

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung des Fachbereichs Medizin  
der Philipps-Universität Marburg. Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

## **Charakterisierung der Interaktion zwischen der Src-Kinase Fyn und hnRNP K im Neuroblastom**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von  
Daniela Jenny Deppe, geboren in Frankfurt am Main, Marburg 2008.

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. DAS NEUROBLASTOM</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. <i>Inzidenz</i> .....	3
1.1.2. <i>Histologie</i> .....	4
1.1.3. <i>Genetik</i> .....	4
N-Myc .....	4
Neutrophinrezeptoren .....	5
1.1.4. <i>Apoptose</i> .....	6
1.1.5. <i>Diagnostik</i> .....	7
1.1.6. <i>Therapie</i> .....	7
1.1.7. <i>Zytostatikaresistenz</i> .....	8
1.1.8. <i>Prognose</i> .....	8
1.2. FYN, EINE NON-REZEPTOR TYROSINKINASE DER SRC-FAMILIE .....	10
1.3. HETEROGENES NUKLEARES RIBONUKLEOPROTEIN K-HNRNP K.....	14
1.4. FRAGESTELLUNG .....	17
<b>2. MATERIAL</b> .....	<b>19</b>
2.1. MATERIALIEN FÜR DIE ZELLKULTUR.....	19
2.1.1. <i>Medien/Lösungen</i> .....	19
2.1.2. <i>Zelllinien</i> .....	19
2.1.3. <i>Verwendete Plasmide</i> .....	20
2.1.4. <i>Verwendete Mutanten</i> .....	20
2.1.5. <i>Transiente Transfektion</i> .....	20
2.2. MATERIAL FÜR BIOCHEMISCHE METHODEN .....	21
2.2.1. <i>Materialien für die Herstellung von Zelllysaten: NP-40-Lyse</i> .....	21
2.2.2. <i>Materialien für die Herstellung von Zelllysaten: Hancock/Evan-Lyse</i> .....	21
2.2.3. <i>Proteinbestimmung nach Bradford</i> .....	22
2.2.4. <i>Immunpräzipitation</i> .....	22
2.2.5. <i>Materialien für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)</i> .....	23
2.2.6. <i>Materialien für Western-Blot</i> .....	24
2.2.7. <i>Kinase-Assay</i> .....	25
2.2.8. <i>Materialien für den Luciferase-Assay</i> .....	26
2.2.9. <i>Immunfluoreszenz</i> .....	27
2.2.10. <i>Immunfluoreszenz: BrdU-Färbung</i> .....	28
<b>3. METHODEN</b> .....	<b>29</b>
3.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	29
3.1.1. <i>Einfrieren von Zellen</i> .....	29
3.1.2. <i>Auftauen von Zellen</i> .....	29
3.1.3. <i>Passagieren von Zellen</i> .....	30
3.1.4. <i>Bestimmung der Zellzahl</i> .....	30
3.1.5. <i>Transiente Transfektion von Säugerzellen durch Kalziumphosphatpräzipitation</i> .....	31
3.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	32
3.2.1. <i>Kultivierung von Bakterien</i> .....	32
3.2.2. <i>Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im Maxi-Maßstab</i> .....	32
3.3. BIOCHEMISCHE METHODEN .....	33
3.3.1. <i>Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen: NP-40-Lyse</i> .....	33
3.3.2. <i>Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen: Hancock/Evan-Lyse</i> .....	33
3.3.3. <i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford</i> .....	34
3.3.4. <i>Immunpräzipitation</i> .....	35

3.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-Page) .....	36 -
3.3.6. Western-Blot .....	37 -
3.3.7. Kinase-Assay .....	38 -
3.3.8. Bestimmung der Luciferaseaktivität mittels Luciferase-DICE-Reporterassay .....	39 -
3.3.9. Immunfluoreszenz .....	40 -
3.3.10. Immunfluoreszenz: BrdU-Färbung .....	41 -
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>42 -</b>
4.1. DARSTELLUNG DER <i>IN-VITRO</i> INTERAKTION VON FYN UND HNRNP K .....	42 -
4.2. BIOCHEMISCHE ANALYSE EINER POTENTIELLEN <i>IN-VIVO</i> INTERAKTION VON FYN UND HNRNP K .....	44 -
4.2.1. Untersuchung der <i>in-vivo</i> Bindungseigenschaften zwischen Fyn und hnRNP K .....	44 -
4.2.2. Analyse der Kinaseaktivität von Fyn in Gegenwart von hnRNP K .....	48 -
4.2.3. Phosphorylierung von hnRNP K durch die Tyrosinkinase Fyn .....	50 -
4.3. FUNKTIONELLE ANALYSE EINER POTENTIELLEN <i>IN-VIVO</i> INTERAKTION VON FYN UND HNRNP K .....	52 -
4.3.1. Potentielle funktionelle Interaktion zwischen Fyn und hnRNP K .....	52 -
4.4. BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG EINER POTENTIELLEN INTERAKTION VON FYN UND HNRNP K .....	55 -
4.4.1. Bedeutung von hnRNP K bei der Fyn-abhängigen Differenzierung von Neuroblastomzellen .....	55 -
4.4.2. Die Rolle von hnRNP K beim Fyn-induzierten Zellzyklusarrest in Neuroblastomzellen .....	57 -
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>59 -</b>
5.1. TRANSLATIONSKONTROLLE DURCH HNRNP K .....	59 -
5.2. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG EINER POTENTIELLEN INTERAKTION VON FYN UND HNRNP K .....	62 -
5.3. UNTERSUCHUNG DER MÖGLICHEN BIOLOGISCHEN RELEVANZ EINER INTERAKTION VON FYN UND HNRNP K .....	65 -
5.4. POTENTIELLE BEDEUTUNG VON HNRNP K FÜR DAS NEUROBLASTOM .....	67 -
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>70 -</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>71 -</b>
<b>8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>72 -</b>
<b>9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>73 -</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>74 -</b>
<b>11. DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>82 -</b>
<b>12. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....</b>	<b>83 -</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor des Kindesalters. Es handelt sich um einen embryonalen Tumor des postganglionären sympathischen Nervensystems, der häufig in der Nebenniere oder dem sympathischen Grenzstrang lokalisiert ist. Das Neuroblastom weist ein sehr heterogenes Verhalten auf. Bei Kindern, bei denen ein Neuroblastom im ersten Lebensjahr diagnostiziert wird, finden sich oft lokalisierte Tumorstadien. Auch kann es zu einer spontanen oder unter minimaler Therapie herbeigeführten Remission des Tumors kommen. Kinder, die bei der Diagnosestellung älter als ein Jahr sind, weisen meist fortgeschrittene, metastasierte Tumorstadien auf und haben eine wesentlich schlechtere Prognose. Die Kinder versterben trotz intensiver multimodaler Therapie oft an der raschen Tumorprogression.

Das biologische Verhalten des Neuroblastoms ist noch wenig aufgeklärt. Deshalb ist es auch so schwierig, den Krankheitsverlauf korrekt vorherzusagen und der richtigen Therapie zuzuordnen.

### 1.1.1. Inzidenz

Das Neuroblastom ist der häufigste solide Tumor in der Kindheit. Etwa 7-10% aller kindlichen Krebserkrankungen sind auf das Neuroblastom zurückzuführen (Brodeur, 2003, Deutsche Krebsgesellschaft 2008).

Laut dem Jahresbericht des deutschen Kinderkrebsregisters 2002 erkrankten pro Jahr in Deutschland 1,4 von 100.000 Kindern am Neuroblastom. Dabei sind Säuglinge und Neugeborene am häufigsten und Jungen in der Regel etwas häufiger als Mädchen betroffen (Deutsches Kinderkrebsregister Jahresbericht 2002).

Die Ätiologie des Tumors ist weitgehend unbekannt. Es ist unwahrscheinlich, dass Umweltfaktoren eine wesentliche Rolle spielen (Brodeur, 2003).

Bei etwa 22% der Patienten findet sich eine familiäre Prädisposition, welche autosomal dominant vererbt wird. Oft werden bei diesen Patienten bilaterale Nebennierenbefunde oder multifokale Primärtumore diagnostiziert (Brodeur, 2003).

### 1.1.2. Histologie

Die meisten Neuroblastome sind undifferenzierte Tumore, für die kleine, runde neuroblastische Zellen charakteristisch sind. In der Regel weisen sie nur geringfügige oder keine Differenzierung auf (Brodeur, 2003).

Der Grad der Differenzierung ist innerhalb einzelner Tumore sehr unterschiedlich. Einige, meist lokalisierte, Tumore zeigen partielle histologische Differenzierung und werden Ganglioneuroblastome genannt. Haben die Tumore teilweise reife Neurone und zusätzlich einen Anteil an Schwannzellen, wird dies als Teil eines Ausreifungsprozesses verstanden. Dies gilt als günstig für die Prognose. Im Gegensatz dazu gelten Tumoren mit völlig undifferenzierten Zellen, die keinen Hinweis auf Ausreifung zeigen, als prognostisch ungünstig.

### 1.1.3. Genetik

Es sind zahlreiche genetische Marker bekannt, die für die unterschiedlichen klinischen Verläufe des Neuroblastoms mitverantwortlich sind.

Als prognostisch ungünstig wurden hierbei die Amplifikation des *N-MYC* Gens, eine 1p- sowie eine 11p-Deletion identifiziert. Auch der Anstieg von 17q-Material ist fast ubiquitär in high-risk Neuroblastomen. Trotz der klaren klinischen Relevanz dieser Genveränderungen wurde bisher jedoch kein definiertes 1p- oder 11q-Tumorsuppressorgen im Neuroblastom identifiziert (Brodeur, 2003; Wang et al, 2006; Bagatell et al, 2005).

#### **N-Myc**

Amplifikationen des *N-MYC* Gens treten in ca. 22% der Primärtumore auf. Diese Amplifikation ist der wichtigste molekulare prognostische Marker und stets mit einer schlechten Prognose behaftet (Brodeur, 2003). Sie ist oft bei älteren Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien und rascher Tumorprogression zu finden (Seeger et al, 1985; Wang et al, 2006; Bagatell et al, 2005).

Myc Onkoproteine sind Transkriptionsfaktoren, die bei Überexpression zu dereguliertem Wachstum und Proliferation führen. Sie haben als transkriptionelle Aktivatoren und Repressoren vielfältige Effekte auf die Zellfunktion. *N-MYC* ist normalerweise auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 (2p24) lokalisiert. In Zellen mit

Amplifikation von *N-MYC* finden sich jedoch auch extrachromosomal amplifizierte DNA-Abschnitte, die als „*double minutes*“ bezeichnet werden und in die chromosomale DNA reintegriert werden können. Der Mechanismus der Amplifikation ist nicht bekannt, möglicherweise wird aber der *NMYC*-Locus kopiert und bildet dann ein extrachromosomales DNA-Element (Brodeus, 2006).

Es wurde eine starke Korrelation zwischen der Amplifikation von *N-MYC* und einem 1p LOH (*loss of heterozygosity*) festgestellt. Auch die Deletion des Chromosoms 1p ist mit einer schlechten Prognose behaftet. Es ist noch unklar, ob beides voneinander unabhängige prognostische Variablen sind. Beide treten jedoch oft in hochaggressiven Tumoren auf (Brodeur, 2003, Takita, 1997; Wang et al, 2006).

Warum die Amplifikation von *NMYC* mit diesen fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert ist, ist noch nicht hinreichend geklärt. Es ist aber bekannt, dass N-Myc einen Heterodimer-Komplex mit Max bildet. Dieser Proteinkomplex funktioniert als transkriptioneller Aktivator und als Repressor. In Abwesenheit von N-Myc, formiert sich Max dagegen in einem transkriptionshemmenden Komplex. Einige Zielgene von *NMYC* sind bekannt (z.B. ODC, MCM7 und MRP1). Eine Aktivierung dieser Gene führt zu einem Arrest der Zelle in der G1-Phase des Zellzykluses. Das Eintreten in die G0-Phase wird verhindert (Brodeur, 2003).

Kontrovers wird diskutiert, ob die Überexpression von *N-MYC* mRNA oder N-Myc Proteinen in Tumoren, die keine Amplifikation von *N-MYC* aufweisen, eine prognostische Signifikanz hat. Manche Neuroblastomzelllinien zeigen eine sehr hoch exprimierte *N-MYC* mRNA oder N-Myc Proteine ohne eine Genamplifikation.

Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass bei Tumoren, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Amplifikation von *N-MYC* aufweisen, sich diese Abnormalität nur sehr selten, wenn überhaupt, zu einem späteren Zeitpunkt manifestiert (Brodeur, 2003; Wang et al, 2006).

### **Neutrophinrezeptoren**

Die verschiedenen Faktoren, die für die malignen Veränderungen der Zellen im Neuroblastom verantwortlich sind, sind bis heute noch nicht hinreichend bekannt.

Da die Entwicklung neuronaler Strukturen über die Induktion verschiedener Signalkaskaden spezifischer Neutrophinrezeptoren vermittelt wird, ist es möglich, dass eine Deregulation dieses Systems zu einer Entstehung maligner Tumore führt.

Im Neuroblastom zeigte sich, dass die Neutrophinrezeptoren Trk A und Trk C, ebenso wie die Expression der kürzeren Variante (ohne Kinase-Domäne) von Trk B, mit einem niedrigen Tumorstadium und einem jungen Patientenalter korrelieren. Sie sind nicht mit einer Amplifikation von *N-MYC* assoziiert und Marker für eine günstigere Prognose. Die unverkürzte Variante von Trk B sowie die Expression des Trk B-Liganden BDNF korrelieren meist mit einer Amplifikation von *N-MYC* und einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Brodeur, 2003; Nakagawara et al, 1993; Svensson et al, 1997; Eggert et al, 2002).

Eggert et al zeigten, dass die Expression von Trk A und Trk B nicht nur einen Einfluß auf die Differenzierung und Proliferation von Neuroblastomzellen hat, sondern dass sie auch in die Regulation der Tumorangione involviert sind. Eine Überexpression von Trk A führt zu einer reduzierten Expression von Angiogenesefaktoren und zu einem verminderten Tumorwachstum, wohingegen Trk B die Expression von Angiogenesefaktoren nicht herunterreguliert (Eggert et al, 2002).

#### **1.1.4. Apoptose**

Unter allen Krebserkrankungen haben Neuroblastome die höchste Rate spontaner Regression. Etwa 5-10% der klinisch diagnostizierten Neuroblastome bilden sich spontan zurück, wobei die Rate asymptomatischer Neuroblastome mit spontaner Regression vermutlich wesentlich höher liegt (Brodeur, 2003).

Die Ursache für diese spontane Regression ist noch ungeklärt. Neben einer Ausdifferenzierung der Zellen spielt hier möglicherweise die Aktivierung von Apoptose induzierenden Mechanismen eine Rolle (Oue et al 1996). Kaspase-1, ein Bestandteil der Apoptose induzierenden Proteasen-Signalkaskade, wird beispielsweise in einigen primären Neuroblastomen hoch exprimiert. Es korreliert mit der Expression weiterer, mit günstiger Prognose assoziierter Marker (Ikeda et al, 1997).

Apoptose supprimierende Proteine wie Bcl2 und Bclxl sind dagegen in den meisten Neuroblastomzelllinien hoch exprimiert, wobei deren Expression invers mit der Rate apoptotischer Zellen und dem Grad der Differenzierung korreliert (Brodeur 2003, Reed et al 1991, Oue et al 1996).

Neuroblastome, die zu Apoptose neigen, haben eine größere Wahrscheinlichkeit einer spontanen Regression und zeigen ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie. Das

ist dadurch zu begründen, dass Apoptose suprimierende Bcl2 Proteine vermutlich auch für die Entwicklung von Zytostatikaresistenzen mitverantwortlich sind (Brodeur, 2003).

### **1.1.5. Diagnostik**

Das Neuroblastom zeichnet sich durch seine typische Lage im Nebennierenmark (50%, M. Paulussen, 2002; Deutsches Krebsgesellschaft, 2008) sowie entlang des sympathischen Grenzstranges aus. Auch Tumorzellnester im Knochenmark sind häufig zu finden.

In erster Linie wird das Neuroblastom jedoch aufgrund der Histologie diagnostiziert, wobei undifferenzierte Tumore mit zahlreichen Neuroblasten charakteristisch sind. Eine Erhöhung der Katecholaminmetabolite, Vanillinmandelsäure und Homovanillinmandelsäure in Blut und Urin erhärten den Verdacht der Diagnose Neuroblastom (Brodeur, 2003). Weiterhin können Laktatdehydrogenase, Ferritin und Neuronspezifische Enolase (NSE) im Serum erhöht sein. Ein szintigraphischer Nachweis mittels Metajodbenzyl-guanidin(MIBG)-Aufnahme ist ebenfalls möglich (Berthold and Hero, 2000). Das radioaktiv markierte MIBG wird fast ausschließlich von adrenergem Gewebe aufgenommen. So kann es zur szintigraphischen Darstellung von Neuroblastomen eingesetzt werden.

### **1.1.6. Therapie**

Die meisten Neuroblastome werden mit konventionellem therapeutischem Vorgehen, wie Operationen, Bestrahlung oder Chemotherapie behandelt. Dabei werden die Neuroblastompatienten je nach Stadieneinteilung, klinischer Symptomatik und Amplifikationsstatus von *N-MYC* in 3 Gruppen unterteilt.

Säuglinge der Stadien 1,2,3 und 4s nach einer initialen Operation oder Biopsientnahme sowie Kinder mit einem Alter über einem Jahr der Stadien 1 und 2 mit Tumoren ohne eine Amplifikation von *N-MYC* werden lediglich beobachtet. Säuglinge der Stadien 2,3 und 4s mit tumorinduzierten Symptomen sowie Kinder die älter als ein Jahr alt sind und die Stadien 2 und 3, welche keine Amplifikation von *N-MYC* haben, werden mit 2-5 Chemotherapieblöcken behandelt. Hochrisikopatienten im Stadium 4 oder Tumore mit Amplifikation von *N-MYC* werden mit einer sechs Blöcke umfassenden Induktionschemotherapie und einer darauf folgenden



Konsolidierungstherapie behandelt. Diese besteht zum Beispiel aus einer knochenmarkablative, sogenannten Megatherapie mit anschließender autologer Stammzellenreimplantation (Brodeur, 2003; Deutsche Krebsgesellschaft, 2008). Auch in höherer Dosis radioaktiv markiertes Metajodbenzyl-guanidin (MIBG), welches sich vorwiegend in Neuroblastomzellen anreichert, wird zur Behandlung von Tumor- bzw. Metastasenresten verwendet.

Es werden zunehmend andere möglicherweise effektivere und minimal toxische Behandlungsmöglichkeiten angestrebt. Hierzu zählen beispielsweise die Immuntherapie, eine Induktion der Differenzierung durch Retinolsäure oder die Apoptose-induktion (Brodeur, 2003).

Da das Neuroblastom einen hohen Grad an Vaskularisierung aufweist, käme auch eine Inhibition der Angiogenese in Frage (Brodeur 2003, Berthold 1999).

### **1.1.7. Zytostatikaresistenz**

Eines der Hauptprobleme in der Therapie des Neuroblastoms ist die primäre und die erworbene Resistenz gegenüber Zytostatika. So zeigten Tumore von Rezidiv-Patienten eine signifikant höhere Resistenz gegenüber Standardchemotherapieverfahren im Vergleich zu Kontrollzelllinien (Kuroda et al 1991, Keshelava et al 1997).

Es wurde die Überexpression bestimmter Gene beobachtet. Vor allem sind hier das *MDR1* (*multidrug resistance gene1*) und das *MRP* (*multidrug resistance related protein*) zu nennen (Brodeur, 2003). Es konnte eine *N-MYC* abhängige Expression sowie eine Korrelation mit dem Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Norris et al, 1996).

### **1.1.8. Prognose**

Wesentliche Determinanten für den Verlauf der Erkrankung sind das Tumorstadium, das Alter des Kindes bei Diagnosestellung, die Kopienzahl des *N-MYC* Gens und die Lokalisation des Primärtumors (Berthold et al 1997, 1994, Brodeur 2003). Primärtumore im Nebennierenmark haben eine schlechtere Prognose als andernorts lokalisierte Tumore.

Eines der wichtigsten Prognosekriterien stellt die klinische Tumorstadieneinteilung dar. Nach der INSS-Klassifikation (International Neuroblastoma Staging System) werden 5 klinische Stadien unterschieden (Brodeur, 2003).

Stadium 1 umfasst Tumore, die auf das Organ oder die Struktur ihres Ursprungs begrenzt sind. Makroskopisch können diese Tumore chirurgisch vollständig entfernt werden.

Stadium 2 beschreibt Tumore, die durch lokale Infiltration (2a) oder regionalen Lymphknotenbefall (2b) auffallen. Diese Tumore sind nur unilateral lokalisiert, was bedeutet, dass sie die Körpermittellinie, welche durch die Wirbelsäule definiert ist, nicht überschreiten.

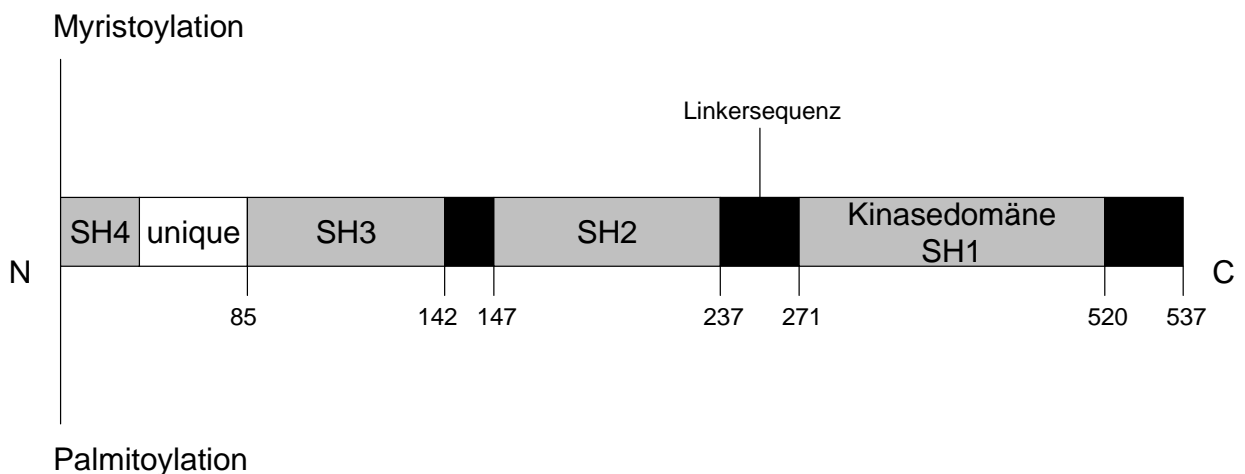
Im Stadium 3 wird die Körpermittellinie durch den Tumor überschritten, und es sind regionale Lymphknoten auf beiden Seiten der Wirbelsäule beteiligt. Hier ist eine operative Entfernung des Tumors nicht mehr möglich.

