

**Aus der Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch**  
**vertreten durch das Institut für Molekulare Medizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel**

---

# **Klonierung, Charakterisierung und Funktionsanalyse des proliferationsassoziierten Ki-67 Antigens**

**Kumulative Habilitationsschrift**

verfasst an der Medizinischen Fakultät  
der  
Universität zu Lübeck  
zur Erlangung der Venia legendi für das Fach  
Molekulare Medizin

vorgelegt von

**Dr. rer. nat. Michael Duchrow**

Lübeck 2003

*Meiner Familie*  
*und*  
*im Gedenken an meine Mutter*

## Verzeichnis der in dieser Schrift zusammengefassten und publizierten Original-Artikel (OA):

- OA 1:** Schlüter C\*, **Duchrow M\***, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993)  
The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: A Very Large, Ubiquitous Nuclear Protein with Numerous Repeated Elements, Representing a New Kind of Cell Cycle-maintaining Proteins.  
*The Journal of Cell Biology* 123: 513 – 522  
(\*both authors contributed equal)
- OA 2:** **Duchrow M**, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J (1996)  
Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67.  
*Cell Proliferation* 29: 1 – 12
- OA 3:** **Duchrow M**, Häsemeyer S, Broll R, Bruch HP, Windhövel U (2001)  
Assessment of proliferative activity in colorectal carcinomas by quantitative RT-PCR.  
*Cancer Investigation* 19: 596 – 604
- OA 4:** **Duchrow M**, Schmidt MHH, Zingler M, Anemüller S, Bruch HP, Broll R (2001)  
Suppression of Cell Division by Ki-67 Antisense-RNA and Recombinant Proteins.  
*Cellular Physiology and Biochemistry* 11, 2001: 331 – 338
- OA 5:** Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, **Duchrow M** (2002)  
Proliferation marker pKi-67 affects the cell cycle in a self-regulated manner.  
*Journal of Cellular Biochemistry* 87: 334 – 441
- OA 6:** Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, **Duchrow M** (2002)  
The proliferation marker pKi-67 becomes masked to MIB-1 staining after expression of its tandem repeats.  
*Histochemistry and Cell Biology* 118: 415 – 422
- OA 7:** Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Bögler O, **Duchrow M** (2003) The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and Cyclin B. *Journal of Pathology* 199: 18 – 27
- OA 8:** **Duchrow M**, Ziemann T, Bruch HP, Broll R (2003)  
Colorectal carcinomas with high MIB-1 labeling indices but low pKi-67 mRNA levels correlate with a better prognostic outcome.  
*Histopathology* 42: 566 – 574

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Ziel und Methodik der Arbeit	1
1.2	Aufbau der Schrift	2
<b>2</b>	<b>Überblick</b>	<b>3</b>
2.1	Die Zellteilung	3
2.2	Das Ki-67 Antigen	4
2.2.1	Der monoklonale Antikörper Ki-67	4
2.2.2	Die Expression von pKi-67 im Zellzyklus	4
2.2.3	Die intrazelluläre Verteilung von pKi-67	6
2.2.3.1	Die Lokalisation von pKi-67 im Nukleolus	7
2.2.3.2	Die Translokation von pKi-67 in die perichromosomale Scheide	9
2.3	Die klinische Relevanz des Ki-67 Antigens	10
<b>3</b>	<b>Bestimmung der molekularen Struktur von pKi-67 (OA 1 und OA 2)</b>	<b>12</b>
3.1	Immunklonierung der <i>pKi-67</i> cDNA	12
3.2	Klonierung des kompletten <i>pKi-67</i> Genlokus	14
3.3	Sequenz-Analysen der <i>pKi-67</i> mRNA und der abgeleiteten Peptid-Sequenz	15
3.4	Sequenz-Analyse der <i>pKi-67</i> Intron-Exon Struktur	17
3.5	Sequenz-Analysen der 5' flankierenden Region und des Promotors von <i>pKi-67</i> 18	
3.6	Diskussion	20
<b>4</b>	<b>Expression und Regulation von pKi-67 in gastrointestinalen Karzinomen (OA 3 und OA 8)</b>	<b>21</b>
4.1	Bestimmung der <i>pKi-67</i> mRNA Expression durch quantitative PCR und Korrelation mit dem MIB-1 Markierungsindex	22
4.1.1	Konstruktion eines exogenen homologen Standards und Quantifizierung der pKi-67 mRNA	22
4.1.2	Korrelation von pKi-67 mRNA Expression und MIB-1 Markierungsindex mit klinischen Parametern sowie untereinander	23
4.1.3	Ausblick zur quantitativen <i>pKi-67</i> PCR in der Diagnostik	24
4.2	Quantifizierung der <i>pKi-67</i> mRNA Expression durch <i>in situ</i> Hybridisierung mit einer <i>pKi-67</i> spezifischen Sonde und Korrelation mit dem MIB-1 Markierungsindex	24
4.2.1	<i>In situ</i> Hybridisierung mittels spezifischer Sonde für die pKi-67 mRNA	25
4.2.2	Korrelation des pKi-67 mRNA <i>in situ</i> Hybridisierungsindex und MIB-1 Markierungsindex mit klinischen Parametern sowie untereinander	25
4.2.3	Schlussfolgerungen aus dem Vergleich des pKi-67 mRNA <i>in situ</i> Hybridisierungsindex mit dem MIB-1 Markierungsindex	26
4.3	Diskussion	27

<b>5</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion von pKi-67 (OA 4 bis OA 7)</b>	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Inhibition der Zellteilung durch Antisense-Oligonukleotide</b>	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Inhibition der Zellteilung durch Antisense-RNA exprimierende Plasmide</b>	<b>30</b>
<b>5.3</b>	<b>Expression rekombinanter Teilstrukturen von pKi-67</b>	<b>31</b>
5.3.1	Expression von drei „Ki-67 Tandem-Repetitionen“ aus Exon 13	31
5.3.2	Expression des N-terminalen Endes (Exons 2 bis 12 ohne Exon 7), des C-terminalen Endes (Exons 14 und 15) und von Exon 7	33
<b>5.4</b>	<b>pKi-67 und Apoptose</b>	<b>34</b>
<b>5.5</b>	<b>pKi-67 in Zellen mit hohem Protein-Umsatz</b>	<b>35</b>
<b>5.6</b>	<b>Identifizierung von Proteinen, die mit pKi-67 interagieren</b>	<b>35</b>
5.6.1	Genbank-„Screening“ mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems	35
5.6.2	Verifizierung der putativen Bindungspartner	37
<b>5.7</b>	<b>Selbst-Interaktion von pKi-67</b>	<b>38</b>
<b>5.8</b>	<b>Einfluss von pKi-67 auf andere Zellzyklus-abhängige Proteine</b>	<b>38</b>
<b>5.9</b>	<b>Diskussion</b>	<b>39</b>
5.9.1	Inhibition der Zellteilung durch Antisense- bzw. Teilstrukturen von pKi-67	39
5.9.2	pKi-67 als Interaktionspartner	40
<b>6</b>	<b>Diskussion zur Funktion von pKi-67</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>55</b>
<b>10</b>	<b>Anhang</b>	<b>57</b>

## 1 Einleitung

Replikationsfähigkeit und Selektionsdruck sind die wichtigsten Prämissen für die Phylogenese der Organismen. Die Steuerung der milliardenfachen Zellteilung (Proliferation), die unmittelbar nach der Befruchtung einer Eizelle einsetzt, bildet in Abstimmung mit dem programmierten Zelltod (Apoptose) die wichtigsten Kontrollmechanismen zur Ontogenese höherer Organismen einschließlich des *Homo sapiens sapiens*.

Die Entstehung maligner Neoplasien beruht kausal auf einer deregulierten Zellteilung. Es gilt als sicher, dass die Umwandlung einer Zelle in eine Tumorzelle ein Mehrschritt-Prozess ist, da bis zur kompletten Transformation und konsekutiven Progression mehrere Defekte im Genom notwendig sind (Fearon & Vogelstein, 1990; Hamilton, 1992). Vereinfacht dargestellt beruht die maligne Entartung aber auf dem Verlust der Fähigkeit die Zellteilung (z.B. bei Zell-Zell-Kontakt) zu stoppen oder auf der Anregung ruhender Zellen zur Teilung (Watson et al., 1993).

Für die Tumordiagnostik ist u.a. die quantitative Erfassung der Zellproliferation von elementarem Interesse, um das biologische Verhalten von Neoplasien zu prognostizieren. Anfang der 80er Jahre wurde von Gerdes et al. erstmals der monoklonale Antikörper „Ki-67“ beschrieben, der sich für diesen Zweck als einfach einzusetzender immunhistologischer "Proliferationsmarker" eignete (Gerdes et al., 1983). Später wurde Ki-67 durch eine Reihe neuer monoklonaler Antikörper gegen das gleiche Antigen ergänzt, beispielsweise durch MIB-1, dem paraffingängigen Homolog zu Ki-67 (Cattoretti et al., 1992; Key et al., 1993a). In den zwanzig Jahren seit der Entdeckung und Beschreibung des monoklonalen Antikörpers Ki-67 wurden mehr als 4.000 Arbeiten in den Literatur-Datenbanken (wie z. B. „PubMed“; „<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/literature>“) verzeichnet, die sich überwiegend mit der immunhistologischen Bestimmung der Proliferationsrate über den Ki-67 bzw. MIB-1 Markierungsindex in einer Reihe von Tumoren beschäftigen.

### 1.1 Ziel und Methodik der Arbeit

Die in dieser Schrift zusammengefassten Original-Artikel (OA) haben das Ziel, durch Anwendung eines breiten Spektrums von Techniken die molekulare Struktur und Zellzyklus-abhängige Funktion des Proteins aufzuklären, das durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 spezifisch erkannt wird. Dieses Protein - nach der gängigen Nomenklatur „pKi-67“ genannt - war vermutlich eines der am häufigsten in Veröffentlichungen genannten Peptide mit unbekannter Funktion. Das Hauptproblem bei der Erforschung der Funktion mag sein, dass das Protein sehr groß und instabil ist. Obwohl die Darstellung des Proteins Ziel umfangreicher Forschungsbemühungen war, gelang es beispielsweise

erst acht Jahre nach der Erstbeschreibung Immunblots mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67 durchzuführen (Gerdes et al., 1991).

Aus diesem Grund wurde die seit einigen Jahren immer prominentere Idee verfolgt, die Funktion von pKi-67 nicht mehr hauptsächlich durch immunchemische Methoden aufzuklären, sondern molekularbiologische und biochemische Methoden anzuwenden.

## 1.2 Aufbau der Schrift

Im Anschluss an den einführenden **Überblick** werden im **ersten Ergebnisteil** zunächst zwei Original-Artikel zur Ermittlung der molekularen Struktur sowie der genomischen Organisation und Lokalisation des pKi-67 Gens zusammengefasst. Diese Arbeiten bildeten die Vorraussetzungen für die Entwicklung von neuen, mit verbesserten Eigenschaften versehenen, monoklonalen Antikörpern (wie z.B. MIB-1) gegen das Ki-67 Antigen. Dieser Teil wurde in einem wesentlichen Anteil von mir am Forschungszentrum Borstel in Zusammenarbeit mit anderen Mitarbeitern der Laborgruppe unter der Leitung von Prof. Dr. J. Gerdes durchgeführt.

Im **zweiten Ergebnisteil** werden zwei weitere Original-Artikel beschrieben, in denen u. a. mit Hilfe dieser monoklonalen Antikörper die Expression und Regulation des Ki-67 Antigens in kolorektalen Karzinomen untersucht wurden. Im **dritten Ergebnisteil** werden vier Original-Artikel über Untersuchungen zusammengefasst, die Hinweise auf die Funktion von pKi-67 im Zellzyklus geben. Diese Teile wurden im Forschungslabor der Klinik für Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch) des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, von mir in Zusammenarbeit mit mehreren Doktoranden der Universität zu Lübeck unter meiner Leitung angefertigt.

Die in den zusammengefassten Arbeiten angewendeten wesentlichen **Methoden** werden kontextnah zu den jeweils dargestellten Ergebnissen beschrieben. Die **Diskussion** einer umfassenden Hypothese zur Funktion von pKi-67 bildet den Schluss dieser Schrift.

Die in dieser Schrift zusammengefassten **Original-Artikel** sind im Anhang wiedergegeben.

## 2 Überblick

### 2.1 Die Zellteilung

Für die Funktion vielzelliger Organismen ist die Kontrolle bzw. Unterdrückung des Teilungspotentials der Zellen von entscheidender Bedeutung. Nach der wissenschaftlichen Erstbeschreibung der Zellteilung wurde für den Vorgang der Kernteilung von Eukaryonten der Begriff der Mitose eingeführt (Flemming, 1882). Die Mitose (M-Phase) ist die häufigste Form der Kernteilung. Sie ist exakt erbgleich, d.h. die Tochterkerne enthalten infolge der Chromosomenverteilung die gleiche genetische Information. Schon während der Schlußphase der Kernteilung setzt gewöhnlich die Zellteilung (Zytokinese) ein. Die Mitose wechselt sich mit der Interphase (Intermitose) ab.

Das eigentliche, moderne Konzept zur Zellteilung eukaryotischer Zellen wurde mit der Unterteilung des Zellzyklus in vier Phasen entwickelt (Howard & Pelc, 1951; Howard & Pelc, 1953). Maßgebend hierfür war die Beobachtung, dass die Replikation der DNA nur in einem bestimmten Abschnitt der Interphase stattfindet, der als S-Phase (Synthesephase) bezeichnet wird. Der Abschnitt vom Ende der Mitose bis zum Beginn der DNA-Synthese wird G<sub>1</sub>-Phase (G von Gap=Lücke) genannt. Zwischen dem Ende der DNA-Replikation und der einsetzenden Mitose ist eine weitere Phase definiert, die G<sub>2</sub>-Phase.

Die Zellen höherer Organismen, die nicht wie Einzeller, embryonale Zellen oder Gewebekulturzellen ständig den Zyklus durchlaufen, sondern zu speziellen Aufgaben differenziert sind, befinden sich in der postmitotischen G<sub>0</sub>-Phase, die sowohl als Ruhephase (Pardee, 1989), aber auch als Arbeitsphase bezeichnet wird. Viele differenzierte Zellen können auf bestimmte Signale hin dedifferenzieren und in die G<sub>1</sub>-Phase zurückkehren. Der Zellzyklus wird von verschiedenen Zellen höherer Organismen auch unterschiedlich schnell durchlaufen; am variabelsten in der Dauer ist hierbei die G<sub>1</sub>-Phase (Grundmann, 1971). In der späten G<sub>1</sub>-Phase gibt es eine Art Schwelle, der sog. Restriktionspunkt (Pardee, 1974), nach dessen Überschreitung eine Zelle für eine neue Replikationsrunde konditioniert ist.

Mittlerweile ist bekannt, dass die einzelnen Abschnitte des Zellzyklus durch eine Vielzahl von Faktoren kontrolliert und gesteuert werden. Der Frage nach dieser relativ komplizierten Steuerung des Zellzyklus wurde besonders in genetischen und biochemischen Studien an Hefen (*Saccharomyces*) und Amphibieneiern nachgegangen (Smith & Ecker, 1969; Smith & Ecker, 1971; Andrews & Herskowitz, 1990; Lewin, 1990; Nurse, 1990; Woollard & Nurse, 1995; Verde et al., 1995). Mit Hilfe von Zellzyklus-Mutanten wurde eine Reihe von Genen isoliert, z.B. das *cdc2* („cell division control“; synonym für die „cyclin dependent kinase 1“, „*cdk1*“), dessen Genprodukt, das p34cdc2 (*cdk1*), eine

zentrale Regulatorfunktion hat (Nurse, 1975; Nurse and Thuriaux, 1980; Gautier et al., 1988; Labib et al., 1995; Fisher and Nurse, 1995). Diese Proteinkinase ist stark konserviert und kommt in allen eukaryotischen Organismen vor. Eine weitere wichtige Rolle spielen die Cycline (Roberts, 1993; Fisher and Nurse, 1995), die periodisch im Zellzyklus akkumulieren und während der Mitose wieder proteolytisch abgebaut werden.

Zwei Kontrollpunkte im Zellzyklus sind bekannt, der bereits erwähnte Restriktionspunkt in der G<sub>1</sub>-Phase sowie der Übergang von der G<sub>2</sub>-Phase zur M-Phase. p34cdc2 (cdk1) bildet mit Cyclin B am Ende der G<sub>2</sub>-Phase einen aktiven Komplex, den MPF („Maturation Promoting Factor“) (Nurse, 1975; Norbury & Nurse, 1992; Lee & Kirschner, 1996). MPF initiiert wahrscheinlich alle Ereignisse, die eine Interphasezelle zur Mitose führen, wobei noch unklar ist, ob MPF ein übergeordneter Regulator ist, der andere Regulatoren durch Phosphorylierung aktiviert, oder entscheidende Substrate direkt phosphoryliert.

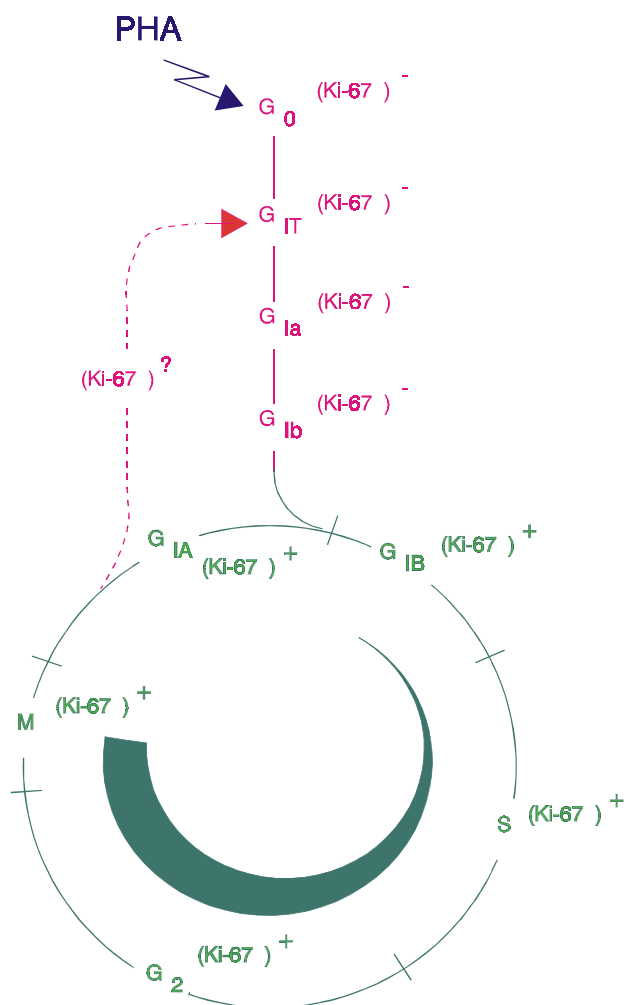
## **2.2 Das Ki-67 Antigen**

### **2.2.1 Der monoklonale Antikörper Ki-67**

1983 gelang es Gerdes et al., Mäusen gegen die Zellkerne von Hodgkin- und Sternberg-Reed Zellen zu immunisieren. Dazu wurde Mäusen (Stamm BALB/c) ein Rohextrakt aus Zellkernen von L428 Zellen injiziert. Diese Zelllinie stammt von einem Patienten mit Morbus Hodgkin ab. Mittels der Hybridoma Technik wurden so Zellklone gewonnen, die Kern-spezifische Antikörper sezernierten. Der monoklonale Antikörper Ki-67 erkannte ein Antigen, das ausschließlich in proliferierenden Zellen vorkommt (Gerdes et al., 1983). Das dabei erkannte Peptid wurde dementsprechend „Ki-67 Antigen“, bzw. nach der gängigen Nomenklatur für Proteine „pKi-67“ genannt.

### **2.2.2 Die Expression von pKi-67 im Zellzyklus**

Weitere Untersuchungen zeigten, dass pKi-67 tatsächlich während des gesamten Zellzyklus (G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase) nachgewiesen werden kann (Gerdes et al., 1984), nicht aber in ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>-Phase; vergl. Abbildung 1). In sich permanent teilenden humanen MCF-7 bzw. MR65 Tumorzellen ist das Ki-67 Antigen konstitutiv nachweisbar (van Dierendonck et al., 1989; Verheijen et al., 1989a). Werden dagegen T-Lymphozyten, die sich in der G<sub>0</sub> Phase befinden, mit PHA (Phytohaemagglutinin) zur Proliferation stimuliert, so kann pKi-67 erst ab der späten G<sub>1</sub>-Phase (G<sub>1B</sub>) nachgewiesen werden (vergl. Abbildung 1). In Zellen, die unmittelbar zuvor eine Mitose abgeschlossen haben, ist pKi-67 auch schon in der frühen G<sub>1</sub>-Phase (G<sub>1A</sub>) nachweisbar (Verheijen et al., 1989a). Diese Befunde wurden auch für aktivierte dermale Fibroblasten bestätigt (Kill et al., 1994). Zur Unterscheidung der frühen G<sub>1</sub>-Phase je nachdem ob sich die Zel-



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Zellzyklus in Korrelation zur pKi-67 Expression in durch PHA (Phytohaemagglutinin) zur Proliferation stimulierten T-Lymphozyten (nach Duchrow et al., 1994b; nähere Erläuterung im nebenstehenden Text).

Abschluss der M-Phase nimmt die Nachweisbarkeit von pKi-67 sehr schnell ab. Einige Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass das Protein komplett abgebaut wird (Sawhney & Hall, 1992), bzw. zumindest darauf, dass das Epitop von Ki-67 nicht mehr nachweisbar ist. Es wurde daher angenommen, dass pKi-67 während der S-Phase synthetisiert und dann in der G<sub>1</sub>-Phase rasch abgebaut wird.

Nach Inhibition der Proteinsynthese mit Cycloheximid wird pKi-67 unabhängig von der Phase des Zellzyklus mit einer Halbwertszeit von etwa einer Stunde abgebaut (Bruno & Darzynkiewicz, 1992). Aus diesem Ergebnis wurde abgeleitet, dass in allen aktiven Phasen des Zellzyklus eine permanente *de novo* Synthese von pKi-67 erforderlich ist (Duchrow et al., 1994a). Eine Blockierung des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>/S oder G<sub>2</sub>/M Phase durch Synchronisations-Inhibitoren, durch Induktion von p21(Waf1/Cip1) in einem

len zuvor in der G<sub>0</sub>- oder M-Phase befanden, wurde sie entweder als G<sub>1a</sub>/G<sub>1b</sub> oder als G<sub>1A</sub> bezeichnet. Die Behauptung, dass pKi-67 kontinuierlich während des Zellzyklus exprimiert wird und immer in der selben Konzentration vorliegt (Lindmo et al., 1984; Baisch & Gerdes, 1987), konnte später nicht bestätigt werden. Es wurde aber nachgewiesen, dass proliferierende Zellen bei Nahrungsmangel pKi-67 negativ werden können (Verheijen et al., 1989b), vermutlich wegen der unzureichenden *de novo* Synthese des Proteins.

