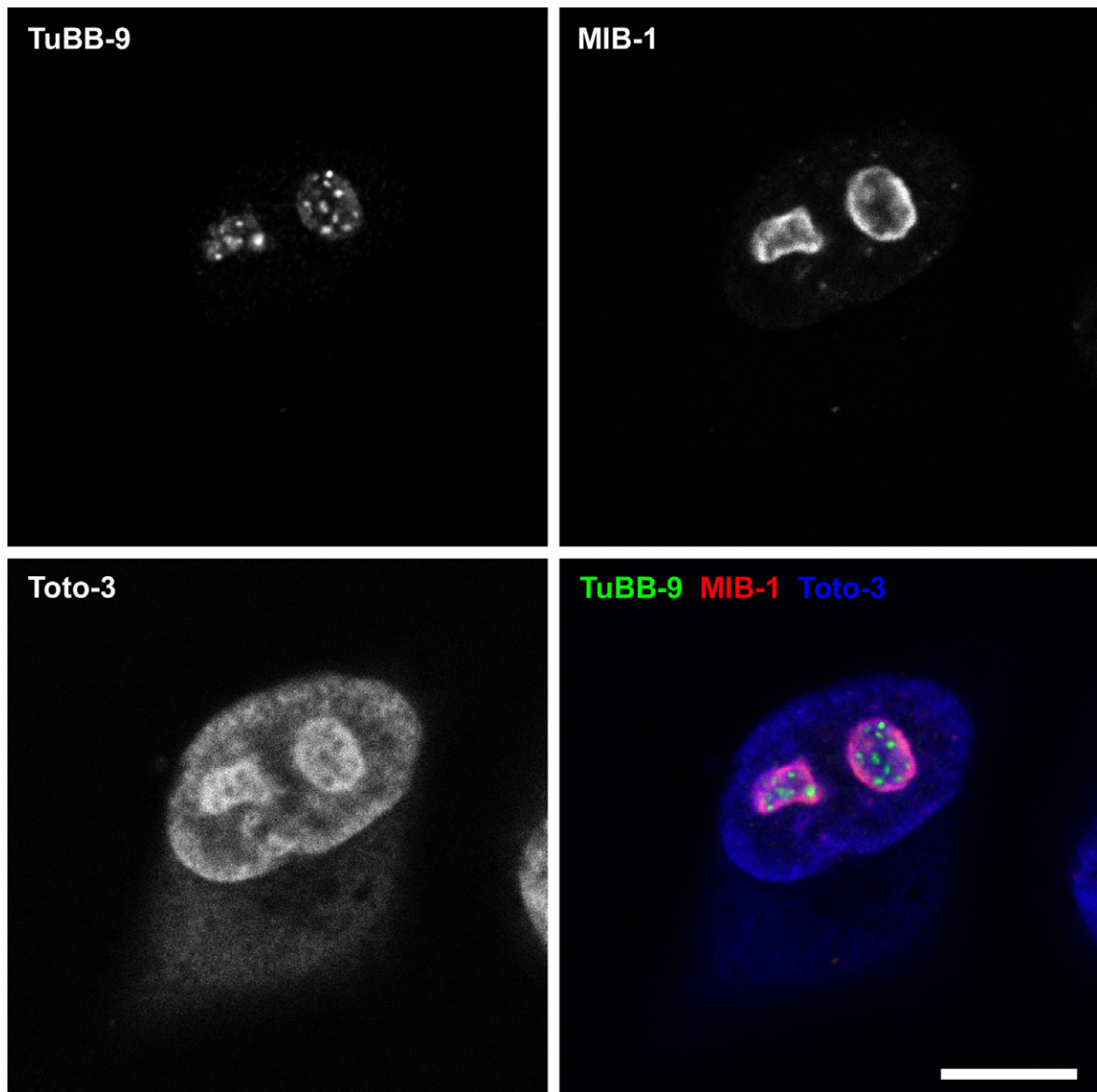


Abbildung 11: Die Doppelfärbung von HeLa-Zellen (Interphase) mit TuBB-9 (indirekter Nachweis, grün) und MIB-1 (direktmarkiert, rot) zeigt ein unterschiedliches Muster: MIB-1 färbt hauptsächlich den Nucleolusrand, TuBB-9 dagegen innernucleoläre Punkte. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Immuncytologische Experimente mit TuBB-9 deckten eine unerwartete Verteilung des Ki-67-Proteins in HeLa-Zellen auf, die sich erheblich von der mit MIB-1 bestimmten unterschied. Interessanterweise ließen sich dabei für TuBB-9 in Interphase-Zellen zwei distinkte Färbemuster beobachten (siehe Abbildungen 11 und 12). Die am häufigsten vorkommende Verteilung ist in Abbildung 11 dargestellt: MIB-1 zeigte die typische vor allem im Randbereich der Nucleoli zu findende Färbung, die noch einige strukturierte Ausläufer in weiter innenliegende Bereiche besaß. Die Nucleoli selbst waren – wahrscheinlich aufgrund ihres hohen RNA-Gehalts – als auffällige Strukturen im Zellkern klar durch die Toto-3-Färbung identifizierbar. Im Gegensatz zu MIB-1 färbte TuBB-9 kleine, aber deutlich abgegrenzte innernucleoläre Punkte. Sie befanden sich bevorzugt in den Regionen, in denen die MIB-1-Färbung im Inneren des Nucleolus nur schwach war. Die Toto-3-Färbung zeigte an diesen Punkten eine niedrige Intensität, was auf eine niedrige Nucleinsäure-Dichte schließen lässt. Zudem war aber mit TuBB-9 auch an denjenigen Orten eine diffuse Färbung nachweisbar, an denen MIB-1 am stärksten färbte, also insbesondere am Nucleolusrand (siehe Überlagerung).

Das oben erwähnte zweite Färbemuster, welches in 10 bis 15 %

der HeLa-Zellen bevorzugt in Randbereichen von Zellverbänden auftrat, ist in Abbildung 12 dargestellt. Die TuBB-9-Färbung zeigte hier ein völlig verändertes Bild: Die gesamte Färbung war auf wenige intensiv gefärbte, große Punkte konzentriert. Diese waren zum Teil mit den Nucleoli assoziiert (Pfeilköpfe) oder aber unabhängig von ihnen im Nucleoplasma zu finden (Pfeile). Interessanterweise war die Intensität der Toto-3-Färbung in den letztgenannten Bereichen immer niedrig. Die Nucleoli erschienen in nahezu allen Zellen mit diesen nucleoplasmatischen Punkten außergewöhnlich gerundet und die MIB-1-Lokalisation war sehr stark auf den äußersten Rand konzentriert.

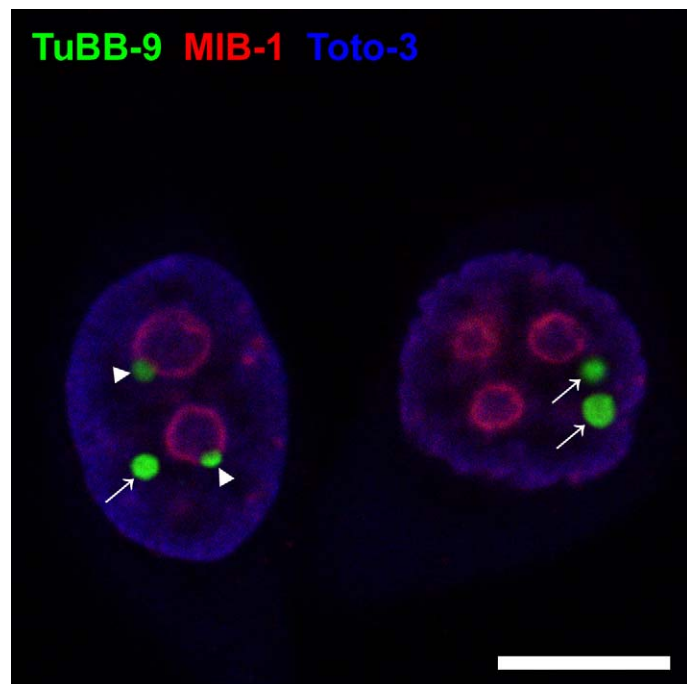


Abbildung 12: In einem Teil der Zellen färbt TuBB-9 große, runde, nucleoplasmatische (Pfeile) oder nucleolusassoziierte Punkte (Pfeilköpfe). Doppelfärbung von HeLa-Zellen (Interphase) mit den Antikörpern TuBB-9 (indirekter Nachweis, grün) und MIB-1 (direktmarkiert, rot). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

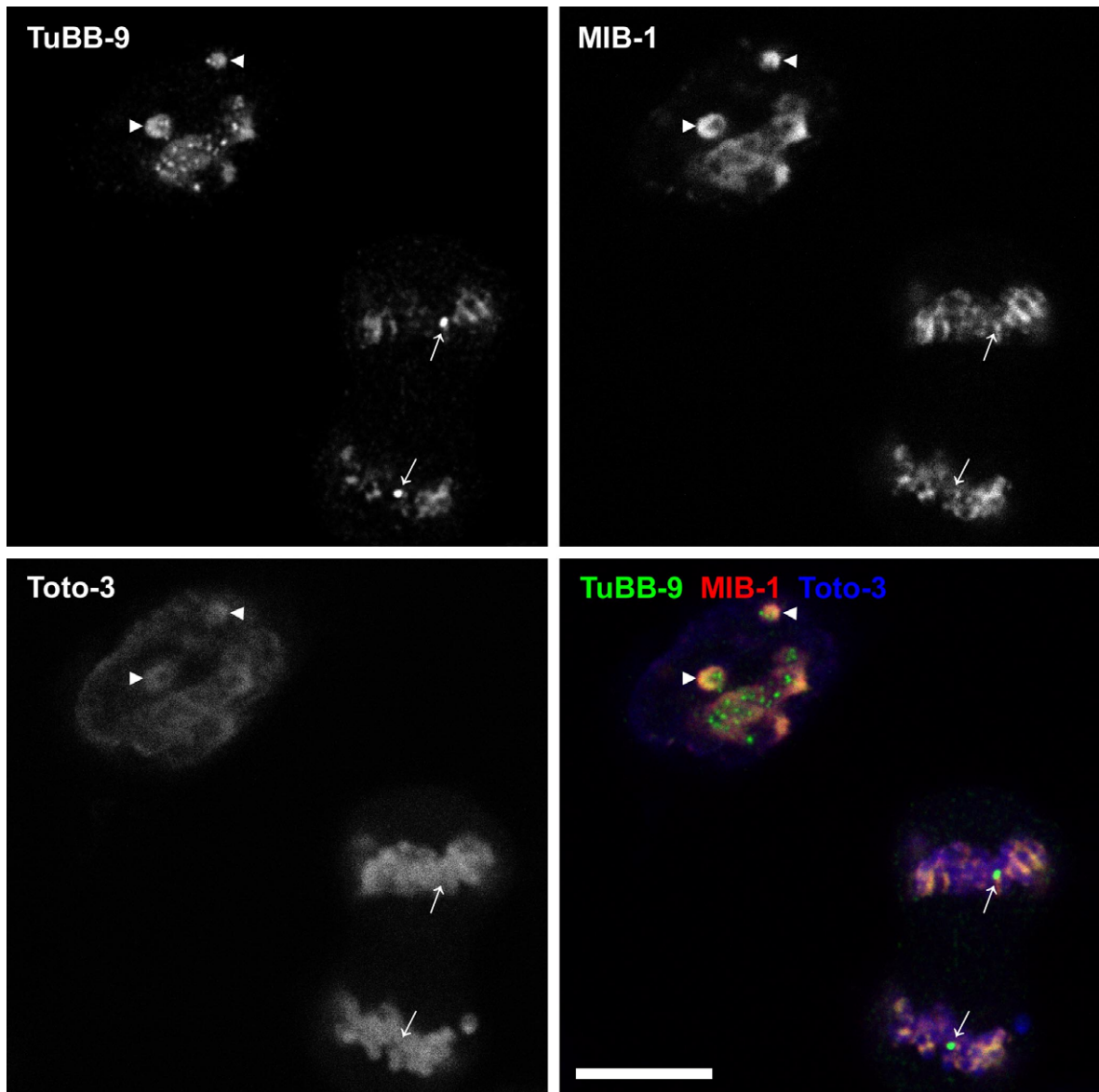


Abbildung 13: In HeLa-Zellen liegt in der frühen G_1 -Phase eine partielle Kolokalisation zwischen TuBB-9 (indirekter Nachweis, grün) und MIB-1 (direktmarkiert, rot) vor (Pfeilköpfe), während die Muster in der Anaphase unterschiedlich sind: TuBB-9 färbt vorwiegend abgegrenzte Punkte (Pfeile), MIB-1 die perichromosomale Schicht. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 μ m.

Darüber hinausgehend wurde die Verteilung des Ki-67-Proteins während der Mitose und der frühen G_1 -Phase studiert. In einer unsynchronisierten Kultur befindet sich ständig ein Anteil von etwa 10 % der Zellen in der Mitose. In Abbildung 13 ist eine mitotische HeLa-Zelle (Anaphase, rechts unten) neben einer Zelle in der frühen G_1 -Phase gezeigt (links oben). Die Anaphase ließ sich durch das kondensierte Chromatin und die gegenüberliegende Anordnung der Chromosomen identifizieren (siehe Nucleinsäure-Färbung). Dagegen erschien die Toto-3-Färbung der Zelle in der frühen G_1 -Phase aufgrund der wesentlich geringeren Chromatin-Kondensation schwächer. Die Nucleoli waren noch nicht wieder ausgebildet; sie werden erst im Laufe der G_1 -Phase aus den hier mit Pfeilköpfen gekennzeichneten *pre-nucleolar bodies* (PNBs) aufgebaut (Dundr *et al.*, 2000). In der frühen G_1 -

Phase findet man das Ki-67-Protein zum Teil in kleinen Flecken, die unter anderem mit heterochromatischen Regionen kolokalisieren (Bridger *et al.*, 1998). Daneben befand sich aber offenbar ein Teil des Proteins in den PNBs, wie die Färbung mit den Antikörpern TuBB-9 und MIB-1 zeigte (Pfeilköpfe). Ein Teil der TuBB-9-Färbung war in den innernucleolären Punkten (wie bereits in der in Abbildung 11 gezeigten Zelle zu erkennen) zu finden, die auch hier von einer diffusen Färbung umgeben waren. Letztere kolokalisierte wiederum mit dem durch MIB-1 gefärbten Bereich. Die mitotische Zelle zeigte wie auch die Interphase-Zelle aus Abbildung 11 eine fast komplette Divergenz der Färbemuster. Während MIB-1 – wie in der Literatur vielfach beschrieben – die perichromosomale Schicht anfärbte, war die TuBB-9-Färbung in einzelnen, klar umgrenzten Punkten (Pfeile) zu finden, die sich relativ zur Teilungsebene oftmals gegenüber lagen. Die Färbung der perichromosomalen Schicht durch TuBB-9 war nur schwach ausgeprägt.

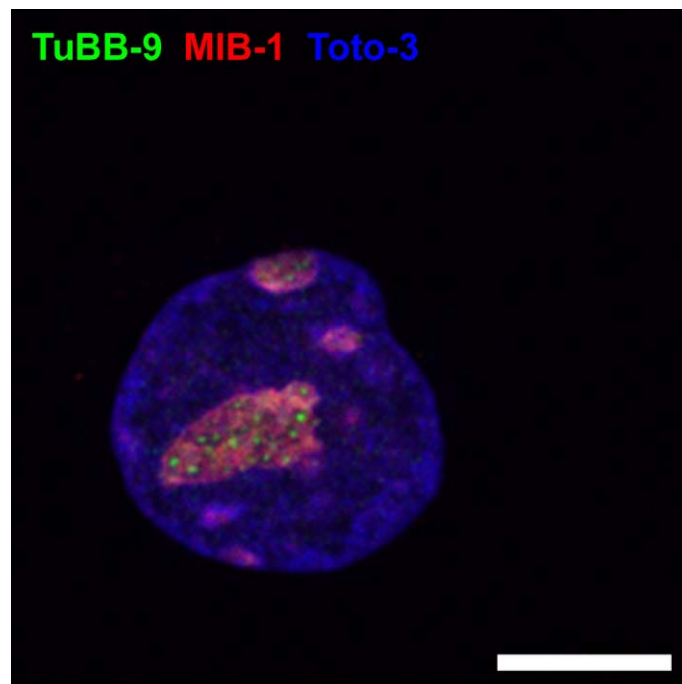


Abbildung 14: Die Doppelfärbung eines HDLM-2-Cytozentrifugenpräparats mit TuBB-9 (indirekter Nachweis, grün) und MIB-1 (direktmarkiert, rot) zeigt ein im Vergleich zu HeLa-Zellen ähnliches Muster. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Diese Befunde ließen sich durch Untersuchungen an anderen Zelllinien bestätigen. Die humane Hodgkin-Lymphom-Zelllinie HDLM-2 zeigte eine gegenüber HeLa-Zellen unterschiedliche Kernfärbung mit einer diffuseren Struktur und weitaus weniger ausgeprägten, zum Teil an der Kernhülle lokalisierten Nucleoli (siehe Abbildung 14). Die MIB-1-Färbung war schwächer und nicht so sehr auf den Rand konzentriert, aber gleichfalls in den Nucleoli zu finden. Wie in HeLa-Zellen zeigte TuBB-9 ein Muster von gleichmäßig über

den Nucleolus verteilten innernucleolären Punkten. Letzteres lässt sich auch für die Doppelfärbung von L-428-Zellen konstatieren, welche ebenfalls von einem Hodgkin-Lymphom abstammen (siehe Abbildung 15). Diese Abbildung zeigt wiederum, dass die innernucleolären Punkte zwar nicht streng regelmäßig verteilt waren und nicht dieselbe Größe hatten, aber doch jeweils einen annähernd gleichen Abstand voneinander besaßen.

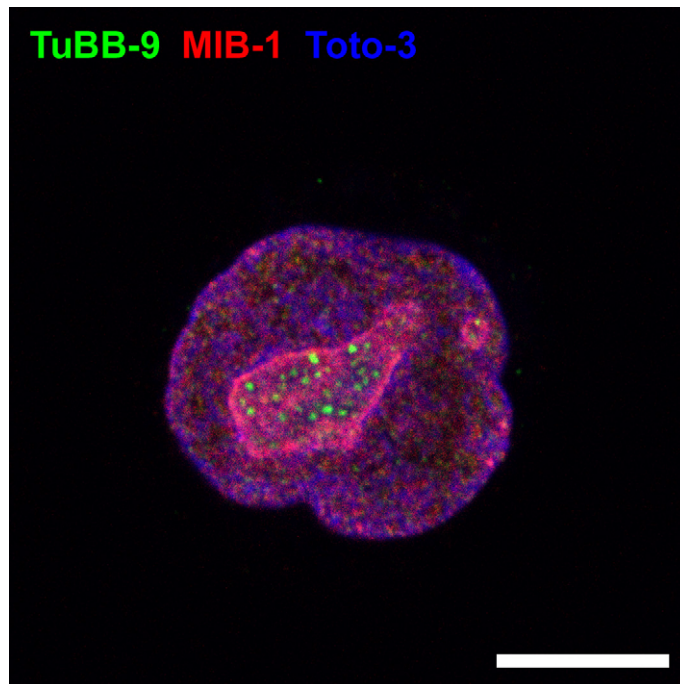


Abbildung 15: Die Doppelfärbung eines L-428-Cytozentrifugenpräparats (Interphase) mit TuBB-9 (indirekter Nachweis, grün) und MIB-1 (direktmarkiert, rot) zeigt ein im Vergleich zu HeLa-Zellen ähnliches Muster. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 μ m.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Befunde zeigen, dass die Färbung von TuBB-9 ein deutlich anderes Muster im Zellkern aufwies als die des ebenfalls gegen pKi-67 gerichteten Antikörpers MIB-1. Eine ausgeprägte Kolokalisation beider Muster war im Verlauf des Zellzyklus' nur in der frühen G₁-Phase zu erkennen.

3.2.2 Die intrazelluläre Lokalisation des Ki-67-Proteins – Kolokalisation mit anderen nucleären Strukturen

Im Folgenden sollte die Verteilung des Ki-67-Proteins im Vergleich mit anderen nucleären Proteinen studiert werden. Dazu wurde zunächst eine Doppelfärbung von HeLa-Zellen mit MIB-1 und einem anti-Nucleolin-Antikörper durchgeführt. Von Nucleolin, einem multifunktionellen Protein, wird unter anderem vermutet, dass es an der frühen Prozessierung der rRNA-Primärtranskripte beteiligt ist (Ginisty *et al.*, 1999; Piñol-Roma, 1999; Srivastava und Pollard, 1999). Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, zeigten beide Muster einen hohen Grad an Übereinstimmung am Rand der Nucleoli. Darüber hinaus färbte besonders MIB-1 einen strukturierten Bereich im Inneren (vgl. auch Abbildung 11).

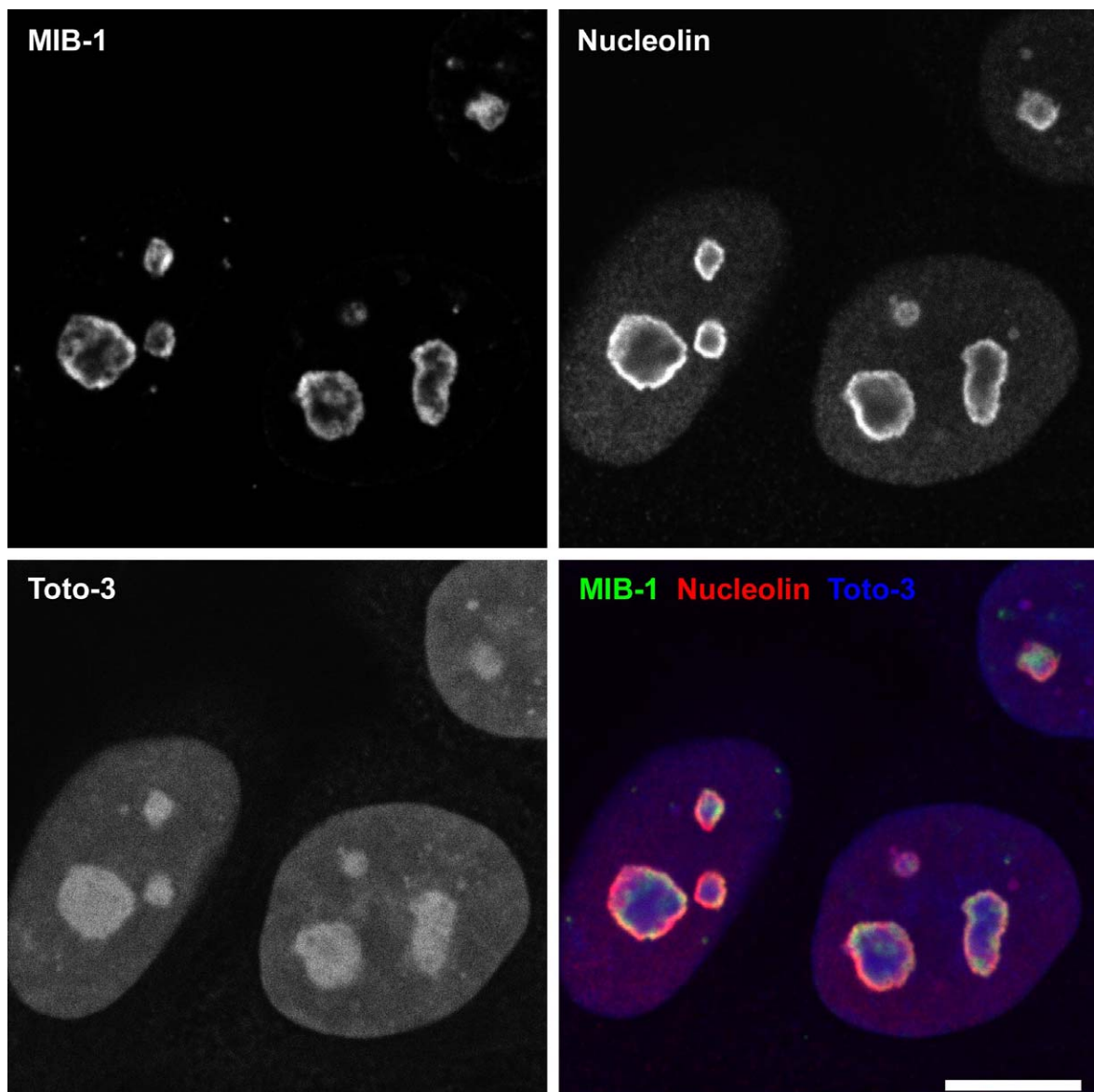


Abbildung 16: Die Doppelfärbung von HeLa-Zellen (Interphase) mit MIB-1 (direktmarkiert, grün) und einem anti-Nucleolin-Antikörper (indirekter Nachweis, rot) zeigt eine Kolokalisation am Rand der Nucleoli. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

In der Mitose kolokalisierte die Nucleolin-Färbung an der perichromosomalen Schicht mit MIB-1 (nicht gezeigt).