Das Stadium 4 zeichnet sich dadurch aus, dass Metastasen bevorzugt in Knochenmark, Knochen, entfernten Lymphknoten, Leber, Haut und anderen Organen zu finden sind. Ein besonderer Sachverhalt zeigt sich bei Stadium 4s. Hierbei handelt es sich um lokalisierte Primärtumore nur in Leber, Haut und/oder Knochenmark. Laut Definition muss die Knochenmarksinfiltration jedoch weniger als 10% betragen. Die Prognose von Stadium 1 und 2 Tumoren kann als relativ gut bewertet werden, wohingegen Stadium 3 schon wesentlich ungünstiger und Stadium 4 trotz intensiver Therapie oft letal ist. Trotz Fernmetastasierung ist Stadium 4s mit einer günstigen Prognose behaftet. So beträgt die Fünfjahresüberlebensrate für Stadium 1 und 2 nahezu 95-98%, für Stadium 3 und 4s rund 75%. Stadium 4 hingegen hat lediglich eine Überlebensrate von 33% (M.Paulussen, 2002).

Neben der Histologie und den oben erwähnten genetischen Markern spielt das Alter der Patienten eine wesentliche Rolle. Die Prognose für Kinder, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als ein Jahr sind, ist im gleichen Tumorstadium, besonders jedoch bei fortgeschrittenen, aggressiven Tumoren als wesentlich günstiger anzusehen (Beckwith und Perrin 1963, Brodeur 1994).

## 1.2. Fyn, eine non-rezeptor Tyrosinkinase der Src-Familie

Tyrosinkinasen sind Enzyme, welche durch die reversible Phosphorylierung von Tyrosinresten Zielproteine aktivieren können. Diese Zielproteine induzieren Zellwachstum und Differenzierung. Mutationen, die eine andauernde Aktivität der Tyrosinkinase nach sich ziehen, können zu Zellproliferation und einer bösartigen Zelltransformation führen (Stryer, 1999). Die Kinaseaktivität ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Src-Kinasen sind eine bestimmte Unterfamilie der Tyrosinkinasen. Der Prototyp dieser Proteinfamilie wurde aus einem onkogenen Retrovirus, dem Rous-Sarkom-Virus, isoliert. Src-Kinasen sind in zahlreiche intrazelluläre Signaltransduktionswege verwickelt, die unter anderem bei Zellproliferation, Migration und Differenzierung eine Rolle spielen. Der strukturelle Aufbau der verschiedenen Src-Kinasen ist sehr ähnlich (Stryer, 1999; Thomas, Brugge, 1997).



**Abbildung I: Struktur der Tyrosinkinase Fyn**

Am C-Terminus der Src-Kinasen befindet sich eine Tyrosinkinase Domäne (SH1). Im zentralen Teil des Proteins sind zwei SH-Domänen (*src-homology domains*) lokalisiert, welche für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich sind. Diese intra- und intermolekularen Interaktionen regulieren die funktionelle Aktivität dieser Proteine in intrazellulären Signaltransduktionswegen. Die Bindungen über diese Domänen bestimmen die katalytische Aktivität der Kinasen (Resh, 1998; Thomas, Brugge, 1997).

Die SH2-Domäne, ein Modul aus 10 Aminosäuren, bindet über Phosphotyrosinreste an phosphorylierte Peptide, wohingegen die SH3-Domäne polyprolinreiche Strukturen bevorzugt (Weng, 1994; Resh, 1998; Stryer, 1999; Zamoyska, 2003). Die SH2-Domänen steuern die Src-Kinasen zu aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (in aktiver

Form sind Rezeptor-Tyrosin-Kinasen selbst phosphoryliert), durch welche sie phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungen können sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Repression der katalytischen Aktivität von Src-Kinasen führen.

Die SH3-Domäne, die sich aus 50 Aminosäuren zusammensetzt, ist für intra- und intermolekulare Interaktionen (Ostareck-Lederer zeigte beispielsweise für c-src und hnRNP K eine spezifische Bindung über diese Domäne; Ostareck-Lederer, 2002), welche die katalytische Aktivität von Src-Kinasen bestimmen, von Bedeutung. Auch bei der Src-Lokalisation und der Rekrutierung von Substraten spielt die SH3-Domäne eine Rolle (Thomas, Brugge, 1997).

Eine weitere homologe Region ist die SH4-Domäne, welche am N-Terminus lokalisiert ist. In dieser aus 15 Aminosäureresten bestehenden Sequenz befindet sich auch ein „Met-Gly-Cys“ Motiv, welches für die doppelte Acylierung durch Myristat und Palmitat, wichtig ist. Dies spielt bei der Bindung an Membranen eine wichtige Rolle (Resh, 1998).

Jede Src-Kinase verfügt außerdem über eine spezifische Sequenz, welche zwischen der SH4 und der SH3 Domäne lokalisiert ist. Diese Domäne vermittelt die Interaktion mit Rezeptoren oder Proteinen, welche spezifisch für die einzelnen Kinasen sind.

Die Kinase-Domäne (SH1) besitzt die tyrosin-spezifische Kinaseaktivität. Diese katalysierende Aktivität wird durch eine Phosphorylierung eines Tyrosinrestes im C-terminalen Ende kontrolliert. Ist der Tyrosinrest durch die zytoplasmatische Kinase phosphoryliert, kommt es zu einer Repression der Kinaseaktivität. Für diese Repression lassen sich zwei verschiedene Mechanismen aufführen.

Zum einen bindet die SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest im C-terminalen Ende. Zum anderen kommt es zu einer Anlagerung der SH3-Domäne an die Kinase-Domäne, sowie an eine prolinreiche Typ II Linker-Helix, welche die SH2- und die Kinase-Domäne verbindet. Diese Interaktionen halten die Kinase in einer geschlossenen und inaktiven Form (Resh, 1998; Thomas, Brugge, 1997).

Src-Kinasen werden nach ihrem Expressionsmuster in drei Gruppen unterteilt. Die Einteilung erfolgt nach Vorkommen in epithelialen Zellen, vorwiegend in B-Zellen und Myeloidzellen sowie solchen Kinasen mit einer ubiquitären Expression. Dieser Untergruppe gehört die non-rezeptor Tyrosinkinase Fyn an (Thomas, Brugge, 1997).

Dieses 59kDa große Protein wurde 1986 in Fibroblasten erstmals als Fyn identifiziert. Wie andere Src-Kinasen hat Fyn ein breites Spektrum an biologischen Funktionen und kann mit vielen verschiedenen zellulären Molekülen interagieren. Der strukturelle Aufbau von Fyn ähnelt dem anderer Src-Kinasen sehr stark (Resh, 1998).

Als Ergebnis eines Vorgangs alternativen Splicings liegt das Fyn-Protein in zwei verschiedenen Isoformen vor. Zum einen ist hier das in T-Zellen exprimierte Fyn(T) zum anderen das Fyn(B) zu nennen. Fyn(B) kommt zwar auch in einigen anderen Geweben vor, wird jedoch vorwiegend im Gehirn exprimiert. Diese Isoform beeinflusst die Neuronentwicklung- und proliferation und ist deshalb von besonderem Interesse bei der Neuroblastomentstehung (Kai, 1997; Resh, 1998). Die beiden Isoformen unterscheiden sich in etwa 50 Aminosäuren, die sich in einer Region zwischen dem Ende der SH2-Domäne und dem Anfang der Kinasendomäne befindet.

Die biologischen Funktionen von Fyn sind sehr vielfältig und zu einem großen Teil noch nicht hinreichend bekannt. Die Funktionen sind in großem Maße davon abhängig, wie gut Fyn an andere intrazelluläre Signalmoleküle binden, bzw. diese phosphorylieren kann. Zum Beispiel ist Fyn an der Regulation der Gehirnfunktion, der T-Zell vermittelten-, sowie an der Adhäsions vermittelten Signaltransduktion und an der Myelinisierung im frühen Stadium der Gehirnentwicklung beteiligt (Resh, 1998). Außerdem beeinflusst Fyn die Sensitivität des Körpers auf Ethanol und ist an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt. Fyn<sup>-/-</sup> Mäuse weisen eine reduzierte Anzahl von Apoptosen auf (Kai, 1997; Resh, 1998; Kuo, 2005). Diese Mäuse zeigen außerdem Verhaltensauffälligkeiten sowie Einschränkungen im Lern- und Erinnerungsvermögen.

In Neuroblastomzellen führt Fyn zu Zellzyklusarrest und Differenzierung der Zellen (Resh, 1998; D.J.Osterhout, 1999; B.Berwanger, 2002). Auch in die Organisation des Zytoskeletts in T-Zellen ist Fyn involviert. Es besteht eine direkte Interaktion mit Tubulin (Martín-Córces et al, 2006).

Kürzlich wurde gezeigt, dass Fyn auch bei der Rekrutierung von TrkB Neutrophinrezeptoren in *lipid rafts* eine Rolle spielt. *Lipid rafts* sind cholesterin- und sphingolipidreiche membranöse Mikrodomänen, welche eine wichtige Rolle im Neutrophinsignaltransduktionsweg spielen. Die Neutrophinrezeptoren sind in dieser Membrandomäne lokalisiert. Neutrophine aktivieren diese Rezeptoren und beeinflussen so die neuronale Entwicklung. Die selektive Rekrutierung von TrkB in *lipid rafts* in

intrazellulären Kompartimenten findet über einen Mechanismus statt, in welchen Fyn direkt involviert ist. In Fyn *knock-out* Mäusen wurde gezeigt, dass die BDNF-vermittelte TrkB-Lokalisierung in *lipid rafts* in Abwesenheit von Fyn nicht möglich ist (Pereira, Chao, 2007).

Für die prognostische Relevanz der Expression von Fyn bei der Neuroblastomerkrankung gibt es verschiedene Anhaltspunkte. Eine ausgeprägte Expression von Fyn sowie eine hohe Kinaseaktivität zeigten sich ausschließlich in niedrigen Neuroblastomstadien. In fortgeschrittenen Tumorstadien ist die Src-Kinase Fyn herunterreguliert. Die Fyn-Expression korreliert also streng mit dem Tumorstadium. Es lassen sich keine prognostischen Aussagen unabhängig vom Stadium machen (Berwanger et al, 2002).

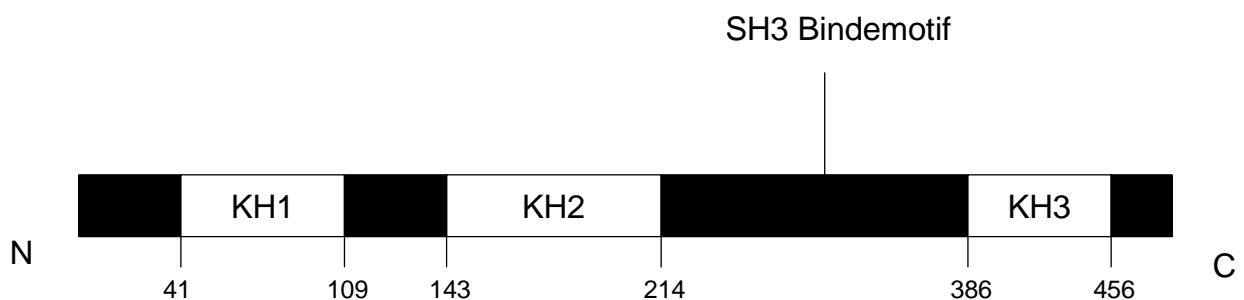
Bis heute ist noch wenig über Faktoren bekannt, welche die Neuroblastomentwicklung in Tumoren mit fehlender Amplifikation von *N-MYC* kontrollieren. B. Berwanger et al beschreibt einen Signaltransduktionsweg, in dem Fyn sowohl in *N-MYC*-amplifizierten als auch in nicht amplifizierten Tumoren eine wichtige Rolle spielt. Fyn scheint unabhängig von der Amplifikation mit *N-MYC* Einfluss auf die Entstehung und die Prognose von Neuroblastomen zu haben.

In kultivierten Neuroblastomzellen führt die Expression von aktiver Fyn-Kinase zur Induktion von Differenzierung und zu Wachstumsarrest in der G1-Phase. Folglich ist es durchaus möglich, dass die verminderte Expression von Fyn bei der Metastasenbildung oder Lymphknoteninvasion von Tumorzellen eine Rolle spielt. Möglicherweise könnten daher Signalmoleküle, die durch Fyn inhibiert oder aktiviert werden, Angriffspunkte für therapeutische Interventionen bei Neuroblastomen darstellen (Berwanger et al, 2002).

### 1.3. Heterogenes nukleares Ribonukleoprotein K-hnRNP K

Im Zellkern liegt die RNA nie frei vor. Schon während der Transkription wird sie mit Proteinen bedeckt. Dieser Komplex wird als „*Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (hnRNP)*“ bezeichnet. Die hnRNPs kommen in großen Mengen im Zellkern vor, ihre Funktionen werden durch ihre spezifische Bindung an verschiedene mRNAs bestimmt. Sie verpacken die mRNA und vermitteln unter anderem die Vorbereitung für den Spleißprozess oder helfen bei der Anheftung des poly(A)-Endes. Andere hnRNPs sind für die mRNA-Stabilisierung sowie den Export der neusynthetisierten mRNA aus dem Kern zum Ort der Translation im Zytoplasma zuständig. Komplexe mit hnRNP-Proteinen sind dynamische Strukturen, die sich je nach Stand der prä-mRNA-Verarbeitung in ihrer Struktur und Zusammensetzung ändern (Knippers, 2001).

Für einige bestimmte hnRNPs, nämlich hnRNP K, E1 und E2, wurde gezeigt, dass sie auch bei der mRNA-Stabilisierung und in der translationalen Regulation im Zytoplasma eine wichtige Rolle spielen. Diese hnRNPs weisen alle jeweils drei KH- (*hnRNP K homology*) Domänen auf, die es ihnen ermöglichen mit pyrimidinreichen Sequenzen in der Ziel-RNA zu interagieren (Ostareck-Lederer et al, 1998). KH-Domänen sind Regionen von 65-70 Aminosäureresten Länge, die nicht nur in hnRNPs, sondern auch in vielen anderen Proteinen zu finden sind.



**Abbildung II: Struktur des heterogenen Ribonukleoproteins - hnRNP K**

In den Proteinen hnRNP K, E1 und E2 sind die drei KH-Domänen in ähnlicher Weise angeordnet. Zwei KH-Domänen liegen nahe dem N-Terminus und sind durch eine zentrale Region variabler Länge von der weiter C-terminal gelegenen dritten KH-Domäne separiert. Durch die drei KH-Domänen ist hnRNP K dazu in der Lage sowohl an RNA als auch an Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA zu binden. KH2 und KH3 spielen eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen mit unterschiedlichsten Partnern,

unter anderem Transkriptionsfaktoren und anderen in Signaltransduktionswege involvierte Proteine (Bomsztyk et al, 1997). HnRNP K bindet bevorzugt an Poly(C)-Strukturen (Ostareck-Lederer et al, 1998; Braddock et al, 2002).

HnRNP K ist ein 66 kDa großes, nukleoplasmatisches Protein. Die Gene sind auf Chromosom 9q21-q22.33 lokalisiert (Tommerup, 1995). Neben den drei KH-Domänen finden sich auf dem Protein in der Region zwischen KH2 und KH3 weitere wichtige Bindedomänen. Unter anderem zwei RGG-Boxen (Arg-Gly-Gly), welche eine sequenzspezifische Bindung von Proteinen an RNA vermitteln können (Knippers, 2001).

Außerdem befindet sich hier eine prolinreiche Region, die *in-vitro* an die SH3-Domäne der Src-Familien-Tyrosinkinasen (Src, Fyn, Lyn und Vav) binden kann (Weng, 1994).

Durch alternatives Spleißen kommt es zu vier sehr ähnlichen Isoformen von hnRNP K, welche sich durch kleine Insertionen (5 und/oder 20 Reste) unterscheiden. Diese Isoformen weisen unterschiedliche Nukleinsäurebindungseigenschaften auf.

HnRNP K dient als Bindeplattform im Regulationsprozess an der RNA. Es ermöglicht Proteinen, die nicht an Nukleinsäuren binden können, sich den Komplexen anzuschließen oder über hnRNP K direkt an mRNA zu binden (Bomsztyk, Ostrowski, 2004). Das Protein ist außerdem an der Transkription beteiligt. So findet sich beispielsweise auf dem humanen *C-MYC*-Gen ein CT-reiches Promotorelement, an welches hnRNP K binden und eine transkriptionelle Aktivierung induzieren kann (Takimoto et al, 1993). Das K-Protein ist jedoch nicht nur an nukleären Prozessen beteiligt, sondern spielt auch beim nukleozytoplasmatischen Transport von gebundenen Proteinen und RNA über die Kernhülle eine Rolle. Außerdem verfügt hnRNP K über multiple Phosphorylierungsstellen, über die es extrazelluläre Signale wahrnehmen kann (Ostareck-Lederer, 1998).

Desweiteren fungiert HnRNP K als Regulator von cytoplasmatischer mRNA. Dies wurde von Ostareck-Lederer et al an dem Beispiel der Retikulozyten-15-Lipoxygenase (LOX) gezeigt. LOX ist ein Schlüsselenzym in der erythroiden Zelldifferenzierung. Erreichen die Retikulozyten im Laufe der Erythrozytenentwicklung ein fortgeschrittenes Reifestadium bewirkt LOX den Untergang der mitochondrialen Membranen. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Translation der LOX-mRNA herunterreguliert. Für diese reversible Hemmung wird eine CU-reiche repetitive Sequenz in der 3'-UTR der LOX-mRNA verantwortlich gemacht. Diese Region wird als *DICE* (*differentiation control*



*element*) bezeichnet. HnRNP K kann an diese Region binden und reguliert so über dieses Element spezifisch die Translation der LOX-mRNA. Die Blockierung der Translation wird durch einen Mechanismus herbeigeführt, bei welchem der hnRNP K/DICE-Komplex das 80s Ribosom blockiert, indem es die Anlagerung der 60s Untereinheit verhindert (Ostareck-Lederer et al, 1998, 2002).

Der C-Terminus des hnRNP K-Proteins enthält, wie oben erwähnt, eine prolinreiche Domäne, die eine Interaktion mit den SH3-Domänen der Src-Kinasen ermöglicht. Ostareck-Lederer et al zeigten, dass c-Src dazu in der Lage ist, hnRNP K *in vitro* und *in vivo* zu phosphorylieren und dessen RNA-Bindung zu beeinflussen. Die Tyrosin-Phosphorylierung, die an multiplen Tyrosinresten stattfinden kann, führt zu einer reversiblen Hemmung der DICE-Bindung von hnRNP K (Ostareck-Lederer et al, 2002).

Interessanterweise ist auch hnRNP K dazu in der Lage, spezifisch c-Src direkt zu aktivieren. Der genaue Mechanismus dieser Aktivierung ist noch nicht geklärt, da hnRNP K ein RNA-bindendes Protein ist, welches keine Domänen besitzt, die Kinase- oder Phosphataseaktivität besitzen. Es wäre vorstellbar, dass durch die Bindung an hnRNP K die Konfirmation von c-Src verändert wird und es im Folgenden zu einer Autophosphorylierung und Aktivierung der Tyrosinkinase kommt. Die durch hnRNP K aktivierte c-Src-Kinase kann anschließend hnRNP K und andere Proteine seinerseits phosphorylieren (Ostareck-Lederer et al, 2002).

HnRNP K kann abhängig von verschiedenen zellulären und extrazellulären Signalen die Translation positiv oder negativ regulieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hnRNP K an der Transkription, mRNA-Transport und Stabilisierung sowie an der Translation beteiligt ist. Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen in Bezug auf die Regulation der Genexpression und der zahlreichen Interaktionen mit verschiedenen Proteinen wäre es naheliegend, dass hnRNP K auch in Signaltransduktionswege involviert ist, die in der Kanzerogenese verschiedenster Tumore eine Rolle spielen.

## 1.4. Fragestellung

HnRNP K kann an das „*Differentiation control element (DICE)*“ bestimmter mRNAs binden und damit die Translation dieser mRNAs hemmend beeinflussen.

Die Src-Kinase Fyn kann über seine SH3-Domäne an andere Proteine binden und diese durch eine Phosphorylierung aktivieren. E. Bergmann (und Weng, 2004) zeigte, dass eine *In-vitro*-Interaktion zwischen den beiden Proteinen hnRNP K und Fyn besteht.

Aus diesen Beobachtungen konnte folgende Modellvorstellung hergeleitet werden:

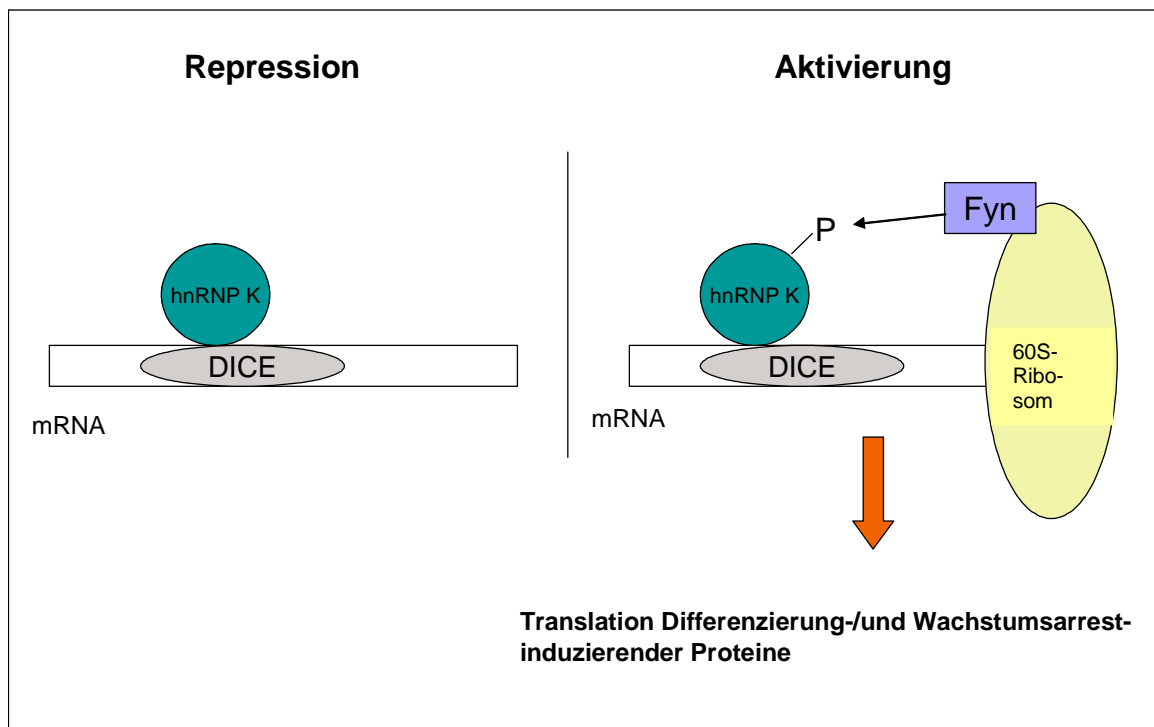


Abbildung III: Modellvorstellung einer Interaktion von Fyn und hnRNP K

HnRNP K könnte über eine Bindung an das DICE-Element die Translation der mRNA *reprimieren*, indem es die Anlagerung der Ribosomenuntereinheiten verhindert. Nach einer Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase Fyn könnten sich die Ribosomeneinheiten anlagern, und es käme zu einer Translation von Proteinen, welche Differenzierung und Wachstumsarrest induzieren. Die Abwesenheit, bzw. der Verlust von Fyn würde dementsprechend zu einer Entdifferenzierung und Entstehung eines Malignoms führen.