Zahlreiche Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergaben, dass die Konzentration von pKi-67 während der S-Phase zunimmt und sein Maximum in der G<sub>2</sub>/M-Phase erreicht (Sasaki et al., 1987; van Dierendonck et al., 1989; Hitchcock, 1991; Sawhney & Hall, 1992). Nach

Tetracyclin-reguliertem Expressionssystem oder durch Induktion von Wildtyp-p53 und -p21 nach DNA-Schädigung erhöhte dagegen die Halbwertszeit von pKi-67 auf bis zu 60 Stunden (van Oijen et al., 1998).

Der heutigen Vorstellung zufolge nimmt die Nachweisbarkeit bzw. Konzentration von pKi-67 von der G<sub>1</sub>-Phase bis zur G<sub>2</sub>-Phase kontinuierlich zu und erreicht ihr Maximum während der Mitose (vergl. Abbildung 1: zentrale Illustration). Die höchste Nachweisrate für pKi-67 wird in der Metaphase erreicht und fällt dann in Ana- und Telophase bis zu ihrem Minimum in G<sub>1</sub> ab. Die schnelle Abnahme in dieser Phase führte zu einer geschätzten Halbwertszeit des Proteins von 20 bis 90 Minuten (Ross & Hall, 1995; Scholzen & Gerdes, 2000), wobei unklar blieb, was mit pKi-67 während der G<sub>1</sub>-Phase passiert. Dem umfassendsten Modell zur Zellzyklus-abhängigen Expression von pKi-67 zufolge (du Manoir et al., 1991), das von verschiedenen Arbeitsgruppen übernommen wurde (Duchrow et al., 1994a; Ross & Hall, 1995; Scholzen & Gerdes, 2000), kann eine Zelle zwischen den drei folgenden Pfaden wählen:

- Der abnehmende pKi-67 Pfad: Die Zelle verläßt den Zellzyklus in Richtung Differenzierung und degradiert dabei das Ki-67 Antigen, welches nicht in ruhenden Zellen vorkommt.
- Der zunehmende pKi-67 Pfad: Eine Zelle, die sich auf dem abnehmenden Pfad befindet, kann restimuliert werden, tritt wieder in den Zellzyklus ein und produziert erneut pKi-67.
- Der stabile pKi-67 Pfad: Die Konzentration von pKi-67 bleibt stabil, z.B. in sich permanent teilenden Zellen.

Eine Erklärung für die anfänglichen Probleme bei der Beschreibung der Verteilung von pKi-67 in der Zelle durch unterschiedliche Autoren könnte möglicherweise in der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und Fixierungsmethoden liegen (Scholzen & Gerdes, 2000). Weiterhin hängt die Nachweisbarkeit des Proteins von der Ionenstärke des Puffers und der DNA-Bindung des Proteins ab (Bruno et al., 1992; Lopez et al., 1994). So reduziert z. B. die Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> die Anfärbbarkeit mit MIB-1 (Shi et al., 1999), dem paraffingängigen Homolog zu Ki-67. Die Zugänglichkeit des Ki-67 Epitops, Konformationsänderungen, supramolekulare Komplexe und die Bindung von Nucleinsäuren können die Bindungsstärke der Antikörper grundsätzlich beeinflussen. Eine Maskierung der antigenen Determinante von pKi-67 ist vermutlich dafür mitverantwortlich, dass das Protein während seiner Synthese nicht im Zytosol durch Antikörper gegen das Epitop von Ki-67 nachweisbar ist (Braun et al., 1988).

### **2.2.3 Die intrazelluläre Verteilung von pKi-67**

Schon frühe Beobachtungen ergaben, dass nicht nur die Expressionsstärke von pKi-67 im Zellzyklus variiert, sondern auch äußerst stark die Lokalisation. Während der Inter-

phase färbt Ki-67 nur das Nukleoplasma aber nicht das Zytoplasma und bildet dort prominente Flecken. Während der Mitose werden dann die Chromosomen gefärbt (Bading et al., 1989). Weitere Untersuchungen ergaben folgendes Modell der Zellzyklus-abhängigen Verteilung von pKi-67 (Kill, 1996): Das Protein kommt in der frühen G<sub>1</sub>-Phase in einer großen Anzahl diskreter Foki im Nukleoplasma vor, die in der Nähe der Kernlamina zu finden sind. pKi-67 verbindet sich dann bis zur Mitte der G<sub>1</sub>-Phase an genau determinierten Stellen mit den sich neu bildenden Nukleoli und befindet sich während der S- und G<sub>2</sub>-Phase im Nukleolus. Mit dem Einsetzen der Mitose ändert sich die Lokalisation von pKi-67 vollkommen. Der Interphasenkern bricht durch Phosphorylierung der Lamine zusammen und gleichzeitig kondensiert das Chromatin. Ein Teil der Kernproteine verteilt sich auf die Chromosomen, einige diffundieren ins Zytoplasma und einige Proteine verbleiben in den Nukleolären Organisations Regionen (NOR), in denen die rRNA Gene geclustert sind und postmitotisch die neuen Nukleoli entstehen (Gautier et al., 1992).

Präzise Untersuchungen zur Verteilung von pKi-67 während der Mitose (van Dierendonck et al., 1989; Verheijen et al., 1989a; Verheijen et al., 1989b) ergaben, dass pKi-67 in der Prophase, wenn die Kondensation der Chromosomen noch nicht beendet ist, netzartig über den Kern verteilt ist. Dieses Netz ist mit dem Chromatin assoziiert. In der Metaphase bildet pKi-67 ein wirkliches Netz mit interdigitierenden Fibrillen um die Chromosomen. In der Anaphase und Telophase erscheint das Netz zunehmend granulär (van Dierendonck et al., 1989; Verheijen et al., 1989a; Verheijen et al., 1989b). In der späten Telophase bildet pKi-67 dann die schon zuvor beschriebenen Foki, die aggregieren und mit den sich neu bildenden Nukleoli der Tochterzellen assoziieren (Kill et al., 1994). Diese Beobachtungen wurden noch dadurch ergänzt, dass pKi-67 während der Meta- und Anaphase hauptsächlich in den kortikalen Regionen der Chromosomen vorkommt, wo später die prä-nukleolären Körperchen und damit die Nukleoli entstehen (Verheijen et al., 1989a; Verheijen et al., 1989b).

### **2.2.3.1 Die Lokalisation von pKi-67 im Nukleolus**

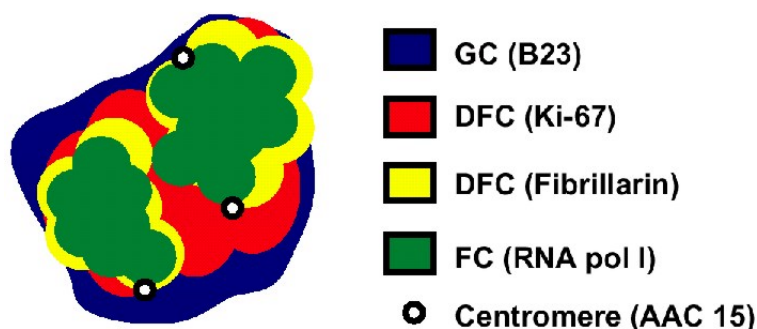
Die ubiquitär in den Kernen eukaryotischer Zellen vorkommenden Nukleoli (Kernkörperchen) haben als Hauptaufgabe die Herstellung der Prä-Ribosomen, die dann später im Zytoplasma zu reifen Ribosomen assembliert werden. Die aus zwei Untereinheiten zusammengesetzten Ribosomen enthalten neben ribosomalen Proteinen ribosomale RNA (rRNA), die sogenannten „großen“ rRNAs (28 S, 18 S und 5,8 S), sowie die „kleine“ rRNA (5 S). Da die großen rRNAs innerhalb der Nukleoli transkribiert werden, sind die Kernkörperchen räumlich eng mit den rRNA Genen (rDNA) verbunden, die in Clustern angeordnet sind. Jedes Cluster enthält je ein Gen für die 28 S, 18 S und 5,8 S rRNA, das als „Precursor“-rRNA (pre-rRNA) einschließlich sogenannter „Spacer“

transkribiert wird. Die pre-rRNAs werden in den Nukleoli mit Hilfe nukleolärer Proteine, Nukleasen und kleiner ribonukleärer Partikel (RNPs), die sno-RNA (small nucleolar RNAs) enthalten, zu den reifen rRNAs prozessiert. In den Nukleoli befinden sich neben ribosomalen Proteinen auch transient mit den Prä-Ribosomen assoziierte Proteine sowie nukleo-zytoplasmatische Trägerproteine. Zusätzlich ist das Kernkörperchen an der Biogenese einiger nicht-ribosomaler RNAs beteiligt und steht im Zusammenhang mit einigen für den Zellzyklus spezifischen Antigenen, deren genaue Wechselwirkungen aber noch unbekannt sind (Lyon & Lamond, 2000).

In ruhenden und proliferierenden Zellen sind die Nukleoli grundsätzlich gleich aufgebaut (Schedle et al., 1992). Sie bestehen aus drei Regionen, der fibrillären (FC), der dichten fibrillären (DFC) sowie der granulären (GC) Komponente (Stoykova et al., 1985; Scheer & Weisenberger, 1994):

- Die fibrilläre Komponente (FC) befindet sich im Zentrum des Nukleolus und enthält das r-Chromatin (tandemartig angeordnete, mit Histonen assoziierte rDNA). In der FC befinden sich weiterhin Proteine, die an der Transkription der rDNA beteiligt sind: RNA Polymerase I, Topoisomerase I und der Transkriptionsfaktor UBF. Dieser Teil des Nukleolus bleibt auch während der Mitose erhalten und ist als NOR (Nukleoläre Organisations Region) bekannt. Die in dieser Region enthaltenen Proteine können leicht mit Hilfe einer Silber-Färbung dargestellt werden (Ag-NOR). Die NORs, deren Anzahl speziesabhängig ist, sind in der späten Telophase die Ausgangspunkte für die Reformation der Nukleoli. Beim Menschen existieren zehn NORs, die auf den akrozentrischen Chromosomen sitzen (Schedle et al., 1992). Die sich neu bildenden Nukleoli verschmelzen normalerweise zu einem einzigen Nukleolus, es können sich aber auch mehrere bilden.
- In der dichten fibrillären Komponente (DFC) des Kernkörperchens werden die Prä-Ribosomen zusammgebaut. Die rDNA wird an der Grenze zwischen der FC und der DFC transkribiert, wobei die pre-rRNAs von der fibrillären in die dichte fibrilläre Region hinein synthetisiert werden (Hozak et al., 1994; Hozak, 1995). In der dichten fibrillären Komponente werden dann die rRNAs einschließlich der 5S RNA, die außerhalb der Nukleoli von der RNA Polymerase III transkribiert wird (Hozak, 1995), mit den ribosomalen Proteinen zu den Prä-Ribosomen assembliert (Stoykova et al., 1985; Scheer & Weisenberger, 1994).
- Über die granuläre Komponente (GC) werden die fast reifen Prä-Ribosomen schließlich in das Zytoplasma transportiert.

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen pKi-67 und den Nukleoli kann schon allein aufgrund der Lokalisation vermutet werden, weil das Protein - außer in der Mitose - permanent mit der DFC dieser Organellen assoziiert ist (Verheijen et al., 1989a). Durch Vergleich der Verteilung bekannter Proteine im Nukleolus mit der Lokalisation von



**Abbildung 2:** Lokalisation von pKi-67 in der dichten fibrillären Komponente (DFC) in einem Fibrillarin defizienten Teil des Nukleolus. GC: granuläre Komponente; FC: fibrilläre Komponente; RNA Pol I: RNA Polymerase I. (Schematische Darstellung nach Kill, 1996b)

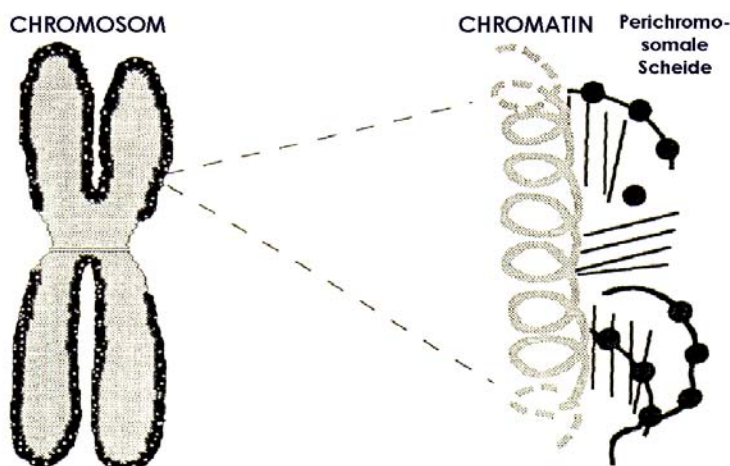
pKi-67 konnte mit Hilfe konfokaler Laserscan-Mikroskopie gezeigt werden (Kill, 1996), dass pKi-67 nicht in Bereichen zu finden ist, in denen sich RNA Polymerase I oder Fibrillarin befinden (vergl. Abbildung 2). Lediglich eine partielle Kolokalisation mit B23/Nukleophosmin wurde beobachtet, das

RNA bindet und an der Strukturbildung der prä-ribosomalen Partikel beteiligt ist. Die Zerstörung der Nukleoli durch Zugabe von Aktinomycin D, eines Basenanalogs (z. B. DRB; 1,4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Ribitol) oder eines Antikörpers gegen RNA Polymerase I führt zu einer Translokation von pKi-67 zu nukleoplasmatischen Foki. Während die Kolokalisation mit B23/ Nukleophosmin erhalten bleibt, ist das Protein weiterhin nicht in Regionen mit RNA Polymerase I und Fibrillarin zu finden. Daraus kann gefolgert werden, dass pKi-67 in der DFC in einem Fibrillarin defizienten Teil des Kompartiments am Übergang zur granulären Komponente des Nukleolus lokalisiert ist.

### 2.2.3.2 Die Translokation von pKi-67 in die perichromosomale Scheide

Zu Beginn der Mitose werden die Strukturen des Zellkerns und der Nukleoli aufgelöst und müssen später in den sich trennenden Tochterzellen jeweils wieder neu formiert werden. Nach dem Zusammenbruch der Kernlamina und Desintegration der Nukleoli verteilt sich ein Teil der nukleolären Peptide im Zellplasma mit dort bislang unbekannter Funktion. Andere nukleoläre Proteine, darunter Fibrillarin, B23/Nukleophosmin, einige ribosomale Proteine sowie pKi-67 streben nach massiver Phosphorylierung in die Peripherie der kondensierenden Chromosomen (Hernandez-Verdun, 1991) und bilden dort zusammen mit Peptiden der nukleären Matrix und einigen RNA-Molekülen die sogenannte perichromosomale Scheide (vergl. Abbildung 3). Diese Scheide, die die Chromosomen wie ein Handschuh umgibt, ist vermutlich an der Organisation der Chromosomen beteiligt und könnte als provisorische Kernhülle eine Barriere gegen zyttoplasmatische Proteine bilden. Gleichzeitig werden die Proteine der perichromosomalen Scheide zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen aufgeteilt.

Aufgrund der Kolokalisation von pKi-67 und der Topoisomerase II in der perichromosomalen Scheide (MacCallum & Hall, 2000b) wurde ein funktioneller Zusammenhang



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der perichromosomalen Scheide (nach Hernandez-Verdun, 1991; Hernandez-Verdun & Gautier, 1994).

zwischen beiden Proteinen vermutet (Verheijen et al., 1989b). Diese Hypothese fand zwar dadurch Unterstützung, dass sich die räumliche Verteilung von pKi-67 stark von der der Onkogene c-myc und c-myb oder RNA Polymerase I und II, DNA Polymerase  $\alpha$  sowie den heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNPs) unterschied (Bading et al.,

1989), sie konnte allerdings nicht verifiziert werden.

### 2.3 Die klinische Relevanz des Ki-67 Antigens

Für die Tumorforschung ist die Untersuchung der Proliferation somatischer Zellen von elementarem Interesse. Zum einen liegt in der unkontrollierten Zellteilung einer der Schlüssel für die Tumorentstehung, zum anderen wird in der Routinediagnostik die quantitative Erfassung der Zellproliferation benötigt, um das biologische Verhalten von Neoplasien zu prognostizieren.

Die Zellteilungsrate, bzw. die Ermittlung der Wachstumsfraktion der Tumorzellen, dient oft als Gradmesser für die Malignität eines Tumors. In der "klassischen" histopathologischen Tumordiagnose werden die Zellteilungsraten bzw. -indices anhand der sich in Mitose befindlichen Zellen bestimmt. Da diese Bestimmung jedoch sehr zeitaufwendig ist, wurde nach einfach einzusetzenden immunhistologischen "Proliferationsmarkern" gesucht. Einen solchen geeigneten Marker stellt der monoklonale Antikörper Ki-67 dar. Wie bereits beschrieben, konnte am Beispiel von PHA-stimulierten peripheren Lymphozyten gezeigt werden, dass die Expression des Ki-67 Antigens 24 bis 36 h nach der Aktivierung der Zellen mit PHA nachweisbar ist (vergl. Abbildung 1). Weiterhin konnte in einem experimentellen "Tumor Xenograft Modell" gezeigt werden, dass der Index, der mit monoklonalen Antikörpern gegen das Ki-67 Antigen bestimmt wurde, exakt mit der Wachstumsfraktion korreliert (McCormick et al., 1993). In der histopathologischen Routine-Diagnostik ist es daher möglich, mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen das Ki-67 Antigen schnell und reproduzierbar die Wachstumsfraktion einer humanen Zell-Population immunhistologisch zu bestimmen (Brown & Gatter, 1990; Gerdes, 1990).

Zahlreiche retrospektive Studien zeigen, dass die Determinierung der Wachstumsfraktion mit Ki-67 tatsächlich ein unabhängiger prognostischer Marker ist (Gerdes et al., 1987; Grogan et al., 1988; Hall et al., 1988; Bouzubar et al., 1989; Holte et al., 1989; Nicholson et al., 1991; Tungekar et al., 1991; Wintzer et al., 1991; Fontana et al., 1992; Locker et al., 1992). In vielen Tumorentitäten, die untersucht wurden (vergl. Tabelle 1), besteht eine signifikante Korrelation zwischen den Mittelwerten des MIB-1 Markierungsindex (prozentualer Anteil pKi-67 exprimierender Zellen) und der histopathologischen Malignitätseinschätzung, wobei jedoch die individuellen Werte innerhalb der histopathologisch definierten Tumorstadien stark variieren. Aus diesem Grund sollte die Bestimmung der Tumor-Wachstumsfraktion mit pKi-67 eine objektive Hilfe zur Beurteilung eines Tumorfalls und von besonderer Bedeutung für die Auswahl einer individuellen Tumorthherapie sein.

In Tabelle 1 werden drei Gruppen definiert, welche sich durch die prognostische Aussagekraft von pKi-67 bei verschiedenen malignen Erkrankungen unterscheiden. Beim Mammakarzinom existiert z.B. eine signifikante statistische Korrelation des Ki-67 bzw. MIB-1 Markierungsindex mit klinischen Parametern und Überleben. Dies ist jedoch den meisten Publikationen zufolge nicht für das kolorektale Karzinom beschrieben worden.

**Tabelle 1:** Relevanz des Ki-67 bzw. MIB-1 Markierungsindex in Bezug auf die Prognose bei verschiedenen Tumorentitäten (modifiziert nach Brown & Gatter, 2002).

Tumorentität	Anzahl der Studien mit prognostischem Wert*	Anzahl der Studien ohne prognostischen Wert*
<b>I (&gt;75 % der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)</b>		
Mammakarzinom	23	1
Weichteiltumore	11	3
Bronchialkarzinom	10	2
Astrozytom	6	0
<b>II (25 %-75 % der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)</b>		
Cervixkarzinom	5	6
Prostatakarzinom	15	7
<b>III (&lt; 25 % der Studien mit prognostisch positivem Wert von pKi-67)</b>		
Kolorektale Karzinome	2	10

\*Der prognostische Wert basiert auf statistisch signifikanten Korrelationen zwischen pKi-67 Expression und den erhobenen klinischen Parametern.

### 3 Bestimmung der molekularen Struktur von pKi-67 (OA 1 und OA 2)

Aufbau und molekulare Struktur des Antigens, das durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 spezifisch gebunden wird, waren zunächst nicht bekannt und mussten daher erst aufgeklärt werden. Das Ki-67 Antigen, das nach der gängigen Nomenklatur für Proteine „pKi-67“ genannt wird, ist als sehr fragil beschrieben worden (Bruno & Darzynkiewicz, 1992). Da keine Methodik zur Darstellung dieses Proteins bekannt war, sollte zunächst das Gen, das für dieses Antigen kodiert, mit Hilfe der Klonierung und Sequenzierung identifiziert und charakterisiert werden.

#### 3.1 Immunklonierung der *pKi-67* cDNA

Um die *pKi-67* mRNA zu klonieren, wurde eine Lambda gt11 Expressions-Bibliothek (Genbank) aus cDNA (transkribierte mRNA) der humanen Zelllinie IM9 nach entsprechender Ausplattierung und Blotten auf eine Nitrozellulose-Membran mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Ki-67 auf spezifische Bindung untersucht („Immunoscreening Methode“; vergl. OA 1 sowie Gerdes et al., 1991). Von  $2 \cdot 10^6$  Plaques verschiedener Lambda gt11-Klone konnten zehn positiv mit dem Antikörper reagierende Klone isoliert werden. Die Bereiche der Lambda-DNA, die die cDNA-Insertionen enthielten, wurden in den DNA-Einzelstränge generierenden Vektor M13mp18/19 umkloniert und mit Hilfe der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) sequenziert, zunächst mittels radioaktiver Markierung und anschließender manueller Auswertung, später mit Hilfe eines automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequenziergerätes („ALF“, Pharmacia, Upsala, Schweden). Die Sequenzanalysen wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes („MicroGenie Rel 7.1“, Beckmann Instruments, USA) untereinander sowie mit den Genbank-Sequenzen verglichen und analysiert. Überraschenderweise enthielten alle Insertionen dieser Klone homologe, repetitive Elemente von ca. 366 bp Länge, die sog. „Ki-67 Tandem-Repetitionen“. Jede dieser Repetitionen enthielt wiederum ein hochkonserviertes 66 bp langes Motiv, das sog. „Ki-67 Motiv“. Diese Sequenzen zeigen allerdings keine signifikanten Homologien mit den in Datenbanken (EMBL; GenBank) gespeicherten Sequenzen. Es ist daher davon auszugehen, dass pKi-67 zu einer eigenen Klasse von Proteinen gehört.