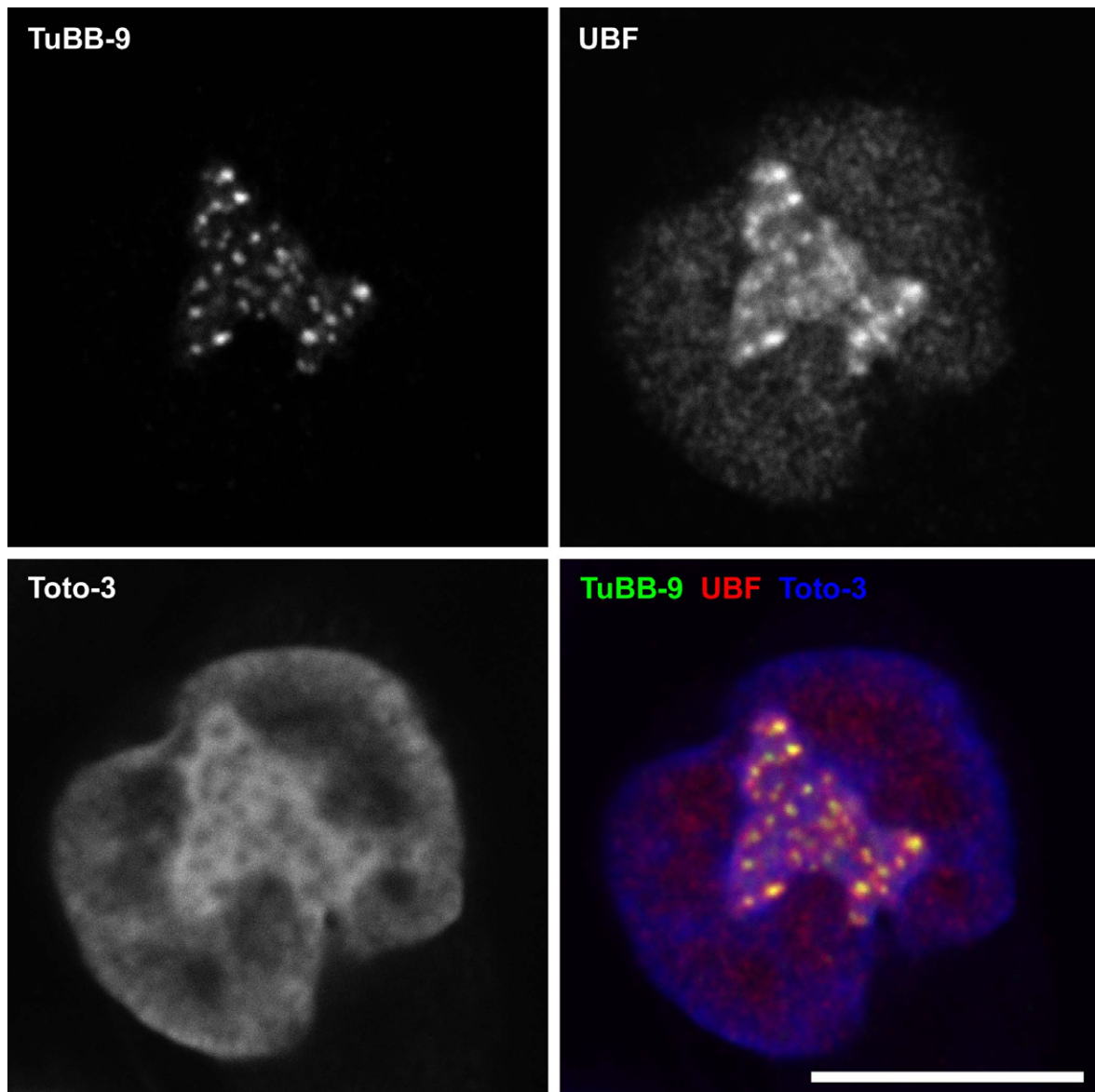


Abbildung 17: TuBB-9- und anti-UBF-Färbung kolokolisieren in HeLa-Zellen (Interphase) in inner-nucleolären Punkten. TuBB-9 (grün) und anti-UBF-Antikörper (rot) wurden indirekt nachgewiesen. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Da das im vorigen Abschnitt gezeigte Muster der durch TuBB-9 angefärbten inner-nucleolären Punkte den Verdacht nahegelegt hatte, dass pKi-67 mit Komponenten des rDNA-Transkriptionsapparats kolokolisieren könnte, wurde auf diese bei Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen andere nucleoläre Proteine besonderes Augenmerk gelegt. Zunächst wurde die Verteilung von dem durch TuBB-9 detektierten Ki-67-Protein mit der von UBF (*upstream binding factor*), einem an der Transkriptionsinitiation beteiligten Protein (Goenechea *et al.*, 1992; Zatsepina *et al.*, 1996; Klein und Grummt, 1999), verglichen. In Interphase-Zellen (siehe Abbildung 17) zeigte UBF innerhalb des Nucleolus – abgesehen

von einer diffusen, durchgehenden Färbung – dasselbe innernucleoläre punktförmige Muster wie TuBB-9. Wenngleich sich diese Punkte in ihrer Intensität zwischen TuBB-9 und UBF unterschieden, so war festzustellen, dass beide genau die Areale ausfüllten, die in der Toto-3-Färbung als Orte niedriger Nucleinsäuredichte erschienen. Auch in Zellen, in denen das Muster mit den großen nucleoplasmatischen Punkten in der TuBB-9-Färbung auftrat, lag eine fast vollständige Kolo-kalisation beider Färbungen vor (siehe Pfeilköpfe in Abbildung 18). Besonders interessant erscheint die Feinstruktur des Punktes, die in beiden Fällen identisch war.

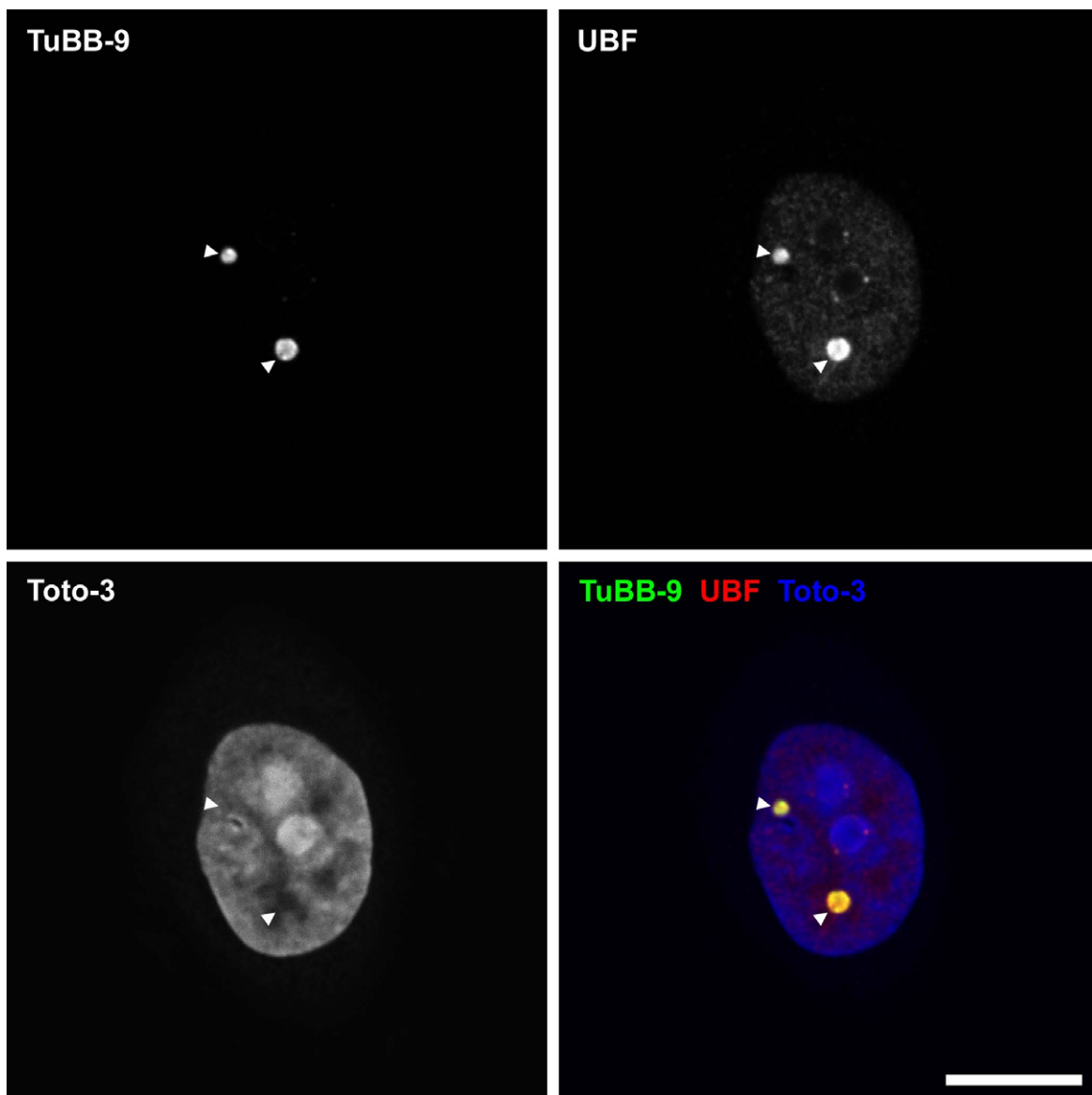


Abbildung 18: Die Färbung gegen UBF (indirekter Nachweis, rot) gleicht der von TuBB-9 (indirekter Nachweis, grün) auch in HeLa-Zellen mit großen nucleoplasmatischen Punkten (Pfeilköpfe). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

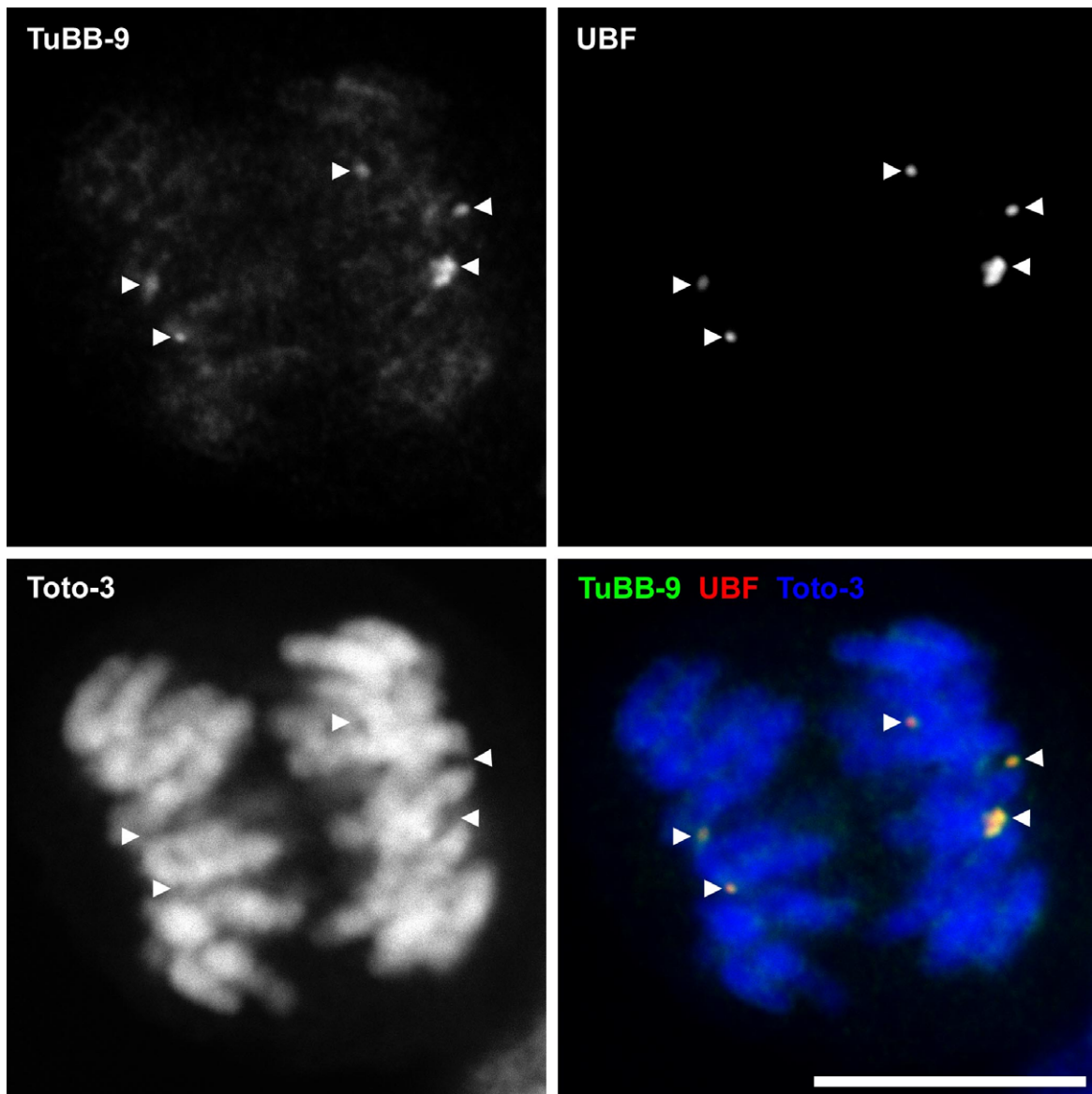


Abbildung 19: Die Doppelfärbung einer HeLa-Zelle mit TuBB-9 und einem anti-UBF-Antikörper zeigt eine klare Kolo­kalisation während der Mitose (Anaphase). Die Pfeilköpfe markieren die UBF-Foci (aktive NORs). TuBB-9 (grün) und anti-UBF-Antikörper (rot) wurden indirekt nachgewiesen. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Die Verteilung der beiden Proteine wurde des Weiteren in mitotischen Zellen untersucht (siehe Abbildung 19). Wie schon in den Interphase-Zellen waren auch hier zum großen Teil identische Färbemuster zu erkennen. Von UBF ist bekannt, dass es während der Mitose an die aktiven NORs (*nucleolar organizer regions*) bindet (Chan *et al.*, 1991). Diese enthalten die während der Interphase aktiv abgelesenen rDNA-Cluster und dienen nach Abschluss der Zellteilung als ‚Plattform‘ für den Neuaufbau der Nucleoli. Offenbar band auch durch TuBB-9 detektiertes pKi-67 an diese Regionen. Wie schon im vorigen Abschnitt gezeigt (vgl. Abbildung 13), war nur ein kleiner Teil des mit TuBB-9 nachweisbaren Proteins an die perichromosomale Schicht gebunden.

Das durch TuBB-9 erkannte Ki-67-Protein und UBF kolokalisierten bis zum Ende der Anaphase fast vollständig. Mit Beginn der Telophase unterschieden sich die Färbungen dagegen partiell (siehe Abbildung 20, Zelle rechts oben). UBF blieb hauptsächlich mit den NORs assoziiert, breitete sich von dort in der frühen G₁-Phase (Zelle links unten) langsam aus und bildete das typische innernucleoläre Punktmuster.

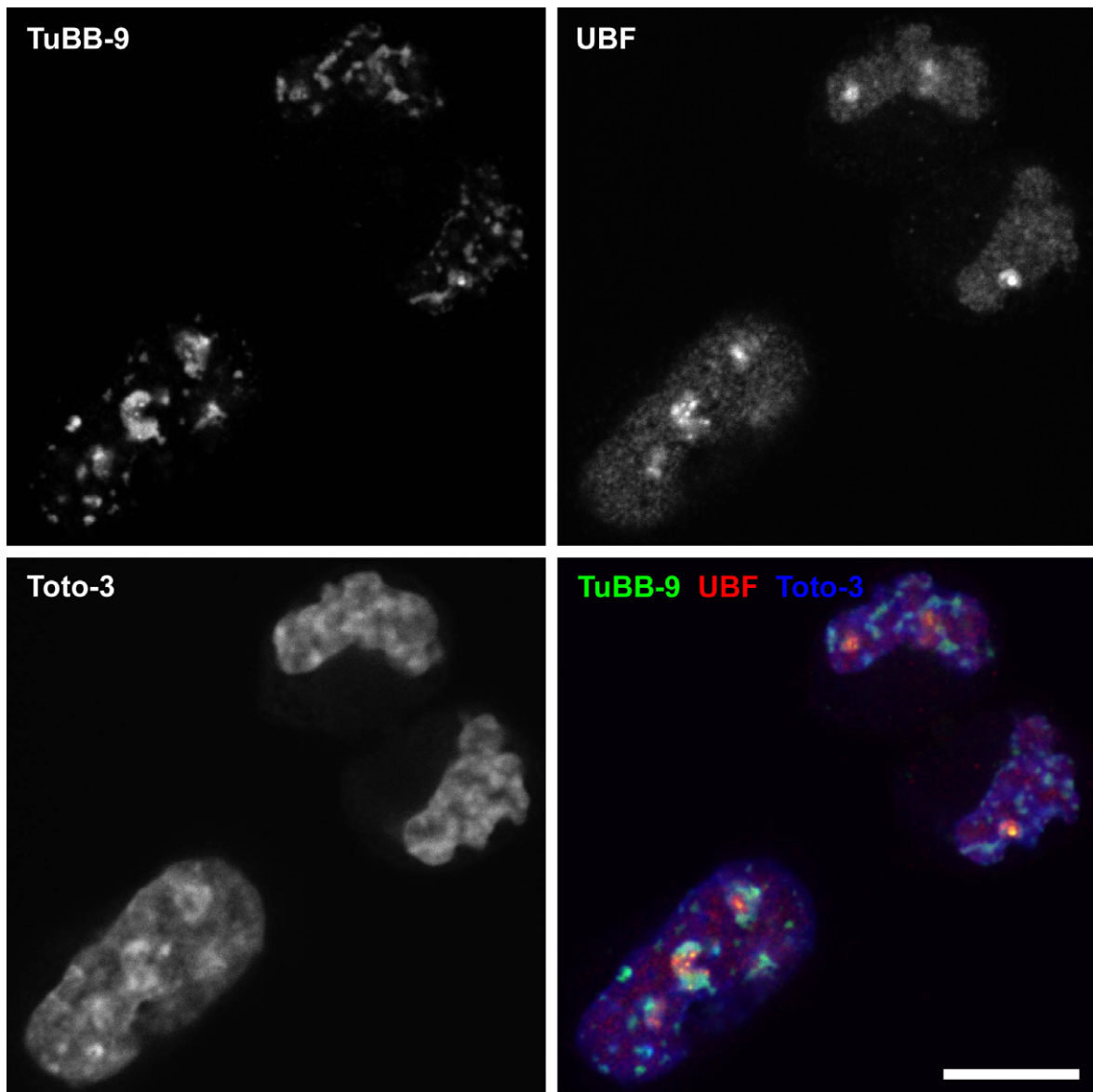


Abbildung 20: TuBB-9 und anti-UBF-Antikörper färben zum Teil unterschiedliche Bereiche von HeLa-Zellen in früher G₁- (Zelle links unten) und Telophase (Zelle rechts oben). TuBB-9 (grün) und anti-UBF-Antikörper (rot) wurden indirekt nachgewiesen. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Dagegen nahm die Intensität der durch TuBB-9 gefärbten mitotischen Punkte (aktive NORs) in der Telophase ab. Ein Teil des durch diesen Antikörper erkannten Ki-67-Proteins zeigte ein unregelmäßiges Fleckenmuster am decondensierenden Chromatin. In der G₁-Phase bildeten sich die für den Rest der Interphase typischen innernucleolären Punkte aus

(Zelle links unten), zusätzlich war jedoch eine fleckige Struktur erkennbar, welche mit der MIB-1-Färbung kolokalisierte (vgl. Abbildung 13) und von Bridger *et al.* (1998) mit heterochromatischen Regionen in Verbindung gebracht wurde.

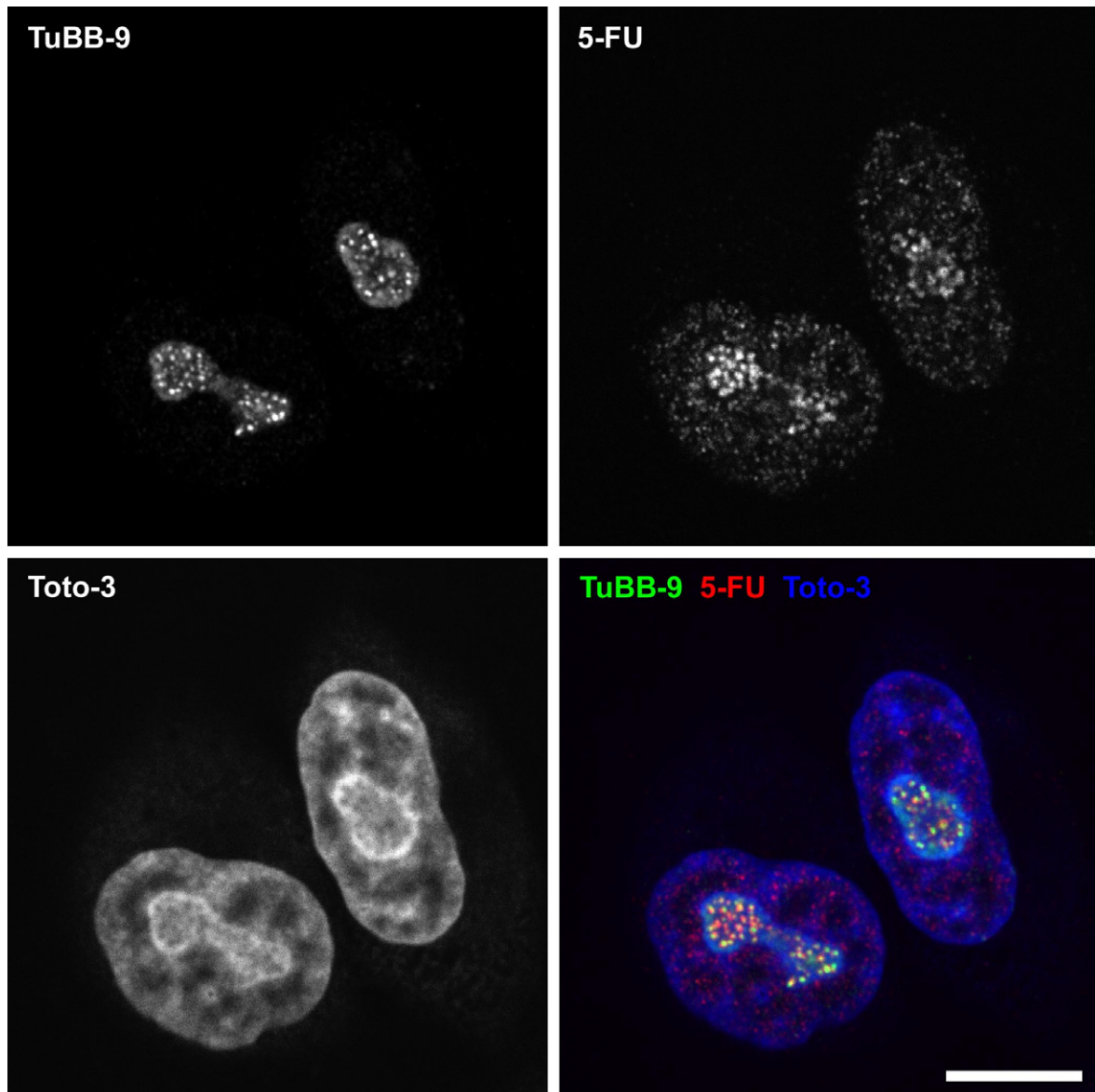


Abbildung 21: Die innernucleoläre TuBB-9-Färbung (indirekter Nachweis, grün) kolokalisiert mit der im Nucleolus synthetisierten RNA. Zum Nachweis der RNA-Synthese wurden HeLa-Zellen für zehn Minuten mit 8 μM 5-Fluoruridin (5-FU) pulsmarkiert. Der Nachweis der in dieser Zeit gebildeten RNA erfolgte durch einen mit 5-FU kreuzreagierenden Antikörper gegen BrdU (indirekter Nachweis, rot). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 μm .

Ausgehend vom Befund zur Kolokalisation von pKi-67 mit UBF, einem wichtigen Bestandteil der rDNA-Transkriptionsmaschinerie, sollte im Folgenden geklärt werden, inwieweit die innernucleolären Punkte in der TuBB-9-Färbung auch mit aktiver Bildung von rRNA in Zusammenhang stehen. Für den Nachweis naszierender RNA *in vivo* wurden Zellen direkt vor der Fixierung für die Immunfärbung zehn Minuten mit 8 μM 5-Fluoruridin (5-FU) pulsmarkiert. Dieses Basenanalogon wird intrazellulär phosphoryliert und

anschließend in neu synthetisierte RNA inkorporiert. Der immunocytologische Nachweis der Substanz erfolgte in diesem Versuch durch einen anti-BrdU-Antikörper mit Kreuzreaktivität gegen 5-FU (Boisvert *et al.*, 2000).

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, färbte dieser Antikörper sowohl Transkripte im Nucleolus als auch im Nucleoplasma. Bei den kleineren nucleoplasmatischen Punkten handelt es sich um Transkripte der RNA Polymerasen II und III (Pol II und III), während die größeren Punkte in den Nucleoli rRNA-Transkripte der schneller transkribierenden RNA Polymerase I (Pol I) darstellen. Wie im Vergleich der beiden Färbungen sowie in der Überlagerung klar erkennbar ist, konnte beinahe jedem innernucleolären Punkt in der TuBB-9-Färbung ein Punkt in der 5-FU-Färbung zugeordnet werden. Letztere gingen in ihrer Größe meist leicht über den Umfang der TuBB-9 Punkte hinaus, wenngleich Position und Intensität nicht immer völlig übereinstimmten.

Es scheint, dass TuBB-9 eine Fraktion von pKi-67 nachweisen konnte, die sich am gleichen Ort befand, an dem die rDNA-Transkriptionsmaschinerie residierte und die rDNA selbst transkribiert wurde. Im Gegensatz hierzu war die aktive Transkription von rRNA in den Zellen mit nucleoplasmatischem TuBB-9-Muster interessanterweise oftmals reduziert, allerdings nicht vollkommen abgestellt (siehe Abbildung 22). Wie schon zuvor gezeigt (vgl. Abbildung 12), hatten die Nucleoli in diesen Zellen häufig eine untypisch runde Form.