In der vorliegenden Arbeit wird in vier unterschiedlichen Ansätzen untersucht, ob es eine Interaktion der beiden Proteine *in-vivo* gibt, in welcher Form diese stattfindet und ob eine biologische Relevanz dieser möglichen Interaktion besteht.

Im ersten Ansatz wird der Frage nachgegangen, ob eine Interaktion von Fyn und hnRNP K *in-vivo* besteht.

Parallel dazu soll untersucht werden, ob bei einer möglichen Interaktion die Kinaseaktivität von Fyn eine Rolle spielt und ob es zu einer Phosphorylierung von hnRNP K durch die Tyrosinkinase Fyn kommt.

Weiterhin soll analysiert werden, ob Fyn durch eine Interaktion in der Lage ist, hnRNP K funktionell zu beeinflussen, indem es die translationale Herunterregulierung durch hnRNP K inhibiert.

Wie Berwanger et al zeigte, führt Fyn in Neuroblastomzellen zu Differenzierung und induziert des Weiteren einen G1-Arrest des Zellzyklus.

In vorliegender Arbeit soll nun geklärt werden, ob eine möglicherweise bestehende Interaktion zwischen Fyn und hnRNP K für Differenzierung und Wachstumsarrest von Bedeutung ist.

## 2. Material

### 2.1. Materialien für die Zellkultur

#### 2.1.1. Medien/Lösungen

Vollmedium	500ml RPMI-1640 Medium 50ml FCS (GIBCO), wärmeinaktiviert (30 min bei +56°C) 5ml Penicillin/Streptomycin Stammlösung (CAMBREX, Bio Whithaker) 5ml L-Glutamin (200mM)
Trypsin-EDTA	1 x EDTA-Trypsin
PBS pH 7,4	137mM NaCl 6,4mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3mM KCl 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 mit HCl einstellen
DMSO	Dimethylsulfoxid 100% (Merck)

#### 2.1.2. Zelllinien

SY5Y-Zellen (humane Neuroblastomzellen aus Stadium 4 Tumoren)

IMR-32-Zellen (humane Neuroblastomzellen, MYC amplifiziert)

HeLa-Zellen

Shep-Zellen

### 2.1.3. Verwendete Plasmide

#### **Fyn-Wildtyp**

Fyn-Wildtyp wurde in voller Länge in einen pCMV5 Vektor kloniert.  
(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Berwanger.)

#### **PSG5-His-hnRNP K (Wildtyp)**

In einen hnRNP K-pSG5-Vektor wurden durch eine Insertion 10 Histidinreste zwischen den *SmaI* und *XhoI* Schnittstellen am N-terminalen hnRNPK-Ende eingefügt.  
(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer/ D. Lederer.)

### 2.1.4. Verwendete Mutanten

#### **Fynmutante-k299m**

In die Kinasedomäne von Fyn wurde die Aminosäure 299 Lysin(K) gegen Methionin(M) getauscht. Das kinasenegative Allel induziert eine dominant negative Mutante von Fyn. Die Mutation bewirkt, dass keine durch Fyn induzierte Differenzierung stattfindet. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Berwanger.)

#### **HnRNP K-Mutante-Δ97 (pSG5-His-hnRNP K)**

Dominant negative Mutante von hnRNP K, an der Bindestelle von hnRNP K wurden Aminosäure 240-337 herausgeschnitten. Am N-Terminus wurde ein His-tag mit einer Oligonukleotidsequenz von 10 Histidinresten eingefügt (*SmaI/XhoI*).  
(Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer/ D. Lederer.)

### 2.1.5. Transiente Transfektion

2,5M CaCl	filtrern, Lagerung bei Raumtemperatur
-----------	---------------------------------------

2x HBS pH 7,05	280mM NaCl
----------------	------------

50mM Hepes  
1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
auf pH 7,05 einstellen  
filtrieren, Lagerung bei -20°C

## 2.2. Material für Biochemische Methoden

### 2.2.1. Materialien für die Herstellung von Zellysaten: NP-40-Lyse

NP-40-Lysepuffer                      5M NaCl: 150mM  
  
   1M Tris-Puffer pH 8: 50mM  
  
   NP-40: 1% in H<sub>2</sub>O  
  
   Lagerung bei +4 C

Proteinaseinhibitoren                      Apoptin: 5mg/ml in PBS  
  
   Leupeptin: 5mg/ml in ddH<sub>2</sub>O  
  
   Pepstatin. 1mg/ml in Methanol  
  
   PMSF: 0,2M in Ethanol

Alle Proteinaseinhibitoren werden 1:1000 in Lysepuffer verdünnt eingesetzt.

### 2.2.2. Materialien für die Herstellung von Zellysaten: Hancock/Evan-Lyse

Hancock/Evan-Lysepuffer (hypoton)  
  
   Hepes-KOH pH 6,8: 20mM  
  
   KCl: 5mM  
  
   MgCl<sub>2</sub>: 5mM

NP-40: 0,5%

Na-Deoxycholat (w/v): 0,1%

in H<sub>2</sub>O

Lagerung bei +4°C

Hancock/Evan-Lysepuffer/500mM

1/10 des Volumens NaCl 5M hinzufügen

Proteinaseinhibitoren siehe unter 2.2.1.

### 2.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford Reagenz

Coomassie brillant Blue G-25: 0,01% (w/v)

Ortho-Phosphorsäure: 10% (v/v)

Ethanol: 4,75% (v/v)

in H<sub>2</sub>O

filtrieren und lichtgeschützt lagern

Referenz Stocklösung

BSA: 1mg/ml in Lysepuffer

Sonstiges

150mM Natriumchlorid-Lösung

### 2.2.4. Immunpräzipitation

Lysepuffer

siehe oben

Proteinaseinhibitoren

siehe oben

Protein-G-Sepharose

Suspension in 20% (v/v) Ethanol/H<sub>2</sub>O (Sigma)

BSA

20% (w/v) in Lysepuffer (AppliChem)

**Antikörper:**

- $\alpha$ -Fyn-Antikörper: sc-16, Kaninchen, polyklonal, IgG (Santa Cruz)
- $\alpha$ -Flag-Antikörper: F-3165, Maus (Sigma)
- $\alpha$ -his-Antikörper: Maus, monoklonal (Qiagen)
- $\alpha$ -hnRNP K-Antikörper: P-20, Ziege, polyklonal

### 2.2.5. Materialien für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Sammelgelpuffer	Tris/HCl pH 6,8: 0,5M SDS: 0,4% (w/v)
Trenngelpuffer	Tris/HCl pH 8,8: 1,5M SDS: 0,4% (w/v) EDTA: 8mM
Acrylamidstammlösung	Acrylamid: 30% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid in H <sub>2</sub> O: 0,8% (w/v) Lichtgeschützte Lagerung bei +4°C
TEMED	Tetramethylethyldiamin
APS	Ammoniumpersulfat 10% (w/v) in H <sub>2</sub> O
Isopropanol	100%
3x SDS Probenpuffer	4x Trenngelpuffer: 4,8ml SDS (6% SDS): 0,6g



---

	Glycerin: 3,5ml
	DTT (0,3M DTT): 429g
	Bromphenolblau: kleine Spatelspitze
	10ml in H <sub>2</sub> O geben
Laufpuffer pH 8,3	Tris: 25mM
	Glycin: 0,2M
	SDS: 0,1% (w/v)
Marker	Seeblye Plus 2 (Invitrogen)

### 2.2.6. Materialien für Western-Blot

Blotpuffer	Methanol (v/v): 20%
	Tris-Base: 20mM
	Glycin: 150mM
Blocklösung	Magermilchpulver(w/v): 5%
	Tween-20(v/v): 0,2%
	Gelatine (w/v): 0,01%
	in 1x TBS
20x TBS	Tris/HCl: 1M
	NaCl: 3M
TBS-T pH 7,4	20x TBS pH 7,4: 20%
	Tween-20: 20%
PVDF-Membran	Immobilon-P, Transfer Membrane (Millipore)

---

Methanol	100% (für Behandlung der Membran)
Entwicklerlösungen	ECL Plus Western blotting Detection Systems (Amersham)
Film	ECL Hyperfilm (Amersham)

**Antikörper:**

- $\alpha$ -Fyn-Antikörper: sc-16, Kaninchen, polyklonal, IgG (Santa Cruz)
- $\alpha$ -Flag-Antikörper: F-3165, Maus (Sigma)
- $\alpha$ -his-Antikörper: Maus, monoklonal (Qiagen)
- $\alpha$ -Phospho-Tyrosin-Antikörper: py 20, Maus, monoklonal (SantaCruz)
- $\alpha$ -Cdk2: sc-163, Kaninchen, polyklonal (Santa Cruz)

**2.2.7. Kinase-Assay**

Kinase-Assay Puffer	MnCl <sub>2</sub> : 10mM
	MgCl <sub>2</sub> : 10mM
	KCl: 10mM
	Tris pH 7,4: 50mM
	DTT (Dithiothreitol, 1M): 1mM
	+ Protease- und Phosphataseinhibitoren (1/1000 vol/vol)
	Apoptin, Leupeptin, Pepstatin, PMSF, NaF; 1/100 (v/v) ; $\beta$ -Glycerophosphat)
	Lagerung bei +4°C

Phosphatgruppenakzeptor	Histon H1 (Boehringer/ Mannheim) 1mg/ml Stammlösung in H <sub>2</sub> O
20mM ATP	
Substrat	$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (Amersham), 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l
Co-Substrat	ATP (Amersham) Stammlösung 1mM
Film	Scientific Imaging Film (Kodak)

### 2.2.8. Materialien für den Luciferase-Assay

Kpi-Puffer	K-Phosphat pH 7,8: 100mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 90,8ml (21,77g für 250ml, 0,5M ) in H <sub>2</sub> O mit KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 7,8 einstellen autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur
Gly-Gly Puffer	25mM Gly-Gly pH 7,8 = 3,3g in 800ml H <sub>2</sub> O mit NaOH auf pH 7,8 einstellen mit H <sub>2</sub> O auf 1L auffüllen autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur
Luciferase-Assay-Puffer (10Proben)	25mM Gly-Gly-Puffer pH 7,8: 4,5ml 1M MgSO <sub>4</sub> : 50 $\mu$ l 20mM ATP: 500 $\mu$ l

---

Luciferin-Lösung	25mM Gly-Gly pH 7,8: 2,25ml 1mM Luciferin: 500µl im Dunkeln aufbewahren
1M MgSO <sub>4</sub> : 0,5ml	1M KCl: 5ml mit H <sub>2</sub> O auf 500ml auffüllen filtrieren, Lagerung bei Raumtemperatur vor Gebrauch 50mM β-Mercaptoethanol hinzufügen
ONPG (frisch ansetzen)	6mg/ml in H <sub>2</sub> O im Dunkeln aufbewahren

### 2.2.9. Immunfluoreszenz

Fixierlösung	3% Paraformaldehyd in PBS frisch ansetzen, filtrieren
DNA-Denaturierung	2M HCl
Waschlösungen	1x PBS pH 7,4 1x PBS + 0,1M Glycin 1x PBS + 0,1% (v/v) NP-40 1x PBS + 3% BSA 1x PBS + 0,1% Tween + 0,5% BSA 1x PBS + 0,1% NP-40 + 5% FCS

---

1. Antikörper	$\alpha$ -Fyn: sc-16, Kaninchen, polyklonal, IgG (SantaCruz) $\alpha$ -Flag: F-3165, Maus (Sigma)
2. Antikörper	$\alpha$ -Maus-Antikörper-Cy3, Ziege, monoklonal, (Dianova) $\alpha$ -Kaninchen-FITC-Antikörper: Nr.51, Kaninchen, polyklonal
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (Sigma) Stocklösung 5mg/ml
Mounting Medium	70% (v/v) Glycerin/PBS

### 2.2.10. Immunfluoreszenz: BrdU-Färbung

BrdU	(5-Bromo-2-desoxyuridin) Stammlösung 50mM Endkonzentration 100 $\mu$ M
1. Antikörper	$\alpha$ -BrdU Antikörper: Maus, monoklonal (Dianova) $\alpha$ -Fyn: sc-16, Kaninchen, polyklonal, IgG (SantaCruz)
2. Antikörper	$\alpha$ -Maus-Cy3-Antikörper: Ziege, monoklonal (Dianova) $\alpha$ -Kaninchen-FITC-Antikörper: Nr.51, Kaninchen, polyklonal - übrige Lösungen siehe unter 2.2.9.

## **3. Methoden**

### **3.1. Zellbiologische Methoden**

#### **3.1.1. Einfrieren von Zellen**

Die langfristige Lagerung von Säugerzellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-190^{\circ}\text{C}$ . Während des Einfrierprozesses kann es durch Bildung von Eiskristallen zu irreversiblen Schädigungen der Zellen kommen. Um dies zu verhindern wurde ein spezielles Einfriermedium verwendet und die Zellen wurden langsam auf die gewünschte Lagerungstemperatur heruntergekühlt. Durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen hierzu, wie in 3.1.3. beschrieben, von den Zellkulturschalen abgelöst. Die Zellsuspension wurde für 5min bei 1000rpm in einer Heraeus-Minifuge abzentrifugiert und das Zellpellet in eiskaltem RPMI-Medium mit 25% FCS und 10% DMSO (1ml pro konfluenter 15cm Platte) aufgenommen. Es wurde sofort auf vorgekühlte 1,8ml Cryo-tubes (Nalgene) verteilt (je 1ml). Im Verlauf von 3 Tagen erfolgte die Abkühlung der Zellen auf  $-80^{\circ}\text{C}$ . Für eine langfristige Lagerung wurden sie anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **3.1.2. Auftauen von Zellen**

Die eingefrorenen Zellen (1ml in 1,8ml Cryo-tubes) wurden in einem Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Danach wurde zu der Zellsuspension 10ml vorgewärmtes Medium gegeben. In einem 15ml Falcon-Reagenzgefäß wurden die Zellen in einer Heraeus-Minifuge für 5min bei 1000rpm abzentrifugiert und der DMSO enthaltende Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Zellpellet in 10ml Medium resuspendiert und je nach Dichte der Zellen auf 10cm oder 15cm Zellkulturschalen ausplattiert. Es sollte möglichst schnell gearbeitet werden, um während des Auftauens eine Schädigung der Zellen zu vermeiden.

### 3.1.3. Passagieren von Zellen

Um zu vermeiden, dass es während der Kultivierung durch Kontaktinhibierung zu einem Wachstumsstop der Zellen kommt, mussten diese je nach Wachstumsdichte alle 2-4 Tage zwischen 1:5 und 1:20 verdünnt und erneut ausplattiert werden. Da die verwendeten Zellen adhärent wachsen, mussten sie zunächst durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung (Proteaseaktivität) von den Zellkulturschalen abgelöst werden. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Dadurch wurden Serumreste entfernt, die Proteinaseinhibitoren enthalten.

Anschließend wurde Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und diese für 2-5min bei +37°C im Brutschrank inkubiert. Besonders schonend für die Zellen ist die Behandlung mit kalter Trypsin-EDTA-Lösung, da bei niedrigen Temperaturen keine Endozytose stattfindet und die Zellen dadurch kein für sie schädliches Trypsin aufnehmen können. Die vollständig von der Kulturschale gelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Endverdünnung in vorbereitete Zellkulturschalen mit frischem Medium gegeben. Durch einen im Serum enthaltenen Trypsininhibitor wurde überschüssiges Trypsin inhibiert.

### 3.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurde eine modifizierte Neubauer-Zählkammer verwendet. Auf dem Zählgitter der Kammer wurde ein Deckgläschen so aufgebracht, dass so genannte Newton'sche Ringe sichtbar wurden. Auf die Zählkammer unter dem Deckgläschen wurden anschließend Zellen pipettiert, die frisch trypsinisiert und in einer definierten Menge Medium aufgenommen waren. Danach wurde die Zellzahl in 25 Feldern ausgezählt und hieraus der Mittelwert berechnet. Man erhält die Angabe der Zellzahl pro ml, indem man den Mittelwert mit  $1 \times 10^4$  multipliziert.

### **3.1.5. Transiente Transfektion von Säugerzellen durch Kalziumphosphatpräzipitation**

Es wurden auf 6cm, bzw. 15cm Kulturschalen eine definierte Anzahl von Zellen ausplattiert und einen Tag kultiviert. Vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 5ml, bzw. 15ml frisches DMEM-Medium auf die Zellen gegeben. Die zu transfizierende DNA (es wurden 10µg, bzw. 60µg DNA verwendet) wurde auf ein Volumen von 170µl, bzw. 840µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und anschließend mit 20µl, bzw. 100µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> versetzt. In 15ml Falcon-Reaktionsgefäßen wurde pro Ansatz 200µl, bzw. 1ml einer 2x HBS-Lösung vorgelegt. Anschließend wurde tropfenweise die DNA-CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzu gegeben. Während dessen wurde kontinuierlich über eine Pasteurpipette Luft eingeblasen, was zu einer Vermischung der beiden Lösungen führte. Das gebildete Präzipitat wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert. Nach 12-15h wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt (SY5Y= RPMI; HeLa= DMEM).

Transiente Transfektionen für Reporter-Assays wurden in unabhängigen Triplikaten angesetzt. Es wurden jeweils  $2 \times 10^2$  HeLa- bzw. SY5Y-Zellen auf 6cm Kulturschalen ausplattiert. Die zu transfizierende DNA (dreifach) wurde auf das Volumen von 585µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend wurden 65µl einer 2,5M CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzugegeben. Diese DNA-CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde tropfenweise zu 650µl 2x HBS-Lösung hinzugegeben und gut vermischt. Es wurden jeweils 400µl des Ansatzes auf eine 6cm Kulturschale gegeben. Pro einfachen Ansatz wurden 5µg Luciferase-Reportervektor und 5µg Expressionsvektor transfiziert. Ergaben sich unterschiedliche Mengen an Expressionsvektoren, wurden Differenzen mit leeren Vektoren (PSG-5) beglichen.

Nach 16 stündiger Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Nährmedium wurde hinzugegeben. Nach weiteren 24h wurden die Zellen geerntet.



## **3.2. Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1. Kultivierung von Bakterien**

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA bei Retransformationen und Klonierungszwecken wurden E.coli-Sicherheitssämme DH5 $\alpha$  eingesetzt. Für Maxipräparationen wurden in einem 2 Liter Erlenmeyerkolben 400ml LB-Medium mit 100 $\mu$ l/ml Ampicillin versetzt und mit Bakterien oder einer Einzelkolonie angeimpft. Das Ganze wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei +37°C inkubiert.

### **3.2.2. Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im Maxi-Maßstab**

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit einem „Maxi-Prep“-Kit der Firma Qiagen und nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Präparation beruhte auf einer chromatographischen Auftrennung in Präparationssäulen, bei welcher die DNA nach alkalischer Lyse durch SDS und NaOH über eine Anionenaustauscher-Säule aufgereinigt wurde. Die aufgereinigte DNA wurde in 100 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst und nach der Konzentrationsbestimmung in einem Photometer auf eine Konzentration von 1 $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

### **3.3. Biochemische Methoden**

#### **3.3.1. Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen: NP-40-Lyse**

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Plastischaber von der Kulturschale abgelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um das überschüssige PBS zu entfernen, wurde für 1min bei 5000rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Die Zellpellets wurden mit NP-40-Lysepuffer resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen und so die Untersuchung bestimmter Proteine möglich zu machen, wurde die Methode des schnellen Einfrierens und Auftauens (freeze-thaw) verwendet.

Da jede Zelle auch zelleigene Proteasen besitzt, welche die Proteine nach dem Vorgang des Aufbrechens abbauen können, wurde dem Lysepuffer Proteaseinhibitoren zugegeben, im Falle einer weiteren Verwendung des Lysats für Kinase-Assays auch Phosphataseinhibitoren (siehe Material). Der gesamte Vorgang erfolgte im Eisbad.

Die Proben wurden zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend in einem +37°C Wasserbad aufgetaut, wobei eine Überwärmung der Suspension auf über +10°C vermieden wurde. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Nach einer darauf folgenden 20minütigen Inkubation im Eisbad waren die Zellen weitgehend aufgeschlossen. Die entstandenen Zellfragment- und Proteinsuspension wurde in der Tischzentrifuge für 20min bei +4°C und 13.000rpm abzentrifugiert. Der den Großteil der Tumorzellproteine enthaltende Überstand wurde abgenommen und weiterverwendet.

#### **3.3.2. Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen: Hancock/Evan-Lyse**

Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen. Dann wurde 1ml PBS auf die Zellen gegeben, welche anschließend mit einem Plastischaber von der Kulturplatte abgelöst und anschließend in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurden. Alle diese Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch 3min Zentifugation bei 2200rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in hypotonem Lysepuffer resuspendiert. Eine Zerstörung der Zellen erfolgte mit Hilfe

eines kleinen (mini dounce homogenizer) Mörsers, den man mehrere Male in dem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf und ab bewegte. Um die Kerne zu pelletieren, wurde wiederum für 5min bei +4°C und 4000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Kerne durch auf und ab Pipettieren mit Lysepuffer gewaschen. Es folgte eine erneute Pelletierung (wie oben). Danach wurden die Kerne in Lysepuffer/500mM NaCl resuspendiert. Es folgte eine 15minütigen Inkubationszeit auf einem sich langsam drehenden Rotor bei +4°C. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation für 5min bei 13000rpm, +4°C.