Unter den zehn unabhängig isolierten Klonen befand sich mehrmals ein bestimmtes 1092 bp großes Fragment. Nach der Umklonierung eines der 1092 bp großen Inserts in allen drei Leserastern in Expressionsvektoren (pEV-vrf 1, 2, 3) (Crowl et al., 1985) und Expression der Plasmide in Bakterien (*Escherichia coli*) wurden die rekombinanten Proteine isoliert. Anhand von Immun-Blots konnte demonstriert werden, dass die im richtigen Leseraster exprimierten Fragmente wiederum mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67 reagierten (Gerdes et al., 1991). Northern Blot Analysen zeigten, dass das

1092 bp große Fragment mit über 9 kb großen mRNA-Molekülen aus proliferierenden Zellen hybridisierte (vergl. OA 1: Fig. 5), nicht jedoch mit mRNA-Molekülen aus ruhenden ( $G_0$ -Phase) Zellen (Gerdes et al., 1991). Mit Hilfe des gleichen cDNA-Fragmentes konnte das Gen auf dem Chromosom 10q25-ter lokalisiert werden (Fonatsch et al., 1991). Dieses Ergebnis bestätigte eine frühere Arbeit (Schonk et al., 1989), in der gezeigt wurde, dass nur solche Mensch-Hamster-Hybridzellen pKi-67 produzierten, die das menschliche Chromosom 10 enthielten. Die exakte Lokalisierung auf Chromosom 10q26.2 von Position 128966120 bp bis 128936575 bp (in umgekehrter Orientierung) wurde später durch die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms bestätigt (McPherson et al., 2001).

Aus der im Northern Blot ermittelten Größe der mRNA konnte geschlossen werden, dass das Protein ungewöhnlich groß sein musste. Bei einer kodierenden mRNA von ca. 9-10 kb ist ein Molekulargewicht der translatierten Polypeptidkette von 300 bis 400 kDa anzunehmen. Mit Hilfe einer einfachen, schnellen Protein-Präparationsmethode sowie einem für große Proteine geeigneten Immun-Blot konnte das native Ki-67 Protein schließlich aus Lysaten proliferierender Zellen als Doppel-Bande mit apparenten Molekulargewichten von 345 kD bzw. 395 kD dargestellt werden (vergl. OA 1: Fig. 6). Das hierzu verwendete Solubilisierungsprotokoll eignete sich aber leider nicht zur weiteren Anreicherung des Proteins, u.a. weil es eine Denaturierung in SDS-haltigem Puffer einschloss.

Da es sich bei den durch die Immunklonierung identifizierten Fragmenten um homologe bzw. identische Fragmente handelte, die sich aber nicht überlappten, wurden weiterführende Strategien angewendet, um die vollständige cDNA mit einer vermuteten Gesamtgröße von über 9 kbp zu isolieren. Zunächst wurde das 1092 bp große Fragment (s.o.) als Hybridisierungssonde zum erneuten "Screening" der Lambda gt11 cDNA-Bibliothek (s.o.) verwendet. Dadurch konnten zwei weitere Klone mit homologen Sequenzen zu den Ki-67 Tandem-Repetitionen isoliert werden (vergl. OA 1). Von den insgesamt fünf klonierten Fragmenten mit einer Länge von zusammen über 5000 bp überlappten aber nur zwei, so dass wir zu diesem Zeitpunkt nicht sicher sein konnten, ob die Fragmente ausschließlich zu einer einzigen cDNA gehörten. Mit Hilfe der reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) gelang es uns dann, die fehlenden Abschnitte zwischen den Klonen zu amplifizieren. Die 5' und 3' Enden der cDNA konnten wir schließlich durch "Anker-Primer PCR-Methoden", insbesondere durch die RACE-PCR ("Rapid Amplification of cDNA Ends") (Frohman et al., 1988) isolieren (vergl. OA 1).

Zur genauen Ermittlung der Transkriptions-Startstelle wurden das 5' Ende der *pKi-67* cDNA mit Hilfe der RACE-PCR und drei unterschiedlichen Primern (Positionen: 644-633, 347-365 und 118-138 bp) amplifiziert, kloniert und sequenziert. Von insgesamt 20

analysierten Sequenzen hatten zwölf identische 5' Enden, während acht verkürzten Fragmenten entsprachen, die vermutlich durch unvollständige reverse Transkription der mRNA entstanden waren. Im Vergleich zur Sequenz der genomischen DNA (vergl. 3.2) war die erste Base am 5' Ende der mRNA nicht identisch, da hier ein „C“ anstelle eines „T“ festgestellt wurde. Diese zusätzliche Base könnte durch posttranskriptionale Modifikation („capping“) entstanden sein. Aus diesem Grunde wurde der Startpunkt der Transkription (Position 1) an der ersten übereinstimmenden Position zwischen cDNA und genomischer DNA festgelegt. Die Richtigkeit dieser Bestimmung wurde mittels PCR bestätigt, da alle Versuche zur Amplifikation von cDNA mit Primerpaaren, die jeweils vor bzw. nach dem Startpunkt der Transkription spezifisch an die genomische DNA binden können, erfolglos blieben.

Die vollständige cDNA hat eine Länge von 12.515 bp (EMBL-ID: „HSMKI67“ / AC: „X65550“; <http://srs.embl-heidelberg.de>). Überraschenderweise konnten wir eine zweite cDNA mit einer Länge von 11.435 bp isolieren (EMBL-ID: „HSMKI67A“ / AC: „X65551“), die sich von der 12,5 kbp cDNA durch die Abwesenheit eines vollständigen Exons von 1080 bp Länge (Exon 7) unterscheidet (vergl. OA 1: Fig. 3). Mit Hilfe der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass beide mRNA-Formen in proliferierenden Zellen exprimiert werden.

Am 3' Ende der *pKi-67* mRNA (strangabwärts nach dem Stopp-Kodon) konnten mehrere Konsensus-Sequenzen des sog. „Polyadenylierungssignals“ lokalisiert werden (vergl. OA 1: Fig. 3). Mit Hilfe der 3'RACE-PCR wurden dementsprechend drei unterschiedliche Polyadenylierungsstellen identifiziert (vergl. OA 1: Fig. 2). Durch Northern-Blots konnten die entsprechenden, unterschiedlich langen mRNA-Spezies visualisiert werden (vergl. OA 1: Fig. 5).

### 3.2 Klonierung des kompletten *pKi-67* Genlokus

Zur Charakterisierung der gesamten Genstruktur einschließlich des Promotors und aller Introns wurde der gesamte genomische DNA-Abschnitt, der für das *pKi-67* Gen kodiert, kloniert und sequenziert. Für die Klonierung der *pKi-67* Introns wurden verschiedene PCR-Techniken eingesetzt. Das *pKi-67* Gen enthält insgesamt 14 Introns (vergl. OA 2). Introns mit einer Größe unter 2 kbp (Introns Nr. 1,3 und 6 bis 14) wurden durch Intron-überspannende PCR mit genomischer DNA, die aus IM9-Zellen isoliert wurde, und Intron-flankierenden cDNA-Primern amplifiziert. Die größeren Introns 2, 4 und 5 sowie die 3' und 5' flankierenden Abschnitte vor dem ersten bzw. nach dem letzten Exon wurden mit Hilfe inverser PCR-Techniken amplifiziert („genomic walking“) (Triglia et al., 1988). Die Amplifikate wurden in M13mp18/19 kloniert und die isolierten M13-Einzelstrang-DNAs mit Hilfe eines automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequenziergerätes (ALF, Pharmacia, Upsala, Schweden) sequenziert. Die gesamte Sequenz, die aus allen

15 Exons und 14 Introns durch Sequenz-Abgleich („alignment“) konstruiert wurde, umfasste 29.627 bp. Einschließlich eines 74 bp großen Fragmentes der 5' Region sowie 264 bp aus der 3' Region wurden 29.965 bp des chromosomalen Genabschnitts von *pKi-67* sequenziert (EMBL-ID: „HSAMAK67“ / AC: „X74107“; <http://srs.embl-heidelberg.de>).

Zur Klonierung eines größeren Abschnitts des Promotors im 5' flankierenden Bereich wurde eine Hybridisierungssonde aus dem 5' Bereich von *pKi-67* zum "Screening" einer Bibliothek des Vektors „EMBL“ mit genomischen DNA aus der humanen Zelllinie HeLaS3 verwendet. Dadurch konnte ein mit der Hybridisierungssonde überlappender Klon von 14.041 bp Länge isoliert werden, der insgesamt 11.797 bp strangaufwärts („upstream“) vom 5' Ende enthielt (EMBL-ID: „HSKI67“ / AC: „X94762“). Zusammen mit allen Exons und Introns sowie der 3' flankierenden Region wurden insgesamt 41.688 bp des chromosomalen Genabschnitts von *pKi-67* ermittelt.

### 3.3 Sequenz-Analysen der *pKi-67* mRNA und der abgeleiteten Peptid-Sequenz

Das erste Startkodon („ATG“) für die Translation der *pKi-67* mRNA liegt im zweiten Exon (Position 197 bp relativ zur cDNA). Der gesamte offene Leserahmen hat eine Länge von 9.768 (Exon 2 bis 15) bzw. 8.688 bp (Exon 2 bis 15 ohne Exon 7). Die beiden Isoformen der aus ihnen abgeleiteten pKi-67 Peptid-Sequenzen haben kalkulierte Molekulargewichte von 358.761 Da und 319.508 Da mit isoelektrischen Punkten bei  $pI=9,87$  bzw.  $pI=9,94$ . Die Proteine sollten daher unter physiologischen Bedingungen stark positiv geladen sein; sie enthalten einen hohen Anteil an zufällig verteilten Lysin-Aminosäuren (11,4 %). Der ebenfalls ungewöhnlich hohe Gehalt an zufällig verteilten Prolin-Aminosäuren (8,2 %) lässt vermuten, dass das Protein keine ausgeprägten alpha-helikalen Domänen besitzt. Das von 13. Exon kodierte Zentrum beider Isoformen enthält alle sechzehn aneinandergereihten Ki-67 Tandem-Repetitionen, die zwischen 42 % und 62 % identische Aminosäuren mit der 122 Aminosäuren langen Konsensus-Sequenz aufweisen (vergl. OA 1: Fig.3). Die 22 Aminosäuren der hochkonservierten Ki-67 Motive innerhalb dieser Repetitionen sind zu 71 % bis 100 % identisch. Obwohl es wahrscheinlich ist, dass die Repetitionen durch Tandem-Duplikationen entstanden sind, lässt sich dafür kein Beweis aus den Sequenzen selbst ableiten. Derartige Repetitionen und Motive, die innerhalb der pKi-67 cDNA ungefähr zwei Drittel der gesamten Sequenz bilden, wurden bislang bei keinem anderen Protein beschrieben, mit Ausnahme des aus der in trockenen Halbwüstengebieten lebenden *Kängururatte* isolierten „chmadrin“-Proteins (Takagi et al., 1999), einem möglichen pKi-67 Equivalent dieser Spezies. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Homologien zu bekannten Sequenzen bzw. zu Domänen anderer Proteine gefunden werden (Sequenzvergleich mit den in Gendatenbanken EMBL bzw. GenBank gespeicherten Sequenzen durch das Programm

„BLAST“; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Lediglich eine FHA („Fork-head-associated“) -Domäne konnte mit Hilfe besonderer Suchalgorithmen für Konsensus-Sequenzen in der aminoterminalen Region von pKi-67 zwischen den Aminosäuren 26 und 76 lokalisiert werden (Hofmann & Bucher, 1995). FHA-Domänen wurden in einer Reihe von Proteinen gefunden, die in der Regulation des Zellzyklus involviert sind (z.B. DUN1 und RAD53 Protein Kinase aus *Saccharomyces cerevisiae*). Eine Funktion konnte dieser Domäne aber nicht zugeordnet werden. Auf den beiden Isoformen des Peptids sind außerdem insgesamt zehn Kern-Ziel-Erkennungssequenzen ("nuclear targeting sites") (Chelsky et al., 1989; Silver, 1991) verteilt angeordnet, darunter acht sogenannte "bipartite nuclear targeting sites" (Dingwall & Laskey, 1991), die deutlich zeigen, dass das Ki-67 Protein aktiv in den Zell-Kern transportiert wird. Am C-terminalen Ende der Peptid-Sequenzen wurde eine potentielle ATP/GTP-Bindungsstelle des Motivs A ("P-Loop") identifiziert, die auf eine mögliche Kinase-Aktivität des Ki-67 Proteins hinweist. Über 200 potentielle Phosphorylierungs-Stellen (143 Phosphokinase C-, 89 Caseinkinase II- und zwei Tyrosinkinase-Stellen), 19 N-Myristoylierungs- und drei Amidierungs-Stellen weisen auf eine vermutlich starke post-translationale Modifizierung des Proteins hin. 10 starke und 40 schwache sog. P-E-S-T Sequenzen, die als potentielle Erkennungssequenzen für den Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Abbau kurzlebiger Proteine dienen (Rogers et al., 1986) (vergl. OA 1: Fig. 3), könnten eine Erklärung für die relativ kurze biologische Halbwertszeit und Labilität des Ki-67 Proteins bieten (Bruno & Darzynkiewicz, 1992).

Wie bereits erwähnt, kodiert das zentrale Exon 13 für sechzehn aneinander gereihte Ki-67 Tandem-Repetitionen von ca. 122 Aminosäuren Länge, die jeweils ein stark konserviertes, 22 Aminosäuren langes Ki-67 Motiv enthalten. Das Ki-67 Motiv ist offensichtlich stark immundominant, da es die Epitope des originalen monoklonalen Antikörpers Ki-67, verschiedener Ki-67 äquivalenter monoklonaler Antikörper (Key et al., 1992) sowie einer Reihe neuer monoklonaler Antikörper (MIB-1, MIB-2 und MIB-5) (Key et al., 1993b; Kubbutat et al., 1994) enthält, die durch Immunisierung mit dem rekombinant exprimierten 1092 bp Fragment (vergl. 3.1) hergestellt wurden. Da das Ki-67 Antigen auch in anderen Spezies als *Homo sapiens sapiens* mit Antikörpern gegen das Ki-67 Motiv nachgewiesen wurde (Falini et al., 1989), ist das Ki-67 Motiv wahrscheinlich eine wichtige Struktur zur Einleitung oder Aufrechterhaltung der Mitose in eukaryotischen Zellen. Computer-Vorhersagen der dreidimensionalen Struktur des Ki-67 Motivs, die mit verschiedenen Programmen durchgeführt wurden, ergaben wiederholt eine Alphahelix (OA 1). Die sechzehn Alphahelices der Ki-67 Motive haben eine typisch amphophile Struktur, wie die Anordnung der geladenen und ungeladenen Aminosäuren zeigt: TPKEKAQALEDLAGFKELFQTP (geladene Aminosäuren sind unterstrichen; Epitop-Bereich von Ki-67 {FKEL} bzw. MIB-1



Durch Homologievergleiche (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) der Sequenz: X74107 (vergl. 3.2) mit den in den Gendatenbanken (EMBL; GenBank) gespeicherten Sequenzen konnten mehrere der sog. hoch-repetitiven „Alu“-Kassetten in den folgenden Introns identifiziert werden: drei in Intron 4 (5760-6072 bp), drei in Intron 5 (7850-8164 und 9339-9651 bp) sowie ein kurzer Abschnitt in Intron 11 (15155-15206 bp). Solche Alu-Kassetten kommen relativ häufig in intergenischen Sequenzen des humanen Genoms vor und sind als typisch für alle Primaten beschrieben worden (Schmid, 1996; Schmid, 1998). Weitere Homologien wurden nicht ermittelt. Ein besonderer Bereich von Exon 4 (4645-4984 bp) weist nur einen GC-Gehalt von 11,5 % auf. Dieser Bereich, der fast ausschließlich A- und T-Basen enthält, ist in sich gleichzeitig direkt und invers wiederholt. Wegen der alternierend auftretenden Purin- bzw. Pyrimidin-Basen könnte dieser Bereich die Konformation einer sog. „Z-Form“ DNA annehmen (Vorlickova & Kypr, 1985).

### 3.5 Sequenz-Analysen der 5' flankierenden Region und des Promotors von *pKi-67*

Der Promotor definiert den Ort und die Häufigkeit der Transkription (mRNA-Synthese) eines Gens. Der unmittelbare DNA-Bereich um die Transkriptions-Startstelle bildet bei den Eukaryonten den basalen Promotor, d.h. die Bindungsstellen für die RNA-Polymerase II sowie für „generelle Transkriptionsfaktoren“. Zwischen Position –30 und –25 bp (relativ zur Transkriptions-Startstelle) befindet sich häufig die sog. „TATA“-Box (Konsensus-Sequenz: 5'-TATAAA-3'), ungefähr bei Position –70 bp die sog. „CCAAT“-Box (Konsensus-Sequenz: 5'-GGCCAATCT-3') sowie zwischen –60 bis –100 bp sog. „GC“-Boxen (Konsensus-Sequenz: 5'-GGGCGGG-3') (Bucher & Trifonov, 1986; Bucher, 1990).

Unmittelbar vor dem Transkriptions-Initiationspunkt (vergl. 3.1) von *pKi-67* zwischen Position -1 und -6 befindet sich ein sog. Cap-Signal („cap-signal for transcription initiation“; Konsensus-Sequenz: 5'-C-A-N-C/T-C/T-C/T -3') (Bucher, 1990), dessen Vorhandensein ein wichtiges Kriterium für den Startpunkt der Transkription darstellt. Der *pKi-67* Promotor enthält weiterhin wahrscheinlich ein sog. „Inr“-Element (Initiator-Element), da der Vergleich des Transkriptionsstarts des *pKi-67* Gens mit der Konsensus-Sequenz von Inr für Säugetiere (C/T-C/T-A(+1)-N-T/A-C/T-C/T) eine Übereinstimmung von 57 % ergibt. Inr-Regionen können den exakten Startpunkt der Transkription determinieren und zusammen mit TATA-Boxen die Stärke des Kernpromotors modifizieren (Smale, 1997). Die Funktion der Inr-Elemente ist der Funktion der TATA-Box gleichwertig, jedoch in ihrer Funktion nicht vollständig analog. Der basale Promotor von *pKi-67* enthält aber weder eine TATA-Box noch eine sog. CCAAT-Box (vergl. OA 2). Er kann daher zusammenfassend als „TATA<sup>0</sup>Inr<sup>+</sup>“ beschrieben werden.

Ein ca. 1 kbp großer Bereich um die Transkriptions-Startstelle von ca. –550 bis +450 bp ist sehr „GC“-reich (ca. 75 % G bzw. C). Dieser Bereich enthält dementsprechend sehr viele 5'-CG-3' Dinukleotide, die potentielle Methylierungsstellen darstellen und typisch für eukaryontische Promotoren sind („CpG rich islands“). Solche GC-reichen Promotor-Regionen in Abwesenheit von TATA- und CCAAT-Boxen werden normalerweise konstitutiv exprimierten Genen zugeordnet („house keeping genes“) (Hoffman et al., 1990; Hapgood et al., 2001).

Unmittelbar vor der GC-reichen Region des *pKi-67* Promotors, von Position –658 bis –558 bp im 5' Bereich befindet sich eine Alu-Kassette (vergl. 3.4). Durch Sequenz-Vergleiche mit den in der Datenbank „Transfac“ (Wingender et al., 2000) (<http://transfac.gbf.de>) zusammengefassten Konsensus-Sequenzen findet man innerhalb der GC-reichen Region um den Initiationspunkt der Transkription eine Reihe von potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. An mehreren Positionen befinden sich viele Konsensus-Sequenzen zur Bindung des Transkriptionsfaktors NF1 („nuclear factor 1“, CTF, „TGGCA-binding protein“; Positionen: –548, –394, –15, 79, 230 sowie weitere strangabwärts) und des ubiquitären Transkriptionsfaktors SP1 („GC-box binding trans-acting transcription factor 1“; wichtigste Positionen: –203 –194, –182, –126, –99, –42), der bei der Aktivierung vieler eukaryotischer und viraler Promotoren eine Rolle spielt (Dyran & Tjian, 1983). SP1 gehört zu den C2H2-Typ Zinkfingerproteinen, deren DNA-bindende Domäne drei tandemartig sich wiederholende Zinkfinger-Motive aufweist. Weitere potentielle Transkriptionsfaktoren sind das zur Tryptophan-Cluster Familie gehörende ETS1 („v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1“; Positionen: –217, –210, +446, +668, +735) und das zu den „Leuzin-Zippern“ gehörende AP1 („Fos/Jun“; Positionen: –194, +58, +769). Ferner wurde an Position –115 eine mögliche Bindungsstelle für USF („upstream stimulating factor) in normaler, strangabwärts gerichteter Orientierung und an weiteren Stellen in umgekehrter Orientierung identifiziert (–31, –18, +77, +104). USF gehört zu den „Helix-Loop-Helix“ [bHLH] Proteinen. Bedeutend könnten auch zwei Konsensus-Sequenzen für MRE („metal response elements“) an Position –11 und –65, eine Konsensus-Sequenz für den Faktor NF kappa b an Position +159 in umgekehrter Orientierung sowie eine potentielle E2A-Bindungsstelle an Position +288 in normaler Orientierung sein.

Am 5'-Ende des 2. Exons im untranslatierten Bereich liegen die sog. „Direct Repeat“ Boxen 1 und 2 von je 24 bp (vergl. OA 2). Sie enthalten je eine TATA-Box in umgekehrter Orientierung. Diese identischen, direkt hintereinander liegenden Boxen liegen aber mehrere hundert Basenpaare strangaufwärts des Transkriptionsstarts. Ob diese Doppel-Box eine regulative Funktion für *pKi-67* besitzt, ist derzeit nicht bekannt.