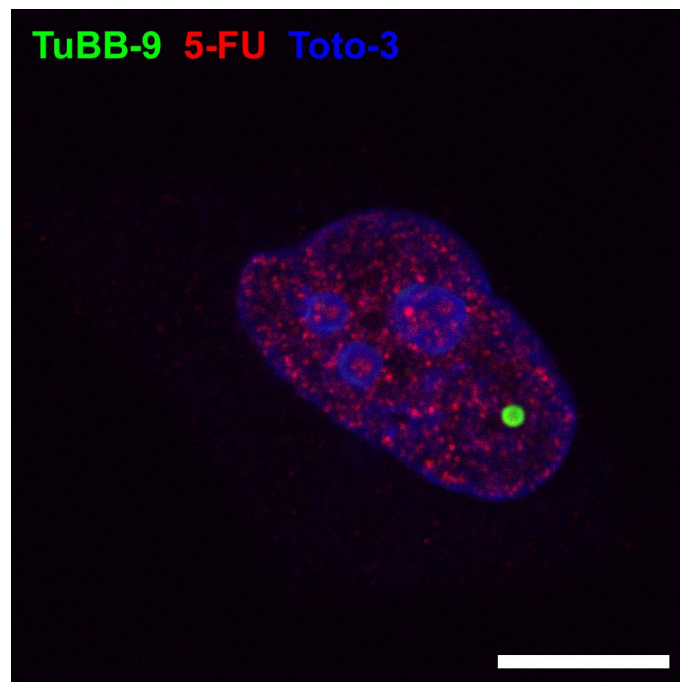


Abbildung 22: In HeLa-Zellen, in denen die TuBB-9-Färbung (indirekter Nachweis, grün) auf nucleoplasmatische Punkte konzentriert ist, zeigt sich oftmals eine verringerte rRNA-Synthese (indirekter Nachweis, rot) sowie runde Nucleoli. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

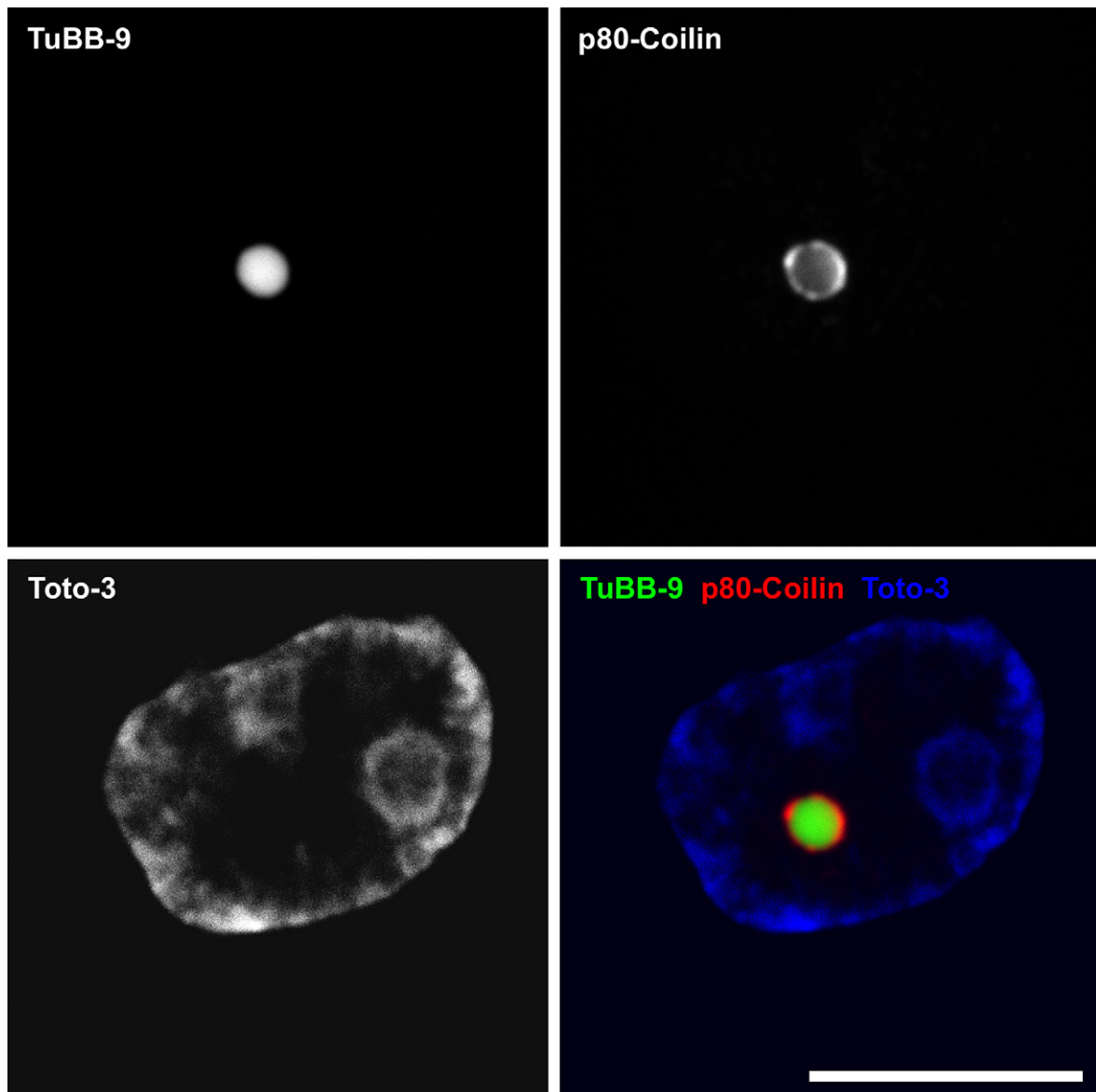


Abbildung 23: In einer doppelt gefärbten HeLa-Zelle mit nucleoplasmatischen Punkten kolokalisieren TuBB-9 (FITC-markiert, grün) und Coilin (indirekter Nachweis, rot). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Die großen, TuBB-9- und UBF-positiven nucleoplasmatischen Punkte (vgl. Abbildung 12 und 18) konnten mit einer bereits beschriebenen subzellulären Struktur, den *Cajal bodies* (CB; früher: *coiled bodies*), in Verbindung gebracht werden. Die CBs sind nucleäre Kompartimente, deren Funktion letztlich nicht vollständig aufgeklärt ist. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie beim Aufbau der Transkriptosomen, welche Transkription und Reifung von rRNA und mRNA katalysieren, eine Rolle spielen (Übersicht bei Gall, 2000). CBs werden durch die Anwesenheit des Markerproteins p80-Coilin definiert. In Abbildung 23 ist dargestellt, wie sich Coilin in einer Zelle verteilte, die in der TuBB-9- und anti-UBF-Färbung die großen nucleoplasmatischen Punkte zeigte. Erstaunlicherweise bildete Coilin hier eine Art Ring mit Verdickungen um das diffus gefärbte Zentrum. Die Innenseite des

Coilin-Rings kolokalisierte mit dem Ki-67-Protein (TuBB-9-Färbung), welches im gesamten Zentrum vorhanden war. UBF kolokalisierte in der gleichen Weise mit Coilin (nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu trat keine Kolokalisation in Zellen auf, in denen UBF und durch TuBB-9 nachgewiesenes Ki-67-Protein innernucleoläre Punkte zeigte: Der anti-Coilin-Antikörper färbte hier kleinere Punkte im Nucleoplasma mit einem Durchmesser von etwa 0,5-1 μm (siehe Abbildung 24). Neben den hier gezeigten Mustern der TuBB-9-Verteilung konnten Zellen, die Zwischenstufen zwischen der rein nucleoplasmatischen und der innernucleolären Färbung aufwiesen, beobachtet werden. Teilweise waren die CBs dabei auch mit den Nucleoli assoziiert (vgl. Abbildung 12).

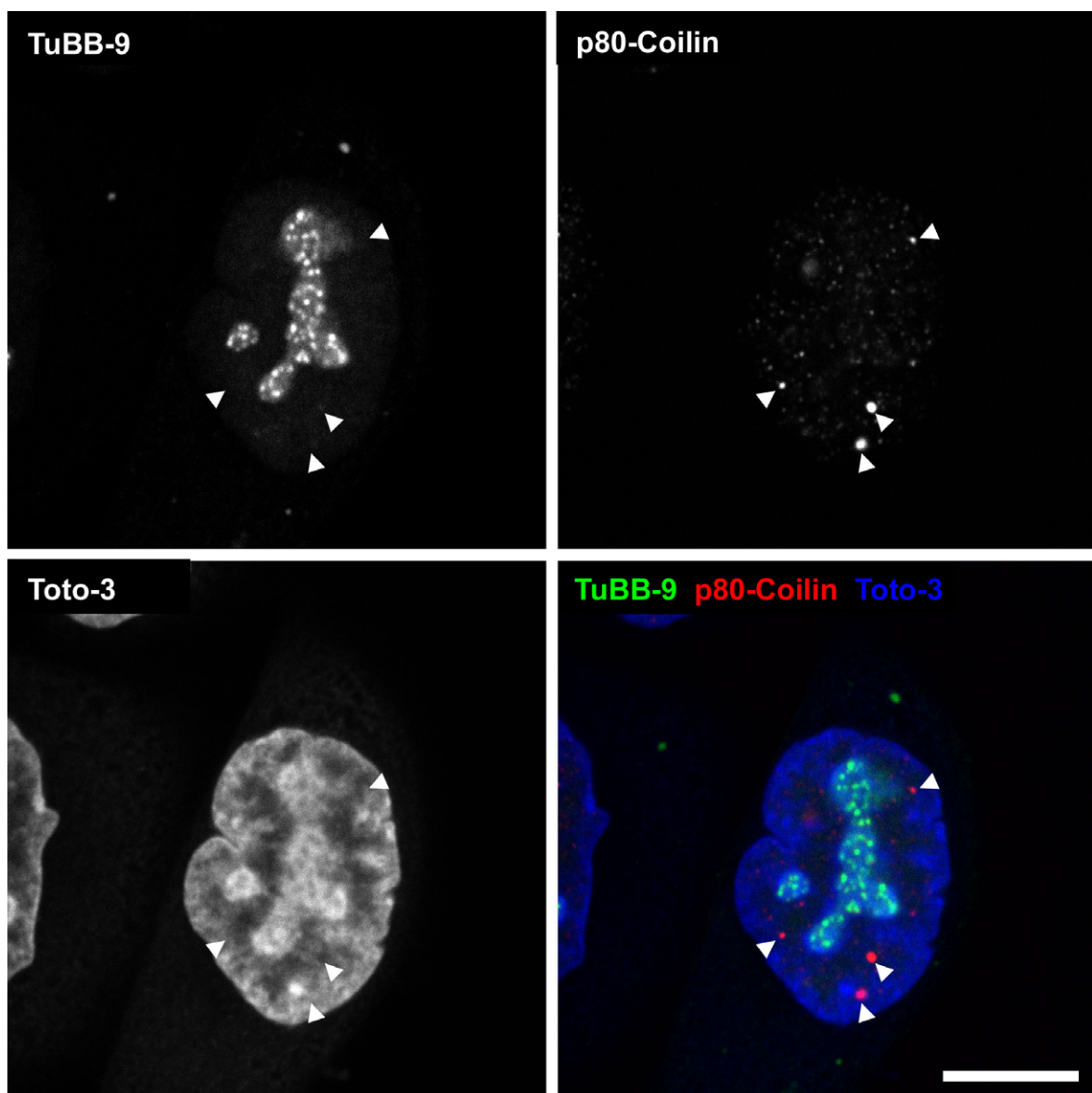
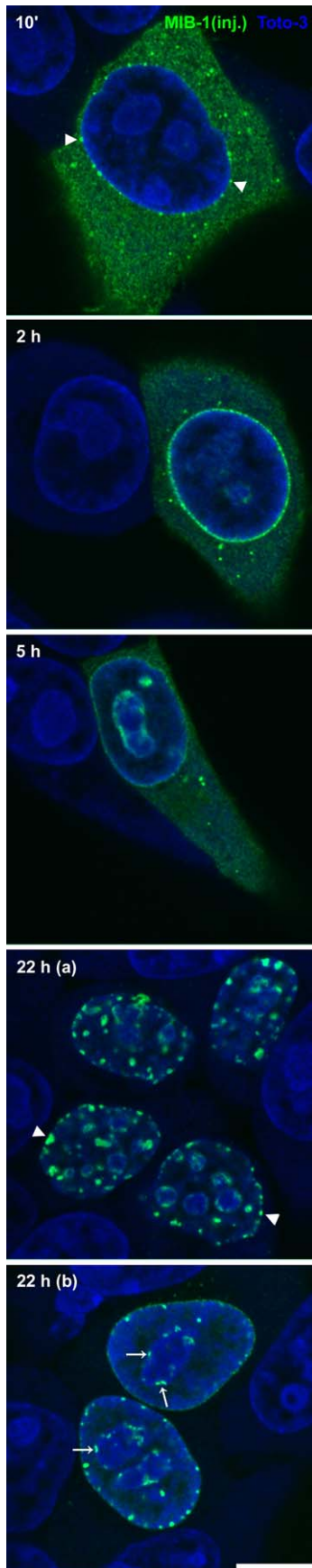


Abbildung 24: Coilin (indirekter Nachweis, rot) ist in HeLa-Zellen mit innernucleolärer TuBB-9-Färbung (FITC-markiert, grün) in kleineren Punkten (Pfeilköpfe) im Nucleoplasma lokalisiert. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 μm .

3.2.3 Mikroinjektion von MIB-1 und TuBB-9 in HEp-2-Zellen

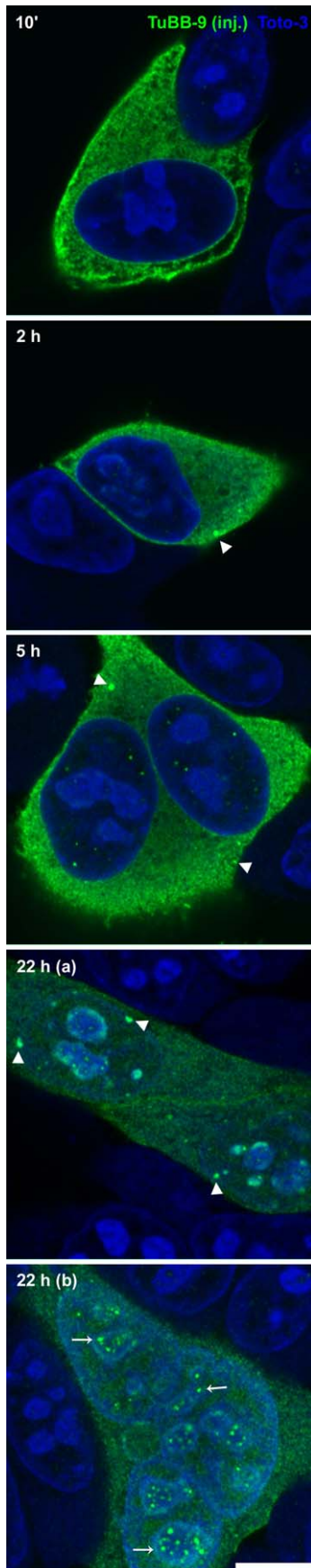


Des Weiteren sollten die Auswirkungen der Mikroinjektion von MIB-1 und TuBB-9 in HEp-2-Zellen untersucht werden. Für die hier dargestellten Versuche wurde der jeweilige Antikörper in das Cytoplasma injiziert und mittels indirekter Immunfluoreszenz nach Inkubationszeiten zwischen zehn Minuten und 72 Stunden nachgewiesen. Die Aufnahmen repräsentativer Zellen sind in Abbildung 25 (für MIB-1) und Abbildung 26 (für TuBB-9) dargestellt.

MIB-1 wies direkt nach der Injektion in das Cytoplasma der Zelle eine diffuse Verteilung im gesamten Volumen dieses Kompartiments auf. Nach etwa zehn Minuten begann die Färbung, sich auf einzelne granuläre Komplexe zu konzentrieren, die überwiegend an der Kernhülle zu finden waren (siehe Abbildung 25, 10', Pfeilköpfe). Im weiteren Verlauf waren diese Komplexe bevorzugt mit der Kernhülle assoziiert, während die diffuse cytoplasmatische Färbung zurückging (siehe Abbildung 25, 2 h). Nach längerer Inkubation wurde eine leichte Kernfärbung durch MIB-1 erkennbar (siehe Abbildung 25, 5 h), die dem in Abbildung 11 gezeigten Muster am Rand der Nucleoli entspricht. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in einer Arbeit von Heyden (1997) beschrieben und als Cotransport des Antikörpers zusammen mit dem neusynthetisierten Ki-67-Protein in den Zellkern gedeutet. Ein vollständiger Import des Antikörpers in den Zellkern wurde jedoch erst nach einer längerer Inkubationsdauer beobachtet (siehe Abbildung 25, 22 h (a) und (b)).

Abbildung 25: Mikroinjizierter MIB-1 verteilt sich zunächst diffus im Cytoplasma von HEp-2-Zellen und ist nach längeren Inkubationszeiten an der Kernhülle zu finden. Nach fünf Stunden wird eine nucleoläre Färbung erkennbar. Nach 22 Stunden verteilt sich MIB-1 nicht am gesamten Nucleolusrand, sondern dort nur in einzelnen Punkten. Außerdem sind mit der Kernhülle assoziierte Flecken (22 h (a), Pfeilköpfe) sowie zahlreiche nucleoplasmatische Punkte (22 h (b), Pfeile) erkennbar. Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (grün) nach angegebener Zeit. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein Teil des injizierten MIB-1 erst während der Mitose und dem damit verbundenen Zusammenbruch der Kernhülle in den Zellkern



eindringen konnte. Nach vollständiger Lokalisation des Antikörpers in den Kernen waren prinzipiell zwei Verteilungsmuster zu beobachten, wobei häufig auch Zwischenstufen angetroffen werden konnten. Zum einen zeigte der mikroinjizierte Antikörper eine Verteilung, die der MIB-1-Färbung nicht-injizierter Zellen gleicht (vgl. Abbildung 11). Zum anderen trat in 30 bis 40 % der Zellen ein ungewöhnliches Muster auf, das eine Konzentration des Antikörpers in Punkten und kleineren Flecken im gesamten Zellkern zeigte (siehe Abbildung 25, 22 h). Diese Strukturen waren oftmals mit der Kernhülle (siehe Abbildung 25, 22 h (a), Pfeilköpfe) und dem Rand der Nucleoli (siehe Abbildung 25, 22 h (b), Pfeile) assoziiert und ähnelten zum Teil der MIB-1-Färbung in der frühen G_1 -Phase. Dennoch befanden sich diese Zellen nicht in der frühen G_1 -Phase, da im Allgemeinen ein vollständig aufgebauter Nucleolus vorhanden war (siehe Abbildung 25, 22 h (a), Nucleinsäurefärbung), was sowohl durch Phasenkontrastmikroskopie als auch durch eine Nucleolin-Färbung bestätigt werden konnte (nicht gezeigt).

TuBB-9 zeigte nach der Mikroinjektion ebenso wie MIB-1 eine diffuse Verteilung im Cytoplasma (siehe Abbildung 26, 10'). Allerdings wurde im Gegensatz zur Mikroinjektion mit MIB-1 offenbar zunächst fast kein Antikörper in den Zellkern importiert (siehe Abbildung 26, 10', 2 h und 5 h). Auch die für mikroinjiziertes MIB-1 charakteristischen Komplexe waren nur selten erkennbar (siehe Abbildung 26, 2 h und 5 h,

Abbildung 26: Mikroinjizierter TuBB-9 verteilt sich zunächst diffus im Cytoplasma von Hep-2-Zellen (10', 2 h und 5 h). Nach 22 Stunden findet man den Antikörper im Zellkern am Nucleolusrand und in nucleoplasmatischen Punkten (22 h (a), Pfeilköpfe). In manchen Zellen erkennt TuBB-9 auch die innernucleolären Punkte (22 h (b), Pfeile). Ein Teil des Antikörpers bleibt diffus in der gesamten Zelle verteilt. Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (grün) nach angegebener Zeit. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 μ m.

Pfeilköpfe). Nach längerer Inkubation (siehe Abbildung 26, 22 h (a) und (b)) befand sich der injizierte Antikörper jedoch im Zellkern, was vermutlich auf eine Bindung des Antigens während der Mitose zurückzuführen war. TuBB-9 färbte hier hauptsächlich Punkte an der Kernhülle (siehe Abbildung 26, 22 h (a), Pfeilköpfe) sowie den Nucleolusrand. In einem Teil der injizierten Zellen war eine Färbung der innernucleolären Punkte (siehe Abbildung 26, 22 h (b), Pfeile) zu erkennen, die wahrscheinlich denen in nicht-injizierten Zellen entspricht (vgl. Abbildung 11). Oftmals blieb noch Antikörper diffus in der gesamten Zelle verteilt. Auch bei längerer Inkubation (bis zu 72 Stunden) wurden sowohl für TuBB-9 als auch für MIB-1 ähnliche Verteilungen wie nach 22 h beobachtet.

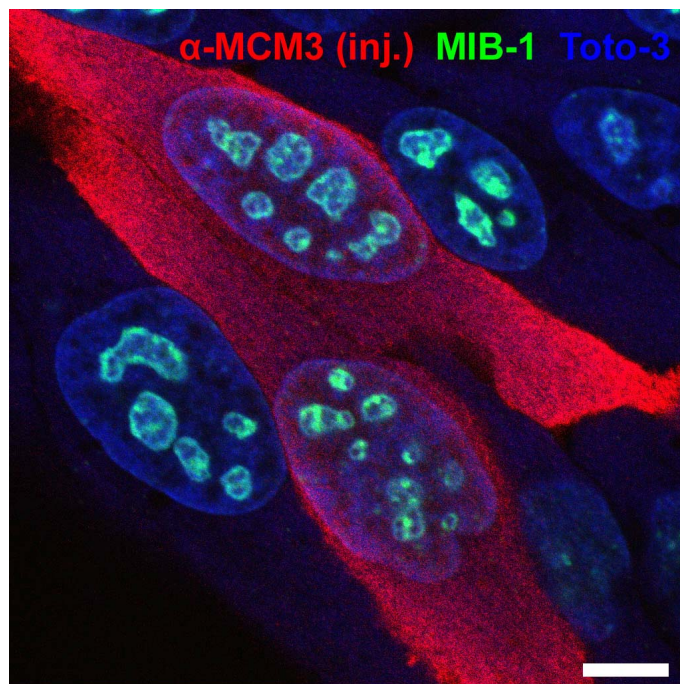


Abbildung 27: In das Cytoplasma von HEp-2-Zellen mikroinjizierter Antikörper gegen MCM3 verändert das Färbemuster von MIB-1 nicht. Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (rot) nach 23 Stunden in HEp-2-Zellen. Zusätzliche Färbung mit direktmarkiertem MIB-1 (grün). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Die Mikroinjektion von gleichen Mengen der Isotypkontrollantikörper gegen das nucleäre Protein MCM3 (*Mini-chromosome maintenance protein 3*) bzw. BO-7 (gegen IL-2 gerichtet) ergab keine Umverteilung des Ki-67-Proteins, wie durch Färbung mit MIB-1 gezeigt werden konnte (dargestellt nur für den anti-MCM3-Antikörper in Abbildung 27).

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob nur die an den injizierten Antikörper gebundene Fraktion oder das gesamte zelluläre Ki-67-Protein von der Relokalisation betroffen ist. Dazu wurde injizierter Antikörper immunocytoologisch wie zuvor mit einem farbstoffmarkierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Dieselben Zellen wurden zusätzlich mit dem gleichen Antikörper, jedoch mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff direktmarkiert, gefärbt, um das gesamte für den Antikörper zugängliche Protein sichtbar zu machen.

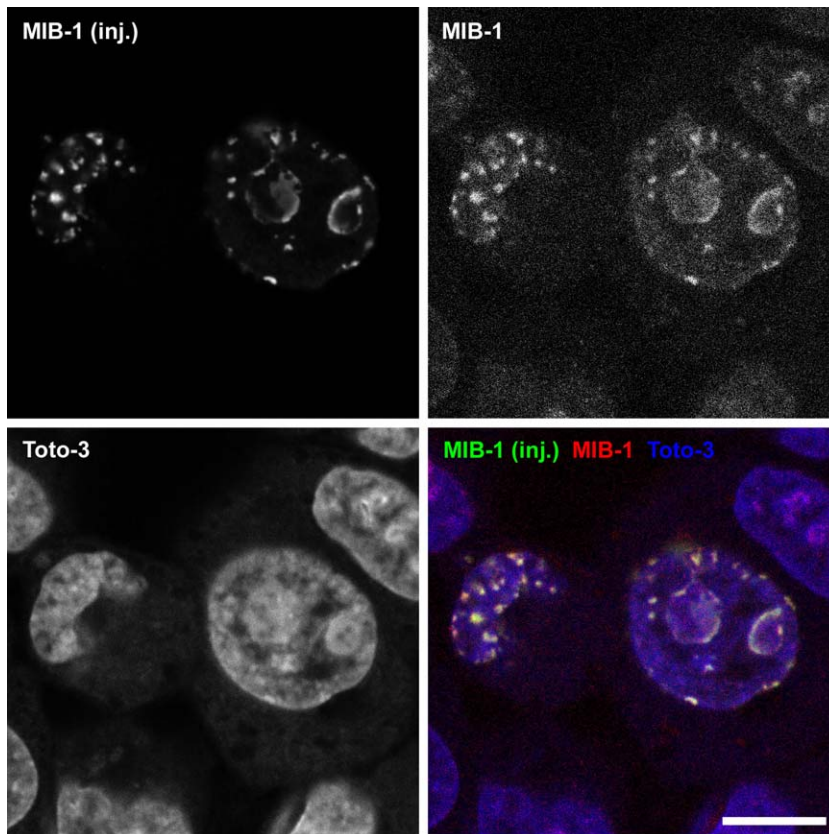


Abbildung 28: Das gesamte von MIB-1 erkennbare Ki-67-Protein ist nach Mikroinjektion von MIB-1 in HEP-2-Zellen umverteilt. Indirekter Nachweis des injizierten MIB-1 (grün) nach 72 Stunden. Zusätzliche Färbung mit direktmarkiertem MIB-1 (rot). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

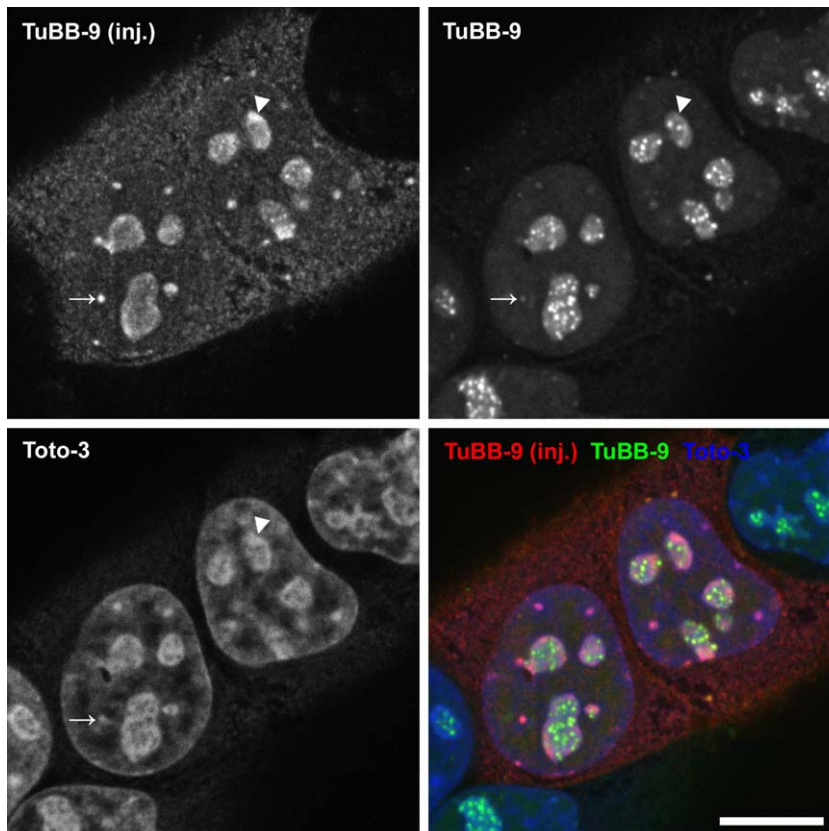


Abbildung 29: Eine Fraktion des zellulären Ki-67-Proteins ist auch nach der Mikroinjektion von TuBB-9 in den innernucleolären Punkten lokalisiert. Indirekte Detektion des injizierten TuBB-9 (rot) nach elf Stunden. Zusätzliche Färbung mit FITC-markiertem TuBB-9 (grün). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, färbte der direktmarkierte MIB-1 praktisch im gleichen Muster wie der injizierte Antikörper, was auf eine vollständige Relokalisation der von MIB-1 erkannten Fraktion des Ki-67-Proteins hindeutete.