Das Lysat wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Bei der weiteren Verwendung für eine Immunpräzipitation wurde Lysepuffer/250mM NaCl verwendet.

### **3.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Um die Proteinkonzentration eines Zelllysates zu ermitteln, misst man in einem Photometer das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung aus Coomassie Brilliant-Blau G-250. Treten Proteinbindungen auf, verschiebt sich dieses Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm. Die Zunahme der Extinktion ist dabei annähernd proportional zu der Zunahme der Proteinkonzentration.

Zunächst wurde eine BSA-Referenzkurve erstellt. Hierzu wurden 1µl, 2µl, 4µl, 6µl und 8µl einer Lösung von BSA(1mg/ml) mit 150mM NaCl Lösung auf 100µl aufgefüllt und mit je 1ml Bradford-Lösung vermischt. Zur Probenvermessung wurden 1µl und 2µl des Proteinlysates in gleicher Weise angesetzt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die OD 595 der Proben gegen einen Leerwert abgelesen. An Hand der BSA-Referenzkurve konnte man die Proteinkonzentration der jeweiligen Lysate ablesen.

### 3.3.4. Immunpräzipitation

Will man ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysats isolieren, ist dies mit Hilfe der Immunpräzipitation möglich. Man koppelt zunächst einen spezifischen Antikörper an eine unlösliche Säulensubstanz. Hierfür wurde Protein-G-Sepharose verwendet, da der Antikörper an diese zwar nicht kovalent, jedoch sehr fest bindet. Gibt man nun ein Proteinlysats hinzu, kann man spezifische Proteine aus dem komplexen Gemisch isolieren. Sämtliche Schritte wurden bei +4°C oder auf Eis durchgeführt, um unerwünschte Enzymaktivität und proteolytischen Abbau der Proteine zu verhindern.

Zunächst wurde der Antikörper an die Protein-G-Sepharose gekoppelt. Hierfür wurden jeweils 20µl Protein-G-Sepharose in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Es folgten zwei Waschgänge mit Lysepuffer, welcher zuvor mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren versetzt worden war. Vor der folgenden Zugabe von 3-5µl Antikörper wurde das Ganze in 100µl Lysepuffer mit 2% BSA aufgenommen. Durch eine Inkubation von mindestens 2 Stunden bei +4°C wurde eine nahezu vollständige Kopplung des Antikörpers an die Trägersubstanz erreicht. Anschließend wurde das Pellet wiederum 2x mit Lysepuffer gewaschen.

Parallel dazu wurde das Zelllysats vorgereinigt. Dies ist wichtig, um eine unspezifische Präzipitation zu verhindern. Für die Reinigung wurden wie bei der Antikörperkopplung 20µl Protein-G-Sepharose pro Ansatz in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und diese 2x mit 100µl Lysepuffer + Proteinase-/Phosphataseinhibitoren gewaschen. Dann wurde das Ganze in 100µl Lysepuffer + 2% BSA aufgenommen und 15min bei +4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Sepharose-Pellet wurden 300-500µg Proteinlysats gegeben, welches zuvor auf 2% BSA eingestellt worden war, um ein unspezifisches Anheften der Proteine an die Sepharose zu vermeiden. Das Ganze wurde wiederum für mindestens 1 Stunde inkubiert und anschließend bei 13.000rpm, +4°C für 15min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für den folgenden Präzipitationsvorgang aufbewahrt.

Für diesen Präzipitationsvorgang wurde schließlich das zuvor gereinigte Zelllysats zu den gekoppelten Antikörpern gegeben und der Ansatz auf einem Überkopfschüttler über Nacht bei +4°C inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (13.000rpm, +4°C, 5min) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in vier Waschschritten mit 100µl Lysepuffer von unspezifisch präzipitierten Proteinen

weitgehend gereinigt. Die Aufbewahrung erfolgte auf Eis. Das Präzipitat wurde schnellst möglich weiter verwendet.

### **3.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-Page)**

Um die Proteine aus den Zelllysaten aufzutrennen, wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die Proteine werden bei dieser Methode durch SDS denaturiert. SDS geht eine nicht kovalente Bindung mit den hydrophoben Bereichen der Proteine ein, wobei das Verhältnis von Aminosäuren und SDS-Molekülen nahezu konstant ist. Es kommt zu einem Ausgleich der Ladungsunterschiede zwischen den Proteinen, welche alle eine negative Ladung erhalten. Im elektrischen Feld wandern alle Proteine daraufhin zur Anode. Die Wanderung hängt überwiegend vom Molekulargewicht der Proteine ab, da ihre spezifischen Ladungen gleich sind.

Zur Auftrennung wurden vertikale Gele verwendet, welche aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid bestanden. Es bestand eine Aufteilung in ein niedrigprozentiges Sammelgel und ein 15%iges Trenngel. Eine einheitliche Proteinfrent im Sammelgel, sowie eine optimale Auftrennung im Trenngel kamen durch unterschiedliche Pufferbedingungen zustande. Beide Gelanteile wurden aus einer Mischung aus dem jeweiligen Gelpuffer und Acrylamid-Stammlösung (30% (v/v)) im erforderlicher Verhältnis hergestellt (im Sammelgel 5% (v/v) Acrylamid). Es wurden sowohl Peroxisulfationen (APS 10% (w/v)), als auch Tetramethyldiaminmoleküle (TEMED 0,08%) in erforderlichen Mengen hinzu gegeben. APS ist für die Einleitung der Polymerisation wichtig, wohingegen die Radikale der Tetramethyldiaminmoleküle die eigentlichen Initiatoren der Radikalkettenpolymerisation sind.

Das Trenngel wurde bis zur erfolgten Polymerisation mit Isopropanol beschichtet. Das Sammelgel wurde anschließend auf die entstandene waagrechte Oberfläche gegossen.

Zu der Lösung mit den aufzutrennenden Proteinen wurde 3x SDS Probenpuffer gegeben (jeweils die Hälfte des Volumens der Proteinlösung). Es folgte eine 5 minütige Inkubation in einem Heizblock bei +100°C. Anschließend wurde die Proteinlösung auf

das Gel aufgetragen. Während des Einlaufens der Proben in das Trenngel wurde eine Spannung von 150V angelegt und zur eigentlichen Trennung auf 300V erhöht.

Der Auftrennungsgrad der Proteine kann an einem mitlaufenden Größenstandard nachvollzogen werden. Die Laufzeit ist von dem gewünschten Auftrennungsgrad abhängig.

Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mittels Western-Blot sichtbar gemacht. Mit dieser Methode ist es möglich, Größenunterschiede von 1kDa, welches in etwa 10 Aminosäuren entspricht, aufzulösen.

### **3.3.6. Western-Blot**

Beim Western-Blot werden die Proteine zunächst aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dies geschieht mit Hilfe eines transversal zur Geloberfläche angelegten elektrischen Feldes. Die Proteine treten auf der anodischen Seite aus dem Gel aus und nehmen auf der Membran exakt dieselbe Position ein, die sie auf dem Gel innehatten. Die Proteine sind somit auf der Membranoberfläche immobilisiert und in diesem Zustand für immunologische Reaktionen zugänglich. Als nächstes folgt eine Inkubation der Membran in einer Lösung, die einen Antikörper enthält, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Nach mehreren Waschschritten, die zur Entfernung überschüssiger, nicht gebundener Antikörper dienen, folgt ein weiterer Inkubationsschritt mit einem Zweitantikörper. Dieser Zweitantikörper ist gegen die konstante Domäne der schweren Kette des Erstantikörpers gerichtet. Durch eine Markierung des Zweitantikörpers mit, in diesem Falle, Horseradish-Peroxidase lässt sich aufgrund deren Enzymreaktion das erwünschte Protein hochspezifisch nachweisen.

Zunächst wurde die auf die Größe des Gels zugeschnittene Nitrocellulose-Membran (PVDF-Membran Immobilon-P, Millipore) für 1min in 100% Methanol, dann für 2min in H<sub>2</sub>O und schließlich fünf Minuten in Blot-Puffer inkubiert. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine wurde eine „semi-dry“ Blot-Apparatur (Bio-Rad) verwendet. Auf die Anode dieser Apparatur wurden nun zunächst drei Lagen mit Blot-Puffer befeuchtetes Whatman-3M Papier aufeinander geschichtet, welches zuvor ebenfalls auf die Größe des Gels zugeschnitten worden war. Darauf wurde die vorbehandelte Nitrocellulose-Membran und das Polyacrylamidgel gelegt, wobei darauf

zu achten war, dass sich in keiner der Schichten Luftblasen bildeten. Es folgten wiederum drei in Blot-Puffer getränkte Lagen mit Whatman-3M Papier. Der Proteintransfer erfolgte bei 22 Volt und 2 Ampere innerhalb einer Zeit von 30 Minuten.

Nach Beendigung dieses Vorgangs wurde die Membran sofort in Blocklösung überführt. Dadurch wurde die PVDF-Membran abgesättigt, wodurch eine unspezifische Bindung von den im Folgenden hinzugegebenen Antikörpern mit der Membran vermieden werden konnte. Nach zwei Stunden Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wurde frische Blocklösung mit dem in angemessener Verdünnung zugesetzten primären Antikörper hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation, wahlweise über Nacht bei +4°C oder 3h bei Raumtemperatur. Nachdem 2x 5min und 2x 15min mit TBS-T (1xTBS, 0,02% Tween-20) gewaschen worden war, folgte eine zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der in der Verdünnung 1:3000 (ebenfalls in Blocklösung) verwendet wurde. Danach wurde erneut für 2x 5min und 2x 15min mit TBS-T gewaschen.

Zur Entwicklung der Membran wurden ECL-Reagenzien (Amersham) verwendet. Hierzu wurden die ECL+-Lösungen A und B im Verhältnis 40:1 zusammen pipettiert und die Mischung für 5min auf die zu entwickelnde Membran gegeben. Die ECL-Reagenzien erzeugten gemeinsam mit der Horseradish-Peroxidase eine Chemolumineszenz. Diese ließ sich mit Hilfe eines ECL-Hyperfilm nachweisen. Die Expositionzeiten des Films betragen 1-40 Minuten. Es besteht in gewissen Grenzen eine Proportionalität zwischen der Schwärzung des Films und der gebundenen Antikörpermenge. Daraus ließ sich auf die vorhandene Proteinmenge schließen.

### **3.3.7. Kinase-Assay**

Mit dieser Methode lässt sich die biologische Aktivität einer Proteinkinase bestimmen. Zunächst wird die Proteinkinase zusammen mit einem geeigneten Phosphatgruppenakzeptor (Protein) und dessen radioaktiven Substrat (radioaktives Nukleotid-tri-phosphat) inkubiert. In einer enzymatischen Reaktion werden Phosphatgruppen und damit Radioaktivität vom Substrat auf den Akzeptor übertragen. Der somit radioaktive Akzeptor kann mit Hilfe vom SDS-PAGE aufgetrennt werden. Es folgt eine Autoradiographie des getrockneten Gels und man erhält eine Auskunft über die biologische Aktivität der untersuchten Kinase.

Es wurden durch Immunpräzipitation gereinigte hnRNP K (flaggetaggt) bzw. Fyn/hnRNP K Präzipitate hergestellt, welche zunächst zweimal mit Kinasepuffer gewaschen wurden. Anschließend wurde das Präzipitat mit  $^{32}\text{P}\gamma\text{dATP}$  als Substrat und Histon H1 als Akzeptor inkubiert. Hierzu wurde das Immunpräzipitat mit 22 $\mu\text{l}$  Kinasepuffer, 1,25 $\mu\text{l}$  Histon H1 Lösung (1mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ), 1,25 $\mu\text{l}$  ATP (1mM) und 2 $\mu\text{Ci}$   $^{32}\text{P}\gamma\text{dATP}$  (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) versetzt und das ganze 30min bei +30°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 $\mu\text{l}$  3x SDS-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt, und es folgte eine weitere Inkubation von 5min bei +95°C. Anschließend wurde in der Tischzentrifuge bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einem 12% SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und das Trenngel auf Whatman-3M Papier überführt. Auf einem Gelrockner wurde es für 60min getrocknet und anschließend für 24h bei -80°C auf einem Kodakfilm exponiert.

### **3.3.8. Bestimmung der Luciferaseaktivität mittels Luciferase-DICE-Reporterassay**

Mit Hilfe eines Luciferaseassay kann der Einfluss eines Proteins auf die Translation bestimmter Genprodukte untersucht werden. Außerdem ist eine Analyse der Interaktion von bestimmten intrazellulären Proteinen an einem bestimmten Promotor möglich.

Für diesen Versuch wurde ein mRNA-DICE-Element mit nachgeschaltetem Luciferase-Gen in ein DNA-Plasmid inkloniert (Ostareck-Lederer/ Lederer). Eine translationelle Repression lässt sich durch eine verminderte Luciferase-Aktivität nachweisen.

Es wurden jeweils  $2 \times 10^5$  HeLa-Zellen auf 6cm Kulturschalen ausplattiert, transfiziert und die Reporteraktivität bestimmt. 36h nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Plastikschaaber von den Schalen gelöst. Nach Überführung in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden die Zellen in 1ml PBS suspendiert. Alle Schritte erfolgen auf Eis. In der Tischzentrifuge wurden die Zellen nun bei 3000rpm, +4°C für 10min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellpellets in 150-200 $\mu\text{l}$  Kpi-Puffer/1mM DTT/Proteinaseinhibitoren resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C wurden die Zellen aufgeschlossen. Danach folgte eine erneute Zentrifugation bei 13000rpm, +4°C für 10min, bei der das Lysat von unlöslichen Bestandteilen getrennt wurde. Der geklärte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die



Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode ermittelt. Als Kontrollprobe wurde Kpi-Lysepuffer verwendet.

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität wurden 50µl des Proteinlysates mit 350µl Luciferase-Assay-Puffer versetzt und nach Zugabe von 150µl Luciferinlösung die Lichtemission im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) gemessen. Assaypuffer und Luciferinlösung wurden hierfür jeweils frisch angesetzt.

### **3.3.9. Immunfluoreszenz**

Bei der Immunfluoreszenz werden intrazelluläre Proteine durch einen spezifischen Antikörper markiert und anschließend durch einen zweiten fluoreszierenden Antikörper sichtbar gemacht. Auf diese Weise kann die quantitative Expression bestimmter Proteine und dessen Einfluß auf die Zellmorphologie beurteilt werden.

Die Zellen wurden in Kulturschalen auf Deckgläschen ausplattiert und kultiviert. Anschließend wurden sie 1x mit PBS gewaschen und mit einer 3% Paraformaldehydlösung für 15min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Deckgläschen in eine abgedunkelte, feuchte Kammer überführt. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde zunächst 2x 10min bei RT mit PBS/0,1M Glycin, dann 2x 5min bei RT mit PBS/0,1% NP-40 gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde mit PBS/0,1% NP-40/5% FCS für 45min geblockt. Daraufhin wurde der erste Antikörper aufgetragen. Es wurde je nach Transfektion und zu untersuchendem Protein entweder  $\alpha$ -Fyn-rabbit oder  $\alpha$ -Flag-mouse oder beide Antikörper gemeinsam verwendet. Es folgte eine Inkubation von 45min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 3x mit PBS/0,1% NP-40/5%FCS für jeweils 5min gewaschen und die Zellen dann mit dem zweiten Antikörper ( $\alpha$ -Kaninchen-FITC- und/oder  $\alpha$ -Maus-cy3-Antikörper) inkubiert. Danach wurde 1:50 in PBS/0,1%NP-40 (Endkonzentration: 100µg/ml) verdünnte DAPI-Stocklösung auf die Zellen gegeben. Durch die Gegenfärbung der Zellkerne wurden diese blau markiert. Anschließend wurde wiederum 3x für 5min mit PBS/0,1%NP-40 gewaschen. Nach jeweils einem Waschschrift in PBS und H<sub>2</sub>O wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert und konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Die Lagerung erfolgte in Dunkelheit bei +4°C.

### 3.3.10. Immunfluoreszenz: BrdU-Färbung

BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridin) ist ein Basenanalogon, welches während der Replikationsphase anstelle von Thymin in die DNA eingebaut wird. Man gibt einen Überschuß von BrdU zu den Zellen. Das in die DNA integrierte BrdU kann mit Hilfe eines gegen BrdU gerichteten Antikörpers markiert werden. Dieser wird wiederum von einem zweiten Antikörper erkannt, der mit einer fluoreszierenden Gruppe markiert ist. Unter einem Fluoreszenz-Mikroskop lassen sich so Zellen nachweisen, welche BrdU in ihre DNA eingebaut haben.

Eine definierte Zellzahl wurde in 6cm Kulturschalen auf Deckgläschen ausplattiert und kultiviert. Anschließend wurde BrdU in einer Endkonzentration von 100µM zu den Zellen gegeben in einem Brutschrank (37°C) inkubiert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit einer 3% Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte wiederum ein Waschgang mit PBS. Durch eine 2x 10min Inkubation mit 0,1M Glycin/PBS und 20min Inkubation mit 0,1% NP-40/PBS bei Raumtemperatur wurden die Zellen permeabilisiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Deckgläschen vorsichtig aus der Kulturschale entnommen und in eine abgedunkelte Feuchtkammer überführt. Anschließend wurden die Zellen 2x 2min mit 2M HCl inkubiert, welches zur Denaturierung der DNA führt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde 3x 5min mit PBS/0,1%NP-40/5%FCS blockiert.

Es folgte die einstündige Inkubation mit einem  $\alpha$ -BrdU Antikörper (unverdünnt). Überschüssige Antikörper wurden anschließend durch 3x 5min Waschen mit PBS/0,1%NP-40/5% FCS entfernt. Der zweite Antikörper, ein monoklonaler Cy3 Antikörper (anti-Maus) wurde 1:40 in dieser Lösung verdünnt und auf die Deckgläser gegeben, welche daraufhin für 30min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen 2x 5min mit PBS/ 0,1% NP-40 erfolgte eine sogenannte DAPI-Färbung. Durch eine Gegenfärbung wurden alle Zellkerne blau gefärbt. Hierzu gab man 1:50 in PBS/0,1% NP-40 verdünnte DAPI-Stocklösung auf die Zellen und inkubierte diese für 5min. Es wurde jeweils 1x mit PBS und 1x mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Mounting Medium eingedeckt und versiegelt. Die Anzahl BrdU-positiver Zellen wurde nun unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ermittelt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Darstellung der *in-vitro* Interaktion von Fyn und hnRNPK

Um Interaktionspartner von Fyn ausfindig zu machen, welche in dessen Signalübertragungsweg eine Rolle spielen, analysierte E. Bergmann Tumorlysate von Neuroblastomen des Stadium I.

Hierzu wurde eine GST-Pulldown-Analyse durchgeführt. Das GST-Fyn-Fusionsprotein wurde zunächst mit Lysat inkubiert, so dass es zur Interaktion zwischen Fyn und anderen Proteinen kommen konnte. Anschließend wurde das Gemisch nach einigen Waschschritten über ein SDS-Gel aufgetrennt und mit einer Coomassie-Färbung angefärbt. Auf diese Weise ließen sich sowohl Fyn als auch daran bindende Proteine nachweisen.

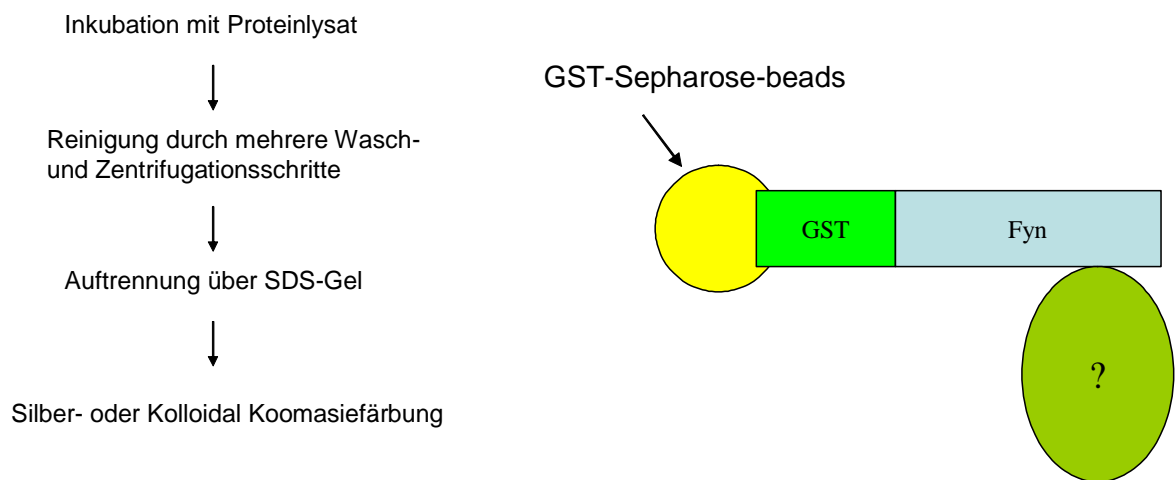
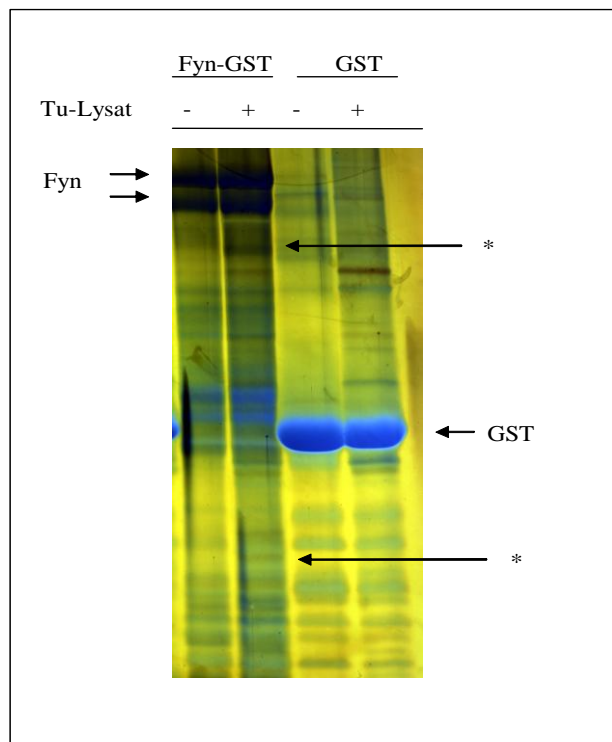


Abbildung IV: Prinzip der GST-Pulldown-Analyse



**Abbildung V: Identifikation von *in-vitro* Interaktionspartnern von Fyn**

(Die Abbildung wurden mir freundlicherweise von Dr. E. Bergmann überlassen.)