### 3.6 Diskussion

pKi-67 kann als Protease-sensibles alkalisches Zellkern-Protein mit repetitiven Elementen und einem hohen Gehalt an zufällig verteilten Prolin- (8,2 %) und Lysin-Aminosäuren (11,4 %) beschrieben werden, das in zwei unterschiedlich großen Isoformen auftritt und das wahrscheinlich posttranslational modifiziert wird. pKi-67 ist für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus wahrscheinlich absolut erforderlich. Jede der sechzehn Ki-67 Tandem-Repetitionen enthält ein konserviertes Ki-67 Motiv mit einem amphipilen und wahrscheinlich immundominanten Charakter. Erwähnenswert sind hunderte von potentiellen Phosphorylierungs- und anderen posttranslationalen Modifikations-Stellen sowie eine ATP/GTP Bindungsstelle am C-terminalen Ende. Das Ki-67 Protein akkumuliert von der G<sub>1</sub>-Phase zur Mitose, in der es seine maximale Konzentration in der Zelle erreicht. Unmittelbar nach Abschluss der Mitose erreicht das Ki-67 Protein sein Minimum, während es in ruhenden Zellen nicht nachweisbar ist. Die relativ kurze biologische Halbwertszeit des Proteins kann mit seiner hohen Protease-Sensibilität aufgrund vorhandener Protease-Erkennungssequenzen erklärt werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass das Protein in jedem Zellzyklus *de novo* synthetisiert wird, ohne die Möglichkeit posttranskriptionaler oder posttranslationaler Regulation außer Betracht zu lassen.

Da pKi-67 einen hohen Überschuss an positiv geladenen Aminosäuren aufweist, kann man eine Nukleinsäure-bindende Eigenschaft postulieren. Damit könnte man die beobachtete starke Anfärbung der Nukleoli während der G<sub>1</sub>-Phase erklären, die auf rein elektrostatischer Anziehung von pKi-67 durch *de novo* synthetisierte, negativ geladene rRNA beruhen könnte. Nach der Auflösung der Kernhülle ist pKi-67 überwiegend auf den Chromosomen lokalisiert (vergl. 2.2.3.2). Auch diese Bindung an die Chromosomen könnte auf der elektrostatischen Anziehung von pKi-67 durch die negativ geladene DNA beruhen. Es ist daher aufgrund der Aminosäurezusammensetzung nicht auszuschließen, dass pKi-67 eine Art Matrix der chromosomalen DNA bildet oder sogar zur Kondensation der Chromosomen beiträgt.

## 4 Expression und Regulation von pKi-67 in gastrointestinalen Karzinomen (OA 3 und OA 8)

In zahlreichen retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass die Determinierung der Wachstumsfraktion durch den immunhistologischen Nachweis der pKi-67 Expression für zahlreiche Tumorentitäten tatsächlich ein unabhängiger prognostischer Marker ist (vergl. 2.3). Der MIB-1 Markierungsindex als Maß der Expressionshäufigkeit von pKi-67 in Tumorgewebe findet heute als "Proliferationsmarker" in der Tumordiagnostik eine weitverbreitete Anwendung.

Der ursprünglich zur Darstellung von pKi-67 verwendete monoklonale Antikörper Ki-67 hat aber den entscheidenden Nachteil, dass er ausschließlich bei Gefrierschnitten anwendbar ist. Aus diesem Grund wurde intensiv versucht, alternative mono- oder polyklonale Antikörper zu erhalten, die auch für routinemäßig in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe geeignet sind. Mit konventionellen Methoden war es jedoch nicht gelungen, einen entsprechenden isospezifischen monoklonalen Antikörper zu erhalten. Erst nach der erfolgreichen Klonierung des für pKi-67 kodierenden Gens (vergl. 3.1) konnten rekombinante Teilstrukturen von pKi-67 bakteriell exprimiert und zur Herstellung neuer, isospezifischer mono- bzw. polyklonaler Antikörper gegen pKi-67 verwendet werden. Mit den aus diesen Versuchen hervorgegangenen Antikörpern der MIB-Serie (z.B. MIB-1, MIB-3, MIB-5) (Cattoretti et al., 1992; Key et al., 1993a) (vergl. OA 1) konnte auch routinemäßig archiviertes Gewebe auf die Expression von pKi-67 untersucht werden.

Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Tumorentitäten, ist der MIB-1 Markierungsindex beim kolorektalen Karzinom nicht als prognostischer Marker anerkannt (vergl. 2.3 und Tabelle 1). Es stellt sich die Frage, ob bei Tumorzellen dieser Entität eventuell ein Unterschied zwischen mRNA und Protein-Expression feststellbar ist. Dies wäre anzunehmen, wenn z.B. eine größere Fraktion der Zellen im Zellzyklus in der S/G<sub>2</sub> Phase blockiert wären, weil sich dann die Halbwertszeit des Proteins von weniger als einer Stunde auf 60 Stunden erhöht (vergl. 2.2.2). Da unter diesen Umständen pKi-67 nicht nur in den aktiv proliferierenden Zellen, sondern auch in den blockierten Zellen nachweisbar wäre, könnte dies zu einer falschen Einschätzung der Proliferationsaktivität dieser Tumorzellpopulation führen. Falls sich diese Hypothese als richtig erweisen sollte, könnte sie eine Erklärung dafür sein, warum der MIB-1 Markierungsindex nicht als prognostischer Marker beim kolorektalen Karzinom verwendbar ist.

In zwei unabhängigen Untersuchungen wurde daher mit unterschiedlichen Methoden (vergl. OA 3 und OA 8) die pKi-67 mRNA Expression in kolorektalen Tumoren bestimmt und mit den MIB-1 Markierungsindices korreliert. Der Vergleich von mRNA und Proteinexpression sollte grundsätzlich Rückschlüsse auf die Regulation von pKi-67 in kolorektalen Karzinomen ermöglichen.

#### **4.1 Bestimmung der *pKi-67* mRNA Expression durch quantitative PCR und Korrelation mit dem MIB-1 Markierungsindex**

Mit der quantitativen RT-PCR (qPCR) steht eine einfache, routinemäßig einsetzbare Methode zur Bestimmung der Expression der *pKi-67* mRNA zur Verfügung. Gegenüber dem Northern Blot erfordert die qPCR keine radioaktiven Isotope und ist wesentlich sensitiver. Unter Verwendung eines exogenen homologen Standards und eines ELISA-Quantifizierungssystems wurde eine schnelle und kostengünstige Methode zur Bestimmung der *pKi-67* Expression in Tumorgeweben etabliert.

##### **4.1.1 Konstruktion eines exogenen homologen Standards und Quantifizierung der *pKi-67* mRNA**

Als qPCR-Standard wurde ein DNA-Fragment verwendet, das bei gleicher Länge und sonst identischer Sequenz gegenüber der nativen cDNA eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle (*HindIII*) aufweist. Dieser Standard wurde durch gezielten Einzelbasenaustausch („site-directed mutagenesis“) mit Hilfe der zweistufigen („nested“) PCR unter Verwendung von drei Primern und eines klonierten 1037 bp *pKi-67* cDNA Fragmentes als Template hergestellt und in den Vektor (PCRII; 3,9 kbp) kloniert (vergl. OA 3). Das resultierende Plasmid wurde mittels Sequenzierung überprüft und in einer definierten Konzentration der kompetitiven PCR zugesetzt.

In der qPCR wurde eine definierte Menge der aus tiefgefrorenem Tumorgewebe isolierten Gesamt-RNA nach reverser Transkription zusammen mit dem exogenen homologen Standard mit wie folgt modifizierten Primern amplifiziert: ein Primer war biotinyliert, der andere enthielt die Konsensus-Sequenz zur spezifischen Bindung an das sog. „GCN4-Protein“. Die PCR-Produkte wurden schließlich mit Hilfe des CAPTA-GENE-GCN4-ELISA (Fa. Pharmacia, Freiburg) quantifiziert. Bei dieser Methode wird das Amplifikat über die GCN4 spezifische Sequenz an das auf der Oberfläche der ELISA-Plattenbodens fixierte GCN4-Protein gebunden. Nach verschiedenen Waschschritten werden die am anderen Ende des gebundenen DNA-Fragmentes befindlichen Biotin-Reste mittels Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase und eines geeigneten Farb-Substrates quantifiziert. Zur Unterscheidung der Produkte aus nativer cDNA und Standard-DNA wurden sowohl *HindIII*-verdaute als auch unverdaute Amplifikate jeweils in Doppelansätzen bestimmt, wobei die Konzentration der verdauten DNA dem Wert der nativen cDNA und die Differenz aus den Konzentrationen der unverdauten und verdauten DNA dem Wert des Standards entsprach. Der Standard-Wert wurde schließlich verwendet, um die Konzentration der nativen cDNA zu normalisieren (vergl. OA 3).

Zur Überprüfung, ob die beschriebene Methode zur Quantifizierung über eine ausreichende Genauigkeit verfügt, wurde eine Verdünnungsreihe (1:1, 1:10, 1:50, 1:100,

1:500 und 1:1000) des amplifizierten Standards hergestellt und in einer Doppelbestimmung im CAPTA-GENE-GCN4-ELISA eingesetzt. Nach der Analyse der Extinktionswerte zeigte sich eine deutlich lineare Korrelation zu den cDNA-Konzentrationen (Pearson-Koeffizient  $r=0,99$ ). Zur Überprüfung der Spezifität der PCR wurde die Sequenz von fünf zufällig ausgewählten Produkten bestimmt.

#### **4.1.2 Korrelation von pKi-67 mRNA Expression und MIB-1 Markierungsindex mit klinischen Parametern sowie untereinander**

Mit Hilfe der dargestellten Methode zur Quantifizierung (vergl. 4.1.1) wurde die pKi-67 mRNA retrospektiv aus dem tiefgefrorenen Tumorgewebe von 25 Patienten bestimmt, die von 1994 bis 1995 in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, wegen eines primären kolorektalen Tumors operiert worden waren. In der Tumorbank der Klinik für Chirurgie waren diese Tumore in flüssigem Stickstoff gelagert. In die Untersuchung eingeschlossen wurden dreizehn weibliche und zwölf männliche Patienten mit einem medianen Alter von 68 Jahren. Der jüngste Patient war 47 Jahre der älteste 80 Jahre alt. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 49 Monate (1 bis 54 Monate). Die postoperative Tumor-Stadieneinteilung nach dem pTNM-Klassifizierungssystem der UICC (Union Internationale Contre le Cancer, Genf, Schweiz) (Hermanek & Sobin, 1987) ergab: fünf Tumore im Stadium I (20 %), sechs im Stadium II (24 %), und jeweils sieben in den Stadien III und IV (je 28 %). Sechzehn Tumore (65 %) waren mäßig ( $G_2$ ) und 9 (35 %) schlecht differenziert ( $G_3$ ). Eine kurative Resektion (R0) erfolgte bei sechzehn Patienten (65 %).

Der mittlere pKi-67 mRNA Gehalt aller untersuchten Tumore betrug 1,09 amol pro  $\mu\text{g}$  isolierter Gesamt-RNA (Median=0,88 amol; Bereich: 0,2 - 4,38 amol). In dem zur Kontrolle ebenfalls untersuchten Tumor-freien Gewebe fanden wir deutlich geringere Werte (Median=0,1; Bereich 0,1 - 0,6 amol). Eine signifikante Korrelation des pKi-67 mRNA Gehaltes wurde mit dem Tumor-Stadium ( $p<0,001$ ), dem Tumor-Invasionsgrad (pT;  $p=0,014$ ), dem Lymphknotenstatus (pN;  $p<0,001$ ) sowie dem Fernmetastasenstatus (pM;  $p=0,004$ ) ermittelt, nicht jedoch zum Tumor-Differenzierungsgrad.

Um festzustellen, ob zwischen dem Gehalt der Tumore an pKi-67 mRNA und der Prognose der Patienten ein Zusammenhang besteht, wurde die Gruppe der Patienten mit pKi-67 mRNA-Konzentrationen gleich oder oberhalb des Medians mit der Gruppe der Patienten mit Werten unterhalb des Medians verglichen. Es zeigte sich, dass die Gruppe von Patienten mit den niedrigen pKi-67 mRNA Konzentrationen ( $<\text{Median}$ ) eine signifikant ( $p=0,014$ ) bessere Überlebensprognose (Kaplan & Meier, 1958) besaß, als die Gruppe der Patienten mit den entsprechend hohen Werten ( $\geq\text{Median}$ ).

Von jeweils denselben Tumorgewebeproben wurden ebenfalls immunhistologisch die Markierungsindices mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1 bestimmt, also das Ver-

hältnis von pKi-67 exprimierenden Tumorzellen zur Gesamtzahl der Tumorzellen (vergl. OA 3). Die MIB-1 Markierungsindices der 25 untersuchten Tumore betragen zwischen 42 % und 84 % bei einem Mittelwert von 60 % (Median= 61 %) und korrelierten signifikant mit dem Tumor-Stadium ( $p < 0,001$ ), dem Tumorinvasionsgrad (pT;  $p = 0,032$ ) dem Lymphknotenmetastasen-Status (pN;  $p < 0,001$ ) sowie dem Fernmetastasen-Status (pM;  $p < 0,001$ ). Zum Tumordifferenzierungs-Grad bestand keine signifikante Korrelation. Ein Vergleich der Überlebensprognose der Gruppe der Patienten mit Indices gleich oder oberhalb des Medians mit der Gruppe der Patienten mit Indices unterhalb des Medians ergab lediglich einen grenzwertig signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,05$ ) zwischen niedrigen Indices und besserer Prognose.

Durch den Vergleich der erhobenen Daten von 25 kolorektalen Karzinomen wurde ermittelt, dass hohe Werte im MIB-1 Markierungsindex ebenso hohen Werten des pKi-67 mRNA Gehaltes gegenüber standen. In Bereichen niedrigerer Werte zeigte sich dieser Zusammenhang dagegen nicht so deutlich. Statistisch ergab sich für alle Werte ein linearer Pearson-Korrelationskoeffizient von  $r = 0,75$ .

#### **4.1.3 Ausblick zur quantitativen pKi-67 PCR in der Diagnostik**

Die verwendete Methode zur Quantifizierung bietet eine einfache und schnelle Möglichkeit, spezifisch den pKi-67 mRNA Gehalt in Gewebeproben zu quantifizieren. Die in einigen Arbeiten erwiesene Korrelation zwischen dem MIB-1 Markierungsindex und der Überlebenszeit wurde für das kolorektale Karzinom nicht hinreichend bestätigt, weil u.a. die sehr geringe Zahl an eingeschlossenen Tumoren keine endgültigen Rückschlüsse zulässt. In der beschriebenen Arbeit konnte aber erstmals gezeigt werden, dass die Bestimmung des pKi-67 mRNA-Gehaltes in kolorektalen Tumoren als prognostischer oder prediktiver Marker in Betracht kommen könnte. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ebenfalls zeigen, dass die pKi-67 mRNA ein besserer Proliferationsmarker ist als das Protein selbst (Tan et al., 1999). Da sich im klinischen Alltag die Tumorthherapie häufig lediglich an der Tumor-Stadieneinteilung orientiert, könnte sich die Bestimmung der Ki-67 Antigen mRNA-Expression zukünftig als wertvolle zusätzliche diagnostische Hilfe erweisen.

#### **4.2 Quantifizierung der pKi-67 mRNA Expression durch *in situ* Hybridisierung mit einer pKi-67 spezifischen Sonde und Korrelation mit dem MIB-1 Markierungsindex**

Neben der Bestimmung der pKi-67 mRNA Expression durch quantitative RT-PCR (qPCR, vergl. 4.1) wurde eine zweite Methode zur Darstellung der pKi-67 mRNA-Expression gewählt, die *in situ* Hybridisierung. Anders als die qPCR ist die *in situ* Hybridisierung eine bildgebende Methode. Sie ist daher in Bezug auf die Auswertung

vergleichbar mit der immunhistologischen Färbung durch monoklonale Antikörper, wie z. B. MIB-1.

#### **4.2.1 *In situ* Hybridisierung mittels spezifischer Sonde für die pKi-67 mRNA**

Zur Herstellung einer spezifischen Digoxigenin- (DIG-) markierten cRNA-Sonde wurde ein 420 bp langes, amplifiziertes Fragment aus Exon 13 der pKi-67 cDNA in einen „Standardvektor“ (pCRII, Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und mit Hilfe des „DIG RNA labelling kits“ (Roche, Mannheim) zur *in vitro* Transkription als Template verwendet. Durch die Verwendung jeweils eines von zwei möglichen Promotoren (T7 bzw. SP6) nach entsprechender Linearisierung des Plasmids durch eine geeignete Restriktionsendonuklease (*Hind*III bzw. *Eco* RV) konnte die Transkriptionsrichtung bestimmt werden. Dadurch konnte entweder eine Sense- oder Antisense-Sonde produziert werden. Die Antisense-Sonde wurde zur Hybridisierung mit der pKi-67 mRNA und die sense-Sonde als Negativkontrolle verwendet.

Die *in situ* Hybridisierung wurde modifiziert nach Höfler (Höfler et al., 1986) durchgeführt (vergl. OA 8). Nach Entparaffinierung, Rehydrierung und weiteren Vorbehandlungsschritten (u.a. Inkubation in 0,2 M HCl, Proteolyse mit Proteinase K, Nachfixierung in Paraformaldehyd und Inkubation in 0,175 % Essigsäureanhydrid in 100 mM Triethanolamin) der Formalin-fixierten, ultradünnen (0,4 µm) Serienschritte wurde die denaturierte, DIG-markierte cRNA-Sonde unter sehr stringenten Bedingungen (54°C, 50 % Formamid) mit den Gewebeschnitten mindestens acht Stunden lang hybridisiert. Im Anschluß an mehrere, ebenfalls sehr stringente Waschschrte, wurde die hybridisierte Sonde mit Hilfe von an „Alkalischer Phosphatase“ konjugierten „Anti-DIG“ monoklonalen Antikörpern (Roche, Mannheim) sowie der Farbreaktion mit NBT/BCIP (4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid / 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat) nachgewiesen.

#### **4.2.2 Korrelation des pKi-67 mRNA *in situ* Hybridisierungsindex und MIB-1 Markierungsindex mit klinischen Parametern sowie untereinander**

Mit Hilfe der dargestellten Methode zur *in situ* Hybridisierung (vergl. 4.2.1) wurde die pKi-67 mRNA retrospektiv aus dem routinemäßig fixierten Tumorgewebe von 47 Patienten bestimmt, die von 1988 bis 1996 in der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, wegen eines primären kolorektalen Tumors operiert worden waren. Es handelte sich um 24 weibliche und 23 männliche Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation zwischen 52 und 87 Jahre (mit einem Median von 69 Jahren) alt waren. Die postoperative Tumor-Stadieneinteilung nach dem pTNM-Klassifizierungs-System der UICC ergab: acht Tumore im Stadium I (17 %), dreizehn im Stadium II (28 %), zehn im Stadium III (21 %), und sechzehn im Stadium

IV (34 %). 27 Tumore (57 %) waren mäßig (G<sub>2</sub>) und 20 (43 %) schlecht differenziert (G<sub>3</sub>). Eine kurative Resektion (R<sub>0</sub>) erfolgte bei 29 Patienten (62 %). Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 73 Monate (1 bis 170 Monate).

Die Auswertung der 47 Tumor-Gewebeproben ergab einen mittleren *pKi-67 in situ* Hybridisierungsindex der Tumorzellen von 42 % (Median=42 %; Bereich: 9 % – 79 %). Der mittlere MIB-1 Markierungsindex der Tumorzellen lag mit 60 % (Median=59 %; Bereich: 26 % – 94 %) vergleichsweise deutlich höher. Aus diesem Grund konnte auch keine sehr gute Korrelation der Werte untereinander festgestellt werden (linearer Pearson-Korrelationskoeffizient  $r=0,105$ ). Während für 32 Patienten (68 %) die Abweichung beider Indices maximal 30 % ausmachte, war der MIB-1 Markierungsindex bei 15 Patienten (32 %) mehr als 30 % größer als der *pKi-67 in situ* Hybridisierungsindex (vergl. OA 8: Fig. 1).

Es wurde versucht, beide Indices mit den verfügbaren klinischen Parametern zu korrelieren. Eine signifikante Korrelation des *pKi-67 in situ* Hybridisierungsindex wurde weder mit dem Alter, Geschlecht, Tumor-Stadium, Tumor-Differenzierungsgrad, noch der pT-, pN- bzw. pM-Kategorie festgestellt. Der MIB-1 Markierungsindex korrelierte lediglich mit dem Tumor-Differenzierungsgrad ( $p=0,024$ ). 25 Patienten (53 %) verstarben innerhalb der Nachbeobachtungszeit. Um festzustellen, ob zwischen den Indices und der Prognose der Patienten ein Zusammenhang besteht, wurde für beide Indices jeweils die Gruppe der Patienten mit Indices gleich oder oberhalb des Medians mit der Gruppe der Patienten mit Indices unterhalb des Medians verglichen (Kaplan & Meier, 1958). Es zeigte sich für beide Indices kein signifikanter Unterschied (vergl. OA 8: Fig. 3 und 4). Überraschenderweise ergab aber der Vergleich der Gruppe von fünfzehn Patienten mit mehr als 30 % Unterschied zwischen beiden Indices mit der Gruppe von 32 Patienten mit kleinerer Differenz eine signifikant bessere Prognose ( $p=0,012$ ) für die erste Gruppe (vergl. OA 8: Fig. 5). Bezogen auf die ausschließlich kurativ resezierten Patienten ergibt sich ebenfalls eine signifikant bessere Prognose ( $p<0,05$ ) für die erste Patientengruppe mit der hohen Differenz der Indices ( $>30\%$ ). Die mediane Überlebenszeit dieser Patientengruppe betrug 151 Monate gegenüber 78 Monaten für die Patienten der zweiten Gruppe mit kleinerer Differenz der Indices.