Im Falle der Injektion von TuBB-9 zeigte sich ein anderes Bild (siehe Abbildung 29). Während sich der injizierte Antikörper auf Flecken im Nucleoplasma (Pfeil) sowie den Nucleolusrand (Pfeilkopf) konzentrierte und die innernucleolären Punkte nur schwach färbte, erkannte der nicht-injizierte, direktmarkierte Antikörper hauptsächlich die mit den Komponenten der rDNA-Transkriptionsmaschinerie korrespondierenden innernucleolären Punkte.

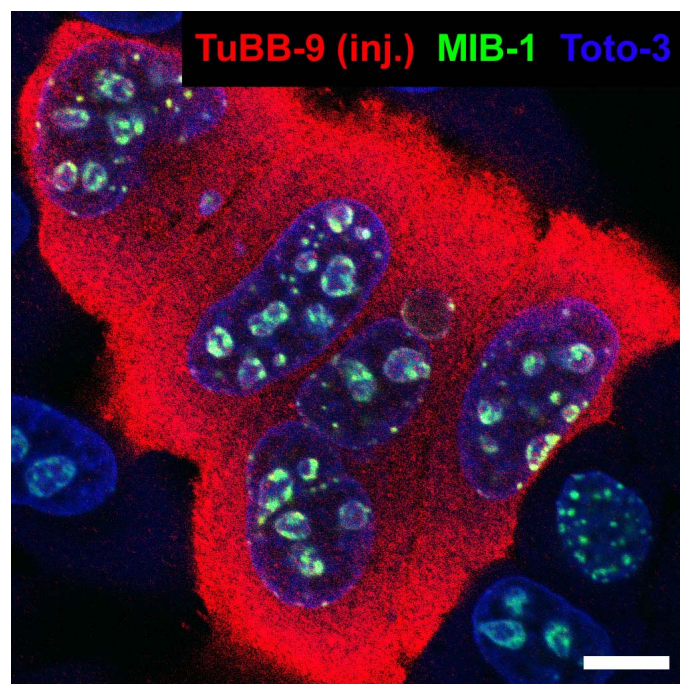


Abbildung 30: Die MIB-1-Färbung am Rand der Nucleoli bleibt nach Mikroinjektion von TuBB-9 in HEp-2-Zellen weitgehend unverändert, allerdings steigt die Anzahl nucleoplasmatischer Flecken gegenüber nicht-injizierten Zellen. Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (rot) nach 23 Stunden. Zusätzliche Färbung mit direktmarkiertem MIB-1 (grün). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

Anschließend sollte untersucht werden, inwieweit die Mikroinjektion des einen das Färbemuster des anderen Antikörpers beeinflusst. Dazu wurde das TuBB-9-Färbemuster mit einem direktmarkierten Antikörper nach MIB-1-Injektion bzw. das MIB-1-Färbemuster nach TuBB-9-Injektion bestimmt. Wie in Abbildung 30 gezeigt, erkannte MIB-1 auch nach TuBB-9-Injektion ein weitgehend unverändertes Muster der pKi-67-Verteilung mit präferentieller Färbung des Nucleolusrands. Auffällig war jedoch die erhöhte Zahl der nucleoplasmatischen Flecken gegenüber der unten im Bild gezeigten nicht-injizierten Zelle. Im umgekehrten Versuch konnte festgestellt werden, dass die Mikroinjektion von MIB-1 offenbar keinen Einfluss auf das Färbemuster von TuBB-9, welcher auch hier die

innernucleolären Punkte färbt, hatte (siehe Abbildung 31).

Das veränderte Verteilungsmuster des Ki-67-Proteins nach Mikroinjektion von spezifischen Antikörpern zeigte Ähnlichkeit zur zellulären Verteilung von HP1-Proteinen (*heterochromatin protein 1*), die im Zellkern zum Teil mit pKi-67 kolokalisieren (Scholzen *et al.*, 2002). HP1 α gilt als Marker für Heterochromatin und lokalisiert präferentiell in nucleoplasmatischen Flecken, aber auch in größeren zusammenhängenden Regionen an der Kernhülle und im perinucleolären Bereich. Zur Untersuchung, inwieweit das Ki-67-Protein in Bereiche hoher HP1 α -Konzentration umverteilt wird, wurden MIB-1- bzw. TuBB-9-injizierte Zellen mit einem Antikörper gegen HP1 α gefärbt.

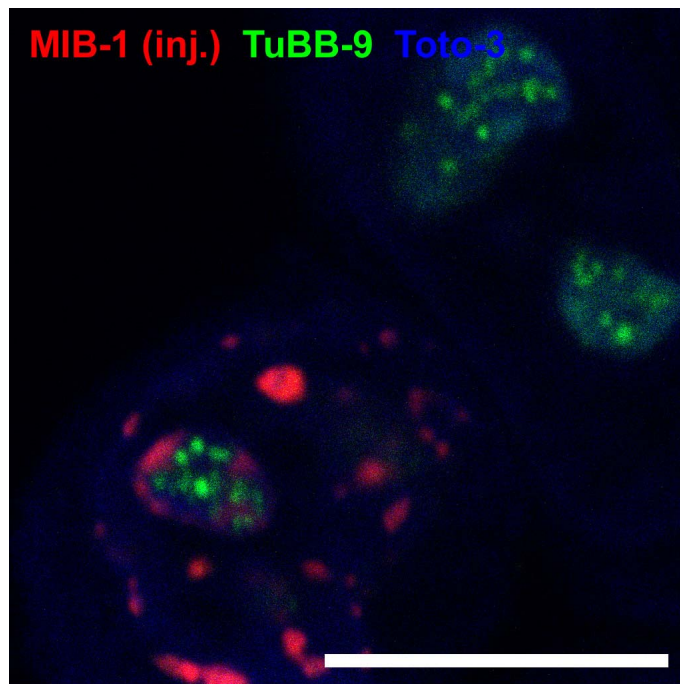


Abbildung 31: Die TuBB-9-Färbung in den innernucleolären Punkten bleibt nach Mikroinjektion von MIB-1 in HEp-2-Zellen unverändert. Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (rot) nach 23 Stunden. Zusätzliche Färbung mit direktmarkiertem TuBB-9 (grün). Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 μ m.

Wie in Abbildung 32 dargestellt, war in MIB-1-injizierten Zellen eine Konzentration des durch diesen Antikörper detektierten Ki-67-Proteins auf solche Regionen zu erkennen, die auch von dem Antikörper gegen das HP1 α -Protein gefärbt wurden. Beide Antikörper erkannten hier Strukturen am Nucleolusrand (Pfeilköpfe), Flecken im Nucleoplasma (Pfeile) und an der Kernhülle. Es muss allerdings bemerkt werden, dass die HP1 α -Färbung – vermutlich aufgrund der Verwendung eines mit dem „Zenon Labeling“-Kit markierten Antikörpers im Gegensatz zu einem indirekten Nachweis mittels markierter Sekundärantikörper – ein erhöhtes diffuses Signal im Nucleoplasma aufwies und die typischen heterochromatischen Flecken weniger ausgeprägt und schwerer zu differenzieren waren.

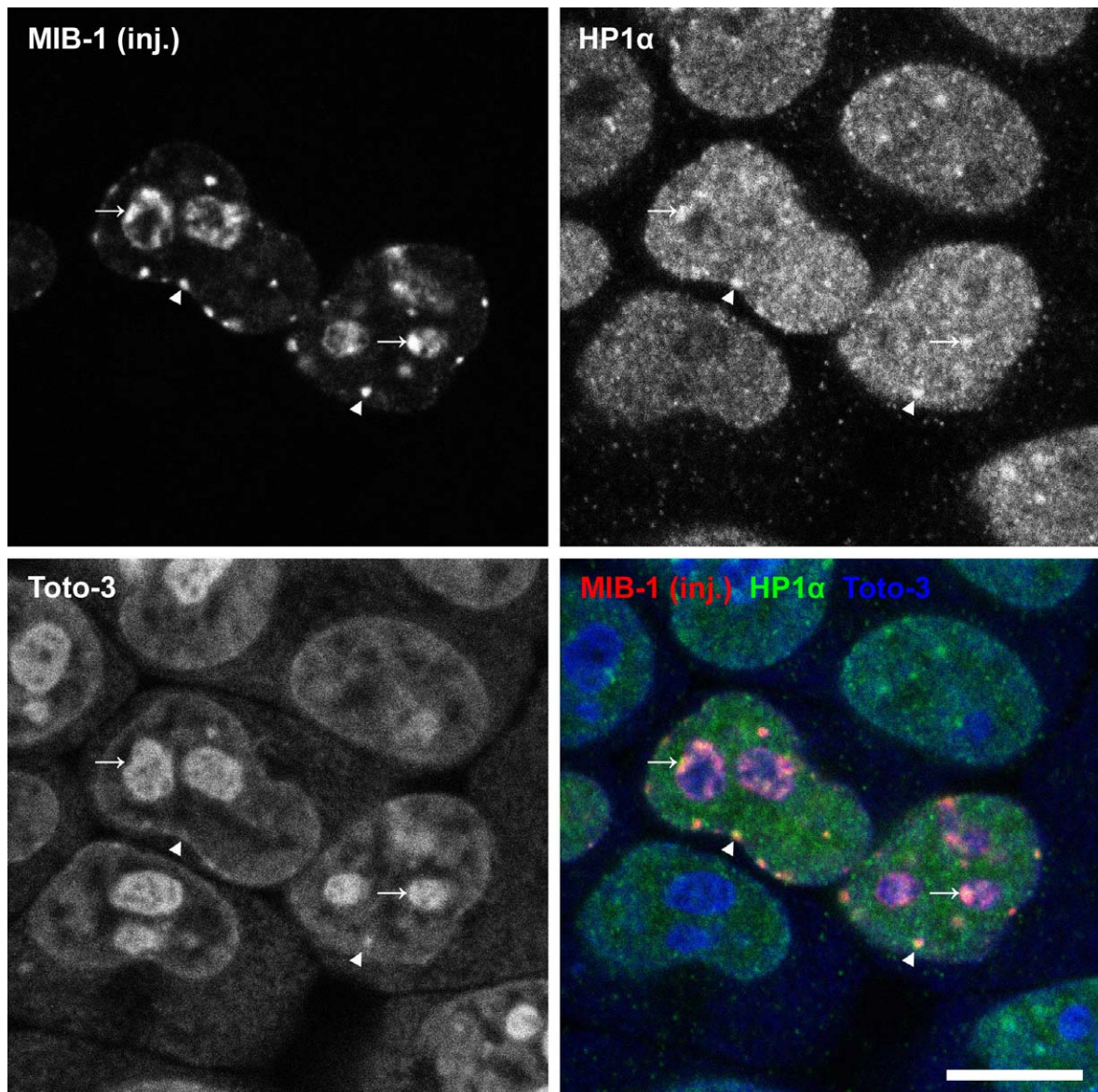


Abbildung 32: In HEP-2-Zellen mikroinjizierter MIB-1 kolokalisiert im perinucleolären Bereich (Pfeile) sowie an der Kernhülle (Pfeilköpfe) teilweise mit HP1 α -positiven Flecken. Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (rot) nach 21 Stunden. Zusätzliche Färbung mit einem anti-HP1 α -Antikörper (grün), der unter Verwendung des „Zenon Labeling“-Kits mit „Alexa Fluor 488“ markiert wurde. Gegenfärbung mit Toto-3, Balken: 10 μ m.

Ein ähnliche Verteilung wurde nach der Mikroinjektion von TuBB-9 beobachtet (siehe Abbildung 33). Das durch diesen Antikörper detektierte Ki-67-Protein war teilweise in heterochromatische Flecken (Pfeile) oder an die Kernhülle relokalisiert. Eine Kolokalisation bestand ebenfalls in den Randbereichen der Nucleoli (Pfeilköpfe). Dagegen zeigte der als Isotypkontrolle eingesetzte Antikörper BO-7 keine präferentielle Kolokalisation mit HP1 α , sondern war diffus im gesamten Cytoplasma und Nucleoplasma verteilt (siehe Abbildung 34). Lediglich die Nucleoli waren von der Färbung ausgenommen.

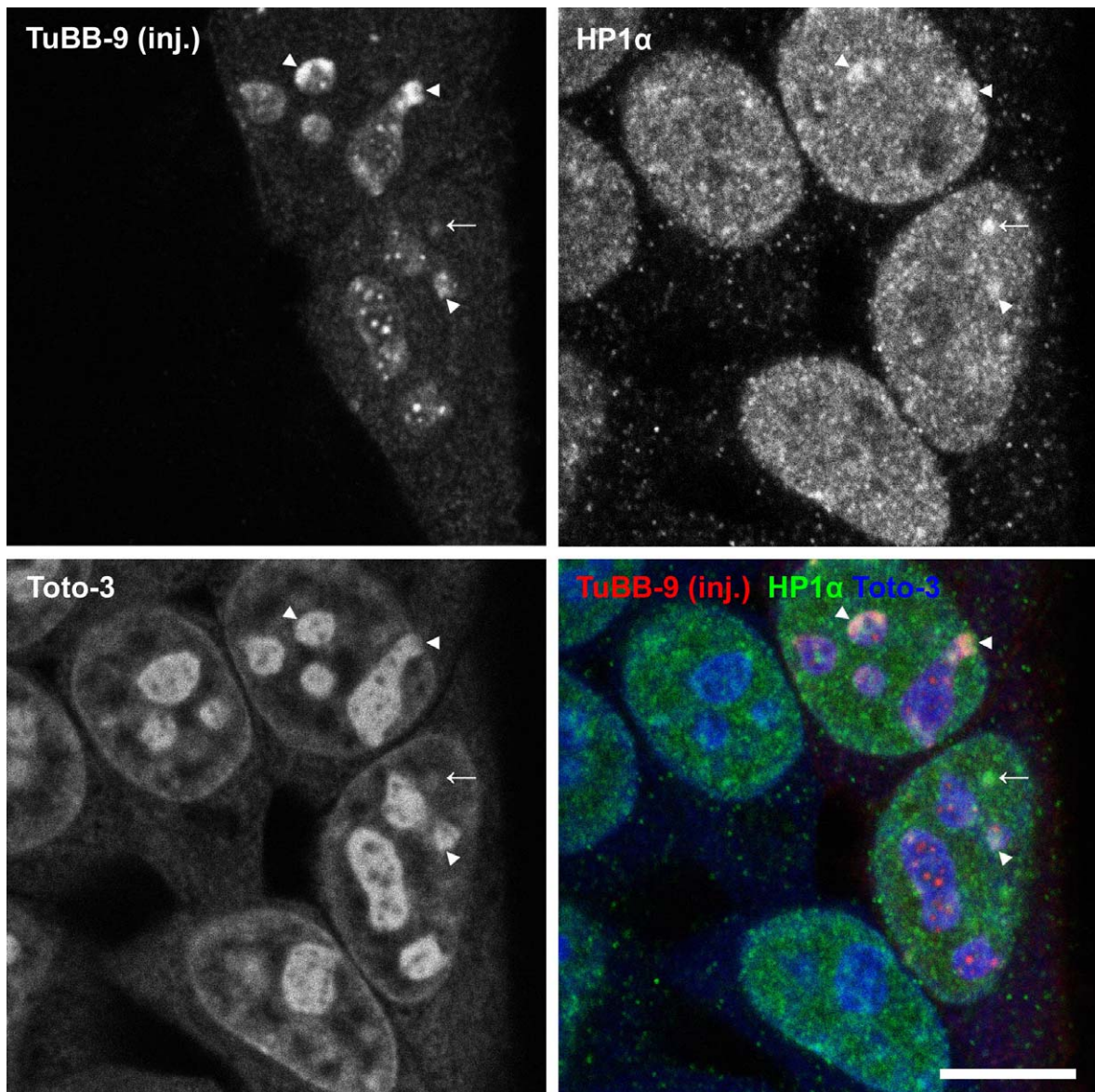


Abbildung 33: In HEP-2-Zellen mikroinjizierter TuBB-9 kolokalisiert im perinucleolären Bereich (Pfeile) sowie an der Kernhülle (Pfeilköpfe) teilweise mit HP1 α . Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (rot) nach 21 Stunden. Zusätzliche Färbung mit einem anti-HP1 α -Antikörper (grün), der unter Verwendung des „Zenon Labeling“-Kits mit „Alexa Fluor 488“ markiert wurde. Gegenfärbung mit Toto-3, Balken: 10 μ m.

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Mikroinjektion von pKi-67-spezifischen Antikörpern eine Auswirkung auf die Transkription der ribosomalen RNA-Gene hat. Wie in Abbildung 35 und 36 gezeigt, kam es weder durch MIB-1- noch durch TuBB-9-Mikroinjektion zu einer deutlichen Beeinflussung der zellulären Synthese von RNA. Dies gilt sowohl für die Transkription im Nucleoplasma als auch für die rRNA-Synthese im Nucleolus. Dabei ist allerdings festzustellen, dass die verwendete Methode (5-FU-Markierung mit anschließendem immunocytoologischen Nachweis) keine quantitative Analyse zulässt und die Variation in der Färbeintensität nicht-injizierter Zellen eine semiquantitative Abschätzung erschwert.

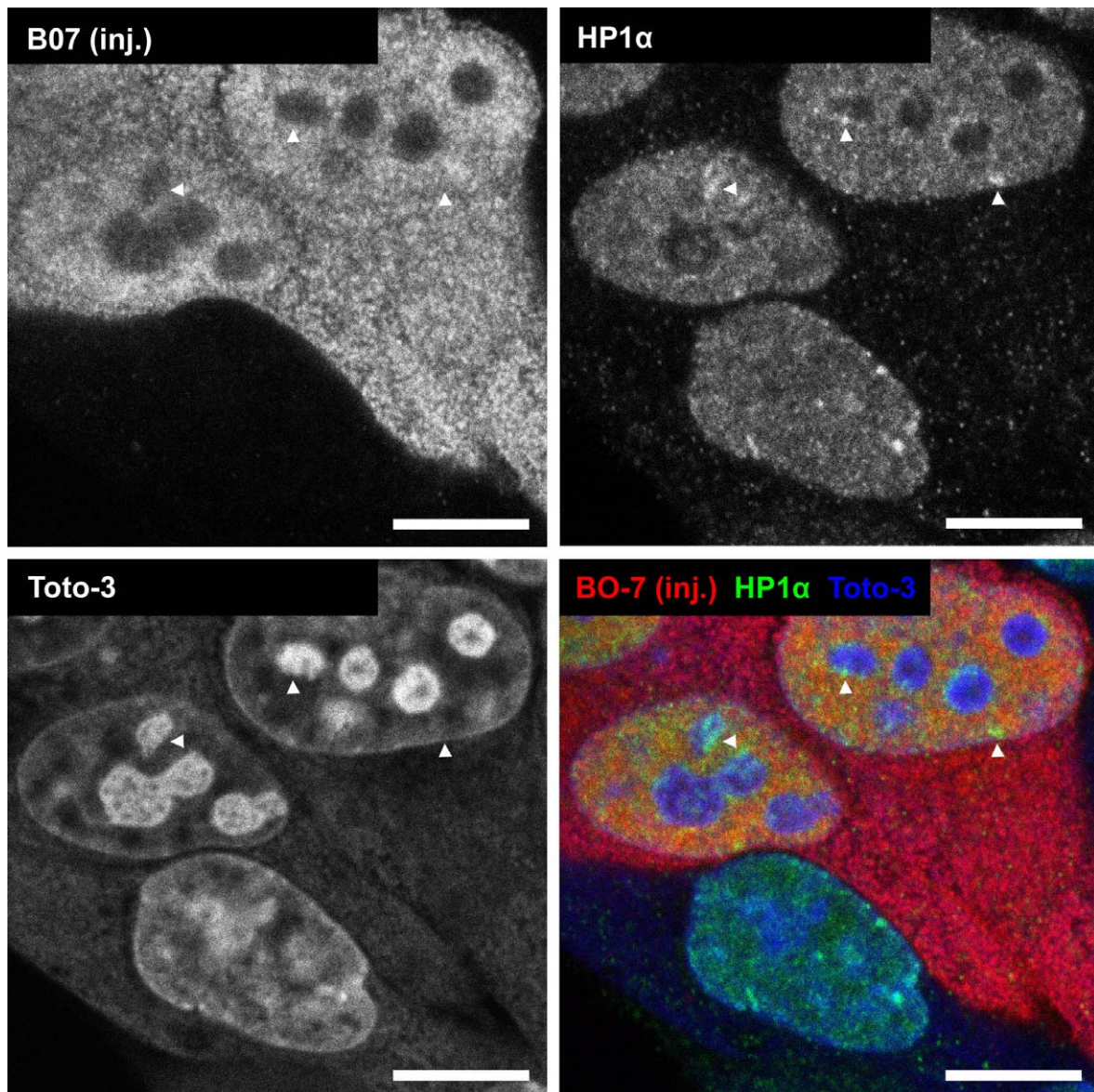


Abbildung 34: In HEp-2-Zellen mikroinjizierter BO-7 verteilt sich diffus. Eine bevorzugte Färbung der HP1 α -positiven Foci ist durch diesen Antikörper nicht zu beobachten. Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (rot) nach 21 Stunden. Zusätzliche Färbung mit anti-HP1 α -Antikörper (grün), der unter Verwendung des „Zenon Labeling“-Kits mit „Alexa Fluor 488“ markiert wurde. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 μ m.

Durch die in diesem Abschnitt dargestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass mikroinjizierte Antikörper gegen pKi-67 eine andere zelluläre Verteilung des Proteins nahe legten, als sie in der Immunfärbung zur Darstellung brachten. Eine Relokalisation der Färbung an den Rand der Nucleoli, das perinucleoläre Chromatin sowie Flecke im Nucleoplasma und an der Kernhülle konnte festgestellt werden. Dabei wurde eine partielle Kolokalisation mit dem Heterochromatin-Marker HP1 α beobachtet. Eine veränderte rDNA-Transkription konnte mit der hier verwendeten Methode nicht ermittelt werden.

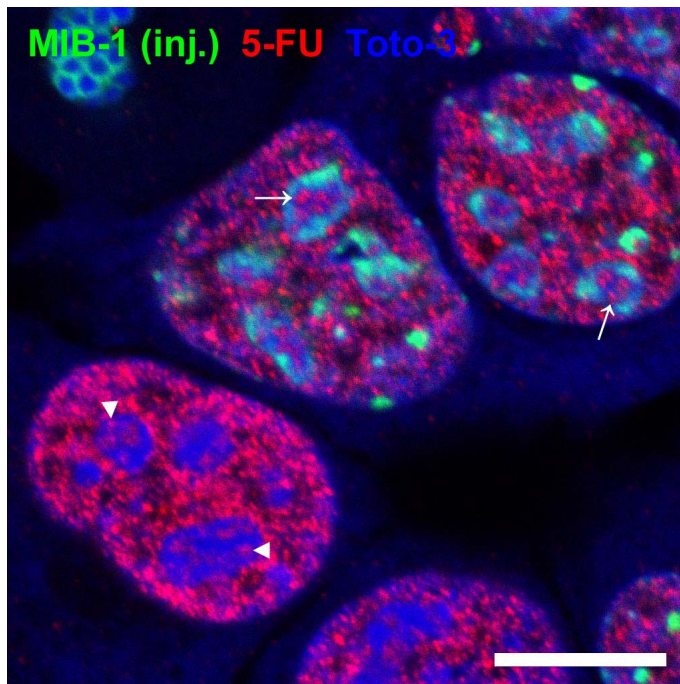


Abbildung 35: Mit MIB-1 mikroiinjizierte HEp-2-Zellen synthetisieren ebenso nucleoläre RNA (Pfeile) wie nicht-injizierte Zellen (Pfeilköpfe). Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (grün) und Detektion der rRNA-Synthese mit 5-FU (indirekter Nachweis, rot) 21 Stunden nach Mikroiinjektion. Gegenfärbung mit Toto-3 (blau), Balken: 10 µm.

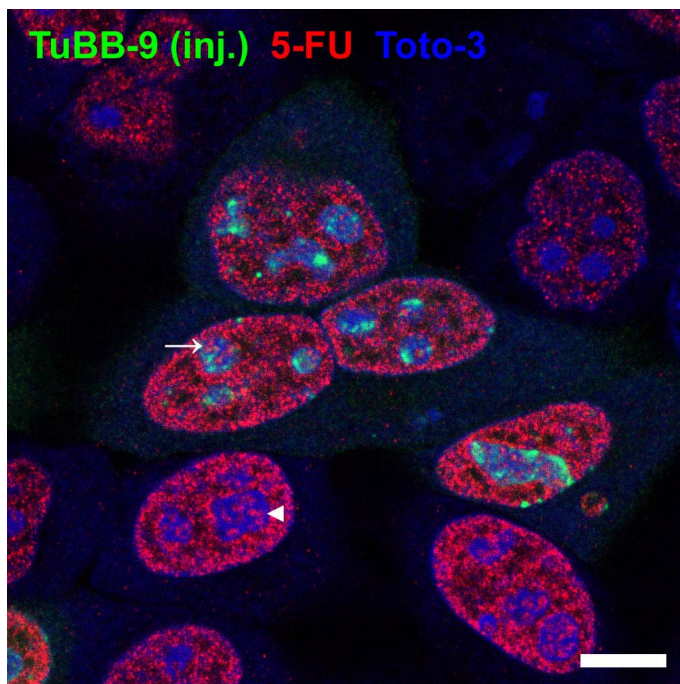


Abbildung 36: Mit TuBB-9 mikroiinjizierte HEp-2-Zellen synthetisieren ebenso nucleoläre RNA (Pfeile) wie nicht-injizierte Zellen (Pfeilköpfe). Indirekter Nachweis des injizierten Antikörpers (grün) und Detektion der rRNA-Synthese mit 5-FU (indirekter Nachweis, rot) 21 Stunden nach Mikroiinjektion. Gegenfärbung mit Toto-3, Balken: 10 µm.