Für die GST-Pulldown-Analyse wurde das Zelllysate von Neuroblastomzellen verwendet (Tumor-Lysat = Tu-Lysat). Nach Inkubation eines GST-Fyn-Fusionsproteins mit dem Lysat folgte eine Auftrennung über ein SDS-Gel sowie eine Anfärbung mit einer Koomasiefärbung.

Wie in Abb.V zu sehen ist, ließ sich eine Fyn-Bande nachweisen. Deutlich sichtbar fielen zwei weitere Banden auf (mit \* gekennzeichnet), welche durch Proteine hervorgerufen werden, die an Fyn gebunden sind.

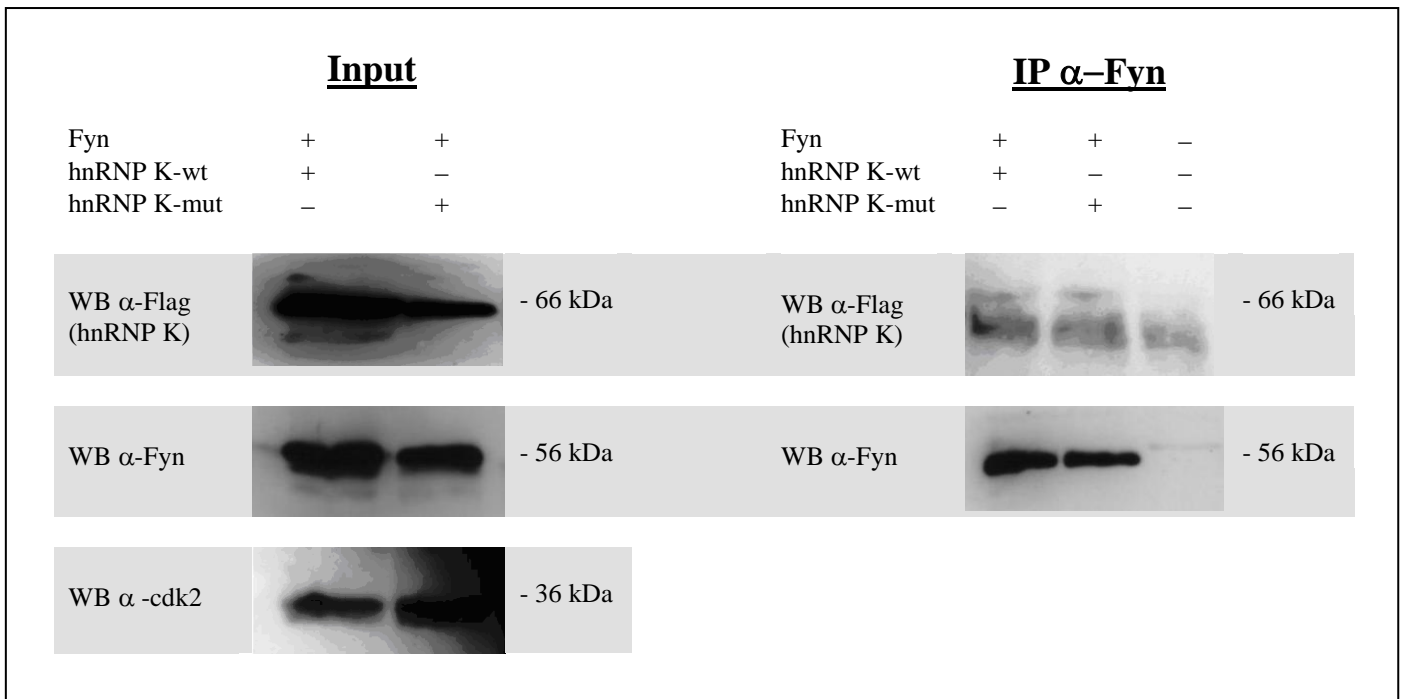
Bei Analyse der Banden mittels Protein-Sequenzierung (Massenspektroskopie) konnte als einer der Bindungspartner das *heterogene Ribonukleoprotein K (hnRNP K)* identifiziert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass es *in-vitro* eine Bindung zwischen den beiden Proteinen gibt.

## **4.2. Biochemische Analyse einer potentiellen in-vivo Interaktion von Fyn und hnRNP K**

### **4.2.1. Untersuchung der *in-vivo* Bindungseigenschaften zwischen Fyn und hnRNP K**

In früheren Arbeiten konnte eine *in-vitro* Interaktion zwischen der Src-Kinase Fyn und hnRNP K nachgewiesen werden (Bergmann; Weng, 1994). Um zu analysieren, ob auch *in-vivo* eine Interaktion stattfindet, wurde eine co-Immunpräzipitation mit beiden Proteinen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst HeLa-Zellen mit einem Fyn- und einem hnRNP K-Plasmid, bzw. dessen Mutante, co-transfiziert. Bei dieser Mutante handelt es sich um eine dominant negative Mutante von hnRNP K, welche an die mRNA binden und dadurch deren Translation hemmen sollte. Eine Bindung an die SH3-Domäne von Fyn sollte dagegen nicht stattfinden können, da eine Mutation der SH3-Bindedomäne im hnRNP K-Gen besteht.

Nach Transfektion wurde ein Zellysate nach der NP<sub>40</sub>-Methode hergestellt und Fyn mittels eines spezifischen Antikörpers an Protein-G-Sepharose gekoppelt. Auf diese Weise ließen sich Proteine, welche eine spezifische Bindung mit Fyn eingehen, aus dem komplexen Gemisch abtrennen. Im Folgenden wurde ein Western-Blot durchgeführt, bei dem ein  $\alpha$ -Flag-Antikörper verwendet wurde, welcher sich gegen die Flag-Sequenz eines Flag-getagten hnRNP K richtet.



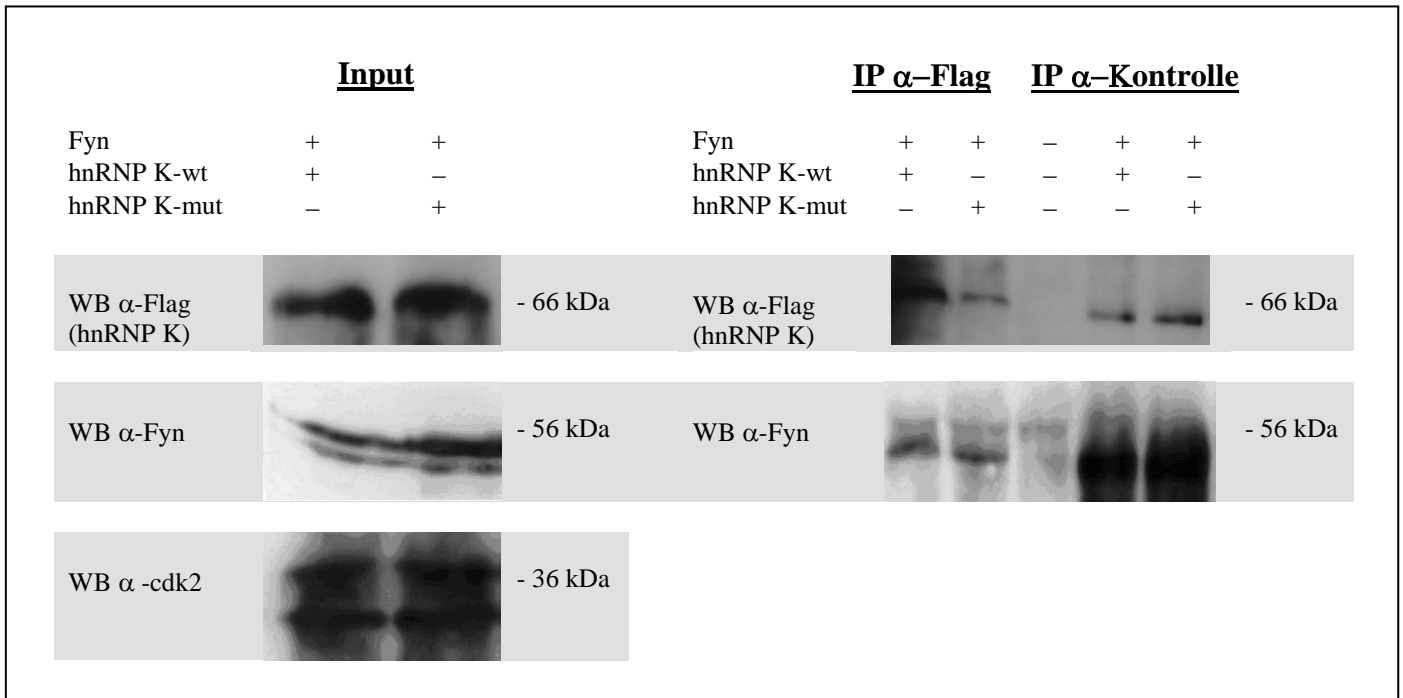
**AbbildungVI: Analyse einer *in-vivo* Interaktion von Fyn und hnRNP K in HeLa-Zellen**

Es wurde eine co-Immunpräzipitation  $\alpha$ -Fyn und ein Western-Blot  $\alpha$ -Flag (hnRNP K) durchgeführt. Hierfür wurde ein NP<sub>40</sub>-Lysat (400 $\mu$ l Zellysat) eingesetzt.

Bei der IP wurden 5 $\mu$ l eines  $\alpha$ -Fyn-Antikörper verwendet. Im WB wurden als Erst-Antikörper ein  $\alpha$ -Flag-Antikörper (Maus, 1:2000 verdünnt), ein  $\alpha$ -Fyn-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 verdünnt) und ein  $\alpha$ -cdk2-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 verdünnt) benutzt. Als Zweit-Antikörper wurde ein  $\alpha$ -Maus-Antikörper und ein  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper (1:3000 verdünnt) eingesetzt.

Man sieht eine gute Expression von Fyn und hnRNP K. Bei dem Ansatz Fyn/hnRNP K-wt und bei Fyn/hnRNP K-mut zeigen sich schwache Banden, die leicht oberhalb von 66 kDa verlaufen. In der Kontrolle ohne Lysat ist keine vergleichbare Bande zu sehen. Da die Banden sowohl bei dem Ansatz mit hnRNP K-wt als auch bei dem Ansatz mit hnRNP K-mut darstellt, kann sie nicht sicher als an Fyn gebundenes hnRNP K betrachtet werden.

Für eine weitere co-Immunpräzipitation wurde ein Zellysat nach der Hancock/Evan-Methode hergestellt. HnRNP K wurde mit einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper, welcher sich gegen die Flag-Sequenz eines Flag-getaggten hnRNP K richtet, an Protein-G-Sepharose gekoppelt. Bei dem anschließend durchgeführten Western-Blot wurde ein spezifischer  $\alpha$ -Fyn-Antikörper verwendet, um an hnRNP K gebundenes Fyn nachzuweisen.



**Abbildung IVII: Analyse einer *in-vivo* Interaktion von Fyn und hnRNP K in HeLa-Zellen**

Es wurde eine co-Immünpräzipitation  $\alpha$ -Flag (hnRNP K) und ein Western-Blot  $\alpha$ -Fyn durchgeführt. Hierfür wurde ein Hancock/Evan-Lysat (500 $\mu$ g Zellysat) verwendet. Bei der IP wurden 5 $\mu$ l eines  $\alpha$ -Flag-Antikörper verwendet. Im WB wurden als Erst-Antikörper ein  $\alpha$ -Fyn-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 verdünnt), ein  $\alpha$ -Flag-Antikörper (Maus, 1:2000 verdünnt) und ein  $\alpha$ -cdk2-Antikörper (Kaninchen, 1:2000 verdünnt) eingesetzt. Als Zweit-Antikörper wurde ein  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper (1:3000 verdünnt) verwendet. Als unspezifische Kontrolle wurde ein cdk2-Antikörper eingesetzt.

In dem Ansatz, welcher Fyn/hnRNP K-wt enthält, sieht man eine Bande, die mit einer Größe von 59 kDa Fyn entsprechen könnte. Jedoch stellt sich auch bei den Ansätzen mit Fyn/hnRNP K-mut, sowie in der unspezifischen Kontrolle eine Bande in ähnlicher Höhe dar. In der Kontrolle ohne Lysat ist bei 59 kDa keine signifikante Bande zu sehen. Ein Kontroll-Westernblot  $\alpha$ -Flag zeigte eine gute hnRNP K-Bindung.

In den Western-Blots der Abb.VI und Abb.VII zeigte sich, dass keine eindeutige *in-vivo* Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachzuweisen ist. In dem Western-Blot in Abb.VII sieht man auf Höhe von 59kDa, wo man beim Lysat Fyn/hnRNP K-wt eine Interaktionsbande erwarten würde, ein schwaches Signal. Auch bei der unspezifischen Kontrolle mit cdk2 und bei der Kontrolle mit Lysat, in welchem die Mutante von hnRNP K + Fyn co-transfiziert wurde zeigen sich jedoch Banden.

Vermutlich handelt es sich um unspezifische Bindungen, so dass mit diesem Experiment eine Bindung und *in-vivo* Interaktion der beiden Proteine nicht nachgewiesen werden konnte.



### 4.2.2. Analyse der Kinaseaktivität von Fyn in Gegenwart von hnRNP K

Fyn ist eine Tyrosinkinase und dazu in der Lage an andere Proteine zu binden und diese durch Phosphorylierung eines Tyrosinrestes zu aktivieren. So könnte man vermuten, dass es im Falle einer *in-vivo* Interaktion von Fyn und hnRNP K zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von hnRNP K durch Fyn kommt. Eine Kinaseaktivität wäre dann nachzuweisen.

Um das zu analysieren, wurden zunächst Zellen mit Expressionsplamiden von hnRNP K oder Fyn/hnRNP K transient transfiziert und daraus ein Zelllysate hergestellt. Durch Immunpräzipitation wurde hnRNP K mit dem potentiell daran gebundenen Fyn aus dem Zelllysate isoliert. Das Gemisch wurde anschließend mit radioaktivem ATP als Substrat inkubiert. Bei vorhandener Kinaseaktivität würde ein radioaktiver Phosphatrest von der Src-Kinase Fyn auf den Phosphatgruppenakzeptor hnRNP K übertragen. Durch das radioaktive Signal ließe sich der übertragene Phosphatrest nach Auftrennung im SDS-Acrylamidgel sichtbar machen. Dementsprechend wäre bei dem Ansatz Fyn/hnRNP K ein Signal zu erwarten, wohingegen sich bei dem Ansatz „hnRNP K alleine“ auf Grund der Abwesenheit einer Tyrosinkinase keine Bande zeigen sollte.

		<b><u>IP <math>\alpha</math>-hnRNP K</u></b>				$\emptyset$ Antikörper		Unspez. Antikörper	
Fyn	+		-		-	+	-	+	-
hnRNP K	+		+		-	+	+	+	+
64 kDa -									
50 kDa -									

**Abbildung VIII: Analyse der Kinaseaktivität von Fyn gegenüber hnRNP K**

Es wurde ein Kinaseassay in HeLa-Zellen durchgeführt. Zunächst erfolgte eine co-Immunpräzipitation  $\alpha$ -Flag (hnRNP K), bei welcher 200  $\mu$ g Proteinlysate und 5  $\mu$ l  $\alpha$ -Flag-Antikörper eingesetzt wurden. Dann wurden die Proteine über ein SDS-Acrylamidgel aufgetrennt. Die Darstellung erfolgte auf einem Kodakfilm nach 42 stündiger Expositionszeit.

In dem Ansatz Fyn/hnRNP K sieht man eine Bande auf Höhe von 66 kDa. Bei „hnRNP K alleine“ und in dem Ansatz ohne Lysat ist kein Signal sichtbar. In den Kontrollen Fyn/hnRNP K-wt ohne Antikörper und mit unspezifischem Antikörper zeigen sich ähnliche Banden wie bei Fyn/hnRNP K. Ebenso bei der Kontrolle „hnRNP K alleine“ mit unspezifischem Antikörper.

In der Abb. VIII zeigt sich eine leichte Kinaseaktivität bei den mit Fyn/hnRNP K co-transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu ist bei „hnRNP K alleine“ kein Signal zu sehen.

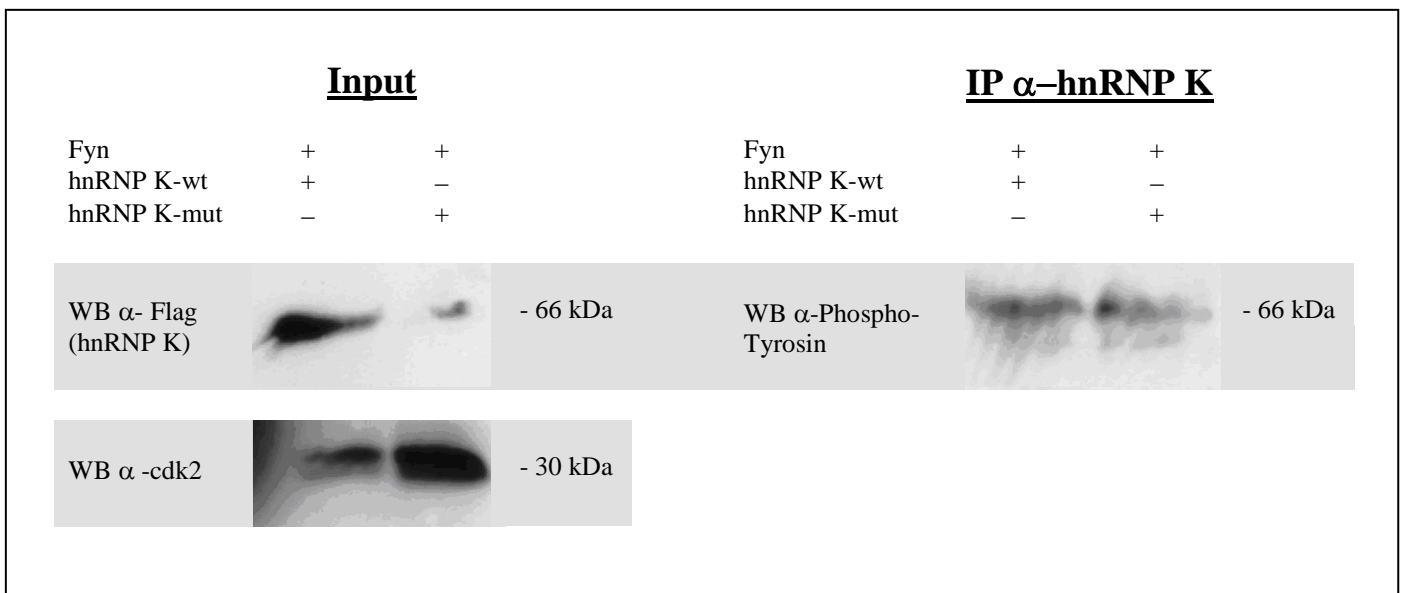
Dies spricht für eine enzymatische Phosphatrest-Übertragung auf hnRNP K in Gegenwart von Fyn.

Im vorliegenden Experiment zeigt sich aber auch in der Negativ-Kontrolle ohne Antikörper für Fyn/hnRNP K ein Signal auf gleicher Höhe. Ebenso sieht man in den Kontrollen mit unspezifischen Antikörpern sowohl für Fyn/hnRNP K als auch „hnRNP K alleine“ eine identische Bande. Das weist auf eine unspezifische Reaktion hin.

Da hier in den Negativ-Kontrollen ebenfalls eine Kinaseaktivität zu sehen ist, lässt sich mit diesem Experiment keine eindeutige Kinaseaktivität von Fyn in Gegenwart von hnRNP K nachweisen. Eine Interaktion im Sinne einer spezifischen Phosphorylierung von hnRNP K durch Fyn kann dementsprechend nicht gezeigt werden.

### 4.2.3. Phosphorylierung von hnRNP K durch die Tyrosinkinase Fyn

Um zu klären, ob es durch die Tyrosinkinase Fyn zur Phosphorylierung eines Tyrosinrestes im hnRNP K-Protein kommt, wurde ein Western-Blot angefertigt, der mit einem  $\alpha$ -Phospho-Tyrosin-Antikörper entwickelt wurde. Zunächst wurde eine transiente Transfektion mit Fyn/hnRNP K-wt sowie mit Fyn/hnRNP K-mut durchgeführt. Im Anschluß folgte eine co-Immunpräzipitation, bei der hnRNP K über einen  $\alpha$ -Flag-Antikörper an Protein-G-Sepharose gebunden wurde. An hnRNP K bindende Proteine wurden damit ebenfalls aus dem Proteingemisch isoliert. Um zu klären, ob es bei der Bindung der beiden Proteine zu einer Phosphorylierung eines Tyrosinrestes im hnRNP K-Protein kommt, wurde im Folgenden ein Western-Blot durchgeführt, bei dem mit einem  $\alpha$ -Phospho-Tyrosin-Antikörper entwickelt wurde. Es wäre zu erwarten, dass es in dem Ansatz, welcher Fyn und hnRNP K-wt enthält, zu einer Phosphorylierung und damit zu einem deutlichen Signal kommt. Bei Fyn und hnRNP K-mut wäre keine Bande zu erwarten, da es durch die Mutation in der Binde-Domäne des hnRNP K-Proteins nicht zu einer Bindung zwischen Fyn und hnRNP K kommen kann, und daher eine Phosphorylierung nicht möglich ist.



**Abbildung IX: Analyse einer möglichen Phosphorylierung von hnRNP K durch Fyn**

Es wurde eine co-Immunpräzipitation  $\alpha$ -Flag (hnRNP K) und anschließend ein Western-Blot  $\alpha$ -Phospho-Tyrosin durchgeführt. Dazu wurde ein NP-40-Lysat aus HeLa-Zellen hergestellt, welche mit Fyn/hnRNP K-wt oder Fyn/hnRNP K-mut transfiziert worden waren. Man sieht sowohl bei Ansätzen mit der Fyn/hnRNP K-wt, als auch Fyn/hnRNP K-mut nahezu identische Banden auf Höhe von 66kDa. Im Input bestehen deutliche Unterschiede im hnRNP K-Gehalt der Zellen.