#### **4.2.3 Schlussfolgerungen aus dem Vergleich des pKi-67 mRNA *in situ***

##### **Hybridisierungsindex mit dem MIB-1 Markierungsindex**

Die verwendete Methode der *in situ* Hybridisierung ist als bildgebendes Verfahren geeignet, die Expression von pKi-67 mRNA darzustellen. Auch für die in dieser Studie untersuchten Tumore konnte für das kolorektale Karzinom keine Korrelation des MIB-1 Markierungsindex bzw. des pKi-67 mRNA *in situ* Hybridisierungsindex mit der Prognose der Patienten festgestellt werden. Die eingangs dieser Untersuchung gestellte

Frage (vergl. 3), ob bei kolorektalen Tumorzellen zwischen mRNA und Protein-Expression eventuell ein Unterschied besteht, konnte für ungefähr jeden dritten Patienten positiv beantwortet werden. Das bedeutet, dass pKi-67 in den Tumorzellen dieser Patienten nachweisbar ist, obwohl eindeutig keine *de novo* Synthese von pKi-67 stattgefunden haben konnte. Bei einer Halbwertszeit des Proteins von normalerweise weniger als einer Stunde (vergl. 2.2.2) ist dies aber praktisch nicht möglich. Da in Zellzyklus-blockierten Zellen die Halbwertszeit auf bis zu 60 Stunden ansteigt (van Oijen et al., 1998), ist es naheliegend zu vermuten, dass bei diesen Tumorzellen ebenfalls der Zellzyklus blockiert gewesen sei könnte. In der Konsequenz werden bei der immunhistologischen Markierung mehr Zellen pKi-67 positiv gezählt, als tatsächlich aktiv proliferieren. Damit würde die Wachstumsfraktion nicht zuverlässig ermittelt werden. Für einen Teil der Patienten würde also eine schlechtere Prognose erwartet werden als tatsächlich gerechtfertigt wäre. Die Daten dieser Studie belegen ebenso wie zahlreiche andere Veröffentlichungen zur prognostischen Relevanz beim kolorektalen Karzinom (Kubota et al., 1992; Ofner et al., 1996; Baretton et al., 1996; Kyzer & Gordon, 1997; Jansson & Sun, 1997; De Jong et al., 1998; Handa et al., 1999; Buglioni et al., 1999; Mairinger et al., 1999; Brown & Gatter, 2002; Allegra et al., 2003), dass der MIB-1 Markierungsindex keine oder sogar eine negative Korrelation zur Überlebensrate aufweist. Durch die Kombination des MIB-1 Markierungsindex mit dem pKi-67 *in situ* Hybridisierungsindex wäre es aber grundsätzlich möglich, Karzinome mit Zellzyklus-arretierten Tumorzellen zu identifizieren. Aufgrund der festgestellten günstigen Prognose der Patientengruppe mit diesem Tumorzelltyp würde sich ggf. der höhere Aufwand lohnen, weil therapeutische Maßnahmen so u. U. individuell besser abgestimmt werden könnten.

### 4.3 Diskussion

Mit Hilfe der hier zusammengefassten Arbeiten wurden mehrer Ziele verfolgt. Neben der Frage der prognostischen Relevanz von mRNA- und Proteinexpression des *pKi-67* Gens sollte anhand der kolorektalen Tumore untersucht werden, ob neben der transkriptionalen Regulation von pKi-67 grundsätzlich andere Mechanismen eine wichtige Rolle spielen könnten. Insbesondere mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte dazu ein interessantes Ergebnis festgestellt werden. Da keiner der 47 untersuchten kolorektalen Tumoren signifikant häufiger pKi-67 mRNA exprimierte als das Protein, kann eine posttranskriptionelle Regulation praktisch ausgeschlossen werden. Damit werden andere Untersuchungen bestätigt, die die ausschließliche Regulation dieses Gens über die *de novo* Transkription bzw. die Degradation über für den Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Abbauweg kurzlebiger Proteine (Rogers et al., 1986) beschrieben haben

(vergl. 2.2.2). Die Möglichkeiten der posttranslationalen Modifikation und Regulation von pKi-67 bleiben hiervon jedoch unberührt (vergl. 3.3).

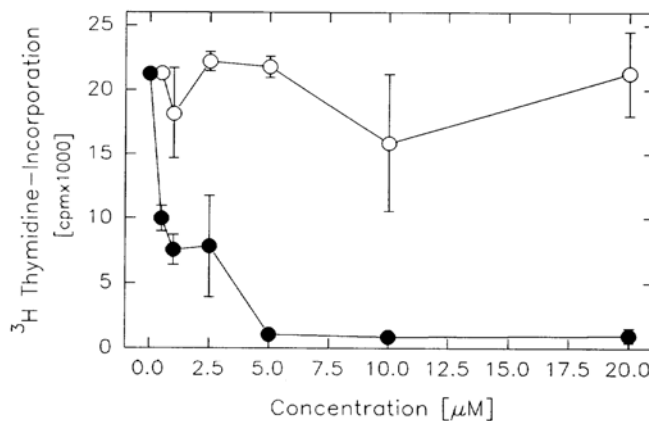
## 5 Untersuchungen zur Funktion von pKi-67 (OA 4 bis OA 7)

Obwohl - wie bereits ausführlich dargelegt – pKi-67 mit zellbiologischen und immunchemischen Methoden sehr gut charakterisiert (vergl. 2), die primäre Struktur aufgeklärt (vergl. 3) und das Expressionsverhalten in Tumorzellen erforscht war (vergl. 4), blieb die exakte Funktion dieses Proteins weiterhin unbekannt. Das größte Problem bei der Erforschung von pKi-67 sind seine Größe und Instabilität. Deshalb lag es nahe zu versuchen, die Funktion von pKi-67 indirekt mit Hilfe von molekularbiologischen und biochemischen Methoden aufzuklären. Zuerst wurde untersucht, welche Veränderungen bezüglich der Zellproliferation eintreten, wenn die Expression von pKi-67 inhibiert wird bzw. wenn rekombinante Teilstrukturen von pKi-67 in den Zellen exprimiert werden. Die Identifizierung von Proteinen, die mit pKi-67 interagieren, sollte dann dazu dienen, ein genaueres Bild der Funktion von pKi-67 zu ermitteln.

### 5.1 Inhibition der Zellteilung durch Antisense-Oligonukleotide

Die Abhängigkeit des Zellzyklus von der Expression des Ki-67 Proteins wurde erstmals mit Hilfe der  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation in IM9-Zellen untersucht, die zuvor mit Sense- bzw. Antisense-Oligonukleotiden (0,5 bis 20  $\mu\text{M}$ ) inkubiert wurden. Die Oligonukleotide waren spezifisch für die ersten 20 kodierenden Basen der pKi-67 mRNA. Die  $^3\text{H}$ -Thymidin Inkorporation wurde Dosisabhängig von den Antisense- nicht aber von den Sense-Oligonukleotiden inhibiert (vergl.

OA 1 und Abbildung 5). Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch die Arbeit anderer Autoren bestätigt (Maeshima et al., 1996; Kausch et al., 2003). Aus diesen Erkenntnissen wurde geschlossen, dass die Expression von pKi-67 eine wichtige Voraussetzung oder sogar **absolute Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus** ist (vergl. OA 1).



**Abbildung 5: pKi-67-Antisense Inhibition.** IM-9 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen eines pKi-67 spezifischen Antisense-Oligonukleotids (bp 197-218) (●) bzw. dazu komplementären Sense-Oligonukleotids (○) sowie  $0,5\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert. Dargestellt ist die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Inkorporation der Zellen. (aus OA\_1: Fig. 7)

## 5.2 Inhibition der Zellteilung durch Antisense-RNA exprimierende Plasmide

Für die Durchführung von Expressionsstudien mit Antisense-RNA wurde der durch Tetracyclin regulierbare Expressionsvektor pTRE der Firma Clontech (Heidelberg) gewählt, in den ein kurzes N-terminales Teilstück von pKi-67 in Antisense-Orientierung kloniert wurde (Fragment „AS“, vergl. OA 5: Fig. 1). Dieser Vektor wurde in HeLa (HT-OFF) Zellen transient transfiziert, die das Tetracyclin-Regulator-Plasmid „pTet OFF“ permanent enthielten. In Tetracyclin-freiem Medium exprimierten die transfizierten Zellen für 48 Stunden die Antisense-Plasmide, während durch die Zugabe von Tetracyclin bzw. Doxycyclin die Expression unterdrückt wurde (vergl. OA 4 und OA 5). Um die Effekte des in das Plasmid klonierten Fragmentes zu ermitteln, wurden Zellen mit und ohne Expression jeweils miteinander verglichen. Mit Hilfe der RT-PCR wurde festgestellt, dass nach Inkubation mit Tetracyclin bzw. Doxycyclin die Antisense-RNA Expression allerdings nicht vollständig zu unterdrücken war. Die Expression der nativen pKi-67 mRNA und des Proteins konnte durch Expression der Antisense-RNA zwar deutlich reduziert, jedoch nicht ganz ausgeschaltet werden (vergl. OA 4: Fig. 5 und 6 sowie OA 5: Fig. 3). Die mittels Immunhistologie untersuchte Protein-Expression ergab interessanterweise, dass nicht die Anzahl der gefärbten Zellen, sondern die Färbeintensität innerhalb der Kerne abnahm. Es zeigte sich, dass Antisense-RNA exprimierende HT-OFF Zellen das Nukleotid-Analogon BrdU (Brom-Deoxyuridin) in erheblich geringerem Maß in die sich replizierende DNA einbauten als die mit Doxycyclin blockierten Kontrollen (vergl. OA 4: Fig. 3). Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analysen ergaben, dass die Inhibition der pKi-67 Expression in HeLa-Zellen durch die Antisense mRNA produzierenden transient transfizierten Plasmide zu einer Verringerung von Zellen führte, die sich in der S-Phase befanden (vergl. OA 4: Fig. 4 sowie OA 5: Fig. 2). Diese Ergebnisse bestätigen allgemein die Inhibition der Zellteilung durch pKi-67 spezifische Antisense-Oligonukleotide (vergl. 5.1). Der verminderte BrdU-Einbau deutet auf eine verlangsamte bzw. unterbrochene DNA-Replikation hin, also auf eine Verlangsamung bzw. Inhibition des Zellzyklus in der späten G<sub>1</sub>-, der frühen S-Phase und/oder beim Übergang von der S- zur G<sub>2</sub>/M-Phase. Eine Akkumulation von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase könnte dagegen allein mit einer Blockierung des Übergangs von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase erklärt werden. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse vermuten, dass pKi-67 eine wichtige Rolle beim Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase, sowie zur Komplettierung der S-Phase haben könnte.

### 5.3 Expression rekombinanter Teilstrukturen von pKi-67

In das Tetracyclin-regulierbare Plasmid pTRE (vergl. 5.2) wurden ebenfalls vier verschiedene Teilstrukturen der cDNA von pKi-67 kloniert und in HT-OFF Zellen für 48 Stunden transient (vergl. OA 4 und OA 5) bzw. stabil exprimiert (vergl. OA 6). Um eine korrekte Expression zu ermöglichen, wurden die rekombinanten pKi-67 Fragmente am 5' Ende durch ein Translations-Initiierungssignal (Kozak-Sequenz) und am 3' Ende durch ein Stopp-Kodon ergänzt. Zusätzlich wurde zu jedem Fragment ein weiteres Fragment konstruiert, das eine Erkennungssequenz zum gezielten Kern-Transport (Kern-Transportsignal) vor dem Stopp-Kodon enthielt. Mit Hilfe dieser Kern-Transportsignale werden Proteine effektiv vom Zytoplasma in den Kern transportiert. Die Unterteilung des pKi-67 Gens in diverse Teilstrukturen war notwendig, da die gesamte cDNA für Expressionsstudien überproportional groß ist. Die Teilstücke wurden entsprechend des Aufbaus von pKi-67 wie folgt ausgewählt (vergl. OA 5: Fig. 1A bzw. OA 6: Fig. 1A): ein repräsentativer Teil des zentralen Exons 13 mit drei von sechzehn homologen Tandem-Repetitionen (Fragment „3R“), jeweils das N- (Fragment „N“: vom Startkodon in Exon 2 bis Exon 12, aber ohne Exon 7) bzw. C- terminale Ende (Fragment „C“: von Exon 14 bis zum Stoppkodon in Exon 15) sowie das 1080 bp große, alternativ gespleißte Exon 7 (Fragment „7“).

Die korrekte Expression der pKi-67 Teilstrukturen wurde mit Hilfe von cDNA-Amplifikation (PCR; vergl. OA 4: Fig. 1 und OA 5: Fig. 1B) bzw. Immunblots (vergl. OA 4: Fig. 2, OA 5: Fig. 1C und OA 6: Fig. 1C) überprüft. Wie schon zuvor beschrieben (vergl. 5.2), wurde auch hier festgestellt, dass nach Inkubation mit Tetracyclin bzw. Doxycyclin die Expression der Teilstrukturen nicht immer vollständig zu unterdrücken war.

#### 5.3.1 Expression von drei „Ki-67 Tandem-Repetitionen“ aus Exon 13

Die transiente bzw. stabile Expression der drei Ki-67 Tandem-Repetitionen aus Exon 13 ohne Kern-Transportsignal (Fragment „3Rs“; vergl. OA7: Fig.1) führte zu einer Akkumulation des rekombinanten Proteins im Zytoplasma (vergl. OA 4 bis 8). Die Expression des endogenen pKi-67 wurde durch die Expression der drei Ki-67 Tandem-Repetitionen im Zytoplasma teilweise noch wirksamer herunterreguliert als nach der Expression der Antisense-RNA (vergl. 5.2). Dies wurde durch RT-PCR, immunhistologisch mit MIB-1 und anhand von Immunblots ermittelt (vergl. OA 4: Fig. 5 und 6, OA 5: Fig. 3 sowie OA 6: Fig. 2A). Auch BrdU wurde in erheblich geringerem Maß in die sich replizierende DNA eingebaut (vergl. OA 4: Fig. 3). Die durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analysen ergaben ebenfalls, dass die Expression der drei Ki-67 Tandem-Repetitionen zu einer Abnahme von Zellen führte, die sich in der S-Phase befanden (vergl. OA 4: Fig.4 und OA 5: Fig. 2).

Wie zu erwarten, führte die Expression der rekombinanten Repetitionen mit Kern-Transportsignal (Fragment „3Rn“; vergl. OA7: Fig.1) zu einer vergleichsweise geringen Akkumulation im Zytoplasma. Überraschenderweise wurden aber keine Kerne mehr durch MIB-1 markiert (vergl. OA 6: Fig. 2B und 2C), d.h. im Kern konnte kein immunhistologischer Nachweis des Antigens mit MIB-1 durchgeführt werden, obwohl dieser monoklonale Antikörper eigentlich sowohl endogenes pKi-67 als auch die in den Kern transportierte rekombinante Teilstruktur binden sollte (vergl. OA 6: Fig. 1A). Dagegen war endogenes wie rekombinantes pKi-67 im Immunblot mit MIB-1 unverändert im Kern nachweisbar (vergl. OA 6: Fig. 1B und 1C). Auch mit Hilfe der pKi-67 spezifischen monoklonalen Antikörper MIB-2, MIB-13 und MIB-21, die das endogene pKi-67 in anderen Regionen binden als MIB-1 (vergl. OA 6: Fig. 1A), konnte das endogene pKi-67 jedoch unvermindert immunhistologisch nachgewiesen werden (vergl. OA 6: Fig. 2A und 3). Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach der Expression der Antisense-RNA (vergl. 5.2) und der drei Tandem-Repetitionen ohne Kern-Transportsignal (s.o.) wurde durch die Expression der drei Ki-67 Tandem-Repetitionen mit Kern-Transportsignal die Expression von endogenem pKi-67 nicht oder in einem weit geringerem Maß herunterreguliert. Dies wurde mittels RT-PCR, immunhistologisch mit MIB-2, MIB-13 und MIB-21 und anhand von MIB-1 Immunblots gezeigt (vergl. OA 5: Fig. 3 sowie OA 6: Fig. 1C, 2A und 3). Während BrdU wiederum in deutlich geringerem Maß in die sich replizierende DNA eingebaut wurde (Zingler, 1997), ergaben durchflusszytometrische Zellzyklus-Analysen, dass der Anteil von Zellen in der S-Phase in diesem Fall weniger stark abnahm (vergl. OA 5: Fig. 2).

Die festgestellte Hemmung der endogenen pKi-67 Expression durch die transiente Expression der drei Ki-67 Tandem-Repetitionen aus Exon 13 ohne Kern-Transportsignal lässt sich möglicherweise damit erklären, dass eine gegenseitige Bindung beider Proteine innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (Ross, 1998) den Transport in den Kern behindert oder dass die repetitiven Strukturen des rekombinanten Proteins mit den für die Faltung von pKi-67 verantwortlichen Chaperonen kompetitiv interagieren und die Reifung des nativen pKi-67 behindern. Da diese Hemmung bei der Expression der drei Ki-67 Tandem-Repetitionen aus Exon 13 mit Kern-Transportsignal marginalisiert war, ist die letztere Vermutung eher zu verwerfen. Dagegen deutet die Nichtnachweisbarkeit des endogenen pKi-67 durch MIB-1 auf eine Maskierung des MIB-1 Epitopes im Kern hin, vermutlich ebenfalls durch eine Protein-Interaktion der rekombinanten pKi-67 Teilstruktur mit dem entsprechenden Abschnitt des endogenen Proteins. Des Weiteren könnte auch eine Störung der posttranslationalen Modifikationen, z.B. eine Phosphorylierung des MIB-1 Epitopes, zur Nichtanfärbbarkeit im Kern beitragen. Da es auch in Tumorzellen gelegentlich zu einer massiven Akkumulation von endogenem pKi-67 im Kern kommt (vergl. OA 3 und 10), wurde die Hypothese aufgestellt, dass die

beobachtete Nichtanfärbbarkeit auch bei immunhistologisch gefärbten Dünnschnitten von Tumorgewebe auftreten könnte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden retrospektiv Dünnschnitte von routinemäßig fixierten Proben kolorektaler Karzinome mit den für pKi-67 für unterschiedliche Domänen spezifischen monoklonalen Antikörpern MIB-1 und MIB-21 markiert. Die jeweiligen Markierungsindices wurden ermittelt und miteinander verglichen. Bei einem Teil (ca. 10 %) der untersuchten Karzinome wurde tatsächlich ein signifikanter Unterschied bei der Ermittlung der Ki-67 Markierungsindices durch MIB-1 bzw. MIB-21 festgestellt (vergl. OA 6: Fig. 5). Dieses Ergebnis bestätigt daher, dass bei massiver Überexpression von pKi-67 bzw. der rekombinanten pKi-67 Tandem-Repetitionen die Epitope, an die MIB-1 spezifisch bindet, im Zellkern grundsätzlich maskiert oder modifiziert werden können, so dass MIB-1 nicht mehr daran binden kann.

Dieses Ergebnis könnte eine zusätzliche Erklärung dafür geben, warum der MIB-1 Markierungsindex beim kolorektalen Karzinom häufig keine oder sogar eine negative Korrelation zur Überlebensrate aufweist (vergl. 4.2.3). Als Konsequenz wäre die Empfehlung abzuleiten, die Ermittlung des MIB-1 Markierungsindex beim kolorektalen Karzinom durch weitere Untersuchungsmethoden, z.B die immunhistologische Färbung mit MIB-21 oder die pKi-67 *in situ* Hybridisierung (vergl. 4.2) zu ergänzen.

### **5.3.2 Expression des N-terminalen Endes (Exons 2 bis 12 ohne Exon 7), des C-terminalen Endes (Exons 14 und 15) und von Exon 7**

Die transienten Expressionen der N- bzw. C-terminalen Enden sowie von Exon 7 wurden analog zur Expression der Ki-67 Tandem-Repetitionen entweder ohne (Fragmente „Ns“, „Cs“, „7s“) oder mit (Fragmente „Nn“, „Cn“, „7n“) zusätzlichem Kern-Transportsignal durchgeführt. Mit Hilfe von RT-PCR und Immunblot wurde die korrekte Expression der Fragmente auf der mRNA- bzw. Protein-Ebene überprüft (vergl. OA 5: Fig. 1B und 1C).

Vergleichbar mit der Expression der drei pKi-67 Tandem-Repetitionen ohne Kern-Transportsignal (Fragment 3Rs), wurde die native pKi-67 mRNA von den Fragmenten Nn, Ns und Cn vollständig und von dem Fragment Cs schwach herunterreguliert. Diese Effekte konnten auch auf Proteinebene bestätigt werden, da die Banden der entsprechenden Fragmente im Immunblot deutlich schwächer angefärbt wurden (vergl. OA 5: Fig. 3). Dagegen beeinflussten die Fragmente 7s und 7n die native pKi-67 Expression nicht oder nur in geringfügigem Maß, genauso wie es schon zuvor für die drei pKi-67 Tandem-Repetitionen mit Kern-Transportsignal (Fragment 3Rn) beschrieben wurde (vergl. 5.3.1).

Die durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analysen ergaben, dass die Expression der Fragmente Nn, Ns, Cn und Cs genauso wie die Expression der Antisense-RNA (Frag-

ment AS; vergl. 5.2) und des Fragmentes 3Rs (vergl 5.3.1) zu einer Abnahme von Zellen führten, die sich in der S-Phase befanden (vergl. OA 5: Fig. 2). Lediglich die Fragmente 7s und 7n zeigten vergleichbar mit dem Fragment 3Rn geringen Einfluss auf die Verteilung der Zellen im Zellzyklus. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse bezüglich der nativen pKi-67 Expression und dem Einfluss auf den Zellzyklus lassen eine funktionelle Beziehung dieser Ereignisse wahrscheinlich erscheinen.

#### **5.4 pKi-67 und Apoptose**

Der zuvor beobachtete Effekt von pKi-67 auf den Zellzyklus (vergl 5.2 und 5.3) legte die Vermutung nahe, dass pKi-67 auch einen Einfluss auf den programmierten Zelltod (Apoptose) haben könnte, da die Apoptose, verallgemeinert, auf dem Wiedereintritt in den Zellzyklus beruht. Aus diesem Grund wurden mit den Fragmenten AS, Ns, Nn, 7s, 7n, 3Rs, 3Rn, Cs und Cn transient transfizierte HT-OFF Zellen mit FITC-markierten spezifischen Antikörpern gegen das Spaltungsprodukt der Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) markiert (vergl. OA 5) und durchflusszytometrisch analysiert. PARP ist ein 116 kDa großes Kernprotein, dass durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird (Germain et al., 1999). Während der Apoptose wird PARP von den Caspasen 3 und 7 in je ein 85 kDa und 25 kDa großes Fragment gespalten.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen ergab, dass allein die Zugabe des Doxycyclins als Transkriptionsblocker der verwendeten Plasmide die Apoptoserate der transfizierten Zellen innerhalb von 48 Stunden um ca. 10 % erhöhte (vergl. OA 5: Fig.4). Mit Ausnahme der Fragmente AS und 7n ergab die Transkription der meisten pKi-67 Teilstrukturen eine verringerte Apoptoserate. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression dieser Fragmente den apoptotischen Effekt von Doxycyclin auf diese Zellen teilweise oder ganz neutralisiert, also dass sie einen anti-apoptotischen Effekt haben. Da die Inhibition der nativen pKi-67 Expression durch Antisense-RNA (Fragment AS) keinen Netto-Einfluss auf die Zu- oder Abnahme apoptotischer Zellen hat, ist ein direkter Einfluss von nativem pKi-67 auf den programmierten Zelltod eher unwahrscheinlich. Auf indirektem Wege könnte pKi-67 aber durchaus für den Fortgang der Apoptose erforderlich sein. Aufgrund der Verwendung der PARP-Methode zur Apoptose-Bestimmung, könnte ein direkter Zusammenhang mit der gleichzeitig festgestellten Verringerung von S-Phase Zellen (vergl. 5.3.1 und 5.3.2) bestehen.