3.2.4 Chromatin-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das Ki-67-Protein und Komponenten des rDNA-Transkriptionsapparates

MIB-1 und TuBB-9 zeigten in den zuvor dargestellten Immunfärbungsexperimenten in den meisten Zellzyklusphasen ein unterschiedliches Verteilungsmuster. Dabei wurde festgestellt, dass durch TuBB-9 detektiertes pKi-67 mit Komponenten des rDNA-Transkriptionsapparates kolokalisiert.

Inwieweit pKi-67 auch physikalisch mit dem rDNA-Gencluster assoziiert ist, sollte mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) untersucht werden. Hierfür wurden die beiden pKi-67-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper MIB-1 und TuBB-9 im Vergleich zu zwei polyklonalen Kaninchenserum gegen die rDNA-bindenden Proteine RNA Polymerase I (Pol I) und UBF verwendet. Die Untersuchung der Assoziation mit transkriptionsinaktivem Chromatin gemäß der „Histon-Code“-Hypothese (Jenuwein und Allis, 2001) erfolgte unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers gegen dimethyliertes Lysin 9 des Histons H3 (anti-Dimethyl-H3/K9). Als Negativkontrollen wurden der monoklonale Maus-IgG1-Antikörper gegen IL-2 (Klon BO-7) und ein Kaninchen-Normalserum eingesetzt.

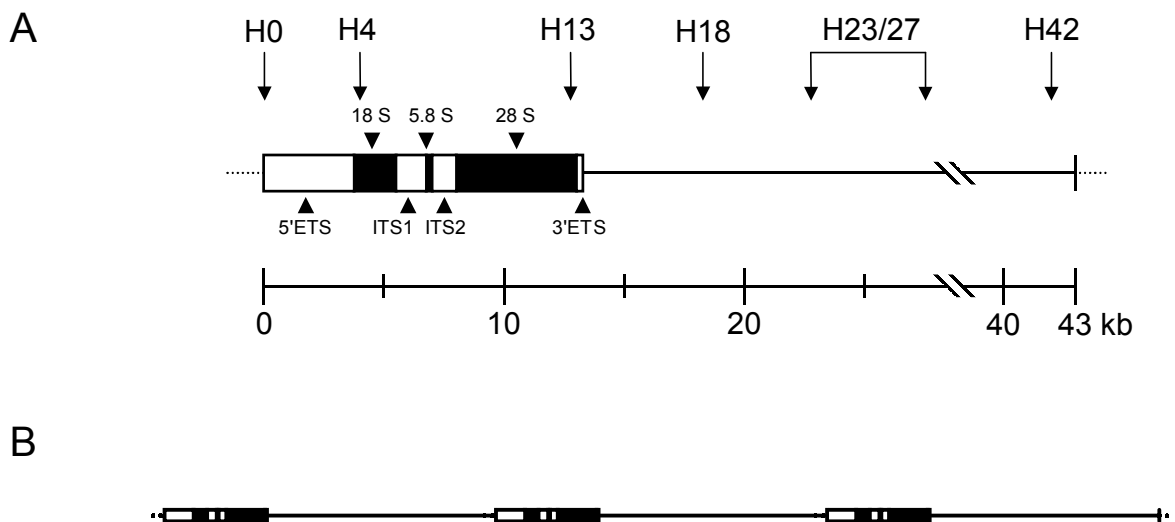


Abbildung 37: Aufbau der humanen rRNA-Gene. A) Dargestellt sind der transkribierte Bereich (rechteckiger Kasten) mit dem rRNA-kodierenden Bereich (schwarz) und den Spacerregionen (weiß) sowie der untranskribierte intergenische Spacer (Linie). Die Positionen der in der PCR verwendeten Primerpaare sind oben angegeben (Pfeile). ETS: external transcribed spacer, ITS: internal transcribed spacer. B) Schema der tandemartigen Anordnung der rRNA-Gene in den Clustern auf den akrozentrischen Chromosomen.

Mit diesen Antikörpern wurden DNA-Fragmente aus quervernetztem, durch Ultraschall fragmentiertem Chromatin aus HeLa-Zellen präzipitiert, die *in vivo* mit den entsprechenden Proteinen assoziiert waren. Die Quantifizierung dieser DNA-Fragmente erfolgte durch Echtzeit-PCR. Da der rDNA-Cluster im Fokus dieser Arbeit steht, kamen verschiedene in diesem Bereich bindende Primerpaare zum Einsatz (siehe Abbildung 37). Das Primerpaar H0 bindet im Bereich des *core promoter element* (CPE), das direkt an der Transkriptionsinitiationsstelle positioniert ist, während H42 eine Sequenz im intergenischen Spacer (IGS, in Abbildung 37A als Linie dargestellt) erkennt, die knapp 800 bp stromaufwärts des rDNA-Promotors liegt (Hannan *et al.*, 1998a). Die ungewöhnliche Lage des Promotors am 3'-Ende des IGS lässt sich durch die tandemartige Anordnung der rRNA-Gene erklären. Hierdurch liegt die 3'-Region des einen *repeats* direkt am 5'-Ende des nächsten (siehe Abbildung 37B).

Die Bindungsstellen der beiden Primerpaare H4 und H13 liegen im Bereich des Primärtranskripts (in Abbildung 37A kastenförmig dargestellt), während H18 und H23/27 (welcher an zwei Sequenzen binden kann) in der zentralen Region des IGS primen.

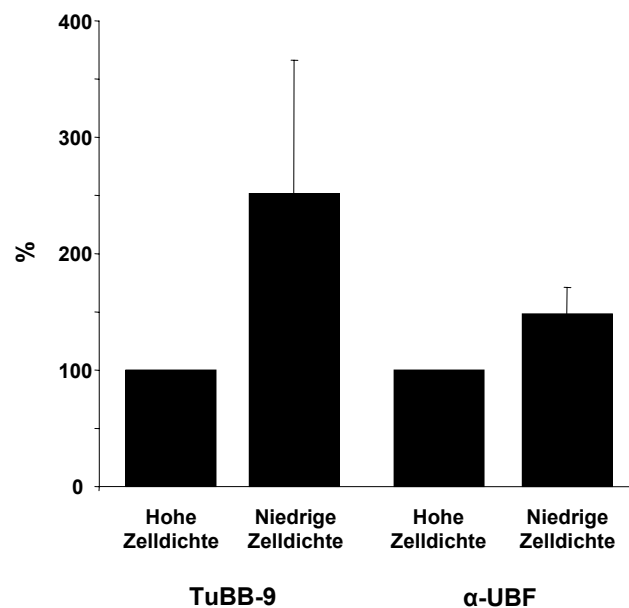


Abbildung 38: ChIP unter Verwendung der angegebenen Antikörper. Gezeigt ist die präzipitierte DNA-Menge relativ zur eingesetzten für zwei unterschiedliche Zelldichten in der Kultur, wobei auf die höhere Zelldichte normiert wurde. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten, jeweils quantifiziert über Echtzeit-PCR (mit Standardabweichung). Verwendet wurde dafür das Primerpaar gegen den Promotorbereich (H0). Anti-UBF und TuBB-9 präzipitieren einen größeren Anteil an DNA aus Zellkulturen niedriger Zelldichte als aus Zellkulturen hoher Zelldichte.

In ersten Experimenten mit den Antikörpern gegen Pol I und UBF sowie mit TuBB-9 wurde festgestellt, dass alle drei größere Mengen an DNA aus dem Bereich des Primärtranskripts präzipitierten, wenn Chromatin aus einer Zellkultur niedrigerer Dichte eingesetzt

wurde. In Abbildung 38 ist dies repräsentativ für das Primerpaar H0 und die Antikörper TuBB-9 und anti-UBF gezeigt. Eine niedrige Zelldichte entsprach in diesem Fall etwa 40 %iger Konfluenz, während Kulturen hoher Dichte circa 90 % konfluent waren. Der prozentuale Anteil präzipitierter DNA im Vergleich zu eingesetzter DNA wurde auf die Werte für die hohe Zelldichte normiert. In den folgenden ChIP-Studien erfolgte die Kultivierung bei niedriger Zelldichte.

In weiterführenden Experimenten wurde untersucht, welche Sequenzen die Antikörper im Detail präzipitieren (siehe Abbildung 39). Der für diese Arbeit generierte anti-pKi-67-Antikörper TuBB-9 präzipitierte fast ausschließlich Chromatin-Fragmente aus dem transkribierten und dem promotornahen Bereich. Dabei wurde bevorzugt DNA aus der Region um den Transkriptionsstartpunkt (Primerpaar H0) isoliert. Aus dem untranskribierten Bereich (H18, H23/27) konnten dagegen nur DNA-Anteile in der Größenordnung der Präzipitationen mit dem Isotypkontrollantikörper BO-7 nachgewiesen werden. Offenbar war das von TuBB-9 erkannte pKi-67 auch mit Sequenzen assoziiert, die noch stromaufwärts des Promotors liegen (Primerpaar H42). Dem entgegen präzipitierte MIB-1 ähnlich hohe Anteile aus allen Regionen des Clusters, jedoch nur geringfügig mehr DNA als der Kontrollantikörper. Der Antikörper gegen Dimethyl-Lysin aus Histon H3 zeigte eine tendenzielle Bevorzugung des untranskribierten Bereichs. Die für anti-Dimethyl-H3/K9 ermittelten Werte waren nicht mit der Isotypkontrolle vergleichbar, da vom Vertreiber kein genauer Wert für die Konzentration angegeben werden konnte.

Mit den Kaninchen-Seren gegen UBF und Pol I wurden insgesamt wesentlich höhere DNA-Anteile isoliert als mit den monoklonalen Maus-Antikörpern (siehe Abbildung 39B). Pol I war zu einem geringen Anteil mit dem durch H42 amplifizierten Segment assoziiert, während – wie erwartet – große Mengen an DNA aus dem gesamten transkribierten Bereich präzipitiert wurden. Dabei nahm der Anteil an isolierten Chromatin-Fragmenten in 3'-Richtung deutlich zu, wohingegen fast keine Bindung an die untranskribierte DNA vorlag. UBF band ebenso wie Pol I nur an die transkribierte Region (H4 und H13) und den erweiterten Promotorbereich (H0 und H42), wobei allerdings eine noch stärkere Bevorzugung von H0 vorlag als im Falle der ChIP mit TuBB-9. Die DNA-Präzipitation durch das Kontrollserum war im Vergleich zu den spezifischen Kaninchen-Seren vernachlässigbar gering.

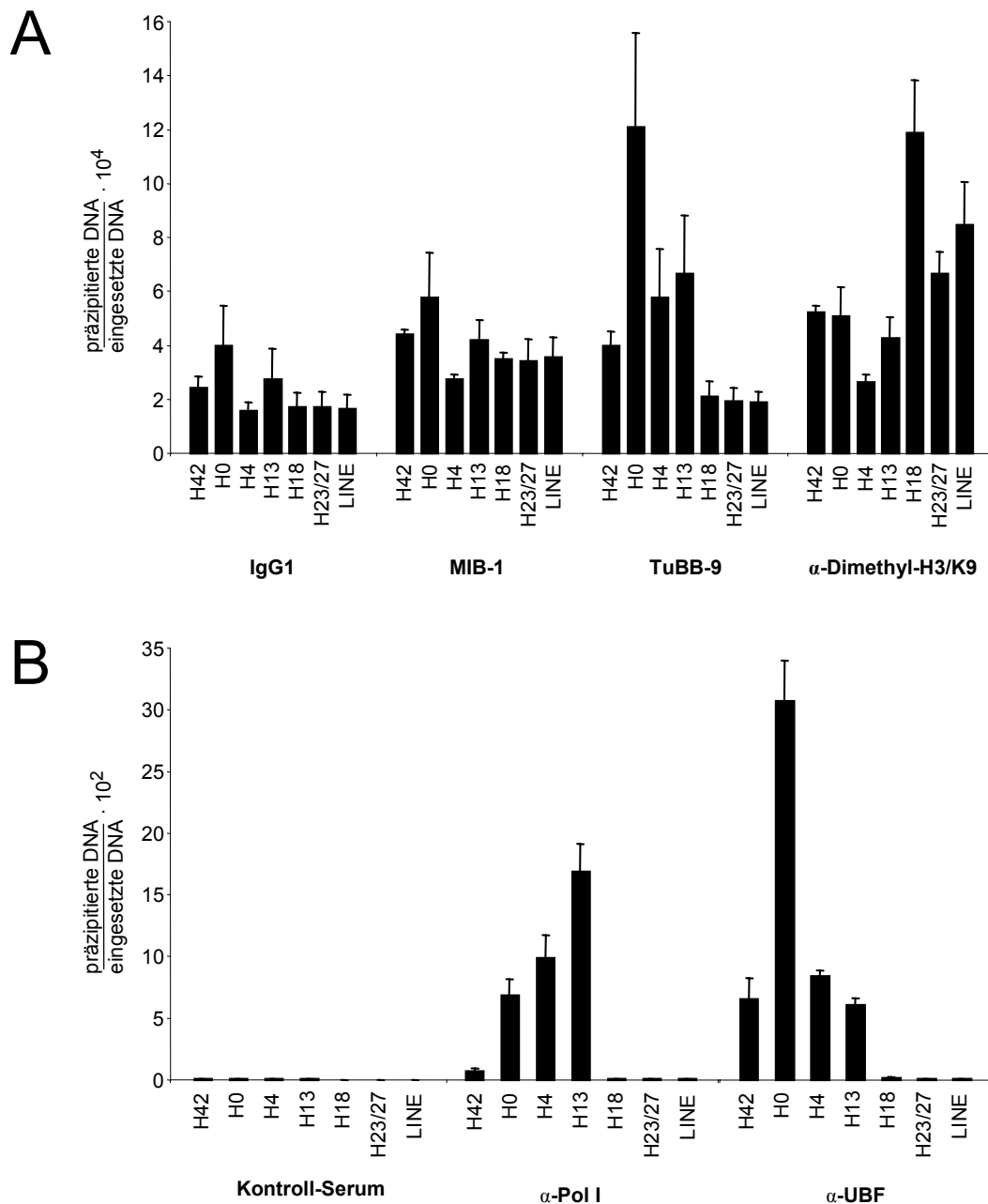


Abbildung 39: TuBB-9 präzipitiert Chromatin aus dem Bereich des rDNA-Clusters. Gezeigt ist die präzipitierte DNA-Menge relativ zur eingesetzten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils quantifiziert über Echtzeit-PCR (mit Standardabweichung). Verwendet wurden dafür Primer gegen den rDNA-Cluster sowie das LINE. A) Ergebnisse der monoklonalen Antikörper gegen pKi-67, einer Isotypkontrolle und des Antikörpers gegen Dimethyl-Histon H3/K9. B) Ergebnisse der polyklonalen Seren gegen Proteine der rDNA-Transkriptionsmaschinerie sowie eines Kaninchen-Normalserums.

Um die Relevanz der Ergebnisse beurteilen zu können, wurden Präzipitationen mit Kontrollantikörpern durchgeführt und alle Präzipitate durch eine PCR mit Primerpaaren gegen sogenannte LINEs (*long interspersed nuclear elements*) untersucht. Hierbei handelt es sich um zahlreiche, verstreut im Genom vorkommende Retrotransposon-Elemente (Smit, 1996), die zwar teilweise in nucleolärer DNA, nicht aber in den rRNA-Genen zu

finden sind (Kaplan *et al.*, 1993).

In Abbildung 40 sind die bereinigten Ergebnisse (nach Abzug der mit unspezifischen Anti-

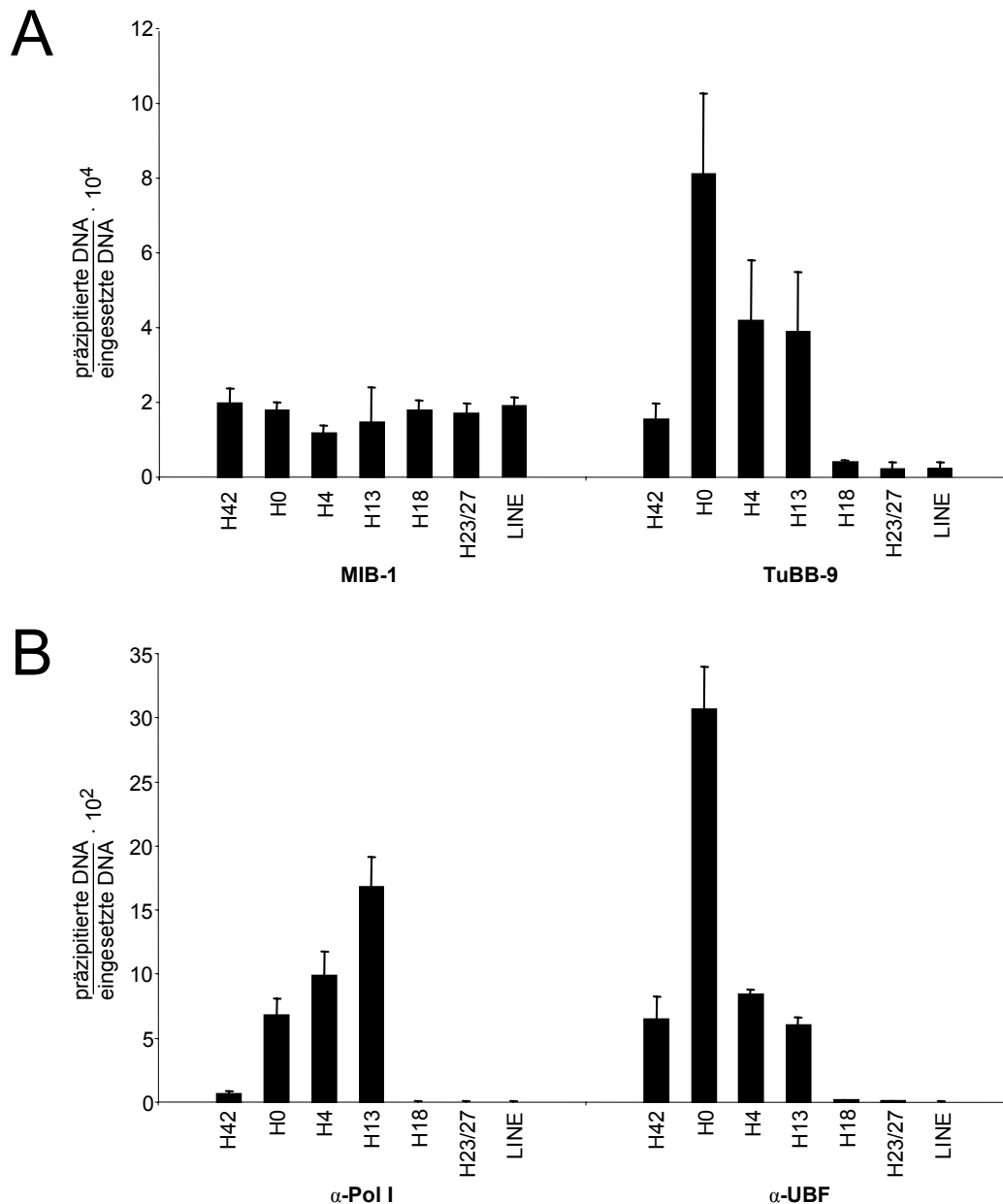


Abbildung 40: TuBB-9 präzipitiert Chromatin aus dem Bereich des rDNA-Clusters. Gezeigt ist die präzipitierte DNA-Menge relativ zur eingesetzten DNA abzüglich der DNA-Menge, die ein Kontrollantikörper präzipitiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils quantifiziert über Echtzeit-PCR (mit Standardabweichung). Verwendet wurden dafür Primer gegen den rDNA-Cluster sowie das LINE. A) Ergebnisse der monoklonalen Antikörper gegen pKi-67 abzüglich der Isotypkontrolle. B) Ergebnisse der polyklonalen Seren gegen Proteine der rDNA-Transkriptionsmaschinerie abzüglich eines Kaninchen-Normalserums.

körpern isolierten DNA) dargestellt. Der pKi-67-spezifische Antikörper MIB-1 zeigte keine bevorzugte Präzipitation von einem der untersuchten Abschnitte des rDNA-Clusters. Ein ähnlicher Anteil wurde auch aus den LINEs präzipitiert (siehe Abbildung 40A). Dagegen wurde mit dem zweiten pKi-67-spezifischen Antikörper, TuBB-9, wie oben

dargelegt, vornehmlich DNA aus dem transkribierten Bereich angereichert. Der durch die in der untranskribierten Region bindenden Primerpaaren amplifizierte DNA-Anteil lag in der Größenordnung des unspezifischen LINE (H23/27) bzw. etwas höher (H18). Eine weitere Kontroll-PCR mit DNA-Fragmenten aus dem strukturgenetischen Bereich von Histon H4 ergab für diese Antikörper ebenso einen Wert im Bereich der Isotypkontrolle (nicht gezeigt).

Wie aus Abbildung 40B nochmals deutlich wird, banden UBF und Pol I ausschließlich an den transkribierten (H4 und H13) und den erweiterten Promotorbereich (H0 und H42) – jeweils mit charakteristischer Verteilung. Die Assoziation mit LINE-DNA war im Vergleich dazu vernachlässigbar gering.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zum Teil hochkonservierte Domäne des Ki-67-Proteins in *E. coli*-Bakterien exprimiert und dazu verwendet, spezifische monoklonale Antikörper zu generieren. Unter Verwendung des so hergestellten Antikörpers TuBB-9 konnte nachgewiesen werden, dass das von ihm erkannte Epitop ein deutlich anderes Verteilungsmuster in HeLa-Zellen zeigte, als dies bisher mit anderen pKi-67-spezifischen Antikörpern festgestellt werden konnte. Das durch TuBB-9 detektierte Ki-67-Protein kolo-kalisierte sowohl in der Interphase als auch der Mitose mit Komponenten des rDNA-Transkriptionsapparates. In der Interphase konnten diese Bereiche im Nucleolus der Zelle als diejenigen identifiziert werden, in denen die Transkription der ribosomalen DNA aktiv erfolgt. In weiterführenden Experimenten (Chromatin-Immunpräzipitation) konnte auch eine physikalische Interaktion zwischen pKi-67 und rRNA-Genen gezeigt werden. Ähnlich wie der Transkriptionsfaktor UBF war es dabei im Wesentlichen auf den transkribierten und den promotornahen Bereich beschränkt, wobei die größte Assoziation mit der Region um den Transkriptionsstartpunkt ermittelt wurde.

4.1 Herstellung und Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers TuBB-9

Die Herstellung des Antikörpers TuBB-9 wurde an verschiedenen Punkten kontrolliert. So konnte die korrekte Klonierung der cDNA über Restriktionsanalysen und Sequenzierungen verifiziert werden. Das in *E. coli*-Bakterien exprimierte und mittels IMAC aufgetrennte „His-Tag“-Fusionsprotein wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel untersucht. Dadurch konnte festgestellt werden, dass das Hauptprodukt ein scheinbares Molekulargewicht von 34 kDa besitzt und ein Nebenprodukt – möglicherweise unvollständig translatiertes Fusionsprotein oder ein Abbauprodukt – von 24 kDa auftritt. Das Hauptprodukt erscheint somit knapp 9 kDa schwerer als zuvor berechnet (vgl. Anhang). Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich ein Phänomen, das häufig bei der Expression DNA-bindender Proteine zu beobachten ist: Aufgrund eines überdurchschnittlich häufigen Auftretens stark basischer Aminosäurereste – in diesem Fall hat das Fusionsprotein eine berechnete positive Ladung von über 30 bei pH 7 und einen pI von 11,3 – zeigen sie in der SDS-Elektrophorese eine verringerte Laufgeschwindigkeit (Übersicht bei Chiou und Wu, 1999).

Der durch Hybridomtechnik gewonnene Antikörper TuBB-9 erkennt zweifelsfrei die

charakteristische Doppelbande des Ki-67-Proteins in Western Blots von Zelllysaten als auch das native Protein in der Immunpräzipitation. Hierbei muss jedoch bemerkt werden, dass MIB-1 im Western Blot sensitiver ist als TuBB-9. Dies hängt wahrscheinlich zum Teil damit zusammen, dass das für MIB-1 beschriebene antigene Epitop innerhalb der Ki-67-Motive (in Exon 13) in neun Wiederholungen vorliegt (Kubbutat *et al.*, 1994), wohingegen das von TuBB-9 erkannte Epitop nur einmal je Protein vorhanden ist. Auch in formaldehydfixierten Präparaten von humanen Tonsillen färben MIB-1 und TuBB-9 dieselben Zellen.