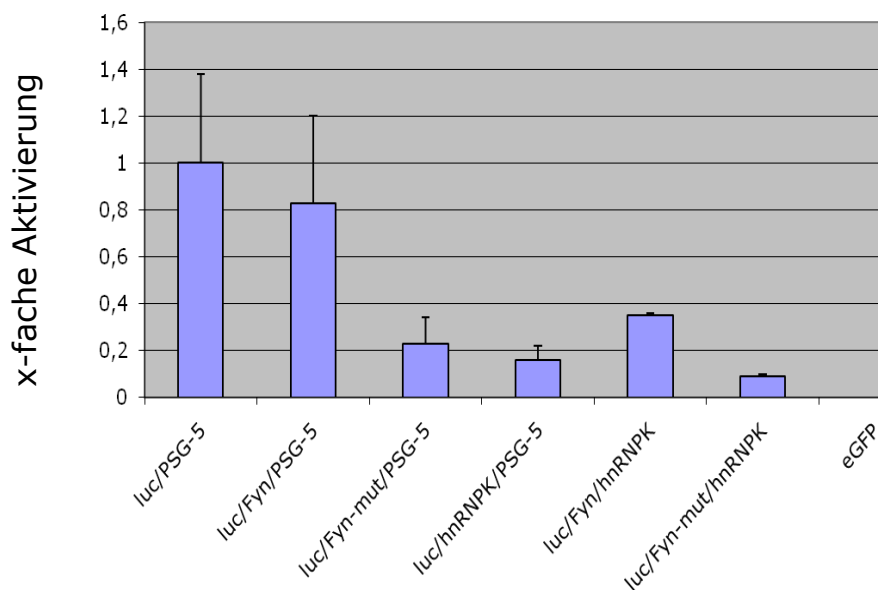
Im dem Versuch zeigt sich, dass eine Phosphorylierung eines Tyrosinrestes von hnRNP K stattfindet. Diese Phosphorylierung findet sowohl bei Transfektionsansätzen mit Fyn + hnRNP K-wt als auch mit Fyn + hnRNPK-mut statt. Die Reaktion ist somit entweder unspezifisch, das heißt unabhängig von Fyn, oder es kommt doch zu einer Bindung von Fyn und der hnRNP K-Mutante. Dann wäre eine Phosphorylierung möglich. Mit diesem Experiment lässt sich der genaue Sachverhalt nicht eindeutig klären.

### 4.3. Funktionelle Analyse einer potentiellen *in-vivo* Interaktion von Fyn und hnRNP K

#### 4.3.1. Potentielle funktionelle Interaktion zwischen Fyn und hnRNP K

Durch die Bindung von hnRNP K an die mRNA eines in der 3'UTR gelegenen DICE-Element (*Differentiation control element*), wird eine Translation dieser mRNA verhindert, da sich die Ribosomenuntereinheiten nicht anlagern können. In diesem Experiment wurde untersucht, ob durch eine potentielle Interaktion zwischen Fyn und hnRNP K diese Repression aufgehoben werden kann.

Es wurde ein Luciferase-DICE-Reporterassay durchgeführt, bei dem eine DICE-regulierte Reporter cDNA verwendet wurde. In das verwendete DNA-Reporterplasmid wurde ein mRNA-DICE-Element mit nachgeschaltetem Luciferase-Gen einkloniert. Eine Repression durch hnRNP K ließe sich durch eine Reduktion der Luciferase-Aktivität gegenüber dem Ausgangswert nachvollziehen. In Anwesenheit von Fyn würde man im Sinne einer funktionellen Interaktion mit hnRNP K einen dereprimierenden Effekt und dementsprechend eine Aktivierung der LUC/DICE-Expression erwarten. Die Fyn-Mutante (k299m), welche durch eine Mutation in der Kinase-Domäne nicht dazu in der Lage sein sollte hnRNP K zu dereprimieren, sollte keine Aktivierung hervorrufen.



**Abbildung X: Funktionelle Interaktion zwischen Fyn und hnRNP K**

Es wurde ein Luciferase-DICE-Reporterassay normiert auf Bradford in SY5Y-Zellen durchgeführt.

Transfektionsschema:

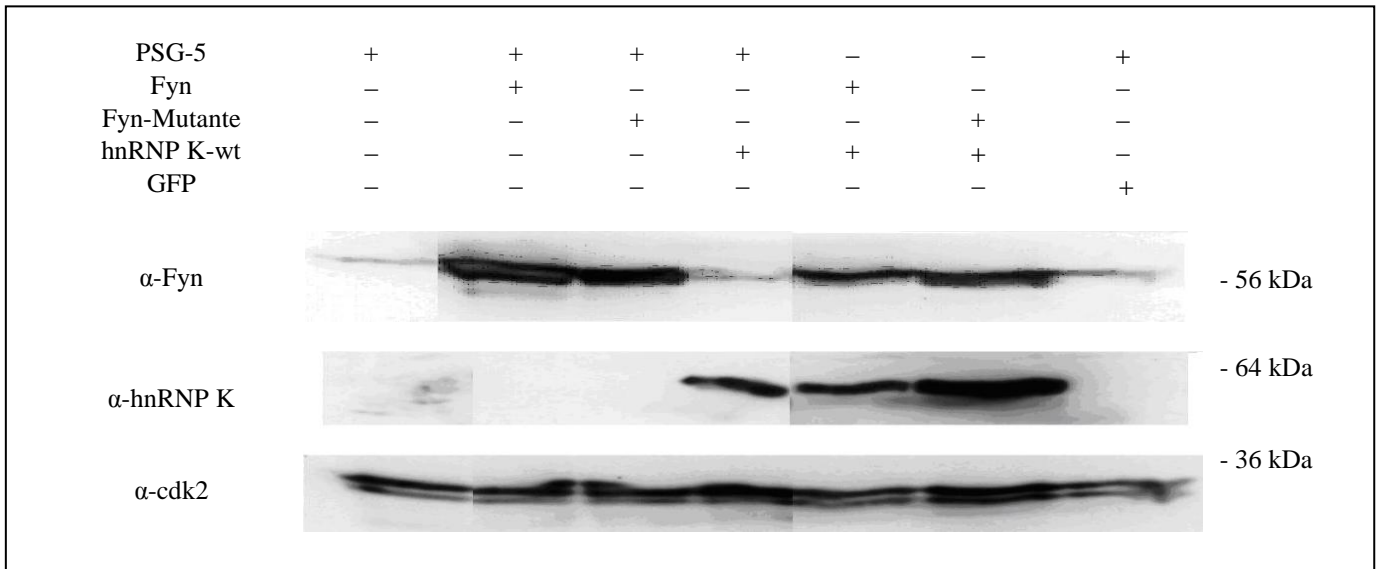
a)	5µg LUC (= Luciferase)	10µg PSG-5 (= Leervektor)	
b)	5µg LUC (= Luciferase)	5µg PSG-5 (= Leervektor)	5µg Fyn
c)	5µg LUC (= Luciferase)	5µg PSG-5 (= Leervektor)	5µg Fyn-Mutante
d)	5µg LUC (= Luciferase)	5µg PSG-5 (= Leervektor)	5µg hnRNP K
e)	5µg LUC (= Luciferase)	5µg Fyn	5µg hnRNP K
f)	5µg LUC (= Luciferase)	5µg Fyn-Mutante	5µg hnRNP K
g)	10µg eGFP		

In dem Ansatz, der nur das LUC/DICE-Plasmid enthält, zeigt sich eine deutliche Luciferase-Aktivität. Durch hnRNP K kommt es zu einer Reduktion dieser Aktivität. „Fyn alleine“ bewirkt eine minimale Reduktion, die Fyn-Mutante reprimiert die Luciferase-Aktivität dagegen ähnlich wie hnRNP K. Fyn kann die Reduktion durch hnRNP K zumindest partiell aufheben. Die Fyn-Mutante zeigt diesen dereprimierenden Effekt nicht.

In diesem Experiment wird deutlich, dass es in mit hnRNP K transfizierten Zellen zu einer deutlichen Repression der Luciferase-Aktivität kommt. Weiterhin wird ersichtlich, dass Fyn auf hnRNP K einen dereprimierenden Effekt hat. Die Fyn-Mutante zeigt dahingegen diese Wirkung nicht. Die Luciferase-Aktivität bleibt reduziert. Man sieht außerdem, dass die Fyn-Mutante an sich schon einen reprimierenden Effekt hat.

Die Tatsache, dass hnRNP K die Luciferase-Aktivität von LUC-DICE reduziert und Fyn diesen Effekt aufheben kann, spräche für eine funktionelle Interaktion im Sinne einer dereprimierenden Wirkung von Fyn auf die Inhibition der Translation durch hnRNP K.

Um zu prüfen, ob in den im Reporter-Assay verwendeten Zellen eine ausreichende Expression der untersuchten Proteine stattgefunden hat, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Hierbei wurde ein  $\alpha$ -Flag-Antikörper gegen hnRNP K sowie ein  $\alpha$ -Fyn-Antikörper verwendet.



**Abbildung XI: Verifizierung des Proteingehaltes der im Reporter-Assay verwendeten Zellen**

Zur Analyse des Proteingehaltes wurde ein Western-Blot durchgeführt. Es wurden jeweils 40 $\mu$ l Proteinlysate mit  $\alpha$ -Fyn-Antikörper [oben] und einem  $\alpha$ -Flag-Antikörper (entspricht  $\alpha$ -hnRNP K) [unten] *geblottet*. Zur Kontrolle der Proteinladung wurde cdk2 bestimmt. In allen Proben konnten vergleichbare Mengen an cdk2-Protein nachgewiesen werden. Auf demselben Gel liefen weitere Kontroll-Proteine mit (Daten nicht gezeigt).

Alle transient transfizierten Proteine wurden in den Zellen gut exprimiert.

## **4.4. Biologische Untersuchung einer potentiellen Interaktion von Fyn und hnRNP K**

### **4.4.1. Bedeutung von hnRNP K bei der Fyn-abhängigen Differenzierung von Neuroblastomzellen**

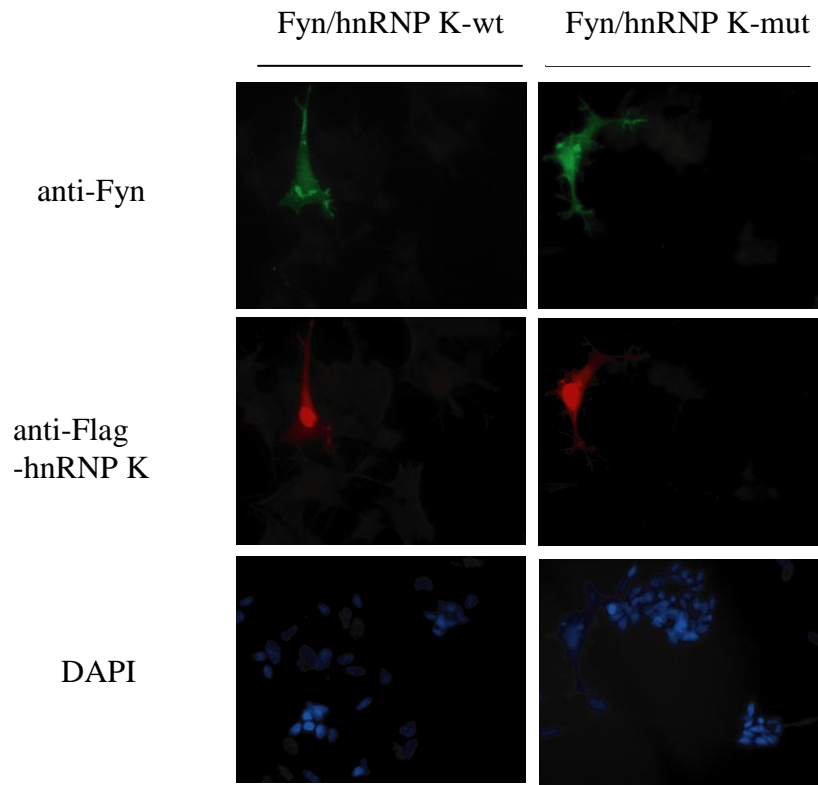
In kultivierten Neuroblastomzellen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Fyn zu einer neuronalen Differenzierung der Zellen führt (Berwanger, 2002).

In diesem Experiment wurde analysiert, ob bei dieser Induktion der Differenzierung die potentielle Interaktion von Fyn und hnRNP K eine Rolle spielt.

Hierzu wurde eine Immunfluoreszenz in IMR-32-Zellen durchgeführt. Es wurden zunächst Zellen mit Fyn/hnRNP K-wt und Fyn/hnRNP K-mut transient transfiziert. Anschließend wurde ein  $\alpha$ -Fyn-Antikörper (bzw. ein hnRNP K-Antikörper) verwendet, der die intrazellulären Fyn (bzw. hnRNP K)-Moleküle erkennt. Diese konnten dann durch einen zweiten fluoreszierenden Antikörper sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise konnte man sowohl die Expression von Fyn (bzw. von hnRNP K) quantitativ nachweisen, als auch die Auswirkung der Proteinexpression auf die Zellmorphologie beurteilen.

Geht man davon aus, dass hnRNP K die Translation von Differenzierung-induzierenden Proteinen hemmt, und dass Fyn eine dereprimierende Wirkung auf diese Hemmung hat, wäre in Fyn/hnRNP K-wt-Zellen eine deutlich sichtbare Ausdifferenzierung im Gegensatz zu den mit Fyn und der hnRNP K-Mutante transfizierten Zellen zu erwarten. Da Fyn und die Mutante nicht aneinander binden können, würde Fyn hier nicht dereprimieren und eine Bildung von Differenzierung-induzierenden Proteinen könnte nicht stattfinden.





**Abbildung XII: Analyse der Fyn/hnRNP K-abhängigen Differenzierung**

Es wurde eine Immunfluoreszenz in IMR-32-Zellen durchgeführt. Hierfür erfolgte zunächst eine co-Transfektion mit Fyn/hnRNP K-wt und Fyn/hnRNP K-mut. Als Erst-Antikörper wurden ein  $\alpha$ -Fyn-Ak (Kaninchen, polyklonal) und ein  $\alpha$ -flag(hnRNP K)-Ak (Maus) verwendet. Als Zweit-Antikörper wurden  $\alpha$ -Kaninchen-FITC-Ak (Kaninchen, polyklonal) und  $\alpha$ -Maus-Cy3-Ak (Ziege, monoklonal) eingesetzt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Sowohl Fyn als auch hnRNP K und dessen Mutante wurden in den transfizierten Zellen gut exprimiert. Der größere Anteil von HnRNP K befindet sich dabei im Zellkern. Für Fyn ist eine etwas vermehrte Lokalisation im Zytoplasma zu beobachten.

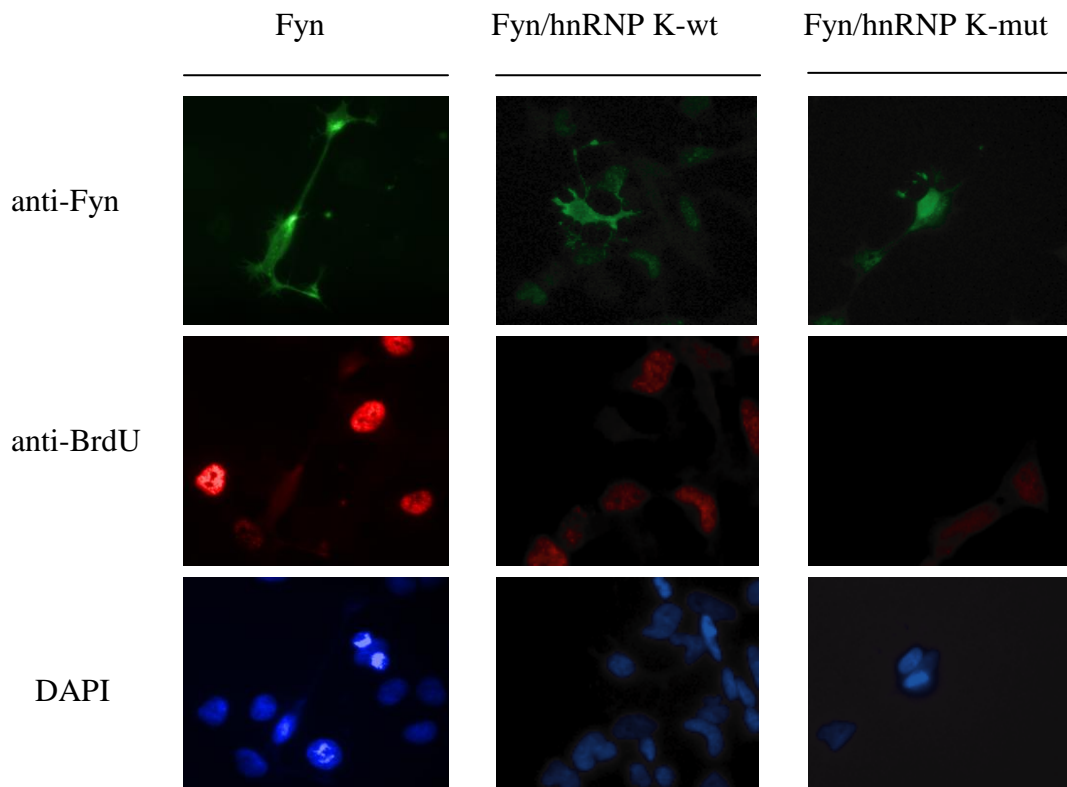
Die Zellen zeigen unabhängig von der Transfektion mit hnRNP K oder dessen Mutante morphologisch viele Fortsätze. Das Ausmaß der Differenzierung wurde nicht beurteilt, es lässt sich jedoch sagen, dass die Zellen trotz Anwesenheit der nicht an Fyn bindenden hnRNP K-Mutante das Potential zur Differenzierung beibehalten. Ein signifikanter Differenzierungsunterschied zwischen den unterschiedlichen Transfektionsansätzen stellt sich nicht dar.

#### **4.4.2. Die Rolle von hnRNP K beim Fyn-induzierten Zellzyklusarrest in Neuroblastomzellen**

Die Aktivierung von Fyn führt in Neuroblastomzellen zu neuronaler Differenzierung und Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Berwanger, 2002).

Es stellte sich die Frage, ob diese Wachstumsrepression möglicherweise über einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg von Fyn und hnRNP K zustande kommt oder ob Fyn unabhängig von hnRNP K den Zellzyklus reprimiert. Um dies zu klären wurde eine BrdU-Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden zunächst Shep-Zellen mit entweder Fyn alleine, Fyn/hnRNP K oder Fyn/hnRNP K-Mutante transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und BrdU gefärbt.

In den Zellen, welche mit Fyn alleine oder Fyn/hnRNP K-wt co-transfiziert wurden, wäre eine deutliche Minderung des fluoreszierenden BrdU-Signals zu erwarten. In den mit Fyn/hnRNP K-Mutante co-transfizierten Zellen würde ein vermehrter Einbau von BrdU in die DNA stattfinden, und es käme dadurch zu deutlich fluoreszierenden Zellkernen. Der Grund für den fehlenden Zellzyklusarrest bestehe darin, dass Fyn und die Mutante nicht aneinander binden und ein reprimierender Einfluss von Fyn via hnRNP K auf den Zellzyklus somit nicht stattfinden könnte.



**Abbildung XIII: Einfluß von Fyn via hnRNP K auf die Zellproliferation**

Es wurde eine BrdU-Immunfluoreszenz in Shep-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Fyn, Fyn/hnRNP K-wt oder Fyn/HnRNP K-mut transfiziert. Als Erst-Antikörper wurden ein  $\alpha$ -Fyn-Ak (Kaninchen, polyklonal) sowie ein  $\alpha$ -BrdU-Ak (Maus, monoklonal) eingesetzt. Als Zweit-Antikörper wurden ein  $\alpha$ -Kaninchen-FITC-Ak (Kaninchen, polyklonal) und ein  $\alpha$ -Maus-Cy3-Ak (Ziege, monoklonal) verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Die Immunfluoreszenzbilder der Abb.XIII zeigen eine gute Expression des transfizierten Fyn. In den verschiedenen Transfektionsansätzen war ein vergleichbarer Anteil BrdU-positiver Zellen zu beobachten. Es war keine vermehrte BrdU-Inkorporation und somit kein signifikanter Anstieg des Anteils proliferierender Zellen bei Fyn/hnRNP K-mut exprimierenden Zellen zusehen.

Es kommt unabhängig von der Verfügbarkeit von hnRNP K oder dessen Mutante zu einer reduzierten BrdU-Inkorporation. Der von Berwanger et al. vorgeschriebene durch Fyn induzierte Zellzyklusarrest scheint nicht über einen hnRNP K-vermittelten Signaltransduktionsweg stattzufinden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Translationskontrolle durch hnRNP K

Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP K) ist ein sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiertes Protein, welches in zahlreiche Schritte der Proteinexpression involviert ist. Zum einen ist es an Splicing-Vorgängen und mRNA-Stabilisierung beteiligt, zum anderen spielt hnRNP K eine wichtige Rolle in der transkriptionalen und translationalen Regulation.

Ostareck-Lederer et al konnten nachweisen, dass es zwischen hnRNP K und der c-Src-Kinase *in-vitro* und *in-vivo* zu einer spezifischen Interaktion kommt (Ostareck-Lederer et al, 2002). Diese findet in Form einer Aktivierung von c-Src sowie in einer Tyrosinphosphorylierung von hnRNP K durch c-Src statt. In Erythrozytenzellen wirkt hnRNP K über das *differentiation control element* (DICE) der 3'UTR inhibierend auf die Translation von Retikulozyten-15-Lipoxygenase-Genen. Die 15-Lipoxygenase (LOX) stellt ein Schlüsselenzym in der Differenzierung und Ausreifung von Erythrozyten dar. Es greift Phospholipide in mitochondrialen Membranen an und ist am Untergang der reifen Retikulozyten beteiligt. In frühen Retikulozyten-Stadien inhibiert hnRNP K die LOX-Expression durch translationales Silencing der LOX-mRNA. Durch Phosphorylierung kann c-Src diese hnRNP K/DICE-Bindung reversibel unterbinden und hat somit eine dereprimierende Wirkung auf die Translation der LOX-RNA (Ostareck-Lederer et al, 2002). C-Src spielt dementsprechend via hnRNP K eine spezifische Rolle in der posttranskriptionellen Regulation und kann über oben genannten Mechanismus zu Differenzierung in heranreifenden Erythrozytenzellen führen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und in wieweit sich die bei der c-Src-Kinase gewonnenen Erkenntnisse über eine translationale Regulation via *in-vivo*-Interaktion mit hnRNP K auf die Tyrosinkinase Fyn in humanen Neuroblastomzellen übertragen lassen.

Dazu kann folgende Modellvorstellung entwickelt werden: Durch eine Bindung von hnRNP K an das DICE-Element kommt es zu einer Inhibition der Translation von

Wachstumsarrest- und Differenzierung-induzierenden Proteinen in Neuroblastomzellen. Die hnRNP K/DICE-Bindung verhindert dabei die Anlagerung der Ribosomenuntereinheiten. Fyn kann diese Bindung durch Phosphorylierung von hnRNP K reversibel inhibieren und es kann zu einer Anlagerung der Ribosomenuntereinheiten kommen. Dadurch wird der Translationsvorgang bestimmter Proteine in Gang gesetzt, welche für Wachstumsarrest und Differenzierung verantwortlich sind.