Zusammengefasst zeigten alle exprimierten pKi-67 Fragmente, die die Zellzyklusverteilung beeinflussten, einen leichten anti-apoptotischen Effekt, nicht jedoch das Antisense-Konstrukt. Eine ander Arbeitsgruppe ermittelte dagegen, dass Zellen, deren pKi-67 Expression durch Antisense-Oligonukleotide inhibiert war, eine erhöhte Apoptoserate aufwiesen und dass apoptotische Zellen grundsätzlich kein pKi-67 ent-

hielten (Kausch et al., 2003). Weitere Versuche müssen daher noch klären, inwieweit pKi-67 tatsächlich Einfluss auf die Apoptose hat.

### **5.5 pKi-67 in Zellen mit hohem Protein-Umsatz**

Wie beschrieben, ist es möglich, pKi-67 in Zellzyklus-arretierten Zellen nachzuweisen (vergl. 4.2.3). Zwar wurde stets ausgeschlossen, dass ruhende bzw. differenzierte Zellen pKi-67 exprimieren, es gibt aber zahlreiche Hinweise, dass pKi-67 als ribosomaler Katalysator wirken könnte (MacCallum & Hall, 2000b). Die Identifizierung von Interaktionspartnern, die mit dem Nukleolus assoziiert sind (vergl. 5.6 und OA 7), sowie die Lokalisierung von pKi-67 im Nukleolus - dem Ort der Ribosomen-Assemblierung - während der Interphase (vergl. Abbildung 2) untermauern, dass pKi-67 in den Lebenszyklus der Ribosomen involviert sein könnte. Die Hypothese, dass pKi-67 die Zahl der Ribosomen pro Zelle beeinflussen könnte und damit die Proteinproduktion allgemein, sollte daher an differenzierten Zellen mit hohem Protein-Umsatz überprüft werden, die demzufolge pKi-67 in den Nukleoli enthalten sollten. Zu diesem Zweck wurde Pankreas- und Kolon-Gewebe sowie Knochenmarkzellen immunhistologisch untersucht. Nach entsprechender Identifizierung der sekretorischen Zellen konnten aber weder die Nukleoli noch andere Zellkompartimente dieser Zellen mit MIB-1 markiert werden (vergl. OA 5: Fig. 5). In den Nukleoli differenzierter Zellen mit hohem Proteinumsatz konnte demzufolge ebenfalls kein pKi-67 nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass pKi-67 in differenzierten Zellen zur Ribosomen-Assemblierung nicht erforderlich ist.

### **5.6 Identifizierung von Proteinen, die mit pKi-67 interagieren**

Ein genaueres Bild über die Funktionen von pKi-67 im Zellzyklus könnte man wahrscheinlich erhalten, wenn im Detail bekannt wäre, mit welchen anderen Proteinen pKi-67 *in vivo* interagieren kann. Aus diesem Grund wurde versucht, über ein Genbank-„Screening“ mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems Interaktionspartner von pKi-67 zu identifizieren.

#### **5.6.1 Genbank-„Screening“ mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems**

Als „Target“ wurden Teilstrukturen von pKi-67 eingesetzt. Diese Fragmentierung war wegen der Größe der cDNA erforderlich und erlaubte außerdem ein differenzierteres Vorgehen als die Klonierung der gesamten cDNA. Allerdings wurde dadurch das „Screening“ der Genbank („Matchmaker“; Clontech, Heidelberg) entsprechend aufwendiger. Die gesamte pKi-67 cDNA wurde in folgenden vier Teilstücken in den Targetvektor „pAS2.1“ des Hefe 2-Hybrid Systems II der Firma Clontech (Heidelberg) kloniert (vergl. OA 7: Fig. 1A):

- a) drei der „Ki-67 Repeats“ aus Exon 13 (Fragment „3R“)
- b) der N-terminale Bereich der kurzen „Splicing“-Variante (Fragment „N“: vom Startkodon in Exon 2 bis Exon 12, aber ohne Exon 7)
- c) Exon 7 (Fragment „7“)
- d) der C-terminale Bereich (Fragment „C“: von Exon 14 bis zum Stoppkodon in Exon 15)

Zusammen repräsentieren diese Fragmente nahezu die komplette cDNA von pKi-67. Nachdem die im „Matchmaker“-Genbankvektor „pGAD GH“ klonierte cDNA aus HeLa-Zellen für jedes der vier Teilstücke 1,5 bis 3 mal (entsprechend  $0,9$  bis  $1,8 \times 10^7$  unabhängigen Klonen) primär „gescreent“ worden war, wurden insbesondere für die Teilstruktur 3R aus Exon 13 eine Vielzahl von Klonen als putative Bindungspartner isoliert und sequenziert. Die tandemartig angeordneten Ki-67 Repetitionen sind für ein breites Spektrum an Interaktionen prädestiniert, da sie u.a. die immundominanten, alphahelikalen Ki-67 Motive enthalten (vergl. 3.1, 3.3 und 3.6). Aufgrund der großen Anzahl (ca. 170) wurden die putativen Bindungspartner je nach ihrer Funktion einer der folgenden Gruppen zugeordnet: DNA-Helikasen, Zellzyklus-Proteine, signaltransduzierende Proteine sowie ribosomale Proteine.

Alle o.g. putativen Bindungspartner wurden über ein zusätzliches Verfahren („Mating“; vergl. OA 7) verifiziert sowie einer weiteren unabhängigen Überprüfung unterzogen. Nach Retransformation aller Plasmide wurden die jeweiligen Bindungsstärken zwischen pKi-67 und den identifizierten Proteinen in den Hefezellen über die Expression des Reportergens *lacZ* quantifiziert (vergl. OA 7: Fig. 1B, 1C und 1D). Dadurch konnten Proteine mit signifikanter Bindung an die pKi-67 Teilstrukturen für eingehendere Untersuchungen ausgewählt werden (vergl. OA 7: Tab. 1).

Die Bindung der Serin/Threonin Kinasen Pak2, S6-Kinase und Caseinkinase II an das Fragment 3R sind besonders erwähnenswert, da pKi-67 während des Zellzyklus in hohem Maß an den Aminosäuren Serin/Threonin bzw. Tyrosin phosphoryliert wird (MacCallum & Hall, 1999; Endl & Gerdes, 2000b). Als ein möglicher Antagonist zu den Protein Kinasen kommt die katalytische Untereinheit der Protein Phosphatase 2A in Frage, die ebenfalls an das pKi-67 Fragment 3R binden kann. Das Ran-bindende Protein 7 (RanBP7), auch als Importin 7 bekannt, ist in den Transport von Makromolekülen durch die Kernlamina involviert (Jakel & Gorlich, 1998; Jakel et al., 1999). Weiterhin wurden vier verschiedene Helikasen als mögliche Bindungspartner der Tandem Repetitionen identifiziert. Als besonders interessant könnte sich die Wechselwirkung von FHA („Forkhead-associated“)-Domänen tragenden Proteinen an Exon 13 erweisen, zumal pKi-67 wahrscheinlich selbst zu dieser Klasse von Proteinen gehört (vergl. 3.3). Während für das Fragment 7 kein Bindungspartner identifiziert werden konnte, interagiert das Fragment N mit den Proteinen MCM2, mit dem Ran-bindenden Protein 9

(RanBP9) sowie vier ribosomalen Proteinen. Die MCM-Proteine kontrollieren während der Zellteilung den Eintritt in die S-Phase und den Beginn der DNA-Replikation (Todorov et al., 1994). RanBP9 organisiert das Verankern der Mikrotubuli am Zentrosom und ist ebenfalls während der Mitose aktiv (Nakamura et al., 1998). Die Bindung von Fragment C an die Heterochromatin-bindenden Proteine 1  $\alpha$  und  $\gamma$  (HP1Hs  $\alpha$  und  $\beta$ ) eröffnet die Möglichkeit, dass pKi-67 auch in das Verankern der Chromosomen an die Innenseite der Kernlamina involviert ist.

### 5.6.2 Verifizierung der putativen Bindungspartner

Beim Hefe 2-Hybrid System handelt es sich um ein artifizielles System, durch das möglicherweise auch falsch-positive Interaktionen identifiziert werden könnten. In Hefezellen als Modell-Organismus werden zudem die meisten post-translationalen Proteinmodifikationen nicht oder nicht korrekt ausgeführt. Ein großer Teil der Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Methylierungen usw. ist speziesspezifisch und kommt deshalb in Hefezellen nicht vor, da diesen die nötigen Enzyme fehlen. Um Interaktionen auszuschließen, die auf *Saccharomyces cerevisiae* beschränkt sind und um eine Verifizierung der gefundenen Wechselwirkungen zu erhalten, wurden die in den Hefezellen gefundenen putativen Bindungspartner von pKi-67 im Säugetier-Modell („Mammalia 2-Hybrid System“; Clontech, Heidelberg) überprüft (Alam & Cook, 1990; Fearon et al., 1992). Mit Hilfe dieses Systems können eventuell Proteine aussortiert werden, die im Hefe- nicht aber im Säugetiermodell an pKi-67 binden.

Alle als Target verwendeten pKi-67 Teilstrukturen sowie die putativen Bindungspartner wurden deshalb in die entsprechenden Vektoren „pM“ bzw. „pVP16“ des Mammalia 2-Hybrid Systems umklontiert (vergl. OA 7). Die jeweiligen Bindungsstärken zwischen pKi-67 und den identifizierten Proteinen wurden über die Expression des Reportergens *CAT* (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) in HeLa S3 Zellen 48 Stunden nach der Transfektion quantifiziert. Die Ergebnisse (vergl. OA 7: Fig. 2A, 2B und 2C) bestätigten im wesentlichen die zuvor gemessenen Bindungen. Für Zellzyklus-relevante Proteine sowie DNA-Strukturproteine wurden noch festere Bindung als zuvor festgestellt. Dafür könnten sekundäre Modifikationen verantwortlich sein, die in den Hefezellen nicht vorkommen. Dagegen blieben die Bindungen an ribosomale Proteine ungefähr konstant.

Für einige der identifizierten Proteine wurde die Bindung an pKi-67 zusätzlich durch Immunpräzipitation untersucht. Nach der Koexpression der entsprechenden Plasmide in HEK293-Zellen („Human Embryonic Kidney Cell Line“; vergl. OA 7), wurden die Bindungspartner mittels Antikörper gegen den Hybridanteil des translatierten Targetvektors aus dem Zelllysats präzipitiert. Die entsprechenden Bindungspartner wurden anschließend im Immunblot durch Antikörper gegen den Hybridanteil des

Genbankvektors spezifisch markiert. Falls die Bindungspartner *in vivo* interagieren, sollte eine Bande bei 63 kD (Fragment 3R) bzw. 116 kD (Fragment N) nachweisbar sein. Für alle untersuchten Proteine konnte dieser Nachweis geführt werden (vergl. OA 7: Fig. 3). Ein besonders intensiver Präzipitationsnachweis erfolgte bei den Proteinpaarungen von pKi-67-3R mit PPP2A (Protein Phosphatase 2A), RanBP7, S6 Kinase, Clusterin, das ribosomale Phosphoprotein P0 („Acidic Ribosomal Protein“) und RBBP7 (Retinoblastoma-bindendes Protein) sowie von pKi-67-N mit MCM2 und RanBP9.

### 5.7 Selbst-Interaktion von pKi-67

Aus den Ergebnissen zur Expression von Teilstrukturen in den HT-Off bzw. HT-On Zellen (vergl. 5.3.1 und 5.3.2) wurde u.a. gefolgert, dass pKi-67 auch mit sich selbst interagieren könnte. Deshalb wurde eine mögliche paarweise Bindung der pKi-67 Teilstrukturen untereinander mit Hilfe des Mammalia 2-Hybrid Systems untersucht. Die Fragmente 3R, N, 7 und C wurden in den entsprechenden Genbankvektor (pVP16) kloniert und mit den gleichen Fragmenten im Targetvektor (pM) in HeLa S3-Zellen kotransfiziert (vergl. OA9). Die Zellen wurden wie zuvor (vergl. 5.6.2) nach 48 Stunden lysiert. Der Reporter CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase), der bei erfolgreicher Bindung exprimiert wird, wurde anschließend quantifiziert (vergl. OA 7: Fig. 2D). Es zeigte sich, dass die Assoziierung von pKi-67-N an die repetitive Region (3R) sehr stark ist, vergleichbar mit der als Positiv-Kontrolle eingesetzten Bindung zwischen P53 an dem „large T-Antigen“. Der C-Terminus von pKi-67 zeigte dagegen mit allen anderen Teilstrukturen keine Interaktionen. Interessanterweise reagierten die repetitiven Strukturen aus Exon 13 von pKi-67 nicht mit sich selbst. Dies wurde nach der Expression von drei Tandem-Repetitionen in HeLa-Zellen als eine mögliche Erklärung der beobachteten Effekte angenommen (vergl. 5.3.1).

Die nachgewiesene starke Bindung des N-terminalen Endes an die repetitive Region von Exon 13 könnte möglicherweise auf die Bildung ringförmiger, multimerer oder sogar netzförmiger Formen von pKi-67 im Zellkern hindeuten.

### 5.8 Einfluss von pKi-67 auf andere Zellzyklus-abhängige Proteine

Aufgrund seiner möglichen Bindung an Importin 7 (RanBP7) wurde die Hypothese aufgestellt, dass pKi-67 die Lokalisation von Zellzyklus-abhängigen Proteinen, wie die der Cycline oder Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk), beeinflussen könnte. Eine funktionelle Verbindung zwischen pKi-67 und Cyclin B wurde auch von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen (Endl & Gerdes, 2000a). Die Cycline B1 und B2 sind während der Interphase hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Sie bilden zusammen mit cdk1 den „Mitose-promoting factor“ (MPF) und werden erst während des Übergangs von der G2- zur M-Phase aktiv durch Importine in den Kern transportiert (Hagting et al., 1998; Moore et

al., 1999). MPF phosphoryliert u.a. das Histon H1 und löst so die Chromosomenkondensation aus.

Um die zellulären Effekte von pKi-67 auf Cyclin B und andere Zellzyklus-abhängige Proteine zu untersuchen, wurde das bereits beschriebene Tetracyclin-regulierbare Expressionssystem verwendet (vergl. 5.2 und 5.3). Die verschiedenen pKi-67 Teilstrukturen wurden neben der Antisense-RNA in HT-OFF Zellen für 48 Stunden transient bzw. stabil exprimiert (vergl. OA 7). Die Zellen wurden immunhistologisch und über das Immunblot-Verfahren auf die Expression von Cyclin A, Cyclin B1, cdk1 und cdk2 untersucht.

Während die Expression der pKi-67 Teilstrukturen sowie der Antisense-RNA keinen Einfluss auf Konzentrationsänderungen von Cyclin A, Cyclin B, cdk1 und cdk2 hatte (vergl. OA 7: Fig. 4B und 5B), bewirkte die Expression der Fragmente 7n und 3Rn eine Translokation von Cyclin B vom Cytoplasma zu den Nukleoli (vergl. OA 7: Fig. 4A). Auch cdk2 war, wenn auch in geringerem Maß, nach Transfektion und Expression der Plasmide mit dem Fragmenten 3Rn in den Nukleoli nachzuweisen (vergl. OA 7: Fig. 5A), im Gegensatz zu den Kontrollen, den anderen pKi-67 Teilstrukturen sowie Cyclin A und cdk2.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass bestimmte Domänen von pKi-67 - Exon 7 sowie die Tandem-Repetitionen aus Exon 13 – selektiv den Transport von Cyclin B bzw. MPF durch die Kernlamina verursachen können, wenn sie selbst über ein zusätzliches Kern-Transportsignal in den Kern transloziert werden. Insofern kann die eingangs aufgestellte Hypothese bestätigt werden, dass pKi-67 aufgrund seiner möglichen Bindung an Importine die Lokalisation von Zellzyklus-abhängigen Proteinen beeinflussen könnte.

## **5.9 Diskussion**

Ziel dieses Abschnitts der Arbeiten war es, die Funktion von pKi-67 durch Antisense-Inhibition, Expression rekombinanter pKi-67 Teilstrukturen sowie durch Identifizierung von Proteinen, die mit pKi-67 interagieren, näher zu definieren.

### **5.9.1 Inhibition der Zellteilung durch Antisense- bzw. Teilstrukturen von pKi-67**

Die transiente Expression von Fragmenten hat den Nachteil, dass die möglichen Effekte immer geringer als zu erwarten ausfallen, weil aus technischen Gründen nicht alle Zellen einer Kultur transfiziert werden können und nicht-transfizierte Zellen die Ergebnisse beeinflussen. Dieser Nachteil entfällt bei stabil exprimierten Plasmiden. Allerdings zeigte sich, dass das Tet-System ein wenig durchlässig („leaky“) ist, so dass auch Transkriptions-blockierte Zellen immer kleine Mengen der Fragmente produzieren. Zellen, die fortwährend kleine Mengen der rekombinanten pKi-67 Fragmente enthalten,

können aber möglicherweise durch Selektionsdruck schon nach wenigen Zellpassagen stark verändert sein. Darum wurden die Experimente zur Messung des Einflusses der Expression von pKi-67 Fragmenten auf den Zellzyklus transient durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analysen ergaben, dass die Expression der meisten Teilstrukturen von pKi-67, mit Ausnahme von Exon 7, die Zahl der Zellen in der S-Phase genauso bzw. sogar in stärkerem Maße verringerten als die Inhibition der pKi-67 Expression durch die Antisense-Konstrukte. Diese Wirkung hatten die drei Ki-67 Tandem-Repetitionen aber nur ohne Kern-Transportsignal, also wenn dieses Teilstück aus Exon 13 im Zytoplasma exprimiert wurde. Am wirksamsten war das im Zytoplasma exprimierte C-terminale Ende, das zu einer starken Verschiebung der Zellen von der S- zur G<sub>1</sub>-Phase führte.

Aus den Erkenntnissen, die mit Hilfe des Hefe bzw. Mammalia 2-Hybrid Systems gewonnen wurden (vergl. OA 7), sowie einer anderen Arbeit zufolge (Scholzen et al., 2002), wurde geschlossen, dass das C-terminale Ende von pKi-67 mit dem Heterochromatin-bindenden Protein HP1 interagiert. HP1 ermöglicht die Bindung der Chromosomen an die Innenseite der Kernlamina am Ende der Mitose. Aus diesem Grund würde man bei der rekombinanten Expression dieser Teilstruktur eine Blockierung des Zellzyklus am Ende der Mitose bzw. am Anfang der frühen G<sub>1</sub>-Phase erwarten. Dies könnte den gemessenen Anstieg der G<sub>1</sub>-Phase Zellen bei unverändertem Anteil an G<sub>2</sub>/M-Phase Zellen erklären.

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Expression verschiedener pKi-67 Teilstrukturen neben der Expression des nativen Proteins auch die Zellteilung insgesamt inhibiert. Deshalb besteht wahrscheinlich ein direkter Zusammenhang zwischen der pKi-67 Konzentration im Zellkern und dem Fortschreiten des Zellzyklus (Scholzen & Gerdes, 2000). Die beobachtete Bindung von pKi-67 (vergl. OA9) an die DNA-Synthese kontrollierenden Proteine MCM2 (Todorov et al., 1994) und p95 (Varon et al., 1998) führt zu der Vermutung, dass pKi-67 auch in die Entscheidung zur Initiierung der DNA-Replikation involviert sein könnte. Weiterhin kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass pKi-67 selbst-reguliert ist, da die Expression der meisten Domänen von pKi-67 die Transkription des nativen Proteins behindert.

### **5.9.2 pKi-67 als Interaktionspartner**

Die beiden 2-Hybrid Systeme (Hefe und Mammalia) erwiesen sich als komplexe und sehr ergiebige Klonierungssysteme, die weitreichende Funktionsstudien von pKi-67 über seine Bindungspartner ermöglichte. Neben ribosomalen Proteinen wurden verschiedene DNA- sowie Zellzyklus-assoziierte Proteine als potentielle Interaktionspartner ermittelt.

Die festgestellte Bindung an ribosomale Proteine ist konsistent mit der Hauptlokalisierung von pKi-67 in der dichten fibrillären Komponente (DFC) des Nukleolus während der Interphase (Braun et al., 1988; Kill, 1996; MacCallum & Hall, 2000b). In Bezug auf diese Lokalisation war bisher keine Funktion bekannt. In Ergänzung zu unseren Ergebnissen wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ein weiteres Protein, NIFK („nucleolar protein interacting with the FHA domain of pKi-67“), als weiterer Bindungspartner von pKi-67 identifiziert (Takagi et al., 2001). Die Assoziation von pKi-67 mit DNA-assoziierten Proteinen ist naheliegend, da pKi-67 selbst DNA binden kann (MacCallum & Hall, 2000a) und Bestandteil des kompakten Chromatins ist (Kreitz et al., 2000). Die Bindung von Zellzyklus-assoziierten Proteinen an pKi-67 stimmt gut mit dem Expressionsmuster von pKi-67 und der Tatsache überein, dass die Koinkubation mit pKi-67 spezifischen Antisense-Oligonukleotiden bzw. -RNA (vergl. OA 1, OA 4 und OA 5), Mikroinjektion von pKi-67 spezifischen Antikörpern (Starborg et al., 1995) oder die Expression von rekombinanten pKi-67 Teilstrukturen (vergl. OA 4 bis OA 6) die Zellteilung behindert bzw. den Zellzyklus verlangsamt.