Alle hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der neue Antikörper TuBB-9 ebenso wie MIB-1 gegen das Ki-67-Protein gerichtet ist. Warum färben beide Antikörper aber jeweils unterschiedliche Bereiche innerhalb der Zelle? Verschiedene Gründe könnten hier eine Rolle spielen. Am wahrscheinlichsten ist, dass MIB-1 und TuBB-9 das Ki-67-Protein in jeweils unterschiedlichem biologischen Kontext erkennen. Möglicherweise färbt TuBB-9 am Nucleolusrand befindliches pKi-67 deswegen nicht (oder weitaus weniger als MIB-1), weil dort eine Interaktion von der durch Exon 9 kodierten Region mit einem bisher unbekanntem Bindungspartner – sei es ein Protein, eine Nucleinsäure oder eine niedermolekulare Struktur – vorliegt und so das Epitop für den Antikörper maskiert. Diese Wechselwirkung muss dabei nicht zwingend über die durch Exon 9 kodierte Domäne vermittelt werden. Vielmehr ist es durchaus möglich, dass eine Bindung in einem entfernten Bereich des Proteins eine Veränderung der Gesamtkonformation von pKi-67 bewirkt, die das durch TuBB-9 erkannte Epitop so modifiziert, dass es nicht mehr erkannt werden kann. Weiterhin könnten bestimmte Proteindomänen durch intramolekulare Wechselwirkung maskiert werden. In diesem Zusammenhang hat die von Schmidt *et al.* (2002 und 2003) beschriebene Bindung zwischen N-Terminus und dem durch Exon 13 kodierten Bereich von pKi-67 möglicherweise eine Bedeutung. Aber auch diese Bindung ist wahrscheinlich von bestimmten physiologischen Voraussetzungen abhängig und somit in verschiedenen Bereichen des Zellkerns unterschiedlich. Genauso kann man für die durch MIB-1 erkannte pKi-67-Fraktion argumentieren: Das in den durch TuBB-9 angefärbten innernucleolären Punkten lokalisierte pKi-67 kann durch MIB-1 nicht detektiert werden, weil hier die durch Exon 13 kodierte Domäne mit den Ki-67-Motiven durch eine intra- oder intermolekulare Wechselwirkung blockiert ist.

Im Vergleich hiermit sind die Ergebnisse der Mikroinjektionsstudien mit MIB-1 und TuBB-9 sehr interessant. Beide Antikörper binden das Ki-67-Protein jeweils in einer Weise, die zumindest zum Teil eine Relokalisation induziert. Allerdings unterscheiden sie

sich in ihrer Fähigkeit, durch Mikroinjektion das Färbemuster des jeweils anderen Antikörpers zu beeinflussen. Während die Injektion von MIB-1 das TuBB-9-Muster nicht verändert, so induziert die TuBB-9-Injektion zumindest ein vermehrtes Auftreten der nucleoplasmatischen Flecken in der MIB-1-Färbung. Dies bestärkt die Hypothese, dass beide Antikörper weitgehend distinkte Populationen von pKi-67-Molekülen erkennen. Lediglich TuBB-9 scheint zu einem geringen Teil das durch MIB-1 erkannte Ki-67-Protein zu binden. Dies zeigt sich ebenfalls in der partiellen Kolo-kalisation in den Immunfärbungen: TuBB-9 färbt in der Mitose – neben den charakteristischen UBF-assoziierten Punkten – die perichromosomale Schicht, wenn auch wesentlich schwächer als MIB-1. In der frühen G₁-Phase ist die Kolo-kalisation in den nucleoplasmatischen Foci, dem perinucleolären Chromatin und den PNBs noch evident. Umgekehrt ist es weit schwieriger zu bestimmen, ob keinerlei MIB-1-Färbung an den Orten vorkommt, an denen sich das durch TuBB-9 erkannte pKi-67 befindet, da ihre Intensität am Rand der Nucleoli so stark ist, dass sich eine schwache, aber spezifische Färbung in der fibrillären Komponente nur schwer nachweisen lässt. Für mitotische Zellen wurde jedoch von Traut *et al.* (2002) beschrieben, dass keine Färbung der NORs durch MIB-1 erfolgt.

Beide Antikörper unterscheiden sich auch in den Mikroinjektionsversuchen bezüglich der Fähigkeit, das gesamte im Zellkern befindliche Protein der jeweiligen Population umzuverteilen. Während MIB-1 offenbar einen sehr großen Teil oder das gesamte für ihn detektierbare Protein erreicht, ist dies für TuBB-9 nicht der Fall. Zwar färbt der injizierte TuBB-9 den Nucleolusrand und Punkte im Nucleoplasma, doch erkennt der in der anschließenden Immunfärbung verwendete Antikörper noch die innernucleolären Punkte.

Zudem erkennt mikroinjizierter TuBB-9 pKi-67 in der Konformation, in der es direkt nach der Translation vorliegt, möglicherweise gar nicht, da noch fünf Stunden nach der Injektion meist keine Kernfärbung erkennbar ist und der Antikörper sich diffus im Cytoplasma verteilt. Wahrscheinlich kann TuBB-9 es erst nach der Einwanderung in den Zellkern während der Mitose binden. Dagegen erkennt MIB-1 sein Epitop offenbar bereits relativ kurz nach der Mikroinjektion, wie die Bildung zahlreicher Komplexe nach wenigen Minuten andeutet.

Das Phänomen der ausschließlichen Erkennung nur einer Fraktion eines zellulären Proteins durch einen Antikörper wurde bereits unter dem Begriff der „Epitop-Maskierung“ für verschiedene andere Antikörper und Proteine beschrieben. Beispielsweise erkennen verschiedene Antikörper gegen das Zinkfinger-Protein ZPR1, das mit der Spinalen Muskelatrophie in Verbindung gebracht wird, offenbar unterschiedliche Fraktionen des

Proteins in verschiedenen subnucleären Kompartimenten (Gangwani *et al.*, 2001). Ebenso bindet der Antikörper 2G2 nur eine bestimmte Konformation von Actin, die von anderen Antikörpern nicht erkannt wird (Gonsior *et al.*, 1999).

Das Ki-67-Protein scheint – nach diesen Ergebnissen – im gesamten Nucleolus vorzukommen, sich dabei allerdings in mindestens zwei distinkte Fraktionen aufzuteilen, die vermutlich mit unterschiedlichen Bindungspartnern assoziiert sind und möglicherweise unterschiedliche Funktionen besitzen.

4.2 Mögliche Funktionen des Ki-67-Proteins bei der Transkription und der Prozessierung von ribosomaler RNA

Die Untersuchung der Färbemuster der pKi-67-spezifischen Antikörper MIB-1 und TuBB-9 ließ in den verschiedenen Zellzyklusphasen charakteristische Veränderungen erkennen. Während die TuBB-9-Färbung postmitotisch zunächst zum Teil mit der von MIB-1 kolokalisiert, unterscheiden sich beide ab der späten G₁-Phase fast vollständig: TuBB-9 färbt im weiteren Verlauf der Interphase vor allem innernucleoläre Punkte. Dagegen findet man die MIB-1-Färbung präferentiell am Nucleolusrand und in geringerem Ausmaß in einem Teil des Nucleolusinneren. In der Meta- und der Anaphase erkennt TuBB-9 klar abgegrenzte Punkte auf den kondensierten Chromosomen, MIB-1 dagegen die perichromosomale Schicht.

Die Kolokalisation der TuBB-9-Färbung mit UBF und naszierender rRNA in der Interphase zeigt, dass sich pKi-67 an den Orten der aktiven rDNA-Transkription befindet. Dieser Befund wird durch die Lokalisation in der Anaphase unterstützt: Hier kolokalisiert die TuBB-9-Färbung ebenfalls mit UBF, einem bekannten Bestandteil der NORs (Chan *et al.*, 1991). In den NORs sind die rDNA-Cluster auf den einzelnen akrozentrischen Chromosomen konzentriert. Ein Teil von ihnen, die sogenannten „kompetenten“ NORs (Roussel *et al.*, 1996), beherbergt zahlreiche an der rDNA-Transkription beteiligte Proteine wie Pol I, UBF, SL1 (*selectivity factor 1*) oder TTF-I (*transcription termination factor I*), welche zwischen Prophase und später Anaphase zwar inaktiv sind, aber mit den rRNA-Genen assoziiert bleiben (Hernandez-Verdun *et al.*, 2002). Hingegen sind Proteine wie Nucleolin, B23/Nucleophosmin, p120 oder Fibrillarin, die mit der Prozessierung der transkribierten rRNA in Verbindung gebracht werden, in der Mitose häufig mit der perichromosomalen Schicht verbunden. Die Ursachen dieser spezifischen Verteilung sind eng mit dem Neuaufbau der Nucleoli und einem schnellen Beginn der Produktion neuer Ribosomen

verbunden: Die direkt an die rDNA gebundenen Komponenten in den NORs beginnen bereits in der späten Anaphase mit der erneuten Synthese von rRNA-Primärtranskripten (Gébrane-Younès *et al.*, 1997). Dagegen sammeln sich die in der perichromosomalen Schicht gebundenen Proteine zunächst in den PNBs, welche in der G₁-Phase schließlich um die NORs herum zu den aktiven Nucleoli fusionieren (Dundr *et al.*, 2000). Der Transkriptionsapparat wird also vor der Prozessierungsmaschinerie zusammengesetzt.

Ein Teil des Ki-67-Proteins ist demnach mit den Orten der rDNA-Synthese verbunden (TuBB-9-Fraktion). Einen anderen, möglicherweise mit der Prozessierungsmaschinerie assoziierten Teil findet man in den weiter außen liegenden Bereichen des Nucleolus (MIB-1-Fraktion).

Verfolgt man die Reifung der rRNA vom Primärtranskript weit im Inneren des Nucleolus (FC oder DFC) bis zum Einbau in die ribosomalen Untereinheiten in den äußeren Regionen dieser Organelle (GC), so könnte pKi-67 folgende Stationen durchlaufen: Nach den gewonnenen Ergebnissen aus Immunfärbung und ChIP ist die von TuBB-9 erkannte Fraktion möglicherweise direkt an der Synthese der rRNA oder einem sehr frühen Prozessierungsschritt beteiligt und hält sich daher in der Mitose an den NORs und in der Interphase in der fibrillären Komponente (FC oder DFC) des Nucleolus auf. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass es anschließend mit einer Art „Prozessierungskomplex“, der auch die rRNA enthält, in die GC einwandert. Zu diesem Zeitpunkt wird die Konformation des Ki-67-Proteins in einer Weise verändert, die eine Erkennung durch MIB-1 ermöglicht; gleichzeitig kann TuBB-9 nicht mehr effizient binden. Die innernucleoläre Färbung von MIB-1 ist meist im Vergleich zum Rand des Nucleolus etwas schwächer. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das Protein mit dem postulierten Prozessierungskomplex sehr schnell durch die GC nach außen wandert. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Prozessierung der rRNA schnell vonstatten geht und pro Minute bis zu 7500 ribosomale Untereinheiten von einer HeLa-Zelle synthetisiert werden (Lewis und Tollervey, 2000). Die starke Färbung des Nucleolusrands durch MIB-1 kann im Rahmen der hier aufgestellten Hypothese zwei mögliche Ursachen haben. Zum einen könnten hier die letzten Schritte der Reifung der ribosomalen Untereinheiten stattfinden. Dies erfordert die Integration der von Pol I transkribierten rRNAs (18 S, 28 S und 5,8 S), der von der RNA Polymerase III abgelesenen 5 S-RNA und den ribosomalen Proteinen, deren mRNA von der RNA Polymerase II transkribiert wird. Es ist sehr gut möglich, dass dieser Schritt für die gesamte Synthese der ribosomalen Untereinheiten geschwindigkeitsbestimmend ist (Chen und Huang, 2001) und es so zu einer Anreicherung der ribosomalen RNAs und ihrer

Prozessierungskomplexe am Rand des Nucleolus kommt. Zum anderen könnte diese Zone allerdings auch als „Reservoir“ für gerade nicht benötigte Proteine der rRNA-Prozessierung oder -Synthese dienen. Eine Beteiligung an den frühen Prozessierungsschritten muss jedenfalls nicht der Lokalisation im nucleolären Cortex widersprechen, wie Nucleolin zeigt: Die Masse an Nucleolin ist in der Randregion zu finden, während auch eine Beteiligung dieses Proteins an den frühen Ereignissen der Reifung gefunden wurde (Ginisty *et al.*, 1999).

In der frühen G₁-Phase liegt eine erhebliche Kolo-kalisation der Färbungen von MIB-1 und TuBB-9 vor. Zudem ist nach dem Aufbau der Nucleoli eine leichte Färbung des nucleolären Rands durch TuBB-9 zu beobachten. Auch die äußere Schicht der mitotischen Chromosomen wird (besonders in Ana- und Telophase) leicht von TuBB-9 gefärbt. Wie ist dies zu erklären? Einerseits könnte es sein, dass TuBB-9 einen kleinen Teil der MIB-1-Fraktion des Ki-67-Proteins erkennt (siehe oben). Andererseits scheinen die Vorgänge in Mitose und früher G₁-Phase aufgrund des Fehlens des Nucleolus ein Sonderfall zu sein: Die TuBB-9-Färbung ist in der frühen G₁-Phase im Bereich der innernucleolären Punkte, die mit der rDNA-Transkriptionsmaschinerie kolo-kalisieren, aber auch in den Vorläufern der Nucleoli – den PNBs – und einzelnen nucleoplasmatischen Flecken zu finden. PNBs und nucleoplasmatische Flecken sind aber gerade auch die Regionen, die durch MIB-1 gefärbt werden. Zwei mögliche Erklärungen bieten sich an. Erstens könnten hier zwei unterschiedliche Spezies an Prozessierungskomplexen am selben Ort vorliegen: Solche, die pKi-67 der TuBB-9-Fraktion und solche, die pKi-67 der MIB-1-Fraktion enthalten. Die Prozessierung der rRNA geht in distinkten Ribonucleoprotein- (RNP-) Komplexen vor sich, von denen einige bereits beschrieben werden konnten (Hernandez-Verdun und Roussel, 2003). Während der Mitose sind sie mit der perichromosomalen Schicht assoziiert (Hernandez-Verdun *et al.*, 2002) und wirken in der frühen G₁-Phase am Neuaufbau der nucleolären Struktur mit. Die partielle Kolo-kalisation von MIB-1 und TuBB-9 in dieser Zellzyklusphase könnte bedeuten, dass die MIB-1-Fraktion – wie oben beschrieben – an der späteren Prozessierung mitwirkt, während die TuBB-9-Fraktion an der sehr frühen Prozessierung beteiligt ist. Daher bleibt ein Teil des durch TuBB-9 erkannten Proteins in der Mitose mit den RNP-Komplexen an der perichromosomalen Schicht assoziiert, während ein anderer Teil in den NORs zu finden ist. Eine zweite mögliche Erklärung für diese Kolo-kalisation wäre eine Erkennung der MIB-1-Fraktion durch TuBB-9 in der frühen G₁-Phase. Die Ursache hierfür könnte ein Fehlen der Bindungspartner sein, die in den anderen Zyklusphasen für die Maskierung der jeweiligen Epitope verantwortlich sind.

Die Ergebnisse der Immunfärbungen ließen sich durch Chromatin-Immunpräzipitationen bestätigen und darüber hinaus noch erweitern. Die Besonderheit der ChIP besteht darin, dass die chemische Quervernetzung des Chromatins eine räumliche Nähe von bestimmten Proteinen und spezifischen DNA-Sequenzen zeigt. Man ermittelt jedoch keine direkte Bindung eines Proteins an eine Erkennungssequenz wie zum Beispiel im Fall eines *DNA Footprintings*. Diese „indirekte Kopplung“ kann sowohl über andere Proteine als auch Nucleinsäuren erfolgen. Durch die Zugehörigkeit zu bestimmten Komplexen kann man somit Aussagen über eine mögliche Proteinfunktion ableiten.

Die besondere Stärke der Methode ist die Untersuchung zum Zeitpunkt der Quervernetzung räumlich benachbarter Proteine und Nucleinsäuren in *lebenden* Zellen. Nach einer Fragmentierung der DNA durch Ultraschall werden dann Proteine (und daran gebundene DNA) mit Hilfe spezifischer Antikörper präzipitiert. Dieser Abschnitt des Experiments orientiert sich prinzipiell an einer klassischen Immunpräzipitation zur Isolierung von Proteinen. Abschließend löst die Quervernetzung wieder auf und hydrolysiert den Protein-Anteil der isolierten, spezifischen Protein-DNA-Addukte. Nach der Aufreinigung steht die reine DNA für verschiedene Analysemethoden wie quantitative PCR, Southern Blot oder Klonierung zur Verfügung.

Im Rahmen der hier vorgestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass sich mit TuBB-9 DNA-Fragmente isolieren lassen, die aus der erweiterten Promotorregion (H42 und H0) bzw. dem gesamten transkribierten Bereich (H0, H4 und H13) der rRNA-Gene stammen. Dagegen wird aus dem intergenischen Spacer nur wenig mehr DNA präzipitiert als aus einer nicht mit der rDNA in Zusammenhang stehenden Sequenz (LINE). Zunächst einmal bestätigt dies die Immunfluoreszenz-Daten: Die TuBB-9-Fraktion von pKi-67 befindet sich am Ort der rDNA-Transkription. Und mehr noch: Es besteht auch eine physikalische Interaktion zwischen dem Protein und den Genen selbst. Ob diese direkt oder indirekt ist, kann mit dieser Methode – wie oben dargelegt – nicht bestimmt werden.

Demgegenüber bindet das von MIB-1 erkannte Ki-67-Protein ohne besondere Präferenz an die untersuchten DNA-Sequenzen. Selbst aus den LINEs wird etwa so viel DNA präzipitiert wie aus allen Bereichen der rRNA-Gene. Der Grund für die im Vergleich mit der durch TuBB-9 isolierten LINE-DNA hohe Anreicherung könnte einerseits darin liegen, dass die MIB-1-Fraktion des Ki-67-Proteins tatsächlich auch spezifisch mit diesen Sequenzen interagiert. Dies kann aufgrund der Daten zur Bindung an Heterochromatin (Bridger *et al.*, 1998; Scholzen *et al.*, 2002) nicht ausgeschlossen werden. Andererseits könnte der Befund aber ebenso durch die Bindung einer – im Vergleich zu TuBB-9 –

größeren Menge an Protein oder aber eine zusätzliche, eher allgemeine Assoziation mit DNA erklärbar sein (Becker, 1993; MacCallum und Hall, 1999 und 2000b).

ChIP-Studien mit Antikörpern gegen RNA Polymerase I wurden so detailliert wie im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht durchgeführt. Kürzlich konnten Philimonenko *et al.* (2004) zeigen, dass ein anti-Pol I-Antikörper mehr rDNA aus dem 28 S-Gen als aus der Promotorregion präzipitiert. Die hier gezeigten Ergebnisse gehen jedoch wesentlich weiter: Erstens zeigen sie die strikte Beschränkung der Pol I auf den transkribierten Bereich. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der allgemein anerkannten Meinung, dass die Polymerase zusammen mit dem Initiationskomplex in der Promotorregion bindet, das gesamte Primärtranskript abschreibt und dann von ihrem Template dissoziiert (Übersicht bei Grummt, 2003). Lediglich ein geringer Anteil an nicht-transkribierter DNA (H42) wird präzipitiert. Dies könnte einerseits die Grenzen der Genauigkeit der Methode aufzeigen, andererseits aber durch eine Theorie zur Transkriptionsinitiation erklärbar sein. Demnach biegt UBF die Promotorregion in eine Schleife, das sogenannte Enhanceosome (Bazett-Jones *et al.*, 1994; Moss und Stefanovsky, 1995), wodurch auch etwas entferntere genetische Regionen in die Nähe des Initiationskomplexes gelangen könnten. Zweitens nimmt der Anteil an DNA, der durch den Antikörper gegen Pol I präzipitiert wird, zu, je näher man dem Ende des transkribierten Bereichs kommt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die durchschnittliche Geschwindigkeit, mit der Polymerase I die DNA abliest, im Verlauf der Transkription abnimmt. Diese Hypothese passt sehr gut zu Befunden von Jansa *et al.* (1998), die die Termination der Transkription als komplexen Prozess beschreiben, in den mehrere Komponenten involviert sind. Demnach schreibt Pol I die rDNA bis zu einem Terminatorelement ab, welches eine weitere Transkription durch Bindung des Terminationsfaktors TTF-I sterisch behindert. Anschließend bindet ein weiteres Protein, PTRF (*Pol I and transcript release factor*), das die Dissoziation des Transkriptionskomplexes bewirkt. Somit ist es in Anbetracht der in dieser Arbeit vorgelegten ChIP-Ergebnisse wahrscheinlich, dass die Termination der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Transkription ist und sich die Polymerase hier zum Ende des Transkripts in gewissem Maße akkumuliert.

Die ChIP mit dem Antikörper gegen UBF steht im Einklang mit früheren Ergebnissen, die dieses Protein als an der Initiation beteiligten, am Promotor bindenden Faktor beschreiben (Hannan *et al.*, 1998a). Dem widersprechend zeigen ChIP-Studien mit denselben auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primern (O'Sullivan *et al.*, 2002) eine Bindung sowohl an rDNA aus dem transkribierten als auch aus dem nicht-transkribierten Bereich.

Abgesehen von Unterschieden in der technischen Durchführung der Experimente muss in diesem Zusammenhang festgehalten werden, dass O'Sullivan *et al.* präzipitierte und amplifizierte DNA per Agarosegelelektrophorese semiquantitativ nachgewiesen und nicht auf eine interne Input-Kontrolle bezogen haben. Eigene Experimente hierzu belegen, dass dies leicht zu einer Überschätzung der Menge an Amplifikat führen kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Außerdem haben O'Sullivan *et al.* in ihre ChIP keine unabhängige Genregion als Negativkontrolle einbezogen. In den hier dargestellten Experimenten wurde eine Methode zur Präparation von Chromatin-Fragmenten aus dem gesamten Nucleus verwendet. Nach O'Sullivan *et al.* könne so aber keine nucleoläre DNA gewonnen werden, weil diese aufgrund ihrer Kompaktheit bei der Ultraschall-Fragmentierung nicht in den Überstand übergehe und somit nicht für die Immunpräzipitation zur Verfügung stehe. Da hier jedoch gerade mit den polyklonalen Seren beträchtliche Anteile aus der transkribierten Region präzipitiert werden konnten und die untersuchten rRNA-Gene nur im Nucleolus vorkommen, muss dieser Hypothese widersprochen werden. Zudem konnte mit dem Antikörper gegen dimethyliertes Histon H3 (Lysin 9) Chromatin aus den mittleren Regionen des intergenischen Spacers (H18 und H23) isoliert werden. Alle Teile der rRNA-Gene scheinen also mit der hier verwendeten Methode zugänglich zu sein. Abschließend sei bemerkt, dass auch die von O'Sullivan *et al.* veröffentlichten Ergebnisse bei kritischer Betrachtung – im Rahmen der oben angeführten Einschränkungen – eine Bevorzugung der promotornahen DNA durch UBF anzeigen.

4.3 Die Lokalisation des Ki-67-Proteins in den *Cajal bodies*

In Immunfärbungen mit TuBB-9 zeigt eine Fraktion der Kulturzellen nicht das innernucleoläre Punktmuster, sondern – ebenso wie UBF – eine Umverteilung des Proteins in größere, runde nucleoplasmatische Punkte, bei denen es sich offenbar um *Cajal bodies* handelt, da sie das Markerprotein p80-Coilin enthalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die rDNA-Transkription in diesen Zellen beachtlich reduziert ist. In der Regel sind CBs als kleinere Punkte im Nucleoplasma verteilt. Lediglich in Zellen, die die aktiven Phasen des Zellzyklus verlassen oder ausdifferenzieren, wurde im Zusammenspiel mit einer geringeren Transkriptionsaktivität sowohl eine Verringerung der Anzahl der CBs als auch ein Ansteigen ihrer Größe beobachtet (Antoniou *et al.*, 1993; Boudonck *et al.*, 1998; Gribbon *et al.*, 2002). Des Weiteren stellten Andrade *et al.* (1993) fest, dass CBs in der G₁-Phase am häufigsten sind, ihre Zahl aber in S- und G₂-Phase abnimmt. Möglicherweise

fusionieren kleine CBs miteinander, um größere Aggregate zu formen. Nach derzeit gängigen Vorstellungen sind die CBs am Aufbau von Transkriptosomen und RNPs beteiligt (Übersicht bei Gall, 2000 und 2003). Transkriptosomen enthalten Proteine der jeweiligen Transkriptionsmaschinerien der Polymerasen I, II und III. Auch an der Prozessierung von rRNA beteiligte Proteine wie Nucleophosmin und Fibrillarin wurden dort gefunden. Das Auftreten von pKi-67 in CBs steht daher im Einklang mit diesem Modell.

Die Reduktion der rDNA-Transkription in diesen Zellen ist auffällig. Eine vorübergehende Einstellung der Proliferation kann bei HeLa-Zellen jedoch als Erklärung nahezu ausgeschlossen werden. Gegen diese Hypothese muss ebenso eingewandt werden, dass die betreffenden Zellen oftmals in Randbereichen von Zellverbänden auftreten, also beste Proliferationsbedingungen besitzen. Eine interessante Frage für die zukünftige Funktionsanalyse des Ki-67-Proteins ist die Aufklärung der möglichen zellulären Unterschiede zwischen Zellen mit großen nucleoplasmatischen Punkten und denen mit innernucleolärer Verteilung in der TuBB-9-Färbung.

4.4 Das Ki-67-Protein und die Regulierung der Genaktivität

In der Interphase sind in einer proliferierenden Zelle etwa 60 % der rRNA-Gene aktiv. Dabei handelt es sich um diejenigen, die in der Mitose den – wenngleich inaktiven – rDNA-Transkriptionsapparat tragen (kompetente NORs; Roussel *et al.*, 1996). Lange Zeit war unklar, durch welche Mechanismen die Aktivität dieser Gene reguliert wird. In den vergangenen zehn Jahren konnte jedoch ermittelt werden, dass die Regulation hauptsächlich über die Positionierung von Nucleosomen relativ zum Promotor und die chemische Modifikation von Histonen erfolgt. In diesem Zusammenhang ist TTF-I interessanterweise nicht nur an der Termination der Transkription von Pol I beteiligt, sondern bindet zudem noch an das promotorproximale Terminationselement T_0 , das 170 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts liegt (Längst *et al.*, 1998). Dadurch kommt es zu einer für die erneute Transkriptionsinitiation günstigen Ausrichtung der Chromatinstruktur höherer Ordnung: Nucleosomen werden optimal für eine erneute Ablesung der Gene positioniert. Auf der Suche nach Faktoren, die diese Genregulation durch Bindung an TTF-I unterstützen, stieß man auf TIP5 (*TTF-I interacting protein 5*), welches mit der ATPase SNF2h den *nucleolar remodeling complex* (NoRC) bildet (Strohner *et al.*, 2001). Überraschenderweise konnte der NoRC jedoch nicht mit der Aktivierung von rRNA-Genen, sondern mit deren Abschaltung durch Rekrutierung von DNA-Methylasen (Dnmt1,

Dnmt3a und Dnmt3b) und Histon-Deacetylasen (HDAC1 und HDAC4) in den promotornahen Bereich und einer darauf folgenden Ausbildung von Heterochromatin im Bereich dieser Gene in Verbindung gebracht werden (Santoro *et al.*, 2002; Strohner *et al.*, 2004). Der NoRC scheint somit für die Etablierung von repressiven epigenetischen Markierungen und der Festlegung des Aktivitätsstatus' verantwortlich zu sein (Li *et al.*, 2005). Die induzierte Heterochromatin-Bildung wurde unter anderem durch die Assoziation von HP1 mit dem promotornahen Bereich in inaktiven rRNA-Genen gezeigt (Santoro *et al.*, 2002). Interessanterweise ist HP1 aber auch ein Bindungspartner von pKi-67 (Scholzen *et al.*, 2002); beide kolokalisieren in heterochromatischen Regionen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung des zellulären Ki-67-Proteins nach der Mikroinjektion von MIB-1 und TuBB-9 zumindest zum Teil in solche Regionen verlagert, die positiv für HP1 α sind. Vermutlich blockiert der injizierte Antikörper eine Stelle für einen nucleolären Bindungspartner, wodurch das Ki-67-Protein an einen anderen Ort transloziert wird. Eine andere Erklärung könnte sein, dass ein Großteil von pKi-67 bereits in der frühen G₁-Phase mit dem Heterochromatin interagiert und sich durch den injizierten Antikörper nicht mehr davon lösen kann. Diese Hypothese ist im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass sich der Zellzyklus nach der Mikroinjektion von Antikörpern gegen die von Exon 13 kodierte Region verlangsamt (Starborg *et al.*, 1996; Heyden, 1997), besonders bemerkenswert. Diese Befunde deuten auf eine Rolle von pKi-67 bei der epigenetischen Regulation der Genaktivitäten wachstumsrelevanter Proteine oder aber der rRNA-Gene.