Um eine solche funktionelle Interaktion zwischen Fyn und HnRNP K nachzuweisen, wurde ein LUC/DICE-Reporter-Assay in Neuroblastomzellen durchgeführt.

Zu erwarten wäre eine deutliche Reduktion der Luciferase-Aktivität durch eine Überexpression von hnRNP K. In Zellen, in denen zusätzlich Fyn hochexprimiert ist, sollte es zu einer Dereprimierung und Steigerung der LUC-Aktivität kommen. Die Mutante von Fyn, welche keine funktionierende Kinase-Domäne besitzt, sollte dagegen nicht zu einer Aktivierung führen.

Die Ergebnisse zeigten, dass es durch Expression von hnRNP K zu einer deutlichen Repression der Luciferaseaktivität, d.h. zu einer Hemmung der Translation kommt. Fyn konnte diese Repression partiell aufheben und die LUC/DICE-Expression aktivieren. Die kinase-inaktive Mutante von Fyn zeigte diesen dereprimierenden Effekt nicht. Auffällig war jedoch, dass diese Mutante an sich schon zu Repression führte.

Eine ausreichende Expression der transient transfizierten Proteine wurde mittels eines Western-Blots nachgewiesen.

Dieses Experiment zeigt, dass das Zusammenspiel von Fyn und hnRNP K *in-vitro* die Expression des Reportergens beeinflussen kann, was aber nicht bedeutet, dass auch endogene Zielgene auf dieselbe Weise reguliert werden müssen.

Weiterführende Arbeiten von Ostareck-Lederer zeigten, dass in hämatopoetischen Zellen (Erythrozyten) sowohl hnRNP K als auch hnRNP E1 an das *differentiation control element* (DICE) binden. Beide Proteine haben, jedes für sich, eine reprimierende Aktivität. Eine optimale Hemmung der Translation findet jedoch nur statt, wenn beide Proteine gleichzeitig agieren (Ostareck-Lederer et al, 2004).

Die Tyrosinkinase c-Src wird durch sein Substrat hnRNP K aktiviert. Das wurde durch co-Transfektionen von hnRNP K und c-Src gezeigt, wobei es zu einer verstärkten

Phosphorylierung von zellulären Proteinen kam. HnRNP E1 ist weder Substrat noch Aktivator von c-Src. Es besteht jedoch eine direkte Interaktion zwischen E1 und K. Möglicherweise wird hnRNP E1 durch diese Bindung bei Phosphorylierung von hnRNP K durch Src ebenfalls von DICE gelöst. Auch wäre es denkbar, dass die Interaktion zwischen K und E1 schrittweise stattfindet. So könnte die mRNA an hnRNP K gebunden in *gesilenceder* Form ins Zytoplasma transportiert werden. HnRNP E1 ist im *steady state* im Zytoplasma lokalisiert. Dort lagert es sich zu hnRNP K an DICE, um eine eigene Kontrolle über die Translation im Zytoplasma zu erlangen (Ostareck-Lederer, 2004, 2006).

In vorliegender Arbeit konnte weder eine *in-vivo* Bindung von Fyn und hnRNP K, noch eine Phosphorylierung von hnRNP K durch Fyn sicher nachgewiesen werden. Im Bezug auf Ostareck-Lederer wäre es dennoch interessant zu untersuchen, ob Fyn, wie c-src, von hnRNP K aktiviert wird und ob hnRNP E1 in diesem Komplex eine Rolle spielt.

## 5.2. Biochemische Untersuchung einer potentiellen Interaktion von Fyn und hnRNP K

Fyn ist ein Enzym, welches zur Familie der Tyrosinkinase gehört. Tyrosinkinase und dementsprechend auch Fyn aktivieren durch Phosphorylierung bestimmte Zielproteine, welche Differenzierung und Zellwachstum induzieren. Im Neuroblastom führt Fyn nachgewiesenermaßen zu Zellzyklusarrest und neuronaler Ausdifferenzierung. Es ist vor allem in niedrigen Tumorstadien hochexprimiert und reguliert das Proliferationsverhalten der Zellen unabhängig von einer Amplifikation mit *N-MYC*.

Weng et al zeigten, dass Src-Kinasen, unter anderem auch Fyn, *in-vitro* an das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP K) spezifisch binden können. hnRNP K bindet dabei direkt an die SH3-Domäne der Src-Kinase (Weng, 1994). Auch E. Bergmann identifizierte mittels eines GST-Pull-down-Experimentes hnRNP K als einen *in-vitro*-Interaktionspartner von Fyn.

Zum Nachweis einer *in-vivo* Bindung wurde eine co-Immunpräzipitation durchgeführt, wobei die Zellen mit Fyn und hnRNP K, bzw. dessen Mutante, co-transfiziert wurden. Die Mutante sollte auf Grund einer defekten Binde-Domäne nicht mit Fyn interagieren können.

Neben einer Bindung von Fyn und hnRNP K stellten sich auch bei Fyn/hnRNP K-Mutante und in den Negativkontrollen Signale dar.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass Fyn (oder hnRNP K) eine unspezifische Bindung mit der Sepharose eingeht und es deshalb zu einem Signal kommt. In diesem Fall würde man ähnliche Banden bei allen Ansätzen erwarten. Die Signale in den Negativkontrollen sehen jedoch morphologisch sehr unterschiedlich aus, was eher gegen diese Theorie spricht.

Da als unspezifischer Antikörper cdk2 verwendet wurde, und die Banden bei dieser Kontrolle bei etwa 55kDa laufen, könnte es sich auch um eine Kreuzreaktion mit dem Zweit-Antikörper handeln. In diesem Falle entsprächen die Banden den langen Ketten der denaturierten Antikörper.

Es stellt sich die Frage, in wieweit die hnRNP K-Mutante die erwarteten Funktionen und Bindungseigenschaften besitzt. Diese hnRNP K-Mutante sollte durch eine Mutation im SH3-Bindemotiv nicht dazu in der Lage sein, an die SH3-Domäne von Fyn zu binden. Die translationsreprimierende Aktivität sollte jedoch erhalten bleiben.

In dem oben dargestellten Experiment zeigte sich, dass die Mutante möglicherweise (ggf. über die SH2-Domäne) doch an Fyn binden kann. Ginge man von einer stattfindenden Bindung zwischen der hnRNP K-Mutante und Fyn aus, liesse sich erklären, warum sich die Interaktion in der co-Immunopräzipitation nicht durch die Mutante unterbinden lässt. Da dieses Mutanten-Konstrukt bei Versuchen mit c-src als dominant negative Mutante funktionierte (Ostareck-Lederer, 2002), gibt es möglicherweise Unterschiede in der Bindungs- und Interaktionsweise von Fyn und Src mit hnRNP K.

Zunächst muß davon ausgehen werden, dass es sich bei den hier gewonnenen Ergebnissen um unspezifische Reaktionen handelt. Eine *in-vivo* Interaktion zwischen Fyn und hnRNP K kann daher nicht belegt werden.

Zur Analyse, ob es zu einer Phosphorylierung von hnRNP K durch die Tyrosinkinase Fyn und dementsprechend zu einer gesteigerten Kinase-Aktivität kommt, wurde sowohl ein Kinase-Assay, als auch ein  $\alpha$ -Phospho-Tyrosin-Western-Blot durchgeführt. Man würde in Zellen, welche Fyn und hnRNP K exprimieren, eine Kinase-Aktivität erwarten. Bei hnRNP K alleine sollte es nicht zu einem Signal kommen. Außerdem sollte man in Fyn/hnRNP K-wt exprimierenden Zellen eine Phosphorylierung von hnRNP K nachvollziehen können. Bei Fyn/hnRNP K-Mutante ist auf Grund der fehlenden Bindungsmöglichkeit kein Signal zu erwarten.

Die Ergebnisse zeigten eine verstärkte Kinase-Aktivität in Fyn/hnRNP K exprimierenden Zellen, im Gegensatz zu nur mit hnRNP K transfizierten Zellen. Es fanden sich jedoch nahezu identische Banden bei den unspezifischen Kontrollen. Auffällig ist, dass das Signal bei Zellen, welche sowohl Fyn, als auch hnRNP K enthalten, immer stärker sichtbar ist als bei nur hnRNP K exprimierenden Zellen. Aus diesem Grund sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Fyn oder hnRNP K an die Sepharose-beads bindet.



Im  $\alpha$ -Phospho-Tyrosin-Western-Blot zeigte sich eine Phosphorylierung von hnRNP K sowohl bei Fyn/hnRNP K-wt, als auch bei Fyn/hnRNP K-Mutante. Entweder handelt es sich um eine unspezifische Phosphorylierung, oder es kommt entgegen der Erwartung doch zu einer Bindung zwischen Fyn und der hnRNP K-Mutante. Dann wäre eine Phosphorylierung möglich.

In diesem Experiment konnte die Kinaseaktivität von Fyn gegenüber hnRNP K sowie dessen Phosphorylierung nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### **5.3. Untersuchung der möglichen biologischen Relevanz einer Interaktion von Fyn und hnRNP K**

Für die Src-Kinase Fyn wurde gezeigt, dass sie in das Proliferationsverhalten von Neuroblastomzellen regulierend eingreift. Dies geschieht unabhängig von einer Amplifikation mit *N-MYC*. So führt die vermehrte Expression von Fyn in den Zellen sowohl zu einer Induktion der neuronalen Differenzierung als auch zu einem Zellzyklusarrest im G1-Stadium. Es besteht eine eindeutige Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von Fyn und einem niedrigen Tumorstadium bzw. einer guten Prognose bei Neuroblastompatienten (Berwanger et al, 2002).

Zur Analyse, ob die durch Fyn induzierte neuronale Differenzierung über einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg mit hnRNP K stattfindet, wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Geht man von einer dereprimierenden Wirkung von Fyn auf die Translationshemmung durch hnRNP K aus, würde man in Fyn/hnRNP K-wt exprimierenden Zellen eine deutlich sichtbare Ausdifferenzierung im Gegensatz zu den mit Fyn und der hnRNP K-Mutante transfizierten Zellen erwarten.

Alle transfizierten Gene wurden in den Zellen gut exprimiert. Es zeigte sich kein signifikanter Differenzierungsunterschied zwischen Zellen, welche Fyn/hnRNP K oder Fyn/hnRNP K-Mutante exprimierten. Alle Zellen zeigten im Vergleich zu nativen Neuroblastomzellen eine vermehrte Dendritenbildung.

Hinterfragt man die Fähigkeit der hnRNP K-Mutante an die mRNA zu binden, zeigt der Ansatz Fyn/hnRNP K-mut dasselbe Bild wie Fyn alleine. Es zeigt sich kein signifikanter Differenzierungsunterschied in Anwesenheit von hnRNP K. Das Experiment zeigt, dass hnRNP K bei der durch Fyn induzierten neuronalen Differenzierung in Neuroblastomzellen keine entscheidende Rolle spielt.

Grundsätzlich ist die Rolle von hnRNP K in Prozessen der neuronalen Differenzierung unklar. Mehrere evidenz basierte Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass HnRNP K durch translationale Repression einen negativen Regulator der terminalen Differenzierung in neuronalen Geweben darstellt (Yano, 2005).

Beispielsweise ist hnRNP K in den Hu-p21-Signaltransduktionsweg involviert. Die Hu-Proteinfamilie ist eine Gruppe neuronaler RNA-bindender Proteine, welche in der

Neurogenese und Entwicklung des Nervensystems eine wichtige Rolle spielt. Hu-Proteine greifen in Differenzierung und Zellzyklusarrest von Nervenzellen ein und induzieren Neuritenwachstum. Dabei führen sie zu Stabilisierung oder Translation von mRNAs, welche Differenzierung-regulierende Proteine, wie z.B. p21 oder p27, kodieren. HuB und hnRNP K interagieren direkt und bilden einen Proteinkomplex *in vivo* (in Neuroblastomzellen nachgewiesen, Yano 2005).

Der Hu-p21-Signaltransduktionsweg führt zu Neuritenwachstum und Proliferation. Eine hnRNP K-Überexpression antagonisiert den Hu-Protein-induzierten Zellzyklusarrest und Nervenzelldifferenzierung in Neuroblastomzellen nahezu komplett (Yano, 2005). Die antagonistische Aktion der beiden RNA-bindenden Proteine, Hu und hnRNP K, scheint an der zeitlichen Kontrolle von Proliferation und neuronaler Differenzierung, durch die post-transkriptionelle Regulation von p21-mRNA, eine wichtige Rolle zu spielen (Yano, 2005). Dies findet möglicherweise über eine gemeinsame Regulation der Ribosomenanlagerung statt.

Es wird deutlich, dass hnRNP K in jedem Fall eine Rolle in der neuronalen Differenzierung spielt. Auf welche Weise dies genau passiert ist noch nicht hinreichend geklärt. Eine direkte Einflußnahme über den Fyn-Signaltransduktionsweg findet nicht statt. Ob eine indirekte Verknüpfung über andere Proteine besteht, ist nicht bekannt.

Neben einer Ausdifferenzierung führt Fyn in Neuroblastomzellen auch zu einem Zellzyklusarrest. In einer weiteren Immunfluoreszenz (BrdU-Immunfluoreszenz) wurde untersucht, ob der reprimierende Effekt von Fyn auf den Zellzyklus von hnRNP K abhängig ist. Man würde bei Zellen, welche Fyn und hnRNP K-wt exprimieren, eine verminderte BrdU-Inkorporation im Gegensatz zum Ansatz Fyn/hnRNP K-Mutante vermuten.

Das Ergebnis zeigt, dass es unabhängig von der Expression von hnRNP K oder dessen Mutante zu einer verminderten BrdU-Inkorporation, ähnlich wie in nur Fyn exprimierenden Zellen, kommt. hnRNP K scheint daher nicht in den Fyn-vermittelten Zellzyklusarrest involviert zu sein. Da Fyn aber noch andere Funktionen (wie z.B. Apoptoseregulation) besitzt, wäre es trotzdem möglich, dass diese von hnRNP K beeinflusst werden.

## 5.4. Potentielle Bedeutung von hnRNP K für das Neuroblastom

hnRNP K ist ein Protein, welches als Knotenpunkt verschiedener Signaltransduktionswege fungiert. Es dient als „Bindeplattform“ für Chromatinrekrutierung, Transkriptions- und Splicingvorgänge und bindet verschiedene Translations- und Transkriptionsfaktoren. Auf diese Weise kommt es zu einer Überschneidung mehrerer Signaltransduktionswege, welche über hnRNP K zusammengeführt und kontrolliert werden (Bomsztyk, 2004).

Die vielfältigen Interaktionensmöglichkeiten von hnRNP K erklären sich durch die modular aufgebaute Struktur des K-Proteins. hnRNP K wird durch Veränderungen in der extrazellulären Umgebung modifiziert. Hier spielen z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie oxidativer Stress und Phosphorylierung eine Rolle (Ostrowski et al., 2000, 2003). Auch Insulin beeinflusst die Phosphorylierung und Aktivität von hnRNP K (Ostrowski et al., 2001).

hnRNP K spielt neben der Translationsregulation auch als Plattform transkriptionsregulierender Prozesse eine Rolle. Durch gleichzeitige Bindung von Histonen, RNA-Bindungsfaktoren und Zink-Finger-Transkriptionsrepressoren sowie Kinasen und anderen, den Transkriptionvorgang bestimmende Proteine greift hnRNP K indirekt regulierend in die Transkription ein (Bomsztyk, 2004).

Darüber hinaus reguliert hnRNP K direkt die Transkription von Genen welche das Protoonkogen *C-MYC* kodieren. Dabei bindet hnRNP K mit seiner KH3-Domäne direkt an ein CT-reiches Element von Einzelstrang-DNA im *C-MYC*-Promotor (Braddock, 2002).

Hierzu wurde ein Model entwickelt, nach welchem hnRNP K am *C-MYC*-Promotor durch seine hohe Affinität zu pyrimidinreichen Sequenzen, insbesondere Einzelstrang-DNA, zur Entstehung einer DNA-Einzelstrang-Blase führt. Dadurch wird die Bindung und Aktivität verschiedener Faktoren ermöglicht, welche an der basalen Transkriptionsmaschinerie beteiligt sind (Ritchie, 2003).

Die Überexpression von hnRNP K-Protein führt zu gesteigerter Aktivität des *C-MYC*-Genpromotors (Bomsztyk, 2004) und damit zu Proliferation und Zellwachstum.

In vielen Geweben wird die Expression der c-Src-Kinase über den SRC1A-Promotor reguliert. Kürzlich wurde herausgefunden, dass auch hnRNP K über diesen Promotor

die Src-Expression beeinflusst. Wird die Bindung von hnRNP K an die Doppelstrang-DNA verhindert, führt dies zu reduzierter Promotoraktivität. Dies wurde für die Situation *in-vitro* gezeigt, trifft jedoch sehr wahrscheinlich auch *in-vivo* zu (Ritchie, 2003). Da polypyrimidinreiche Abschnitte in eukaryotischen Promotorregionen nicht selten sind, ist es gut möglich, dass hnRNP K auf diese Weise in die grundlegende Transkriptionsmaschinerie spezifischer Promotoren eingreift.

Ostrowski et al zeigten, dass es in lebenden Hepatozyten bei Induktion von Zellproliferation (z.B. nach Leberteilektomie) zu einem Anstieg der hnRNP K-Genexpression und vermehrter Tyrosinphosphorylierung von hnRNP K kommt. Auch die Menge an nukleärem hnRNP K-Protein ist im Vergleich zu ruhenden Zellen erhöht. In hepatozellulären Karzinomen konnten (im Vergleich zum Leberparenchym) ebenfalls hohe Level von hnRNP K-mRNA nachgewiesen werden. Die hnRNP K-Konzentration aus Kernextrakt ist hier im Vergleich zu umgebenden Zellen stark erhöht. In zytoplasmatischem Extrakt zeigt sich kein Unterschied. Dies spricht dafür, dass das neusynthetisierte Protein hauptsächlich im Kern lokalisiert ist (Ostrowski, 2003).

Geht man davon aus, dass sich die hnRNP K-Expression in Neuroblastomzellen ähnlich verhält, müsste es beim entdifferenzierten (hochmalignem) Tumor in hohem Stadium zu einer vermehrten Expression kommen. Fyn dagegen ist in niedrigen Tumorstadien hochexprimiert. Dieses inverse Vorkommen könnte ein Hinweis auf eine antagonistische Wirkungsweise, bzw. eine Inhibition von hnRNP K durch Fyn sein.

Eine signifikante *in-vivo* Interaktion der beiden Proteine Fyn und hnRNP K mit Einfluss auf die Entstehung und Malignitätsentwicklung in Neuroblastomzellen konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Trotzdem wäre es in Anbetracht der vielfältigen Funktionen von hnRNP K interessant zu untersuchen, in wieweit hnRNP K grundsätzlich eine Rolle in der Neuroblastomentstehung spielt, ob das K-Protein unabhängig von Fyn einen Einfluss auf Differenzierung und Zellproliferation hat und wie es sich mit der hnRNP K-Expression in den verschiedenen Neuroblastomstadien verhält.

Auch ist nicht auszuschliessen, dass hnRNP K über eine indirekte Bindung oder als zwischengeschaltetes Element in der Signaltransduktion doch eine Rolle im Fyn-Signaltransduktionsweg oder generell bei der Neuroblastomentstehung spielt. So ist

ebenfalls in Betracht zu ziehen, dass eine Wechselwirkung zwischen von hnRNP K reprimierten Proteinen und Fyn möglich wäre. Weiterhin könnte es durch die zentrale Rolle von hnRNP K dazu kommen, dass Fyn mit anderen regulierenden Faktoren in Kontakt kommt und diese durch Phosphorylierung aktiviert oder inhibiert. Am Knotenpunkt hnRNP K könnten sich so zwei Signaltransduktionswege überschneiden (Bomsztyk, 2004).

Beide Proteine sind jedenfalls auf so vielfältige Weise in Differenzierung und Wachstum von neuronalen Tumorzellen involviert, dass eine detaillierte Darstellung der einzelnen Signaltransduktionswege und einer möglicherweise bestehenden indirekten Verknüpfung weiterhin interessante Ansatzpunkte zum Verständnis der Proliferationsregulation in Neuroblastomen sind.

## 6. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor des Kindesalters, welcher vorwiegend im postganglionären sympathischen Nervensystem lokalisiert ist. Die vermehrte Expression der Src-Kinase Fyn führt in Neuroblastomzellen zu einer Induktion der neuronalen Differenzierung und zu einem Zellzyklusarrest im G1-Stadium. Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP K) ist ein Protein, welches *in-vitro* und *in-vivo* eine spezifische Interaktion mit der c-Src-Kinase eingeht. Durch hnRNP K kommt es zu einem *translationalen silencing*. C-Src hat eine dereprimierende Wirkung. Außerdem ist beschrieben, dass Fyn *in-vitro* an hnRNP K spezifisch binden kann.

Es wurde folgende Hypothese erstellt: Durch eine Bindung von hnRNP K an eine bestimmte mRNA kommt es zu einer Hemmung der Translation spezifischer Proteine in Neuroblastomzellen. Fyn kann diese Bindung durch Phosphorylierung von hnRNP K reversibel inhibieren. Dadurch wird der Translationsvorgang von Proteinen in Gang gesetzt, welche für Wachstumsarrest und Differenzierung verantwortlich sind.

In dieser Arbeit wurde zum einen versucht, biochemisch eine *in-vivo*-Bindung von Fyn und hnRNP K nachzuweisen. Weiterhin wurde untersucht, ob es dabei zu einer Phosphorylierung von hnRNP K durch Fyn kommt und ob eine möglicherweise bestehende Interaktion einen regulierenden Einfluß auf die Translation hat. Parallel hierzu wurde eine Analyse der biologischen Auswirkung einer potentiellen Interaktion durchgeführt, in der untersucht wurde, ob die für Fyn gezeigte Wachstumsarrest- und Differenzierung-induzierende Wirkung über hnRNP K vermittelt wird. Zusammengefaßt zeigen die gewonnenen Daten, dass sich die dargestellte Interaktion von c-src-Kinase und hnRNP K nicht auf die Situation Fyn/hnRNP K in humanen Neuroblastomzellen übertragen lässt. Eine *in-vivo*-Bindung der beiden Proteine konnte nicht nachgewiesen werden. Auch eine Interaktion in Form einer Phosphorylierung war nicht eindeutig zu zeigen. In der funktionellen Untersuchung konnte dagegen ein dereprimierender Einfluss von Fyn auf die hnRNP K-vermittelte Translationshemmung gesehen werden. Die Anwesenheit von hnRNP K zeigte aber keinen Einfluss auf die Fyn-abhängige neuronale Differenzierung und den G1-Arrest des Zellzykluses. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass Fyn und hnRNP K nicht über eine direkte Interaktion Einfluss auf die Proliferation von Neuroblastomen nehmen können.