Die Expression der rekombinanten Fragmente 7n und 3Rn im Zellkern verursachte selektiv die Translokation von Cyclin B zum Nukleolus (vergl. OA 7). In Hinblick auf die funktionelle Beziehung von pKi-67 mit Cyclin B (Endl & Gerdes, 2000a), kann deshalb die Hypothese aufgestellt werden, dass pKi-67 bei der Relokalisation von MPF in die Nukleoli beteiligt ist. Der Transport von MPF durch die Kernlamina erfolgt zu Beginn der Mitose, also unmittelbar vor der Desintegration der Nukleoli, die möglicherweise durch Phosphorylierung von Nukleoli-Proteinen (einschließlich pKi-67) durch MPF (Cyclin B - cdk1) initiiert wird. pKi-67 könnte also eine wichtige Funktion bei der Auflösung der Nukleoli zu Beginn der Mitose haben.

Umgekehrt könnte auch die Reintegration der Nukleoli nach Abschluß der Mitose durch pKi-67 katalysiert werden. Während der Mitose befindet sich pKi-67 innerhalb der perichromosomalen Scheide (vergl. 2.2.3.2 sowie Abbildung 3) und ist dort mit vielen nukleolären Proteinen assoziiert. Interessanterweise wird eine direkte oder indirekte Bindung von pKi-67 an die Bereiche um die durch rDNA definierten nukleolären Organisations Regionen (NOR) während der Mitose verhindert (Traut et al., 2002). Nach Abschluß der Mitose könnte die Interaktion von pKi-67 mit verschiedenen DNA-Helikasen zunächst die chromosomale Dekondensation im Bereich um die NORs initiieren, wo die Neubildung der Nukleoli erfolgt. Dies wird auch von zahlreichen Ergebnissen gestützt, die darauf hindeuten, dass die pKi-67 Tandem-Repetitionen in der frühen G<sub>1</sub>-Phase mit zahlreichen nukleolären Proteinen sowie mit DNA interagiert (vergl. OA 4 bis OA 7). Eine weitere Funktion von pKi-67 könnte daher sein, eine schnelle Rückbildung der Nukleoli zu bewirken und damit für die zügige Neu-Synthese von Ribosomen zu sorgen. Auch die Bindung von pKi-67 an RBBP7, das für die korrekte Lokalisation

wichtiger Faktoren bei der Chromatin-Neubildung sorgt (Gregory & Horz, 1998; Bridger et al., 1998; Dhalluin et al., 1999; Gregory et al., 2001), unterstützt diese Hypothese.

Die festgestellte Interaktion des C-Terminus von pKi-67 mit den Heterochromatin-bindenden Proteinen HP1Hs  $\alpha$  und  $\beta$  wurde auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt (Kametaka et al., 2002; Scholzen et al., 2002). Über das Heterochromatin sind die Interphase-Chromosomen mit der Kernlamina verbunden (Ye & Worman, 1996; Ye et al., 1997; Koike et al., 2000). Die rekombinante Expression des C-Terminus von pKi-67 führt zu einer Ablösung der Interphase-Chromosomen von der Kernlamina (MacCallum & Hall, 2000b), wodurch in den Zellen Apoptose ausgelöst wird (Starborg et al., 1995; Bridger et al., 1998). Das Heterochromatin enthält auch die rDNA (Gene der rRNA), die im Kern der Nukleoli lokalisiert sind (vergl. 2.2.3.1 sowie Abbildung 2), wo pKi-67 in der Interphase lokalisiert ist. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass pKi-67 in der frühen G<sub>1</sub>-Phase auch eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Heterochromatins an der Kernlamina spielen könnte.

## 6 Diskussion zur Funktion von pKi-67

Das Ziel der in dieser Schrift zusammengefassten Arbeiten war die Erforschung der Funktion von pKi-67. Mit der Bestimmung der primären Struktur (vergl. 3) wurde die Grundlage für die nachfolgenden Arbeiten geschaffen. Neben den Erkenntnissen aus dem Expressionsverhalten in Tumorzellen (vergl. 4), diente vor allem die Suche nach Interaktionspartnern mit den Hefe und Mammalia 2-Hybrid Systemen sowie die Studien mit dem Tetracyclin-regulierbaren Expressionssystem (vergl. 5) der Aufstellung einer Hypothese zur Funktion von pKi-67.

Wie beschrieben, ist die Expression und Lokalisation von pKi-67 stark Zellzyklus-abhängig (vergl. 2). In ruhenden bzw. differenzierten Zellen wird pKi-67 nicht exprimiert. Mit Beginn der späten G<sub>1</sub>-Phase und während der gesamten Interphase ist pKi-67 hauptsächlich mit den Nukleoli assoziiert. In der späten G<sub>2</sub>-Phase beginnen die Chromosomen zu kondensieren, während die Nukleoli ihre Integrität verlieren und sich auflösen. pKi-67 breitet sich in der Prophase netzartig über das gesamte Nukleoplasma aus. Von der Metaphase bis zur Anaphase bildet es um die Chromosomen eine Netzstruktur, die sich in der Telophase wieder auflöst. Während die Chromosomen decondensieren, bildet pKi-67 eine große Anzahl diskreter Foki im Nukleoplasma aus, die mit der Kernhülle assoziiert sind. In der sehr frühen G<sub>1</sub>-Phase beginnt sich pKi-67 mit den neu bildenden Nukleoli erneut zu assoziieren. Für den Fall, dass die Zelle nicht erneut in den Zellzyklus eintritt, wird pKi-67 rasch über den Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Weg abgebaut.

Aus den Erkenntnissen der hier zusammengefassten sowie zahlreichen weiteren Arbeiten konnte folgende, umfassende Hypothese zur Funktion von pKi-67 aufgestellt werden (vergl. OA 7: Fig. 6):

Zum Ende der G<sub>2</sub>-Phase dirigiert pKi-67 Cyclin B1 und damit den MPF („Maturation Promoting Factor“; Cyclin B-cdk1-Komplex) in die Nukleoli. MPF bewirkt die massive Phosphorylierung der Nukleolus-Proteine sowie von Histon H1. Hierdurch bricht der Nukleolus zusammen und die Chromosomen beginnen zu kondensieren. Der Zusammenbruch des Nukleolus wird durch die Wechselwirkung von pKi-67 mit Casein Kinase II (vergl. OA 7), Protein Kinase C (Endl & Gerdes, 2000b) und einer unbestimmten cGMP-abhängigen Kinase verstärkt. pKi-67 besitzt mehrere Konsensus-Sequenzen für diese Kinase und im Nukleolus ist eine der größeren Ansammlungen von cyclischem GMP im Kern zu finden. Der Start der Chromosomen-Kondensation wird wahrscheinlich durch die Wechselwirkung mit den verschiedenen DNA-Helikasen und dem putativen pKi-67 Interaktionspartner PAK2 (vergl. 5.6.1) induziert, welche u.a. in der aktiven Form Histon H4 phosphorylieren. Die H3-Histone werden wahrscheinlich durch die als Bindungspartner von pKi-67 gefundene ribosomale S6-Kinase phosphoryliert.

Im Anschluss an die Hyperphosphorylierung beginnt pKi-67 mit der Ausbildung des Netzes um die Chromosomen. Die beschriebene Möglichkeit zur Selbstbindung des N-Terminus an die Tandem-Repetitionen von pKi-67 könnte die Ausbildung komplexer Polymere innerhalb der perichromosomalen Scheide unterstützen. Weiterhin könnten die frei zugänglichen Tandem-Repetitionen eine Vielzahl von Proteinen binden, die schon im 2-Hybrid System detektiert wurden.

Die Bindung der im N-Terminus von pKi-67 lokalisierten FHA-Domäne an Hklp2 bzw. NIFK (Sueishi et al., 2000; Takagi et al., 2001) konnte über das hier beschriebene 2-Hybrid-Verfahren nicht verifiziert werden, weshalb die Hypothese, dass pKi-67 über die FHA-Domäne zur Trennung der Chromosomen während der Mitose beiträgt, nicht übernommen wird.

Am Ende der Mitose wird pKi-67 zusammen mit anderen Proteinen des Nukleolus vermutlich durch Protein Phosphatase 2A dephosphoryliert, wodurch die Rückbildung der Nukleoli beginnt. Die Dekondensation der Chromosomen wird möglicherweise durch die Wechselwirkung von pKi-67 mit dem Retinoblastoma bindenden Protein 7 (RBBP7) eingeleitet. RBBP7 dirigiert den „Chromatin Assembly Factor“, „Chromatin Remodelling Factor“ sowie Histon Acetyltransferase und Histon Deacetylase zu ihren DNA-Bindungsstellen (Gregory & Horz, 1998; Bridger et al., 1998; Dhalluin et al., 1999; Gregory et al., 2001). Damit hätte pKi-67 eine mögliche Funktion beim Remodelieren des Chromatins im Anschluss an die Mitose.

pKi-67 wird möglicherweise über die Wechselwirkung seines C-Terminus mit den Heterochromatin Proteinen, die ihrerseits mit den Lamin-Rezeptoren interagieren, an die Chromosomen-Verankerungsorte an der Innenseite der Kernmembran dirigiert. Gebunden an die Tandem-Repetitionen werden so wiederum DNA-Helikasen in räumliche Nähe zu diesen Regionen gebracht, die zur schnelleren Dekondensation der Chromosomen beitragen, wodurch schneller Heterochromatin entwunden wird, die Transkription einsetzen kann und zügig Ribosomen gebildet werden. Dies alles findet an den NORs (Nukleolären Organisations Regionen) statt, wo sich die Nukleoli neu bilden. Diese mögliche Funktion wird dadurch unterstrichen, dass nach Überexpression des C-Terminus von pKi-67 eine Ablösung der Chromosomen von der Innenseite der Kernmembran zu beobachten war, wodurch Apoptose in den Zellen ausgelöst wurde (MacCallum & Hall, 2000b). Diese Abläufe an der Innenseite der sich neu bildenden Membran werden sehr wahrscheinlich durch Myristoylierung der fünf „Myristoylation Sites“ in Exon 13 unterstützt. Die Verankerung von pKi-67 an der Innenseite der Membran würde die Translationsfreiheitsgrade von 3 auf 2 beschränken. Dadurch würde die Diffusion – ähnlich wie bei Proteinen der äußeren Zellmembran - auf zwei Dimensionen beschränkt und erheblich beschleunigt werden. Möglicherweise bindet pKi-67 einen großen Teil der ribosomalen Proteine, die es auch im 2-Hybrid System gebunden

hat. Dies sind zwar relativ „unspezifische“ Bindungen, aber pKi-67 könnte als „Carrier“ dieser Proteine zu einer schnelleren Reassoziierung der Nukleoli beitragen.

Im weiteren Verlauf der postmitotischen G<sub>1</sub>-Phase nimmt die Phosphorylierung des Proteins wieder zu, wodurch die Interaktionen des Proteins zusammenbrechen und das Protein verstärkt zum Nukleolus tendiert. In dieser Phase wurde eine Abnahme der Heterochromatin-Regionen, außer im Bereich der NORs, beobachtet (Bridger et al., 1998). Zu den neugebildeten Nukleoli findet das Protein wahrscheinlich durch Assoziation mit schon vorhandenem pKi-67 oder den neu gebildeten rRNAs. Möglicherweise orientiert sich das Protein durch das Fehlen von anderweitigen Bindungsstellen für pKi-67 in den Bereich um die reformierenden Nukleoli. Damit kann der Zyklus von Neuem beginnen.

Der hier dargestellten Hypothese zufolge kann pKi-67 sowohl vor der Mitose die Desintegration der Nukleoli und die Kondensation der Chromosomen als auch nach der Mitose die Reassoziierung der Nukleoli sowie die Dekondensation der Chromosomen durch seine Fähigkeit zur Bindung multipler Proteine katalysieren. Diese gegensätzlichen Funktionen werden wahrscheinlich durch den Phosphorylierungsstatus von pKi-67 gesteuert. Beim G<sub>2</sub>/M-Übergang wird pKi-67 massiv phosphoryliert, wodurch die biochemischen Eigenschaften des unter physiologischen Bedingungen sonst stark positiv geladenen Proteins drastisch geändert werden. Dies allein könnte die Desintegration der Nukleoli unterstützen sowie die Bindung an Interaktionspartner und die Struktur des Proteins beeinflussen. Am Ende der Mitose wird pKi-67 wieder dephosphoryliert, wodurch die Eigenschaften wieder umgekehrt werden. Dies wird u.a. durch die Tatsache untermauert, dass die Detektion von pKi-67 durch MIB-1 bzw. Ki-67 offensichtlich stark vom Phosphorylierungsstatus abhängig ist (vergl. OA 6).

Es erscheint zwar unwahrscheinlich, dass ein einzelnes Protein alle diese dargestellten Funktionen ausüben kann. Die Hypothese ist vielmehr so zu verstehen, dass pKi-67 diese Funktionen durch räumliche Näherung der ausführenden Enzyme beschleunigt. Eine Beeinträchtigung von pKi-67 sollte damit nicht zu einer absoluten Blockierung der Mitose führen, diese aber verlangsamen. Dies kann durch zahlreiche Ergebnisse der hier zusammengefassten Arbeiten bestätigt werden (vergl. OA 1, OA 4 und OA 5). Ähnliches wurde auch nach Injektion von pKi-67 spezifischen Antikörpern in Zellen (Starborg et al., 1996) bzw. Inkubation von Zellen mit Antisense-Oligonukleotiden (Maeshima et al., 1996; Kausch et al., 2003) beobachtet.

Die Ergebnisse der in dieser Schrift zusammengefassten Original-Artikel bilden eine Grundlage zum Verständnis der Funktion und Regulation von pKi-67 im Zellzyklus und könnten mit zukünftig zu erwartenden weiteren Erkenntnissen möglicherweise zu einer verbesserten Diagnose und Therapie von Tumorpatienten beitragen.

## 7 Zusammenfassung

Das humane Antigen pKi-67 ist durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 definiert und wird ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert. Untersuchungen zur Lokalisation von pKi-67 ergaben, dass es sich während der Interphase (aktive Phasen der Zellteilung mit Ausnahme der Mitose) hauptsächlich in den Nukleoli (Orte der rRNA-Transkription) befindet. Während der Mitose ist pKi-67 dagegen auf der Oberfläche der kondensierten Chromosomen nachweisbar.

Die Klonierung und Sequenzierung der cDNA von pKi-67 ergab, dass es sich um ein Protease-sensibles, alkalisches Zell-Kern Protein mit repetitiven Elementen (sechzehn homologe „Ki-67 Tandem-Repetitionen“ von je ca. 122 Aminosäuren) und einem hohen Gehalt an zufällig verteilten Prolin- und Lysin-Aminosäuren handelt, das in zwei unterschiedlich großen Isoformen (345 kD bzw. 395 kD) auftritt und das wahrscheinlich posttranslational modifiziert wird, insbesondere durch Phosphorylierung. Als molekulare Ursache der unterschiedlich großen Isoformen wurde das alternative Spleißen des 1080 bp großen Exon 7 festgestellt. Jede der sechzehn Ki-67 Tandem-Repetitionen, die von Exon 13 kodiert werden, enthält ein hochkonserviertes „Ki-67 Motiv“ mit einem amphiphilen und wahrscheinlich immundominanten Charakter.

Antisense-Inhibitionsversuche ergaben, dass pKi-67 für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus wahrscheinlich absolut erforderlich ist. Untersuchungen zur Expression des *pKi-67* Gens ergaben, dass pKi-67 ausschließlich über die *de novo* Transkription bzw. die Degradation über den Ubiquitin- und Proteasom-abhängigen Abbauweg kurzlebiger Proteine reguliert wird. Bei Auftreten eines Zellzyklus-Arrests kann die Halbwertszeit des Proteins aber erheblich ausgedehnt sein. Anhand des Vergleichs der mRNA und Proteinexpression in kolorektalen Tumoren konnten posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von *pKi-67* praktisch ausgeschlossen werden.

Über ein 2-Hybrid-Klonierungs-System wurden zahlreiche Interaktionspartner von pKi-67 identifiziert. Demzufolge interagiert pKi-67 vor allem mit Proteinen des Nukleolus sowie verschiedenen DNA- sowie Zellzyklus-assoziierten Proteinen. Die festgestellte Interaktion des C-Terminus von pKi-67 mit den Heterochromatin-bindenden Proteinen HP1Hs  $\alpha$  und  $\beta$  wurde mehrfach durch andere Arbeitsgruppen bestätigt. Die identifizierte Bindung von pKi-67 an Importin 7 (RanBP7) könnte die Lokalisation von Cyclinen oder Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk) beeinflussen. Weitere Versuche ergaben, dass die Expression rekombinanter Fragmente aus Exon 7 und 13 von pKi-67 im Zellkern selektiv die Translokalisierung von Cyclin B zum Nukleolus verursachte. Cyclin B bildet mit p34cdc2 (cdk1) am Ende der Interphase einen aktiven Komplex, den „Maturation Promoting Factor“ (MPF), der wahrscheinlich alle Ereignisse initiiert, die eine Interphasezelle zur Mitose führen.

Aus diesen sowie weiteren Erkenntnissen aus Versuchen zur Expression rekombinanter Teilstrukturen konnten für pKi-67 folgende, nach Domänen aufgeteilte Funktionen vorgeschlagen werden:

Die **N-terminale Domäne**, die in der mRNA Exon 1 bis 12 umfasst, reguliert die Interaktionsfähigkeit von pKi-67 und befähigt das Protein zur Selbstassoziation und Polymerisation.

Der **mittlere Bereich**, der 16 Tandem-Repetitionen aus Exon 13 enthält, vermittelt eine Vielzahl von Bindungen, die es dem Protein ermöglichen, als „Carrier“ zu funktionieren und die der Grund für die Assoziation mit den Nukleoli sind. Wahrscheinlich dirigieren die Tandem-Repetitionen Cyclin B und damit den MPF selektiv in die Nukleoli und initiieren damit die massive Phosphorylierung der nukleolären Proteine einschließlich pKi-67.

Der **C-Terminus**, der in der mRNA das Ende von Exon 13 sowie die Exons 14 und 15 umfasst, bedingt die Affinität zu Heterochromatin. Dadurch trägt der C-Terminus in der frühen G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus zur Verankerung der Chromosomen an der Innenseite der Kernmembran bei. Diese Funktionen finden jedoch nicht beliebig auf allen Chromosomen statt, sondern nur im Bereich der Nukleoli bzw. der „Nukleolären Organisations Regionen“ (NOR).

Den Ergebnissen der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Original-Artikel zufolge ist die wichtigste Funktion von pKi-67 die Regulation der Desintegration und Reformation der Nukleoli. Im Rahmen dieser Funktion induziert bzw. unterstützt es ebenfalls teilweise die Kondensation und Dekondensation der Chromosomen. Die Expression, Phosphorylierung, Dephosphorylierung sowie Degradation von pKi-67 folgt dabei einem Zyklus, der parallel zum Zellzyklus verläuft.

## 8 Literaturverzeichnis

- Alam J, Cook JL (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, **188**: 245-254.
- Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS (2003) Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol*, **21**: 241-250.
- Andrews BJ, Herskowitz I (1990) Regulation of cell cycle-dependent gene expression in yeast. *J Biol Chem*, **265**: 14057-14060.
- Bading H, Rauterberg EW, Moelling K (1989) Distribution of c-myc, c-myb, and Ki-67 antigens in interphase and mitotic human cells evidenced by immunofluorescence staining technique. *Exp Cell Res*, **185**: 50-59.
- Baisch H, Gerdes J (1987) Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation-associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet*, **20**: 387-391.
- Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, Vogt M, Muller C, Dopfer K, Schneiderbanger K, Schmidt M, Lohrs U (1996) Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer*, **77**: 255-264.
- Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JF, Blamey RW, Nicholson RI (1989) Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer*, **59**: 943-947.
- Braun N, Papadopoulos T, Muller Hermelink HK (1988) Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **56**: 25-33.
- Breathnach R, Chambon P (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem*, **50**: 349-383.
- Bridger JM, Kill IR, Lichter P (1998) Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome Res*, **6**: 13-24.
- Brown DC, Gatter KC (1990) Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, **17**: 489-503.
- Brown DC, Gatter KC (2002) Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*, **40**: 2-11.
- Bruno S, Darzynkiewicz Z (1992) Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif*, **25**: 31-40.
- Bruno S, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z (1992) Effect of ionic strength in immunocytochemical detection of the proliferation associated nuclear antigens p120, PCNA, and the protein reacting with Ki-67 antibody. *Cytometry*, **13**: 496-501.
- Bucher P (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol*, **212**: 563-578.
- Bucher P, Trifonov EN (1986) Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, **14**: 10009-10026.
- Buglioni S, D'Agnano I, Cosimelli M, Vasselli S, D'Angelo C, Tedesco M, Zupi G, Mottolese M (1999) Evaluation of multiple bio-pathological factors in colorectal adenocarcinomas: independent prognostic role of p53 and bcl-2. *Int J Cancer*, **84**: 545-552.
- Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*, **168**: 357-363.
- Chelsky D, Ralph R, Jonak G (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol*, **9**: 2487-2492.
- Crowl R, Seamans C, Lomedico P, McAndrew S (1985) Versatile expression vectors for high-level synthesis of cloned gene products in *Escherichia coli*. *Gene*, **38**: 31-38.
- De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, Koudstaal J, Gouw AS, Sluiter WJ, Peeters PM, Slooff MJ, De Vries EG (1998) Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal

- growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology*, **28**: 971-979.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**: 491-496.
- Dingwall C, Laskey RA (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**: 478-481.
- du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G (1991) Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*, **12**: 455-463.
- Duchrow M, Gerdes J, Schlüter C (1994a) The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms. *Cell Prolif*, **27**: 235-242.
- Duchrow M, Schlüter C, Gerdes J (1994b) Molekularbiologische Charakterisierung des Proliferations-assoziierten Ki-67 Proteins. *Focus MUL*, **11**: 219-225.
- Duchrow M, Schlüter C, Key G, Kubbutat MH, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J (1995) Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **43**: 117-121.
- Dynan WS, Tjian R (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, **35**: 79-87.
- Endl E, Gerdes J (2000a) Posttranslational modifications of the Ki-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. *J Cell Physiol*, **182**: 371-380.
- Endl E, Gerdes J (2000b) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res*, **257**: 231-237.
- Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Stein H, Schwarting R, Riccardi C, Manocchio I, Pileri S, Pelicci PG, Lanfrancone L (1989) Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem*, **37**: 1471-1478.
- Fearon ER, Finkel T, Gillison ML, Kennedy SP, Casella JF, Tomaselli GF, Morrow JS, Van Dang C (1992) Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 7958-7962.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**: 759-767.
- Flemming, W. (1882) Zellsubstanz, Kern- und Zellteilung. Vogel, Leipzig.
- Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schlüter C, Gerdes J (1991) Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics*, **11**: 476-477.
- Fontana D, Bellina M, Gubetta L, Fasolis G, Rolle L, Scoffone C, Porpiglia F, Colombo M, Tarabuzzi R, Leonardo E (1992) Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol*, **148**: 1149-1151.
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 8998-9002.
- Gautier T, Dauphin Villemant C, Andre C, Masson C, Arnoult J, Hernandez Verdun D (1992) Identification and characterization of a new set of nucleolar ribonucleoproteins which line the chromosomes during mitosis. *Exp Cell Res*, **200**: 5-15.
- Gerdes J (1990) Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol*, **1**: 199-206.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, **133**: 1710-1715.
- Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991) Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*, **138**: 867-873.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, **31**: 13-20.