Strohner *et al.* (2001) fanden, dass TIP5 – ungeachtet der später festgestellten Involvierung in die Repression der rDNA-Transkription – in der Immunfluoreszenz-Färbung mit aktiv transkribierten rRNA-Genen kolokalisiert. Auch pKi-67 (TuBB-9-Fraktion) kolokalisiert mit Orten naszierender rRNA, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch das Ki-67-Protein bei der Regulation der Aktivität der rRNA-Gene durch epigenetische Markierung und Veränderung der Chromatinstruktur höherer Ordnung von Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang ist sehr interessant, dass mit TIP5 bzw. dem NoRC zwar ein Bindungspartner von TTF-I für die Repression der rDNA-Transkription gefunden wurde, allerdings bisher kein Protein bekannt ist, das die TTF-I-abhängige Aktivierung der rDNA-Transkription ermöglicht (Németh *et al.*, 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch ruhende Monocyten und nicht-proliferierende Fibroblasten sehr geringe Mengen an Ki-67-Protein exprimieren (Dr. Thomas Scholzen, unveröffentlichte Ergebnisse). Der Unterschied in den Expressionsniveaus von pKi-67 in

ruhenden Zellen im Vergleich mit proliferierenden Zellen ist allerdings immens. Dies erklärt zum Teil auch, warum das Protein bisher nicht in ruhenden Zellen nachgewiesen werden konnte. Die strikte Regulation legt jedoch nahe, dass die Expression von pKi-67 eng an den Proliferationsstatus gekoppelt ist. Eine solch direkte Verbindung konnte z. B. für UBF nicht beobachtet werden (Glibetic *et al.*, 1995). Möglicherweise übernimmt das Ki-67-Protein eine wichtige Funktion bei der Initiation der rDNA-Transkription und wird in seiner Expression durch wachstumsrelevante Signale gesteuert. Ein möglicher Ansatzpunkt für die Funktion ist – neben TTF-I (siehe oben) – der Transkriptionsinitiationsfaktor TIF-IA, der eine Schlüsselrolle bei der Bildung des Initiationskomplexes für die rDNA-Transkription übernimmt (Grummt, 2003). Die Aktivität von TIF-IA (Abbildung 41) wird über die Phosphorylierung durch mTOR (*mammalian target of rapamycin*) beeinflusst, welches wiederum ein wichtiges Zielprotein des durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren induzierten Phosphatidylinositid-Transduktionswegs ist (Mayer *et al.*, 2004). Da mTOR ein Sensor-Protein für die intrazelluläre ATP-Konzentration ist, wird angenommen, dass es die Ribosomensynthese je nach zellulärem Energieangebot steuert (Dennis *et al.*, 2001). Das Ki-67-Protein besitzt ebenfalls eine ATP/GTP-Bindungsstelle (Schlüter *et al.*, 1993). Es wäre daher interessant, zu sehen, inwieweit auch pKi-67 in die Regulation der Bildung des Initiationskomplexes involviert ist.

Zahlreiche mit dem Zellzyklus assoziierte Proteine konnten mit der Regulation der Synthese der Ribosomen in Verbindung gebracht werden (Abbildung 41). So hemmen die Tumorsuppressoren RB (Retinoblastom-Protein) und p53 die rDNA-Transkription zellzyklusabhängig, indem sie die Wechselwirkung zwischen UBF und SL1 blockieren (Übersicht bei Ruggero und Pandolfi, 2003). Da die für diese beiden Proteine kodierenden Gene in einer Vielzahl von Tumoren mutiert sind, ist anzunehmen, dass dies einen der Faktoren für die gesteigerte Proliferation von Krebszellen darstellt. Darüber hinaus inhibiert der Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) die Signalkaskade über Phosphatidylinositol-3'-Kinase. Weiterhin werden verschiedene Enzyme, die die Transkription der rDNA positiv regulieren, in mehreren Tumorarten verstärkt exprimiert. Die prominentesten Beispiele hierfür sind ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), CK II (Casein-Kinase II) und die cyclinabhängigen Kinasen Cdk2 und 4.

In diesem Zusammenhang ist es nicht verwunderlich, dass auch das Ki-67-Protein in Tumorzellen verstärkt exprimiert wird. Ausgehend von den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen, die eine Involvierung in die Synthese der ribosomalen Untereinheiten nahe legen, erscheint es äußerst interessant, weiter einzugrenzen, worin seine genaue Aufgabe in diesem für Proliferation und Wachstum notwendigen Prozess besteht.

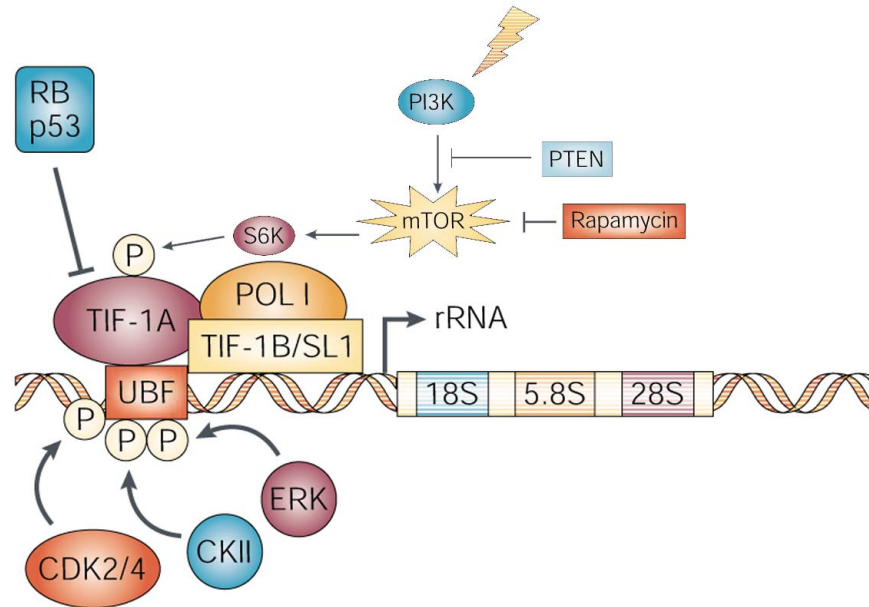


Abbildung 41: Regulation der Aktivität der RNA Polymerase I. Die Tumorsuppressorproteine RB (Retinoblastom-Protein) und p53 beeinflussen die Bildung des Pol I-Initiationskomplexes durch Unterbindung der Wechselwirkung zwischen UBF und SL1. Die Aktivität von UBF ist außerdem vom Phosphorylierungsstatus abhängig. Die cyclinabhängigen Kinasen Cdk2 und Cdk4 und die Casein-Kinase II (CKII) phosphorylieren UBF zellzyklusabhängig und ermöglichen so eine verstärkte Bindung an SL1. Dagegen wird die rRNA-Transkription über ein Wachstumssignal wie EGF (*epidermal growth factor*) durch einen Signaltransduktionsweg über MAP-Kinase (*mitogen activated protein kinase*) und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) aktiviert. ERK phosphoryliert schließlich UBF. Auch über den Phosphatidylinositol-3-(PI3-)Kinase-Weg können Wachstumssignale (Blitz-Symbol), die die Bildung des Pol I-Initiationskomplexes beeinflussen, weitergeleitet werden. Ein zentrales Effektorprotein ist dort die Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), die unter anderem die S6-Kinase aktiviert. Diese hat wiederum verschiedene Funktionen: Sie erhöht erstens die Proteintranslation (unter anderem über die Hyperphosphorylierung des ribosomalen Proteins S6) und bewirkt zweitens (über einen mehrere Proteine umfassenden Transduktionsweg) die Phosphorylierung des wichtigen Initiationsfaktors TIF-1A (Mayer *et al.*, 2004). Diese Signalkaskade wird unter anderem durch die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) reguliert. Abbildung modifiziert nach Ruggero und Pandolfi (2003).

4.5 Résumé

Die Funktion des proliferationsassoziierten Ki-67-Proteins ist mehr als 20 Jahre nach seiner Erstbeschreibung (Gerdes *et al.*, 1983) weitgehend ungeklärt. Jedoch konnten in den letzten Jahren wichtige Fortschritte gemacht werden, die z. B. eine Assoziation mit heterochromatischen Bereichen der Zelle (Bridger *et al.*, 1998) und dem heterochromatinassoziierten Protein HP1 zeigten (Scholzen *et al.*, 2002). Außerdem konnte die Fähigkeit zur

Bindung von DNA nachgewiesen werden (Becker, 1993; MacCallum und Hall, 1999 und 2000b). Verschiedene weitere Bindungspartner wurden ermittelt, allerdings konnten diese aufgrund ihrer eigenen unklaren Bestimmung wenig zur Funktionsanalyse des Ki-67-Proteins beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper hergestellt, die zur Aufklärung der Funktion des Ki-67-Proteins beitragen sollten. Unter Verwendung einer dieser Antikörper, TuBB-9, wurde ein Auftreten von pKi-67 in innernucleolären Punkten in der Interphase und in wenigen größeren Punkten an den kondensierten Chromosomen ermittelt. In der Folge konnte gezeigt werden, dass sich an diesen Orten auch UBF, ein für die rDNA-Transkriptionsinitiation wichtiges Protein befindet und (in der Interphase) neue rRNA entsteht. Diese Kolo-kalisation mit Komponenten der rDNA-Transkriptionsmaschinerie konnte in ChIP-Studien bestätigt und noch verfeinert werden: Das von TuBB-9 erkannte Ki-67-Protein ist mit dem transkribierten und promotornahen Bereich der rRNA-Gene, insbesondere der Region um den Transkriptionsstartpunkt assoziiert. Diese Befunde sprechen eindeutig dafür, dass pKi-67 an einem für Proliferation und Wachstum essentiellen Prozess – der Generierung neuer Ribosomen – beteiligt ist. Wo genau dabei der Ansatzpunkt liegt, muss noch gezeigt werden. Wie oben diskutiert, ist eine Involvierung in die Transkription oder Prozessierung der rRNA sehr wahrscheinlich; auch eine Rolle bei der Steuerung der Aktivität der rRNA-Gene kann nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt gesehen stehen diese Hypothesen im Einklang mit der strengen Regulation der Expression des Ki-67-Proteins. Eine mögliche Aufgabe bei einem (epigenetischen) Regulationsprozess ist durchaus in Übereinstimmung mit früher gewonnenen Erkenntnissen über die Heterochromatin-Assoziation zu sehen. Auch mit dem neuen Antikörper TuBB-9 konnten nucleoplasmatische Punkte nachgewiesen werden, die mit HP1 kolo-kalisieren und insbesondere in der G₁-Phase vermehrt auftreten.

Die Involvierung des Ki-67-Proteins in die Produktion der Ribosomen – einen verhältnismäßig alten und im Laufe von Jahr-millionsen konservierten Prozess – ist zunächst einmal überraschend: Es wurde bisher nur in Wirbeltierarten gefunden und verändert sich in evolutionsbiologischem Maßstab offenbar noch schnell (Deloukas *et al.*, 2004). Inwiefern das Ki-67-Protein möglicherweise eine Aufgabe bei einer für höhere Organismen einzigartigen Feinregulation der rRNA-Synthese übernimmt und ob es – angesichts eines scheinbaren Molekulargewichts von über 300 kDa – noch weitere Funktionen besitzt, müssen weitere Studien aufklären.

5 Literaturverzeichnis

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff L., Roberts K., Watson J. D. (1995) *Molekularbiologie der Zelle*, 3. Auflage, VCH, Weinheim.
- Almeida F., Saffrich R., Ansorge W., Carmo-Fonseca M. (1998) Microinjection of anti-coilin antibodies affects the structure of coiled bodies. *J.Cell Biol.* **142**: 899-912.
- Andersen J. S., Lyon C. E., Fox A. H., Leung A. K., Lam Y. W., Steen H., Mann M., Lamond A. I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr.Biol.* **12**: 1-11.
- Andrade L. E., Tan E. M., Chan E. K. (1993) Immunocytochemical analysis of the coiled body in the cell cycle and during cell proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 1947-1951.
- Antoniou M., Carmo-Fonseca M., Ferreira J., Lamond A. I. (1993) Nuclear organization of splicing snRNPs during differentiation of murine erythroleukemia cells in vitro. *J.Cell Biol.* **123**: 1055-1068.
- Bazett-Jones D. P., Leblanc B., Herfort M., Moss T. (1994) Short-range DNA looping by the *Xenopus* HMG-box transcription factor, xUBF. *Science* **264**: 1134-1137.
- Becker, M. H. G. (1993) *Untersuchungen zur Struktur und Funktion des nukleären, proliferationsassoziierten Antigens, das durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 definiert wird*. Dissertation an der Universität zu Lübeck.
- Birnstiel M. L., Chipchase M. I., Hyde B. B. (1963) The nucleolus, a source of ribosomes. *Biochim.Biophys.Acta* **76**: 454-462.
- Boisvert F. M., Hendzel M. J., Bazett-Jones D. P. (2000) Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J.Cell Biol.* **148**: 283-292.
- Bolivar J., Iglesias C., Ortiz M., Goenechea L., Torres-Montaner A., Valdivia M. M. (1999) The DNA binding domains of UBF represent major human autoepitopes conserved in vertebrates species. *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* **45**: 277-284.

-
- Boudonck K., Dolan L., Shaw P. J. (1998) Coiled body numbers in the Arabidopsis root epidermis are regulated by cell type, developmental stage and cell cycle parameters. *J.Cell Sci.* **111 (Pt 24)**: 3687-3694.
- Brandt E., Ulmer A. J., Flad H. D. (1986) Binding characteristics of a monoclonal antibody against human IL-2 and its application for IL-2 measurement. *Lymphokine Res.* **5 (Suppl 1)**: S35-S42.
- Braun N., Papadopoulos T., Müller-Hermelink H. K. (1988) Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch.B.Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* **56**: 25-33.
- Bridger J. M., Kill I. R., Lichter P. (1998) Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res.* **6**: 13-24.
- Brown D. C. und Gatter K. C. (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* **40**: 2-11.
- Bruno S., Crissman H. A., Bauer K. D., Darzynkiewicz Z. (1991) Changes in cell nuclei during S phase: progressive chromatin condensation and altered expression of the proliferation-associated nuclear proteins Ki-67, cyclin (PCNA), p105, and p34. *Exp.Cell Res.* **196**: 99-106.
- Bruno S., Gorczyca W., Darzynkiewicz Z. (1992) Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry* **13**: 496-501.
- Cattoretti G., Becker M. H., Key G., Duchrow M., Schlüter C., Galle J., Gerdes J. (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J.Pathol.* **168**: 357-363.
- Chan E. K., Imai H., Hamel J. C., Tan E. M. (1991) Human autoantibody to RNA polymerase I transcription factor hUBF. Molecular identity of nucleolus organizer region autoantigen NOR-90 and ribosomal RNA transcription upstream binding factor. *J.Exp.Med.* **174**: 1239-1244.

- Chen D. und Huang S. (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J.Cell Biol.* **153**: 169-176.
- Cheutin T., O'Donohue M. F., Beorchia A., Vandelaer M., Kaplan H., Deféver B., Ploton D., Thiry M. (2002) Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. *J.Cell Sci.* **115**: 3297-3307.
- Chiou S. H. und Wu S. H. (1999) Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Anal.Chim.Acta* **383**: 47-60.
- Comai L. (1999) The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **32**: 1473-1478.
- Conconi A., Widmer R. M., Koller T., Sogo J. M. (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**: 753-761.
- Deloukas P., Earthrowl M. E., Grafham D. V., Rubenfield M., French L., Steward C. A., Sims S. K., Jones M. C., Searle S., Scott C., Howe K., Hunt S. E., Andrews T. D., Gilbert J. G., Swarbreck D., Ashurst J. L., Taylor A., Battles J., Bird C. P., Ainscough R., Almeida J. P., Ashwell R. I., Ambrose K. D., Babbage A. K., Bagguley C. L., Bailey J., Banerjee R., Bates K., Beasley H., Bray-Allen S., Brown A. J., Brown J. Y., Burford D. C., Burrill W., Burton J., Cahill P., Camire D., Carter N. P., Chapman J. C., Clark S. Y., Clarke G., Clee C. M., Clegg S., Corby N., Coulson A., Dhimi P., Dutta I., Dunn M., Faulkner L., Frankish A., Frankland J. A., Garner P., Garnett J., Gribble S., Griffiths C., Grocock R., Gustafson E., Hammond S., Harley J. L., Hart E., Heath P. D., Ho T. P., Hopkins B., Horne J., Howden P. J., Huckle E., Hynds C., Johnson C., Johnson D., Kana A., Kay M., Kimberley A. M., Kershaw J. K., Kokkinaki M., Laird G. K., Lawlor S., Lee H. M., Leongamornlert D. A., Laird G., Lloyd C., Lloyd D. M., Loveland J., Lovell J., McLaren S., McLay K. E., McMurray A., Mashreghi-Mohammadi M., Matthews L., Milne S., Nickerson T., Nguyen M., Overton-Larty E., Palmer S. A., Pearce A. V., Peck A. I., Pelan S., Phillimore B., Porter K., Rice C. M., Rogosin A., Ross M. T., Sarafidou T.,

- Sehra H. K., Shownkeen R., Skuce C. D., Smith M., Standing L., Sycamore N., Tester J., Thorpe A., Torcasso W., Tracey A., Tromans A., Tsolas J., Wall M., Walsh J., Wang H., Weinstock K., West A. P., Willey D. L., Whitehead S. L., Wilming L., Wray P. W., Young L., Chen Y., Lovering R. C., Moschonas N. K., Siebert R., Fechtel K., Bentley D., Durbin R., Hubbard T., Doucette-Stamm L., Beck S., Smith D. R., Rogers J. (2004) The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10. *Nature* **429**: 375-381.
- Dennis P. B., Jaeschke A., Saitoh M., Fowler B., Kozma S. C., Thomas G. (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* **294**: 1102-1105.
- du Manoir S., Guillaud P., Camus E., Seigneurin D., Brugal G. (1991) Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry* **12**: 455-463.
- Duchrow M., Schlüter C., Wohlenberg C., Flad H. D., Gerdes J. (1996) Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.* **29**: 1-12.
- Duchrow M., Schmidt M. H., Zingler M., Anemüller S., Bruch H. P., Broll R. (2001) Suppression of cell division by pKi-67 antisense-RNA and recombinant protein. *Cell Physiol.Biochem.* **11**: 331-338.
- Dundr M., Misteli T., Olson M. O. (2000) The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J.Cell Biol.* **150**: 433-446.
- Durocher D., Henckel J., Fersht A. R., Jackson S. P. (1999) The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol.Cell* **4**: 387-394.
- El-Osta A., Kantharidis P., Zalcborg J. R., Wolffe A. P. (2002) Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol.Cell Biol.* **22**: 1844-1857.
- Endl E. und Gerdes J. (2000) Posttranslational modifications of the Ki-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. *J.Cell Physiol.* **182**: 371-380.

- Endl E., Kausch I., Baack M., Knippers R., Gerdes J., Scholzen T. (2001) The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J.Pathol.* **195**: 457-462.
- Falini B., Flenghi L., Fagioli M., Stein H., Schwarting R., Riccardi C., Manocchio I., Pileri S., Pelicci P. G., Lanfrancone L. (1989) Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *J.Histochem.Cytochem.* **37**: 1471-1478.
- Fonatsch C., Nowotny H., Pittermann-Höcker E., Streubel B., Jäger U., Valent P., Büchner T., Lechner K. (2001) Amplification of ribosomal RNA genes in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **32**: 11-17.
- Franke W. W. (1988) Matthias Jacob Schleiden and the definition of the cell nucleus. *Eur.J.Cell Biol.* **47**: 145-156.
- Fuchs R. und Blakesley R. (1983) Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* **100**: 3-38.
- Gall J. G. (2000) Cajal bodies: the first 100 years. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **16**: 273-300.
- Gall J. G. (2003) The centennial of the Cajal body. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**: 975-980.
- Gangwani L., Mikrut M., Theroux S., Sharma M., Davis R. J. (2001) Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat.Cell Biol.* **3**: 376-383.
- Gébrane-Younès J., Fomproix N., Hernandez-Verdun D. (1997) When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J.Cell Sci.* **110 (Pt 19)**: 2429-2440.
- Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int.J.Cancer* **31**: 13-20.
- Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H. H., Schwab U., Stein H. (1984a) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J.Immunol.* **133**: 1710-1715.

- Gerdes J., Dallenbach F., Lennert K., Lemke H., Stein H. (1984b) Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol.Oncol.* **2**: 365-371.
- Gerdes J., Li L., Schlüter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Gerlach C., Stahmer I., Kloth S., Brandt E., Flad H. D. (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am.J.Pathol.* **138**: 867-873.
- Gerlach C., Kubbutat M., Schwab U., Key G., Flad H. D., Gerdes J. (1998) Proliferation-associated Ki-67 protein is a target for autoantibodies in the human autoimmune disease systemic lupus erythematosus. *Lab Invest* **78**: 129-130.
- Ginisty H., Sicard H., Roger B., Bouvet P. (1999) Structure and functions of nucleolin. *J.Cell Sci.* **112 (Pt 6)**: 761-772.
- Glibetic M., Taylor L., Larson D., Hannan R., Sells B., Rothblum L. (1995) The RNA polymerase I transcription factor UBF is the product of a primary response gene. *J.Biol.Chem.* **270**: 4209-4212.
- Goenechea L. G., Rendon M. C., Iglesias C., Valdivia M. M. (1992) Immunostaining of nucleolus organizers in mammalian cells by a human autoantibody against the polymerase I transcription factor UBF. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* **38**: 841-851.
- Gonsior S. M., Platz S., Buchmeier S., Scheer U., Jockusch B. M., Hinssen H. (1999) Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J.Cell Sci.* **112 (Pt 6)**: 797-809.
- Greenough R. B. (1925) Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J.Cancer Res.* **9**: 453-463.
- Gribbon C., Dahm R., Prescott A. R., Quinlan R. A. (2002) Association of the nuclear matrix component NuMA with the Cajal body and nuclear speckle compartments during transitions in transcriptional activity in lens cell differentiation. *Eur.J.Cell Biol.* **81**: 557-566.

-
- Grummt I., Smith V. A., Grummt F. (1976) Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell* **7**: 439-445.
- Grummt I. (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* **17**: 1691-1702.
- Grundmann, E. (1971) Der mitotische Zellzyklus. In: Altmann H. W., Büchner F., Letterer E., Roulet F. (Hrsg.): *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, Bd. 2/2. Teil: Der Zellkern, Springer, Berlin, S.282-289.
- Hannan K. M., Hannan R. D., Rothblum L. I. (1998a) Transcription by RNA polymerase I. *Front Biosci.* **3**: d376-d398.
- Hannan K. M., Rothblum L. I., Jefferson L. S. (1998b) Regulation of ribosomal DNA transcription by insulin. *Am.J.Physiol.* **275**: C130-C138.
- Harris H. (1999) *The birth of the cell*, Yale University Press, New Haven.
- Henderson A. S., Warburton D., Atwood K. C. (1972) Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69**: 3394-3398.
- Hernandez-Verdun D. und Gautier T. (1994) The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays* **16**: 179-185.
- Hernandez-Verdun D., Roussel P., Gébrane-Younès J. (2002) Emerging concepts of nucleolar assembly. *J.Cell Sci.* **115**: 2265-2270.
- Hernandez-Verdun D. und Roussel P. (2003) Regulators of nucleolar functions. *Prog.Cell Cycle Res.* **5**: 301-308.
- Hernandez-Verdun D. und Louvet E. (2004) Le nucléole: structure, fonctions et maladies associées. *Med.Sci.(Paris)* **20**: 37-44.
- Heyden T. S. (1997) *Zellbiologische Untersuchungen zu intrazellulärem Transport, Funktion und Regulation des proliferations-assoziierten Antigens Ki-67*. Dissertation an der Freien Universität Berlin.

-
- Hofmann K. und Bucher P. (1995) The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem.Sci.* **20**: 347-349.
- Howard A., Pelc S. R. (1953) Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* **6 (Suppl.)**: 261-273.
- Jacob S. T. und Ghosh A. K. (1999) Control of RNA polymerase I-directed transcription: recent trends. *J.Cell Biochem.* **75 (Suppl 32-33)**: 41-50.
- Jahn I. (2003) Vorwort. In: *Klassische Schriften der Zellenlehre*, 2. Auflage, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, S.6-42.
- Janeway C. A. und Travers P. (1995) *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Jansa P., Mason S. W., Hoffmann-Rohrer U., Grummt I. (1998) Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *EMBO J.* **17**: 2855-2864.
- Jenuwein T. und Allis C. D. (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- Jones D. O., Cowell I. G., Singh P. B. (2000) Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* **22**: 124-137.
- Kaesler M. D. und Iggo R. D. (2002) Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**: 95-100.
- Kaplan F. S., Murray J., Sylvester J. E., Gonzalez I. L., O'Connor J. P., Doering J. L., Muenke M., Emanuel B. S., Zasloff M. A. (1993) The topographic organization of repetitive DNA in the human nucleolus. *Genomics* **15**: 123-132.
- Kausch I., Lingnau A., Endl E., Sellmann K., Deinert I., Ratliff T. L., Jocham D., Sczakiel G., Gerdes J., Böhle A. (2003) Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. *Int.J.Cancer* **105**: 710-716.