## 7. Summary

The neuroblastoma is a malignant tumor, which occurs in childhood and which is mainly localized in the postganglion sympatic neuronal system. The increased expression of the Src-kinase Fyn leads in neuroblastoma cells to an induction of neuronal differentiation and to an arrest in the G1-stage of the cell cycle. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) is a protein, which interacts *in-vitro* as well as in *in-vivo* specifically with the c-Src-kinase. HnRNP K leads to a translational silencing. C-Src has a disinhibiting effect. Futhermore it was described that Fyn and hnRNP K are binding *in-vitro* to each other.

The following was hypothesized: With the binding of hnRNP K to a specific mRNA the translation of specific proteins in neuroblastoma cells is inhibited. Fyn is able to inhibit this binding reversibly by phosphorylation of hnRNP K. Thus it launched a process of translation of proteins, which are responsible for growth-arrest and differentiation.

In this thesis the attempt has been made to identify an *in-vivo* binding of Fyn and hnRNP K. Furthermore, it has been examined whether a phosphorylation of hnRNP K by Fyn takes place and if a possibly existing interaction has a regulating influence on the translation. In addition, the biological effects of a potential interaction were analysed. Here it was studied, if the growth-arrest und differentiation-inducing effect of Fyn is mediated by hnRNP K.

In summary the obtained data demonstrate that the described interaction of c-Src-kinase and hnRNP K is non-transferable to the situation of Fyn/ hnRNP K in human neuroblastoma cells. An *in-vivo* binding of the two proteins could not been shown, nor was an interaction by phosphorylation verified. In the functional experiment a dereprimating influence of Fyn on the hnRNP K-mediated inhibition of the translation appeared. The presence of hnRNP K does not show an influence on Fyn-dependent neuronal differentiation and G1-arrest of the cell cycle.

In conclusion, the results do not point out that Fyn and hnRNP K can influence the proliferation of neuroblastoma cells by a direct interaction.



## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung I: Struktur der Tyrosinkinase Fyn.....	- 10 -
Abbildung II: Stuktur des heterogenen Ribonulkeoproteins - hnRNPK.....	- 14 -
Abbildung III: Modellvorstellung einer Interaktion von Fyn und hnRNP K.....	- 17 -
Abbildung IV: Prinzip der GST-Pulldown-Analyse .....	- 42 -
Abbildung V: Identifikation von <i>in-vitro</i> Interaktionspartnern von Fyn.....	- 43 -
AbbildungVI: Analyse einer <i>in-vivo</i> Interaktion von Fyn und hnRNP K in HeLa-Zellen -	45 -
Abbildung VII: Analyse einer <i>in-vivo</i> Interaktion von Fyn und hnRNP K in HeLa-	Zellen .....
	- 46 -
Abbildung VIII: Analyse der Kinaseaktivität von Fyn gegenüber hnRNP K.....	- 48 -
Abbildung IX: Analyse einer möglichen Phosphorylierung von hnRNP K durch Fyn -	50 -
	-
Abbildung X: Funktionelle Interaktion zwischen Fyn und hnRNP K .....	- 52 -
Abbildung XI: Verifizierung des Proteingehaltes der im Reporter-Assay verwendeten	Zellen .....
	- 54 -
Abbildung XII: Analyse der Fyn/hnRNP K-abhängigen Differenzierung.....	- 56 -
Abbildung XIII: Einfluß von Fyn via hnRNP K auf die Zellproliferation.....	- 58 -

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak, $\alpha$	Antikörper
BrdU	5-Bromo-2-Desoxyuridin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DICE	Differentiation control element
DNA	Desoxyribonukleinsäure
hnRNP K	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K
In	Input
IP	Immunpräzipitation
kDa	KiloDalton
KH	hnRNP K-homology
LOX	Retikulozyten-15-Lipoxygenase
LUC	Luciferase
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mut	Mutante
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
RNA	Ribonukleinsäure
SH	src-homology
Trk	Tyrosinkinase
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp

## 10. Literaturverzeichnis

- AMERICAN CANCER SOCIETY: International Neuroblastoma Pathologic Classification (2001)
- AMERICAN CANCER SOCIETY: Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification (2003)
- BAGATELL, R./ RUMCHEVA, P./ LONDON, W./ COHN, S./ LOOK, T./ BRODEUR, G./ FRANTZ, C./ JOSHI, V./ THORNER, P./ RAO, P./ CASTLEBERRY, R./ BOWMAN, L.C.: Outcomes of children with intermediate-risk neuroblastomas after treatment stratified by MYCN status and tumor cell ploidy. *Journal of clinical oncology* (No. 34/2005), pp. 8819-8827
- BECKWITH, J./ PERRIN, E.: In situ neuroblastoma: A contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am.J.Pathol.* 43 (1963), pp. 1089-1104
- BERGMANN, E.: Beeinflussung zellulärer Proliferationsmechanismen durch das Proto-Onkogen MYCN in humanen Neuroblastomen. *Dissertationsschrift* (2002)
- BERTHOLD, F./ SAHIN, K./ HERO, B./ CHRISTIANSEN, H./ GEHRING, M./ HARMS, D./ HORZ, S./ LAMPERT, F./ SCHWAB, M./ TERPE, J.: The current contribution of molecular factors in risk estimation in neuroblastoma patients. *Eur.J.Cancer* 33 (1997), pp. 2092-2097
- BERTHOLD, F.: Neuroblastoma. In: Schmoll, H.J.; Hoeffken, K.; Possinger, K. editors. *Kompandium internistische Onkologie*. Berlin: Springer, (1999), pp. 2389-2402
- BERTHOLD, F./ HERO, B.: Neuroblastoma- Current Drug Therapy Recommendations as part of the Total Treatment Approach. *Drugs* 59/6 (2000), pp. 1261-1277

- BERWANGER, B./ HARTMANN, O./ BERGMANN, E./ BERNARD, S./ NIELSEN, D./ KRAUSE, M./ KARTAL, A./ FLYNN, D./ WIEDEMAYER, R./ SCHWAB, M./ SCHÄFER, H./ CHRISTIANSEN, H./ EILERS, M.: Loss of FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell*, (Nov. 2002), pp. 377-386
- BRADDOCK, D.T./ BABER, J.L./ LEVENS, D./ CLORE, G.M.: Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *The EMBO Journal*, Vol.21, No.13, (2002), pp. 3476-3485
- BRODEUR, G.M.: Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer* 3, (2003), pp. 203-216
- BUNNELL, S./ HENRY, P./ KOLLURI, R./ KIRCHHAUSEN, T./ RICKLES, R./ BERG, L.: Identification of Itk/Tsk Src Homology 3 Domain Ligands. *The journal of biological chemistry*, Vol. 271, No. 41, Issue of October 11 (1996), pp. 25646-25656
- BOMSZTYK, K./ DENISENKO, O./ OSTROWSKI, J.: hnRNP K: One protein multiple processes. Review article. *BioEssays* 26, (2004), Wiley Periodicals, Inc., pp. 629-638
- DEUTSCHES KINDERKREBSREGISTER, Jahresbericht, 2002
- EGGERT, A./ GROTZER, M./ IKEGAKI, N./ LIU, X./ EVANS, A./ BRODEUR, G.: Expression of the neutrophin receptor TrkA down-regulates expression and function of angiogenic stimulators in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cancer research* (March 15, 2002), pp. 1802-1808
- IKEDA, H./ NAKAMURA, Y./ HIWASA, T. ET AL.: Interleukin-1 beta convertine enzyme (ICE) is preferentially expressed in neuroblastomas with favourable prognosis. *Eur.J.Cancer* 33 (1997), pp. 2081-2083

- KAI, N./ MISHINA, M./ YAGI, T.: Molecular Cloning of Fyn-Associated Molecules in the Mouse Central Nervous System. *Journal of neuroscience Research* 48, (1997), pp. 407-424
- KESHLAVA, N./ SEEGER, R.C./ REYNOLDS, C.P. ET AL.: Drug resistance in human neuroblastoma cell lines correlates with clinical therapy. *Eur.J.Cancer* 33 (1997), pp. 2002-2006
- KNIPPERS, ROLF: *Molekulare Genetik*, 8.Auflage; Thieme Verlag, pp. 400-406
- KRESS, T./ YOON, Y./ MOXRY, K.: Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *The journal of Cell Biology*, Vol. 165, No. 2, April 26 (2004), pp. 203-211
- KUO, G./ ARNAUD, L./ KRONSTAD-O'BRIEN, P./ COOPER, J.: Absence of Fyn and Src Causes a Reeler-Like Phenotype. *The journal of Neuroscience*, September 14 (2005), 25(37): pp. 8578-8586
- KURODA, H./ SUGIMOTO, T./ UEDA, K./ TSUCHIDA, S./ HORII, Y./ INAZAWA, J./ SATO, K./ SAWADA, T.: Differentiation drug sensitivity in two neuroblastoma cell-lines established from the same patient before and after chemotherapy. *Int.J.Cancer* 47 (1991), pp. 732-737
- LEE, M.-H./ MORI, S./ RAYCHAUDHURI, P.: Trans-Activation by the hnRNP K Protein Involves an Increase in RNA Synthesis from Reporter Genes. *The journal of biological chemistry*, Vol. 271, No. 7, Issue of Feb. 16. (1996), pp. 3420-3427
- MARIS, J.M./ DENNY, C.T.: Focus of embryonal malignancies. *Cancer cell*, Vol. 2 (Dec. 2002)

- MARTÍN-CÓFRECES, N./ SANCHO,D./ FERNÁNDEZ, E./ VICENTE-MANZANARES, M./ GORDÓN-ALONSO, M./ MONTOYA, M./ MICHEL, F./ ACUTO, O./ ALARCÓN, B./ SÁNCHEZ-MADRID, F.: Role of Fyn in the rearrangement of tubuli cytoskeleton induced TCR. *The journal of immunology* (2006,176), pp. 4201-4207
- MATUNIS, M.J./ MICHAELS, W.M./ DREYFUSS, G.: Characterisation and Primary Structure of the Poly(C)-Binding Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein Complex K Protein. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.12, No. 1, (Jan. 1992), pp. 164-171
- MEYN, M./ SCHREINER, S./ DUMITRESCU, T./ NAU,G./ SMITHGALL, T.: Src Family Kinase Activity Is Required for Murine Embryonic Stem Cell Growth and Differentiation. *Molecular Pharmacology*, Vol. 68, No. 5; (2005), pp. 1320-1330
- MICHAEL, W.M./ EDER, P.S./ DREYFUSS, G.: The K nuclear shutteling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *The EMBO Journal*, Vol.15, No.12 (1997), pp. 3587-3598
- MICHELOTTI, E.F./ MICHELOTTI, G.A./ ARONSOHN, A.I./ LEVENS,D.: Heterogeneous Nuclear Riboprotein K is a Transcriptions Factor. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.16, No.5, (May 1996), pp. 2350-2360
- NAGANO, K./ BORNHAUSER, B./ WARNASURIYA, G./ ENTWISTLE, A./ CRAMER, R./ LINDHOLM, D./ NAABY-HANSEN, S.: PDGF regulates the actin cytoskeleton through hnRNP K-mediated activation of the ubiquitin E3-ligase MIR. *The Embo Journal* (2006) 25, pp. 1871-1882
- NAKAGAWARA, A./ ARIMA-NAKAGAWARA, M./ SCAVARLA, N.J. ET AL: Assosiation between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Eng. J. Med.* 328 (1993), pp. 847-854

- NORRIS, M.D./ BORDOW, S.B./ MARSHALL, G.M. ET AL.: Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. N. Engl. J. Med. 334 (1996), pp. 231-238
- OSTARECK, D.H./ OSTARECK-LEDERER, A./ WILM, M./ THIELE, B.J./ MANN, M./ HENTZE, M.W.: mRNA Silencing in Erythroid Differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 Regulate 15-Lipoxygenase Translation from the 3'End. Cell, Vol.89 (May 16, 1997), pp. 597-606
- OSTARECK-LEDERER, A./ OSTARECK, D./ HENZE, M.W.: Cytoplasmatic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2. Tibs 23, (Nov.1998)
- OSTARECK-LEDERER, A./ OSTARECK, D./ CANS, C./ NEUBAUER, G./ BOMSZTYK, K./ SUPERTI-FURGA, G./ HENTZE, M.W.: c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs. Molecular and Cellular Biology, (July 2002), pp. 4535-4543
- OSTARECK-LEDERER, A./ OSTARECK, D.: Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: The function of hnRNP K and E1/E2. Biology of the cell, 96 (2004), pp. 407-411
- OSTARECK-LEDERER, A./ OSTARECK, D./ RUCKNAGEL, K./ SCHIERHORN, A./ MORITZ, B./ HUTTELMAIER, S./ FLACH, N./ HANDOKO, L./ WAHLE, E.: Asymmetric Arginine Dimethylation of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K by Protein-arginine Methyltransferase 1 Inhibits Its Interaction with c-Src. The journal of biological chemistry, Vol. 281, No. 16, April 21 (2006), pp. 11115-11125
- OSTERHOUT, DONNA J./ WOLVEN, AMY/ WOLF, REBECCA M./ RESH, MARILYN D. AND CHAO/ MOSES V.: Morphological Differentiation of oligodendrocytes Requires Activation of Fyn Tyrosin Kinase. The Journal of Cell Biologie, Vol.145, Nr.6, Juni 14(1999), pp. 1209-1218

- OSTROWSKI, J./ SCHULLERY, D./ DENISENKO, O.N./ HIGAKI, Y./ WATTS, J./ AEBERSOLD, R./ STEMPKA, L./ GSCHWENDT, M./ BOMSZTYK, K.: Role of Tyrosine Phosphorylation in the Regulation of the Interaction of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Protein with Its Protein and RNA Partners. The journal of biological chemistry, Vol. 275, No. 5, Issue of february 4 (2000), pp. 3619-3628
- OSTROWSKI, J./ KAWATA, D./ SCHULLERY, D./ DENISENKO, O.N./ HIGAKI, Y./ ABRASS, C.K./ BOMSZTYK, K.: Insulin alters heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein binding to DNA and RNA. PNAS, July 31 (2001), vol.98, no. 16, pp. 9044-9049
- OSTROWSKI, J./ BOMSZTYK, K.: Nuclear shift of hnRNP K protein in neoplasms and other states of enhanced cell proliferation. British Journal of Cancer (2003) 89, pp. 1493-1501
- OUE, T./ FUKUZAWA, M./ KUSAFUKA, T. ET AL. : In situ detection of DNA fragmentation and expression of bcl-2 in human neuroblastoma: Relation to apoptosis and spontaneous regression. J. Pediatr. Surg. 31 (1996), pp. 251-7
- PAULUSSEN, M.: Hauptvorlesung Pädiatrie WS 02/03, Universität Münster <http://medweb.uni-muenster.de/institute/paedonc/lehre>
- PEREIRA, D./ CHAO, M.: The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. The journal of neuroscience (May 2,2007), 4859-4869
- REED, J.C./ MEISTER, L./ TANAKA, S. ET AL.: Differential expression of Bcl2 protooncogene in neuroblastoma and other human tumor cell lines of neural origin. Cancer Res. 51 (1991), pp. 6529-38



- RESH, MARILYN D.: Fyn, a Src family tyrosine kinase. The international Journal of Biochemistry and Cell Biologie 30, (1998), pp. 1159-1162
- RITCHIE, S./ PASHA, M./ BATTEN, D./ SHARMA, R./ OLSON, D./ ROSS, A./ BONHAM, K.: Identification of the SRC pyrimidine-binding protein (SPy) as hnRNP K: implications in the regulations of SRC1A transcription. Nucleic Acids Research, (2003), Vol. 31, No.5, pp. 1502-1513
- SEEGER, R.C./ BRODEUR, G.M./ SATHER, H. ET AL.: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastoma. N,Engl.J.Med. 313 (1985), pp. 1111-1116
- STETTNER, M./ WANG, W./ NABORS, B./ BHARARA, S./ FLYNN, D./ GRAMMER, J./ GILLESPIE, G./ GLADSON, C.: Lyn Kinase Activity Is the Predominant Cellular Src Kinase Activity in Glioblastoma Tumor Cells. Cancer Res. 2005, 65: (13). July 1, (2005), pp. 5535-5543
- STRYER, LUBERT: Biochemie, 4. Auflage , (1999); Spektrum akademischer Verlag, pp. 370-378
- SVENSSON, T./ RYDEN, M./ SCHILLING, F.H./ DOMINICI, C./ SEHGAL, R./ IBANEZ, C.F./ KOGNER,P.: Coexpression of nRNA for the full-lenth neutrophin receptor trk-C and trk-A in favourable neurpblastoma. Eur.J.Cancer 33 (1997), pp. 2058-2063
- TAKITA, J./ HAYASHI, Y./ YOKOTA, J.: Loss of Heterozygosity in Neuroblastoma-an Overview. European Journal of Cancer, Vol.33, No.12 (1997), pp. 1971-1973
- THOMAS, S.M./ BRUGGE, J.S.: Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu.Rev.Cell Dev.Biol.; 13 (1997); pp. 513-609

- TOMMERUP, N./ LEFFERS, H.: Assignment of Human KH-Box-Containing Genes by in Situ Hybridization: HNRNPK Maps to 9q21.32-q21.33, PCBP1 to 2p12-p13, and PCBP2 to 12q13.12-q13.13, Distal to FRA. Genomics 32, Article No.0121 (1996), pp. 297-298
- WANG, Q./ DISKIN, S./ RAPPAPORT, E./ ATTIYEH, E./ MOSSE, Y./ SHUE, D./ SEISER, E./ JAGANNATHAN, J./ SHUSTERMAN, S./ BANSAL, M./ KHAZI, D./ WINTER, C./ OKAWA, E./ GRANT, G./ CNAAN, A./ ZHAO, H./ CHEUNG, N./ GERALD, W./ LONDON, W./ MATTHEY, K./ BRODEUR, G./ MARIS, J.: Integrativ genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. Cancer research 2006, 66: (12). (June 15, 2006), pp. 6050-6062
- WANZEL, M.: Regulation des Zellzyklus in humanen Neuroblastomen durch N-Myc, Diplomarbeit, (1999)
- WENG, Z./ THOMAS, S./ RICKLES, R.J./ TAYLOR, J.A./ BRAUER, A.W./ SEIDEL-DUGAN, C./ MICHALE, W.M./ DREYFUSS, G./ BRUGGE, J.: Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-Binding Proteins: Implication for a Function of SH3 Domains. Molecular and Cellular Biology, Vol.14, No.7 (July 1994), pp. 4509-4521
- YANO, M./ OKANO, H.J./ OKANO, H.: Involvement of Hu and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K in Neuronal Differentiation through p21 mRNA Post-transcriptional Regulation. The journal of biological chemistry, Vol. 280, No.13, Issue of april 1 (2005), pp. 12690-12699
- ZAMOYSKA ET AL. : The role of Lck and Fyn in T cell signaling. Immunological Reviews 191 (2003)

## 11. Danksagungen

PROF. DR. MARTIN EILERS danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Betreuung der Arbeit.

Ganz besonders danke ich DR. ECKHARD BERGMANN der Kinderklinik Marburg, der durch seine Diskussionsbereitschaft, durch wichtige Hinweise bei Anordnung und Auswertung der Versuche und seine große Hilfsbereitschaft entscheidend zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Außerdem danke ich DR. MICHAEL WANZEL für die Korrektur meiner Arbeit sowie seine stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Mein weiterer Dank gilt CHRISTIAN MICHELBRINK, ANDREAS HOCK und MARTIN STEINER, die mir bei der Erstellung der Abbildungen geholfen haben und mir stets mit computerfachmännischem Rat zur Seite standen.

Außerdem danke ich PROF. DR. HOLGER CHRISTIANSEN der Kinderklinik Marburg für seine Hilfe.

Ebenso bedanke ich mich bei ANTJE OSTARECK-LEDERER und DIRK OSTARECK für die inhaltliche Diskussion sowie die Bereitstellung von Materialien.

Desweiteren danke ich der gesamten ARBEITSGRUPPEN EILERS/LUTZ für ihre vielfachen Anregungen und Tipps.

Ein besonderer Dank geht an KORNELIUS KERL für seine fachliche und vorallem persönliche Unterstützung.

An dieser Stelle möchte ich auch MEINEN ELTERN für Ihre großzügige und verlässliche Unterstützung danken. Es war mir eine große Hilfe, dass sie mir während meines gesamten Studiums und im Besonderen bei der Erstellung meiner Doktorarbeit immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

## 12. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren folgende Damen und Herren, denen ich danke:

Dr. J. Adamkiewicz	Dr. Jackowski-Dohrmann	Prof. Dr. Dr. H. Renschmidt
Prof. Dr. med. R. Arnold	Prof. Dr. H. Junclas	Prof. Dr. H. Renz
Prof. Dr. G. Aumüller	Prof. Dr. H. F. Kern	Prof. Dr. G. Richter
Dr. H. Barth	Dr. H.-S. Kim-Berger	Prof. Dr. H. Schäfer
Prof. Dr. P.J. Barth	Prof. Dr. G. Klaus	Prof. Dr. H. Schmidt
Prof. Dr. Dr. H.D. Basler	Prof. Dr. H.D. Klenk	PD Dr. Schnabel
Prof. Dr. E. Baum	Prof. Dr. J. Koolman	T. Schneyer
PD. Dr. H. Becker	Prof. Dr. J.C. Krieg	Prof. Dr. J. Seitz
Dr. E. Bergmann	Prof. Dr. P. Kroll	Prof. Dr. B. Steiniger
Prof. Dr. H. Christiansen	Prof. Dr. R.E. Lang	Dr. S. Stiller
Prof. Dr. F. Czubayko	PD Dr. A. Leonhardt	Dr. H.W. Vohland
Prof. Dr. M. Eilers	Prof. Dr. R. F. Maier	Prof. Dr. K. Voigt
Dr. B. Feuser	Prof. Dr. B. Maisch	Prof. Dr. S. Waldegger
PD Dr. Gerdes	Dr. Dr. K. Mandrek	Prof. Dr. E. Weihe
Prof. Dr. A. Geus	Prof. Dr. R. Moll	Prof. Dr. J.A. Werner
Prof. Dr. L. Gotzen	Prof. Dr. Dr. U. Mueller	Prof. Dr. H. Wulf
Prof. Dr. P. Griss	Prof. Dr. R. Mutters	Dr. M. Zemlin
Prof. Dr. R. Happle	Prof. Dr. B. Neumüller	
Prof. Dr. R. Hofmann	Prof. Dr. W.H. Oertel	