- Gerdes J, Stein H, Pileri S, Rivano MT, Gobbi M, Ralfkiaer E, Nielsen KM, Pallesen G, Bartels H, Palestro G, Delsol G (1987) Prognostic relevance of tumour-cell growth fraction in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet*, **11**: 448-449.
- Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem*, **274**: 28379-28384.
- Gregory PD, Horz W (1998) Chromatin and transcription--how transcription factors battle with a repressive chromatin environment. *Eur J Biochem*, **251**: 9-18.
- Gregory PD, Wagner K, Horz W (2001) Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res*, **265**: 195-202.
- Grogan TM, Spier CM, Richter LC, Rangel CS (1988) Immunologic approaches to the classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Res*, **38**: 31-148.
- Grundmann, E. (1971) Der mitotische Zellcyclus. Springer Verlag, In: Altmann H-W, Büchner F, Cottier H, Grundmann E, Holle G, Letterer E, Masshof W, Meesen H, Roulet F, Seifert G, Siebert G: Handbuch der Allgemeinen Pathologie II/2, Der Zellkern I.: 282-479, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hagting A, Karlsson C, Clute P, Jackman M, Pines J (1998) MPF localization is controlled by nuclear export. *EMBO J*, **17**: 4127-4138.
- Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG (1988) The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol*, **154**: 223-235.
- Hamilton SR (1992) Molecular genetics of colorectal carcinoma. *Cancer*, **70**: 1216-1221.
- Handa K, Yamakawa M, Takeda H, Kimura S, Takahashi T (1999) Expression of cell cycle markers in colorectal carcinoma: superiority of cyclin A as an indicator of poor prognosis. *Int J Cancer*, **84**: 225-233.
- Hapgood JP, Riedemann J, Scherer SD (2001) Regulation of gene expression by GC-rich DNA cis-elements. *Cell Biol Int*, **25**: 17-31.
- Hermanek, P. and Sobin, L. (1987) TNM Klassifikation maligner Tumoren. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 4. Auflage,
- Hernandez-Verdun D (1991) The nucleolus today. *J Cell Sci*, **99**: 465-471.
- Hernandez-Verdun D, Gautier T (1994) The chromosome periphery during mitosis. *Bioessays*, **16**: 179-185.
- Hitchcock CL (1991) Ki-67 staining as a means to simplify analysis of tumor cell proliferation. *Am J Clin Pathol*, **96**: 444-446.
- Hoffman EK, Trusko SP, Murphy M, George DL (1990) An S1 nuclease-sensitive homopurine/homopyrimidine domain in the c-Ki-ras promoter interacts with a nuclear factor. *Proc Natl acad Sci U S A*, **87**: 2705-2709.
- Höfler H, Delellis H, Montminy MR, Lechan RM, Goodman RH, Wolfe HJ (1986) In situ hybridization methods for the detection of somatostatin mRNA in tissue sections using antisense RNA probes. *Histochem J*, **18**: 597-597.
- Hofmann K, Bucher P (1995) The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci*, **20**: 347-349.
- Holte H, de Lange Davies C, Beiske K, Stokke T, Marton PF, Smeland EB, Hoie J, Kvaloy S (1989) Ki67 and 4F2 antigen expression as well as DNA synthesis predict survival at relapse/tumour progression in low-grade B-cell lymphoma. *Int J Cancer*, **44**: 975-980.
- Howard A, Pelc SR (1951) Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature*, **167**: 569-560.
- Howard A, Pelc SR (1953) Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heridity*, **Suppl. 6**: 261-261.
- Hozak P (1995) Catching RNA polymerase I in Flagranti: ribosomal genes are transcribed in the dense fibrillar component of the nucleolus. *Exp Cell Res*, **216**: 285-289.
- Hozak P, Cook PR, Schofer C, Mosgoller W, Wachtler F (1994) Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci*, **107**: 639-648.
- Jakel S, Albig W, Kutay U, Bischoff FR, Schwamborn K, Doenecke D, Gorlich D (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J*, **18**: 2411-2423.
- Jakel S, Gorlich D (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J*, **17**: 4491-4502.

- Jansson A, Sun XF (1997) Ki-67 expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in colorectal adenocarcinomas. *Apmis*, **105**: 730-734.
- Kametaka A, Takagi M, Hayakawa T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Yoneda Y (2002) Interaction of the chromatin compaction-inducing domain (LR domain) of Ki-67 antigen with HP1 proteins. *Genes Cells*, **7**: 1231-1242.
- Kaplan K, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*, **53**: 457-481.
- Kausch I, Lingnau A, Endl E, Sellmann K, Deinert I, Ratliff TL, Jocham D, Sczakiel G, Gerdes J, Bohle A (2003) Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, **105**: 710-716.
- Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J (1993a) New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest*, **68**: 629-636.
- Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schlüter C, Flad HD, Gerdes J (1993b) New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest*, **68**: 629-636.
- Key G, Meggetto F, Becker MH, al Saati T, Schluter C, Duchrow M, Delsol G, Gerdes J (1992) Immunobiochemical characterization of the antigen detected by monoclonal antibody IND.64. Evidence that IND.64 reacts with the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by Ki-67. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, **62**: 259-262.
- Kill IR (1996) Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*, **109**: 63.
- Kill IR, Faragher RG, Lawrence K, Shall S (1994) The expression of proliferation-dependent antigens during the lifespan of normal and progeroid human fibroblasts in culture. *J Cell Sci*, **107**: 571-579.
- Koike N, Maita H, Taira T, Ariga H, Iguchi-Arigo SM (2000) Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS Lett*, **467**: 17-21.
- Kreitz S, Fackelmayer FO, Gerdes J, Knippers R (2000) The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. *Exp Cell Res*, **261**: 284-292.
- Kubbutat MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J (1994) Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *J Clin Pathol*, **47**: 524-528.
- Kubota Y, Petras RE, Easley KA, Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW (1992) Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis. *Cancer*, **70**: 2602-2609.
- Kyzer S, Gordon PH (1997) Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67. *Dis Colon Rectum*, **40**: 322-325.
- Lee TH, Kirschner MW (1996) An inhibitor of p34cdc2/cyclin B that regulates the G2/M transition in *Xenopus* extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 352-356.
- Lewin B (1990) Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell*, **61**: 743-752.
- Lindmo T, Davies C, Rofstad EK, Fodstad O, Sundan A (1984) Antigen expression in human melanoma cells in relation to growth conditions and cell-cycle distribution. *Int J Cancer*, **33**: 167-171.
- Locker AP, Birrell K, Bell JA, Nicholson RI, Elston CW, Blamey RW, Ellis IO (1992) Ki67 immunoreactivity in breast carcinoma: relationships to prognostic variables and short term survival. *Eur J Surg Oncol*, **18**: 224-229.
- Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR (1994) The labelling of proliferating cells by Ki67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. *Exp Cell Res*, **210**: 145-153.
- Lyon CE, Lamond AI (2000) The nucleolus. *Curr Biol*, **10**: R323-

- MacCallum DE, Hall PA (1999) Biochemical characterization of pKi67 with the identification of a mitotic-specific form associated with hyperphosphorylation and altered DNA binding. *Exp Cell Res*, **252**: 186-198.
- MacCallum DE, Hall PA (2000a) The biochemical characterization of the DNA binding activity of pKi67. *J Pathol*, **191**: 286-298.
- MacCallum DE, Hall PA (2000b) The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol*, **190**: 537-544.
- Maeshima Y, Kashihara N, Sugiyama H, Makino H, Ota Z (1996) Antisense oligonucleotides to proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 inhibit human mesangial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*, **7**: 2219-2229.
- Mairinger T, Happacher R, Gabl C, Hoffmann Y, Ofner D, Schmid KW, Gschwendtner A (1999) Mean weighted nuclear volumes in colonic adenocarcinomas. Evaluation of prognostic significance. *Anal Quant Cytol Histol*, **21**: 194-200.
- McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA (1993) The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology*, **22**: 543-547.
- McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK, Fulton R, Kucaba TA, Wagner-McPherson C, Barbazuk WB, Gregory SG, Humphray SJ, French L, Evans RS, Bethel G, Whittaker A, Holden JL, McCann OT, Dunham A, Soderlund C, Scott CE, Bentley DR, Schuler G, Chen HC, Jang W, Green ED, Idol JR, Maduro VV, Montgomery KT, Lee E, Miller A, Emerling S, AU - Kucherlapati, Gibbs R, Scherer S, Gorrell JH, Sodergren E, Clerc-Blankenburg K, Tabor P, Naylor S, Garcia D, de Jong PJ, Catanese JJ, Nowak N, Osoegawa K, Qin S, Rowen L, Madan A, Dors M, Hood L, Trask B, Friedman C, Massa H, Cheung VG, Kirsch IR, Reid T, Yonescu R, Weissenbach J, Bruls T, Heilig R, Branscomb E, Olsen A, Doggett N, Cheng JF, Hawkins T, Myers RM, Shang J, Ramirez L, Schmutz J, Velasquez O, Dixon K, Stone NE, Cox DR, Haussler D, Kent WJ, Furey T, Rogic S, Kennedy S, Jones S, Rosenthal A, Wen G, Schilhabel M, Gloeckner G, Nyakatura G, Siebert R, Schlegelberger B, Korenberg J, Chen XN, Fujiyama A, Hattori M, Toyoda A, Yada T, Park HS, Sakaki Y, Shimizu N, Asakawa S, Kawasaki K, Sasaki T, Shintani A, Shimizu A, Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, Ramser J, Seranski P, Hoff C, Poustka A, Reinhardt R, Lehrach H (2001) A physical map of the human genome. *Nature*, **409**: 934-941.
- Moore JD, Yang J, Truant R, Kornbluth S (1999) Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J Cell Biol*, **144**: 213-224.
- Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T (1998) When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J Cell Biol*, **143**: 1041-1052.
- Nicholson RI, Bouzubar N, Walker KJ, McClelland R, Dixon AR, Robertson JF, Ellis IO, Blamey RW (1991) Hormone sensitivity in breast cancer: influence of heterogeneity of oestrogen receptor expression and cell proliferation. *Eur J Cancer*, **27**: 908-913.
- Norbury C, Nurse P (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, **61**: 441-470.
- Nurse P (1975) Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*, **256**: 547-551.
- Nurse P (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, **344**: 503-508.
- Ofner D, Grothaus A, Riedmann B, Larcher P, Maier H, Bankfalvi A, Schmid KW (1996) MIB1 in colorectal carcinomas: its evaluation by three different methods reveals lack of prognostic significance. *Anal Cell Pathol*, **12**: 61-70.
- Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA (1986) Splicing of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem*, **55**: 1119-1150.
- Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl acad Sci U S A*, **71**: 1286-1290.
- Pardee AB (1989) G1 events and regulation of the cell proliferation. *Science*, **246**: 603-608.

- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**: 364-368.
- Ross, W. (1998) Studies on the Human Ki67 Protein. PhD Thesis Medical University of Dundee, Dundee, UK.
- Ross W, Hall PA (1995) Ki67: from antibody to molecule to understanding? *J Clin Pathol*, **48**: M113-M117.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl acad Sci U S A*, **74**: 5463-5467.
- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M (1987) The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol*, **133**: 579-584.
- Sawhney N, Hall PA (1992) Ki67--structure, function, and new antibodies. *J Pathol*, **168**: 161-162.
- Schedle A, Willheim M, Zeitelberger A, Gessl A, Frauendorfer K, Schofer C, Wachtler F, Schwarzacher HG, Boltz-Nitulescu G (1992) Nucleolar morphology and rDNA in situ hybridisation in monocytes. *Cell Tissue Res*, **269**: 473-480.
- Scheer U, Weisenberger D (1994) The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol*, **6**: 354-359.
- Schmid CW (1996) Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **53**: 283-319.
- Schmid CW (1998) Does SINE evolution preclude Alu function? *Nucleic Acids Res*, **26**: 4541-4550.
- Scholzen T, Endl E, Wohlenberg C, van der SS, Cowell IG, Gerdes J, Singh PB (2002) The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure. *J Pathol*, **196**: 135-144.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, **182**: 311-322.
- Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, van Dalen CH, AU - Geurts van Kessel AH, Verheijen R, Ramaekers FC (1989) Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet*, **83**: 297-299.
- Shi SR, Cote RJ, Hawes D, Thu S, Shi Y, Young LL, Taylor CR (1999) Calcium-induced modification of protein conformation demonstrated by immunohistochemistry: What is the signal? *J Histochem Cytochem*, **47**: 463-470.
- Silver PA (1991) How proteins enter the nucleus. *Cell*, **64**: 489-497.
- Smale ST (1997) Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta*, **1351**: 73-88.
- Smith LD, Ecker RE (1969) Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*. *Dev Biol*, **19**: 281-309.
- Smith LD, Ecker RE (1971) The interaction of steroids with *Rana pipiens* Oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol*, **25**: 232-247.
- Starborg M, Brundell E, Gell K, Larsson C, White I, Daneholt B, Hoog C (1995) A murine replication protein accumulates temporarily in the heterochromatic regions of nuclei prior to initiation of DNA replication. *J Cell Sci*, **108**: 34.
- Starborg M, Gell K, Brundell E, Hoog C (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci*, **109**: 53.
- Stoykova AS, Dabeva MD, Dimova RN, Hadjiolov AA (1985) Ribosome biogenesis and nucleolar ultrastructure in neuronal and oligodendroglial rat brain cells. *J Neurochem*, **45**: 1667-1676.
- Sueishi M, Takagi M, Yoneda Y (2000) The forkhead-associated domain of Ki-67 antigen interacts with the novel kinesin-like protein Hklp2. *J Biol Chem*, **275**: 28888-28892.
- Takagi M, Matsuoka Y, Kurihara T, Yoneda Y (1999) Chmadrin: a novel Ki-67 antigen-related perichromosomal protein possibly implicated in higher order chromatin structure. *J Cell Sci*, **112**: 2463-2472.
- Takagi M, Sueishi M, Saiwaki T, Kametaka A, Yoneda Y (2001) A novel nucleolar protein, NIFK, interacts with the forkhead associated domain of Ki-67 antigen in mitosis. *J Biol Chem*, **276**: 25386-25391.

- Tan MI, Strunck E, Scholzen T, Gerdes J, Vollmer G (1999) Extracellular matrix regulates steady-state mRNA levels of the proliferation associated protein Ki-67 in endometrial cancer cells. *Cancer Lett*, **140**: 145-152.
- Todorov IT, Pepperkok R, Philipova RN, Kearsley SE, Ansorge W, Werner D (1994) A human nuclear protein with sequence homology to a family of early S phase proteins is required for entry into S phase and for cell division. *J Cell Sci*, **107**: 253-265.
- Traut W, Endl E, Garagna S, Scholzen T, Schwinger E, Gerdes J, Winking H (2002) Chromatin preferences of the perichromosomal layer constituent pKi-67. *Chromosome Res*, **10**: 685-694.
- Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res*, **16**: 8186-8191.
- Tungekar MF, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY (1991) Ki-67 immunostaining and survival in operable lung cancer. *Histopathology*, **19**: 545-550.
- van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ (1989) Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res*, **49**: 2999-3006.
- van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G (1998) Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol*, **110**: 24-31.
- Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanova E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998) Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, **93**: 467-476.
- Verde F, Mata J, Nurse P (1995) Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *J Cell Biol*, **131**: 1529-1538.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC (1989a) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci*, **92**: 123-130.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC (1989b) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci*, **92**: 531-540.
- Vorlickova M, Kypr J (1985) Conformational variability of poly(dA-dT).poly(dA-dT) and some other deoxyribonucleic acids includes a novel type of double helix. *J Biomol Struct Dyn*, **3**: 67-83.
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., and Zoller, M. (1993) Rekombinierte DNA. Spektrum Akademischer Verlag, 2. Aufl., Heidelberg.
- Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Pruss M, Reuter I, Schacherer F (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*, **28**: 316-319.
- Wintzer HO, Zipfel I, Schulte Monting J, Hellerich U, von Kleist S (1991) Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer*, **67**: 421-428.
- Woollard A, Nurse P (1995) G1 regulation and checkpoints operating around START in fission yeast. *Bioessays*, **17**: 481-490.
- Ye Q, Callebaut I, Pezhman A, Courvalin JC, Worman HJ (1997) Domain-specific interactions of human HP1-type chromodomain proteins and inner nuclear membrane protein LBR. *J Biol Chem*, **272**: 14983-14989.
- Ye Q, Worman HJ (1996) Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1. *J Biol Chem*, **271**: 14653-14656.
- Zingler, M. (1997) Untersuchungen zur zellzyklusabhaengigen Expression des Ki-67 Antigens. PhD Thesis University of Lübeck, Lübeck, Deutschland.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch danke ich ganz besonders für die großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit im Chirurgischen Forschungslabor. Seine wohlwollende und motivierende Förderung waren die Voraussetzung für die Durchführung der Forschungsarbeiten und damit für die Entstehung dieser Schrift.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Georg Sczakiel danke ich vor allem für seine Bereitschaft, diese Schrift gegenüber dem Habilitationsausschuss der Universität zu Lübeck zu vertreten, obwohl die zugrundeliegenden Forschungsarbeiten nicht in seinem Institut angefertigt wurden. Ich danke auch für die schnelle und gewissenhafte Korrektur dieser Schrift.

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Broll gilt mein ganz besonderer Dank. Im Labor der Klinik für Chirurgie, das unter seiner Leitung steht, konnte ich stets mit seiner Unterstützung bei der Durchführung der Forschungsarbeiten rechnen. Vor allem aber danke ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine gewissenhaften Korrekturen.

Ich danke auch ganz ausdrücklich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Johannes Gerdes für die Anregung zu den Klonierungsarbeiten von pKi-67 und vor allem für die gute Zusammenarbeit über die vielen Jahre, auch nachdem ich sein Labor in der von ihm geleiteten Gruppe Tumorbilogie, Abteilung Immunologie und Zellbiologie des Forschungszentrums Borstel, verlassen hatte.

Ich möchte mich auf diesem Wege auch bei all meinen ehemaligen und jetzigen Kollegen und Mitarbeitern in Borstel und Lübeck für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. rer. nat. Carsten Schlüter für das perfekte Teamwork während unserer gemeinsamen Zeit in Borstel sowie bei Frau Dr. rer. nat. Ute Windhövel für Ihre stete Hilfsbereitschaft. Ganz besonders danke ich aber meinem ehemaligen Doktoranden, Herrn Dr. rer. nat. Mirko H. H. Schmidt, für sein persönliches Engagement bei der Bewältigung der riesigen Menge an Arbeit.

Ein großer Dank gebührt den zahlreichen medizinischen Doktoranden des Chirurgischen Forschungslabors, besonders aber denen, die unter meiner Anleitung mit großem persönlichen Engagement zum Zustandekommen dieser Forschungsarbeiten beigetragen haben: Frau Dr. rer. biol. hum. Monika Zingler, Dr. med. Stefan Häsemeier sowie Thorsten Ziemann.

Den Laboranten und MTAs in Borstel und Lübeck, Claudia Wohlenberg, Frank Holst, Regina Kaatz, Gisela Grosser-Pape, Vera Grobleben, Elke Gheribi und Annemarie Aumüller gebührt ebenfalls mein besonderer Dank, weil sie bei der Bewältigung der Arbeiten behilflich waren und vor allem, weil sie stets für ein gutes Arbeitsklima sorgten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Dr. Mildred Scheel-Stiftung für Krebsforschung möchte ich an dieser Stelle meinen ausdrücklichen Dank für die langjährige finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeiten aussprechen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner am 9. Juli 2003 verstorbenen Mutter und meinem Vater, die mich beide immer liebevoll in allem unterstützt haben. Nicht zuletzt danke ich auch meiner Frau Dr. rer. nat. Maritta Baumann sowie unseren Kindern Markus, Lukas und Christian, dass sie in den letzten Monaten soviel Geduld mit mir hatten, während diese Schrift beendet wurde.

## 10 Anhang

Im Anhang sind die folgenden, in dieser Schrift zusammengefassten Original-Artikel, wiedergegeben:

1. Schlüter C\*, Duchrow M\*, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J (1993) The Cell Proliferation-associated Antigen of Antibody Ki-67: A Very Large, Ubiquitous Nuclear Protein with Numerous Repeated Elements, Representing a New Kind of Cell Cycle-maintaining Proteins. *J. Cell Biol.* 123: 513 – 522  
(\*both authors contributed equal)
2. Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J (1996) Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell prolifer.* 29: 1 – 12
3. Duchrow M, Häsemeyer S, Broll R, Bruch HP, Windhövel U (2001) Assessment of proliferative activity in colorectal carcinomas by quantitative RT-PCR. *Cancer invest.* 19: 596 – 604
4. Duchrow M, Schmidt MHH, Zingler M, Anemüller S, Bruch HP, Broll R (2001) Suppression of Cell Division by Ki-67 Antisense-RNA and Recombinant Proteins. *Cell. Physiol. Biochem.* 11, 2001: 331 – 338
5. Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M (2002) Proliferation marker pKi-67 affects the cell cycle in a self-regulated manner. *J. Cell. Biochem.* 87: 334 – 441
6. Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Duchrow M (2002) The proliferation marker pKi-67 becomes masked to MIB-1 staining after expression of its tandem repeats. *Histochem. Cell Biol.* 118: 415 – 422
7. Schmidt MHH, Broll R, Bruch HP, Bögler O, Duchrow M (2003) The proliferation marker pKi-67 organizes the nucleolus during the cell cycle depending on Ran and Cyclin B. *J. Pathol.* 199: 18 – 27
8. Duchrow M, Ziemann T, Bruch HP, Broll R (2003) Colorectal carcinomas with high MIB-1 labeling indices but low pKi-67 mRNA levels correlate with a better prognostic outcome. *Histopathology* 42: 566 – 574