- Kausch I., Jiang H., Brocks C., Bruderek K., Krüger S., Sczakiel G., Jocham D., Böhle A. (2004) Ki-67-directed antisense therapy in an orthotopic renal cell carcinoma model. *Eur.Urol.* **46**: 118-124.
- Key G., Becker M. H., Baron B., Duchrow M., Schlüter C., Flad H. D., Gerdes J. (1993) New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* **68**: 629-636.
- Kill I. R. (1996) Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillarin-deficient region of the dense fibrillar component. *J.Cell Sci.* **109**: 1253-1263.
- Klein J. und Grummt I. (1999) Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 6096-6101.
- Kubbutat M. H., Key G., Duchrow M., Schluter C., Flad H. D., Gerdes J. (1994) Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J.Clin.Pathol.* **47**: 524-528.
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Längst G., Becker P. B., Grummt I. (1998) TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *EMBO J.* **17**: 3135-3145.
- Leary D. J. und Huang S. (2001) Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett.* **509**: 145-150.
- Leung A. K., Andersen J. S., Mann M., Lamond A. I. (2003) Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem.J.* **376**: 553-569.
- Levine M. (1931) Studies in the cytology of cancer. *Am.J.Cancer* **15**: 144, 788, 1410.

-
- Lewis J. D. und Tollervey D. (2000) Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science* **288**: 1385-1389.
- Li H., Byeon I. J., Ju Y., Tsai M. D. (2004) Structure of human Ki67 FHA domain and its binding to a phosphoprotein fragment from hNIFK reveal unique recognition sites and new views to the structural basis of FHA domain functions. *J.Mol.Biol.* **335**: 371-381.
- Li J., Santoro R., Koberna K., Grummt I. (2005) The chromatin remodeling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO J.* **24**: 120-127.
- Lopez F., Belloc F., Lacombe F., Dumain P., Reiffers J., Bernard P., Boisseau M. R. (1991) Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* **12**: 42-49.
- Lopez F., Belloc F., Lacombe F., Dumain P., Reiffers J., Bernard P., Boisseau M. R. (1994) The labelling of proliferating cells by Ki67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. *Exp.Cell Res.* **210**: 145-153.
- MacCallum D. E. und Hall P. A. (1999) Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp.Cell Res.* **252**: 186-198.
- MacCallum D. E. und Hall P. A. (2000a) The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J.Pathol.* **190**: 537-544.
- MacCallum D. E. und Hall P. A. (2000b) The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J.Pathol.* **191**: 286-298.
- MacLeod R. A., Spitzer D., Bar-Am I., Sylvester J. E., Kaufmann M., Wernich A., Drexler H. G. (2000) Karyotypic dissection of Hodgkin's disease cell lines reveals ectopic subtelomeres and ribosomal DNA at sites of multiple jumping translocations and genomic amplification. *Leukemia* **14**: 1803-1814.

-
- Maeshima Y., Kashihara N., Sugiyama H., Makino H., Ota Z. (1996) Antisense oligonucleotides to proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 inhibit human mesangial cell proliferation. *J.Am.Soc.Nephrol.* **7**: 2219-2229.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook F. W. (1989) *Molecular cloning*, 2nd edition, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour.
- Marzio G., Tyagi M., Gutierrez M. I., Giacca M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 13519-13524.
- Mayer C., Zhao J., Yuan X., Grummt I. (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* **18**: 423-434.
- Mayr E. (2000) *Das ist Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- McConkey E. H. und Hopkins J. W. (1964) The relationship of the nucleolus to the synthesis of ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **51**: 1197-1204.
- McDonell M. W., Simon M. N., Studier F. W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J.Mol.Biol.* **110**: 119-146.
- Moore A. E., Sabachewsky L., Toolan H. W. (1955) Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15**: 598-602.
- Moss T. und Stefanovsky V. Y. (1995) Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* **50**: 25-66.
- Németh A., Strohner R., Grummt I., Längst G. (2004) The chromatin remodeling complex NoRC and TTF-I cooperate in the regulation of the mammalian rRNA genes in vivo. *Nucleic Acids Res.* **32**: 4091-4099.
- Ochs R. L., Lischwe M. A., Shen E., Carroll R. E., Busch H. (1985) Nucleologenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* **92**: 330-336.

-
- Oehlert W. (1978) *Klinische Pathologie des Magen-Darm-Traktes*, Schattenhauer, Stuttgart.
- O'Sullivan A. C., Sullivan G. J., McStay B. (2002) UBF binding in vivo is not restricted to regulatory sequences within the vertebrate ribosomal DNA repeat. *Mol.Cell Biol.* **22**: 657-668.
- Pederson T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* **26**: 3871-3876.
- Philimonenko V. V., Zhao J., Iben S., Dingova H., Kysela K., Kahle M., Zentgraf H., Hofmann W. A., de Lanerolle P., Hozak P., Grummt I. (2004) Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat.Cell Biol.* **6**: 1165-1172.
- Piñol-Roma S. (1999) Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol.Biol.Cell* **10**: 77-90.
- Puck T. T., Marcus P. I., Cieciura S. J. (1956) Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J.Exp.Med.* **103**: 273-283.
- Remak R. (1841) Bericht über die Leistungen im Gebiete der Physiologie. *Arch. Anat., Physiol. und wiss. Med.*, **Jg. 1841**: 17.
- Remak R. (1852) Ueber extracellulare Entstehung thierischer Zellen und über Vermehrung derselben durch Theilung. *Arch. Anat., Physiol. und wiss. Med.*, **Jg. 1852**: 47-57.
- Ritossa F. M. und Spiegelman S. (1965) Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **53**: 737-745.
- Roussel P., André C., Comai L., Hernandez-Verdun D. (1996) The rDNA transcription machinery is assembled during mitosis in active NORs and absent in inactive NORs. *J.Cell Biol.* **133**: 235-246.
- Ruggero D. und Pandolfi P. P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat.Rev.Cancer* **3**: 179-192.

-
- Santoro R., Li J., Grummt I. (2002) The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat.Genet.* **32**: 393-396.
- Savino T. M., Bastos R., Jansen E., Hernandez-Verdun D. (1999) The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J.Cell Sci.* **112**: 1889-1900.
- Sawhney N. und Hall P. A. (1992) Ki67--structure, function, and new antibodies. *J.Pathol.* **168**: 161-162.
- Schaadt M., Fonatsch C., Kirchner H., Diehl V. (1979) Establishment of a malignant, Epstein-Barr-virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut* **38**: 185-190.
- Schaadt M., Diehl V., Stein H., Fonatsch C., Kirchner H. H. (1980) Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int.J.Cancer* **26**: 723-731.
- Scherl A., Coute Y., Deon C., Calle A., Kindbeiter K., Sanchez J. C., Greco A., Hochstrasser D., Diaz J. J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol.Biol.Cell* **13**: 4100-4109.
- Schleiden M. J. (1838) Beiträge zur Phylogenesis. *Müller's Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medizin*, **Jg. 1838**, 136-176. Jetzt in Auszügen auch in: *Klassische Schriften der Zellenlehre*, 2. Auflage, 2003, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, S.46-78.
- Schlüter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M. H., Key G., Flad H.-D., Gerdes J. (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J.Cell Biol.* **123**: 513-522.
- Schmidt M. H., Broll R., Bruch H. P., Duchrow M. (2002) The proliferation marker pKi-67 becomes masked to MIB-1 staining after expression of its tandem repeats. *Histochem.Cell Biol.* **118**: 415-422.

-
- Schmidt M. H., Broll R., Bruch H. P., Bogler O., Duchrow M. (2003) The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and cyclin B. *J.Pathol.* **199**: 18-27.
- Scholzen T. und Gerdes J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J.Cell Physiol.* **182**: 311-322.
- Scholzen T., Endl E., Wohlenberg C., van der Sar S., Cowell I. G., Gerdes J., Singh P. B. (2002) The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J.Pathol.* **196**: 135-144.
- Schwann T. (1839) *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen*. Verlag der Sander'schen Buchhandlung, Berlin. Jetzt in Auszügen auch in: *Klassische Schriften der Zellenlehre*, 2. Auflage, 2003, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, S.79-130.
- Shi S. R., Cote R. J., Hawes D., Thu S., Shi Y., Young L. L., Taylor C. R. (1999) Calcium-induced modification of protein conformation demonstrated by immunohistochemistry: What is the signal? *J.Histochem.Cytochem.* **47**: 463-470.
- Smit A. F. (1996) The origin of interspersed repeats in the human genome. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **6**: 743-748.
- Srivastava M. und Pollard H. B. (1999) Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* **13**: 1911-1922.
- Starborg M., Gell K., Brundell E., Höög C. (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J.Cell Sci.* **109 (Pt 1)**: 143-153.
- Strohner R., Németh A., Jansa P., Hofmann-Rohrer U., Santoro R., Längst G., Grummt I. (2001) NoRC—a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J.* **20**: 4892-4900.

- Strohner R., Németh A., Nightingale K. P., Grummt I., Becker P. B., Längst G. (2004) Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol. Cell Biol.* **24**: 1791-1798.
- Stryer L. (1988) *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sueishi M., Takagi M., Yoneda Y. (2000) The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hk1p2. *J. Biol. Chem.* **275**: 28888-28892.
- Takagi M., Matsuoka Y., Kurihara T., Yoneda Y. (1999) Chmadrin: a novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 15)**: 2463-2472.
- Traut W., Endl E., Garagna S., Scholzen T., Schwinger E., Gerdes J., Winking H. (2002) Chromatin preferences of the perichromosomal layer constituent pKi-67. *Chromosome Res.* **10**: 685-694.
- van Dierendonck J. H., Wijsman J. H., Keijzer R., van de Velde C. J., Cornelisse C. J. (1991) Cell-cycle-related staining patterns of anti-proliferating cell nuclear antigen monoclonal antibodies. Comparison with BrdUrd labeling and Ki-67 staining. *Am. J. Pathol.* **138**: 1165-1172.
- Verheijen R., Kuijpers H. J., Schlingemann R. O., Boehmer A. L., van Driel R., Brakenhoff G. J., Ramaekers F. C. (1989a) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J. Cell Sci.* **92 (Pt 1)**: 123-130.
- Verheijen R., Kuijpers H. J., van Driel R., Beck J. L., van Dierendonck J. H., Brakenhoff G. J., Ramaekers F. C. (1989b) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J. Cell Sci.* **92 (Pt 4)**: 531-540.
- Virchow R. (1858) *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*, Verlag von August Hirschwald, Berlin.
- Visintin R. und Amon A. (2000) The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 752.

Yasuda Y. und Maul G. G. (1990) A nucleolar auto-antigen is part of a major chromosomal surface component. *Chromosoma* **99**: 152-160.

Zatsepina O. V., Schöfer C., Weipoltshammer K., Mosgoeller W., Almeder M., Stefanova V. N., Jordan E. G., Wachtler F. (1996) The RNA polymerase I transcription factor UBF and rDNA are located at the same major sites in both interphase and mitotic pig embryonic kidney (PK) cells. *Cytogenet. Cell Genet.* **73**: 274-278.

6 Abkürzungen

5-FU	5-Fluoruridin
α	anti-
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CB	<i>Cajal body (coiled body)</i>
cDNA	<i>complementary</i>
cdc	<i>cell division cycle</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CK II	Casein-Kinase II
Da	Dalton
Dabco	Diazabicyclo[2.2.2]octan
DFC	<i>dense fibrillar centre</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's modified Eagle 's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
Dnmt	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ETS	<i>external transcribed spacer</i>
F _{ab}	antikörperbindendes Fragment
FC	<i>fibrillar centre</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
FZB	Forschungszentrum Borstel
FHA	<i>forkhead-associated</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GC	<i>granular component</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	als Vorsilbe: human
H3	Histon 3
H4	Histon 4
HDAC	Histon-Deacetylase
Hklp2	<i>human kinesin-like protein 2</i>
(H+L)	<i>heavy + light chain</i>

HP1	<i>heterochromatin protein 1</i>
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Ig	Immunglobulin
IGS	<i>intergenic spacer</i>
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
LB (-Medium)	Luria Bertani (-Medium)
LINE	<i>long interspersed nuclear elements</i>
LMW	<i>low molecular weight</i>
Lsg.	Lösung
m	als Vorsilbe: Maus-
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCM	<i>mini-chromosome maintenance</i>
MIB	Molekulare Immunologie Borstel
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazolin/5-Brom-4-chlor-3'-indolyl-phosphat
NIFK	<i>nucleolar protein interacting with the FHA domain of pKi-67</i>
NOR	<i>nucleolar organizer region</i>
NoRC	<i>nucleolar remodeling complex</i>
NTA	<i>nitrilo-triacetic</i>
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligodesoxythymidintriphosphat
p	als Vorsilbe: Protein
p. a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PNB	<i>pre-nucleolar bodies</i>
Pol I	RNA Polymerase I
Pol II	RNA Polymerase II
Pol III	RNA Polymerase III
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
r	als Vorsilbe: Kaninchen- (<i>rabbit</i>)
r	als Vorsilbe: ribosomal
RB	Retinoblastom (-Protein)
RPMI	<i>Rosswell Park Memorial Insitute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase A	Ribonuclease A
RNP	<i>ribonucleoprotein</i>
RT	reverse Transkription
S6-K	S6-Kinase
S	Svedberg-Einheit/Sedimentationskoeffizient

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SL1	<i>selectivity factor 1</i>
SNF2h	<i>sucrose non-fermenting 2 homolog</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA (-Puffer)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA (-Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin
ter	<i>terminus</i>
TIF-IA	<i>transcription initiation factor IA</i>
TIP5	<i>TTF-I interacting protein 5</i>
Toto-3	Toto-3-jodid
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)ammoniummethan
Tris/HCl	Tris-Hydrochlorid
Triton X-100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl-)phenyldecaethylglycolether X-100
TTF-I	<i>transcription termination factor I</i>
TuBB	Tumorbiologie Borstel
U	Einheit der Enzymaktivität
UBF	<i>upstream binding factor</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
w/v	Verhältnis Gewicht/Volumen
XC	Xylencyanol
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
Xklp2	<i>Xenopus kinesin-like protein 2</i>

Nucleotidreste:	A	Adenin
	C	Cytosin
	G	Guanin
	T	Thymin

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

Außerdem wurden neben allgemein üblichen Abkürzungen die Einheiten und Vorsatzzeichen des Internationalen Einheitensystems (SI) sowie die Elementsymbole des Periodensystems (nach IUPAC) verwendet.

7 Anhang

7.1 Alignment der durch Exon 8-10 kodierten Aminosäuresequenzen des Ki-67-Proteins von Mensch, Maus und Langschnauzen-Kaninchenkänguruh

pKi-67 Mensch	:	IN ES EGIP LKRRRV SFG GHLRPEL FDENLPPN TP L KR G EA	:	40
pKi-67 Maus	:	IN KSE G MP M KRRRV SFG GHLRPEL FDENLPPN TP L KR G ET	:	40
Chmadrin	:	VS ES D GL SA KRRRV SFG VHLRPEL FDENLPPN TP V KK G ES	:	40
.				
pKi-67 Mensch	:	P. TKRKS IV MHT P. PVL KK. IIKE Q PQ PSG KQES SG SEI H V	:	77
pKi-67 Maus	:	P. TKRKS IV TH SP. AVL KT. IIK ER PQ SPG KQES PG....	:	73
Chmadrin	:	P GIRRT S FC N CP P RAV L KK P IIK Q EH SK LPE KE PP ST SLV	:	80
.				
pKi-67 Mensch	:	E.. VKA Q SLV I SPP AP SPR K TPVA S DQRRR S CKT AP ASS S	:	115
pKi-67 Maus	: IT PP R TND Q RRR S GR T SSG S NF	:	95
Chmadrin	:	E GML H VQ D RS LE LPA SP KKI SS ASS D DIS Q S Y LLD EN AVC	:	120
.				
pKi-67 Mensch	:	KSQ TE V PKR G GER VAT CLQ K RV S SIS RS QHD IL QMI CS KRR	:	155
pKi-67 Maus	:	LCE T DI PKK A GR KS GNL PA KRA S SIS RS QHG IL QMI CS KRR	:	135
Chmadrin	:	VP VEV Q PQ K TM NT PS .. YS R RS S GRR S QYD T LRR I YAK R R	:	158
.				
pKi-67 Mensch	:	SGASEANL IVAK SWAD VV KL GAK Q TQ T. KV I KH GP QR SM N	:	194
pKi-67 Maus	:	SGASEANL IVAK SWAD VV KL GK V Q T Q T. KV A KH V PP K Q T S	:	174
Chmadrin	:	SGASEANL MV V H SWAD VV R LG TR KP Q T GV V V KH GL ER RV I	:	198

7.2 Aminosäuresequenz des „His-Tag“-Fusionsproteins (Exon 8-10)

MRGSHHHHHHTD**PH**ASS**VPR**V**DNE**SEGIPL**KRRRV**SFG**GHLRPEL**FDENL 50
 PPNTPL**KRGE**A**PTKR**KS**IVM**H**TP**P**V**L**KKI**KE**Q**P**Q**PSG**KQES**SG**SEI**H**VEV** 100
 KAQSLVISPPAP**SPR**K**TPVA**S**DQRRR**S**CKT**APASS**KSQTE**V**PKR**G**GRKS** 150
 GNLPS**KRV**S**SIS**RS**QHD**IL**QMI**CS**KRR**SGASEANL**IVAK**SWAD**VV**KL**GAKQ** 200
 TQT**KVI**K**HGP**QR**SMNKR**Q**RR**PAT**PK**LN*

Stark basische Aminosäurereste sind blau, stark saure rot dargestellt.

7.3 Biochemische Daten des „His-Tag“-Fusionsproteins (Exon 8-10)

Isoelektrischer Punkt (pI): 11,3

Ladung (bei pH 7): +30,9

Molekulargewicht: 25,3 kDa

Die Berechnung erfolgte mit dem Programm EditSeq 5.07 von DNASTAR Inc. (Madison/WI, USA).

Zusammenfassung

Die Expression des Ki-67-Proteins (pKi-67) ist eng an die zelluläre Proliferation gekoppelt. Aus diesem Grund werden Antikörper gegen dieses Protein vielfach als Proliferationsmarker in der Diagnostik verschiedener humaner Neoplasien eingesetzt. Die physiologische Rolle von pKi-67 ist bisher jedoch weitgehend unverstanden. Die strenge Regulation der Proteinexpression und eine in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase wechselnde intrazelluläre Lokalisation weisen allerdings auf die Beteiligung an einem essentiellen Prozess im Rahmen von Zellwachstum und -teilung hin.

In dieser Arbeit wird die Herstellung und Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers TuBB-9 beschrieben, welcher spezifisch für die durch Exon 9 kodierte Region des Ki-67-Proteins ist. Unter Verwendung dieses Antikörpers konnte pKi-67 erstmals an Orten innerhalb der Zelle nachgewiesen werden, die mit frühen Phasen der ribosomalen RNA (rRNA)-Synthese verknüpft sind. Während der Interphase findet man die TuBB-9-Färbung zumeist in innernucleolären Punkten, die mit UBF, einem Transkriptionsfaktor für die rRNA-Gene, kolokalisieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass das durch TuBB-9 erkannte pKi-67 räumlich eng mit naszierenden rRNA-Transkripten assoziiert ist. Zellen, die eine deutlich verringerte rRNA-Synthese aufweisen, zeigen dagegen oftmals ein abweichendes TuBB-9-Färbemuster: Hier sind große nucleoplasmatische Punkte erkennbar, in denen sich neben UBF auch Coilin, das Markerprotein für sogenannte *Cajal bodies*, befindet. In der Mitose ist das durch TuBB-9 nachweisbare pKi-67 an den *nucleolar organizer regions* (NORs) zu finden, welche die in dieser Zellzyklusphase inaktiven Cluster der rRNA-Gene enthalten und in der darauffolgenden Interphase am Neuaufbau der Nucleoli beteiligt sind. Diese Befunde konnten durch Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) erweitert werden. Hierzu wurde die Chromatin-Assoziation von pKi-67 im Vergleich mit den an der rDNA-Transkription beteiligten Proteinen UBF und RNA Polymerase I (Pol I) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass RNA Polymerase I (Pol I) ausschließlich mit dem transkribierten und dem promotornahen Bereich der rRNA-Gene assoziiert ist, jedoch nicht mit dem untranskribierten intergenischen Spacer. UBF und das durch TuBB-9 erkannte pKi-67 zeigen eine ähnliche Präferenz, im Gegensatz zu Pol I allerdings mit einer bevorzugten Bindung an das Chromatin aus der Region um den Transkriptionsstartpunkt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass pKi-67 an einem für Proliferation und Wachstum essentiellen Prozess – der Generierung neuer Ribosomen – beteiligt ist.

Einen Hinweis, auf welche Weise pKi-67 in die Regulation der rRNA-Synthese involviert

sein könnte, geben die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikroinjektionsversuche. Monoklonale Antikörper gegen pKi-67 bewirken eine Relokalisation des Proteins in Regionen, die einen hohen Gehalt an HP1 α aufweisen. Die drei Isoformen von HP1 sind wichtige Regulatorproteine bei der Ausbildung von Heterochromatin und binden – wie bereits zuvor nachgewiesen wurde – an pKi-67. In diesem Zusammenhang erscheint die Untersuchung, inwieweit auch pKi-67 an einer allgemeinen epigenetischen Regulation von Genaktivitäten oder der Aktivität der rRNA-Gene beteiligt ist, besonders interessant.

Danksagungen

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Johannes Gerdes für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes inklusive der Finanzierung meiner Stelle, jedwede Unterstützung und ein angenehmes Arbeitsklima. Vielen Dank für alles, Hannes!

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ernst Rietschel für die Übernahme des Gutachtens und das entgegengebrachte Vertrauen.

Herr Dr. Thomas Scholzen hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Für die außergewöhnlich gute Betreuung bin ich ihm zu großer Dankbarkeit verpflichtet. Vielen Dank auch für die Anregungen zur Korrektur des Manuskripts dieser Arbeit!

Für die Bereitstellung von Antikörpern möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Ernst Brandt, Frau Prof. Dr. Maria Carmo-Fonseca, Frau Prof. Dr. Ingrid Grummt und Herrn Prof. Dr. Manuel Martinez Valdivia bedanken.

Am erwähnten guten Arbeitsklima haben natürlich auch meine anderen Kolleginnen und Kollegen tatkräftig mitgewirkt. Besonders bedanken möchte ich mich bei Claudia Wohlenberg, die so freundlich war, mich in die Borsteler Laborabläufe einzuarbeiten. Bettina Baron-Lühr danke ich für Fusion und Reklonierung der Hybridomzellen, ohne welche diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für ständige Hilfsbereitschaft und/oder die Bereitstellung zahlreicher Arbeitsmaterialien danke ich Anja Lüdemann, Margrit Kernbach, Sabine Teichmeier, Tanja Mengden, Patricia Prilla, Doreen Beyer, Birgit Kullmann, Dr. Ulrike Seitzer, Dr. Prim Singh, Dr. Niki Kourmouli, Dr. Elmar Endl und Ramtin Rahmanzadeh.

Marion Döpker, Christian Lücking und besonders Sina Holze haben sich in mühevoller Kleinarbeit mit dem Korrekturlesen dieser Arbeit beschäftigt. Ich bin Euch was schuldig!

Meinem gesamten Freundeskreis möchte ich für Unterstützung und Freundschaft danken, besonders:

Christian „Es bedeutet den Quell in einer Wüste, den blühenden Baum in einer Wildnis.“ Du weißt das.

Sina Es ist Gold wert, eine so gute Freundin wie Dich in der Nähe zu wissen! Nach Abschluss dieser Arbeit werde ich mich wieder der Sinologie widmen!

Marion Vielen Dank, dass Du mir nach Hamburg gefolgt bist!

Gesa Uns verbindet schon so lange so viel! Vielen Dank für schöne Zeiten und vielen Dank für manchmal berechtigte Kritik. Ohne die wird man nix!

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinem Bruder Axel, meinen Großeltern und Regina dafür, dass sie mich nicht nur während meines gesamten Studiums bedingungslos unterstützt, sondern mir auch einen Ort zum Abschalten und Ausruhen geboten haben.

Lebenslauf

Geburtstag 26. Juni 1975

Geburtsort Bremerhaven

Besuchte Schulen

- a) Grundschule Lunestedt
(8/1981 - 7/1985)
- b) Orientierungsstufe des Schulzentrums Beverstedt
(8/1985 - 7/1987)
- c) Gymnasium Wesermünde in Bremerhaven
(8/1987 - 6/1994)

Schulabschluss Abitur (Note: 1,8)

Universitätsbesuch Universität Bielefeld (Studienfach Biochemie)
(9/1994 - 1/2000)

Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Biochemie II
(Titel: „Expression des neuartigen Matrixmetalloproteinasen-Inhibitors RECK in *Pichia pastoris* und Untersuchung seiner Bindungseigenschaften“)

Studienabschluss Diplom (Note: gut)

Mitarbeit in landwirtschaftlichem Betrieb der Eltern

2/2000 - 11/2001

Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Laborgruppe Tumorbologie am Forschungszentrum Borstel

seit 12/2001

Eigene Publikationen

a) Bullwinkel J., Wohlenberg C., Baron-Lühr B., Lüdemann A., Gerdes J., Scholzen T. (2004) The intracellular distribution of the Ki-67 protein as assessed with the novel monoclonal antibody TuBB-9 points to a role in ribosomal RNA transcription. Abstract für das 2004 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium „The cell cycle, chromosomes and cancer“, Miami/FL, USA, 31.1. - 4.2.2004.

(URL: www.med.miami.edu/MNBWS/Scholzen-.pdf)

b) Poster zu a).

c) Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Lüdemann A., Wohlenberg C., Gerdes J., Scholzen T. (2005) The Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell Physiol.* (im Druck).