Universität Ulm
Abteilung Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. W. Vogel

Untersuchungen zur posttranslationalen Regulation von Neurofibromin

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Ralf Müller
aus Ulm
Ulm, 2002

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre
1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Vogel
2. Berichterstatter: PD Dr. C. Beyer
Tag der Promotion: 12. Juli 2002

Meinen Eltern

Abkürzungen

1 Einleitung 1
1.1 Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1 1
1.2 Das *NF1*-Gen und sein Genprodukt Neurofibromin 3
1.3 Funktion von Neurofibromin 4
1.4 Ansätze zur Therapie der NF1 10
1.5 Regulation der Expression von Neurofibromin 11
1.6 Regulation der Degradation von Proteinen 13
1.7 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 14

2 Material und Methoden 16
2.1 Zellkultur 16
2.1.1 Verwendete Zelltypen 16
2.1.2 Kultivierung der Zellen 17
2.1.3 Kultivierungstechniken 18
2.1.4 Kulturbedingungen für die Experimente 19
2.2 Nachweis von Proteinen aus Zellen 22
2.2.1 Lyse der Zellen 22
2.2.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge 22
2.2.3 Immunopräzipitation von Neurofibromin 23
2.2.4 Immunopräzipitation der Fusionsproteine EGFP-NF1(±10a2) und RM1 bis 11 23
2.2.5 Co-Immunopräzipitation von Hsp70 mit Neurofibromin 24
2.2.6 Subzelluläre Fraktionierung 24
2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 25
2.2.8 Nachweis der ^{35}S- oder ^{32}P-markierten Proteine 26
2.2.9 Westernblot und Immunonachweis der Proteine 27
2.2.10 Nachweis eines möglicherweise verkürzten Neurofibromins 29
2.2.11 Aminosäuremapping von Neurofibromin 29
2.2.12 Spaltung von Neurofibromin mittels BrCN 30
2.3 Weitere Untersuchungen 30
2.3.1 Messung der Aufnahme von ^{32}P-Orthophosphat in die Zellen 30
2.3.2 Bestimmung der Proliferation der Zellen 30
2.3.3 Bestimmung der Melanogenese 31
2.3.4 Enzymtest für die lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A/B und Cathepsin D 31
2.3.5 Nachweis der Expression von pEGFP und deren Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie 32
2.4 Klonierung und Transfektion der NF1-Sequenzen 33
2.4.1 Selektion und Vermehrung der Plasmide 33
2.4.2 Herstellung der NF1±10a2-cDNA-Sequenzen und Klonierung in pEGFP-N1 35
2.4.3 Herstellung und Klonierung der 12 einander überlappenden NF1-cDNA-Fragmente in pcDNA4/TO/*myc*-HisC 38
2.4.4 Kontrolle der Sequenz der Plasmide 41
2.4.5 Vorbereitung der Plasmide für die Transfektion in eukaryotische Zellen 43
2.4.6 Transfektion in eukaryotische Zellen 44
2.4.7 Selektion und Kontrolle der transfizierten eukaryotischen Zellen 44
2.5 Elektronische Datenbank Information 46

3 Ergebnisse 47
3.1 Die Unterschiede in der Neurofibrominmenge zwischen Zellen von NF1-Patienten und gesunden Kontrollpersonen 47

3.1.1 Der Aminosäureaustausch R1276P im Neurofibromin eines NF1-Patienten führt zu keiner verringerten Neurofibrominmenge in Zellen 48
3.1.2 Die Neurofibrominmenge bei Patienten mit Sonderformen der NF1 49
3.1.3 Vergleichende Messung der Neurofibrominmenge zur Diagnostik der NF1 54
3.2 Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Neurofibrominmenge in Zellen 55
3.2.1 Die Neurofibrominmenge in Melanozyten korreliert mit der Konzentration an PMA 55
3.2.2 Die Depolymerisation von Mikrotubuli durch Colcemid beeinflusst die Degradation von Neurofibromin in Melanozyten 56
3.2.3 Staurosporin reduziert die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten 57
3.2.4 Der Einfluss von Serum auf die Neurofibrominmenge ist abhängig vom Zelltyp 57
3.2.5 Die Hemmung der Proteasomen und des Calpain-Systems führt zu keiner Erhöhung der Neurofibrominmenge in humanen Melanozyten 59
3.2.6 PMA hat keinen Einfluss auf die Aktivität der lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A und B sowie Cathepsin D in Melanozyten 60
3.2.7 Chloroquin erhöht die Neurofibrominmenge in verschiedenen Zelltypen 61
3.2.8 In Melanozyten, die mit oder ohne PMA kultiviert wurden, ist Neurofibromin unterschiedlich lokalisiert 70
3.2.9 Hsp70 und Neurofibromin 71
3.3 Eine spezifische Phophorylierung an Neurofibromin könnte im Zusammenhang mit der Regulation seines Abbaus stehen 73
3.3.1 Die Phosphatase-Inhibitoren Okadasäure und Na-Orthovanadat erhöhen die Neurofibrominmenge in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert werden, jedoch nicht deren Proliferation 73
3.3.2 Der Phosphatase-Inhibitor Okadasäure erhöht die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten 76
3.3.3 Die Phosphorylierung von Neurofibromin ist in Melanozyten nach der Kultivierung mit PMA erhöht 77
3.3.4 Auch die Kultivierung mit CT/IBMX, bFGF oder Okadasäure erhöht die Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten 79
3.3.5 Phosphoaminosäuremapping von immunopräzipitiertem Neurofibromin 81
3.3.6 Peptidmapping der durch Spaltung von Neurofibromin mit Bromcyan erhaltenen Fragmente 82
3.4 Untersuchung der Phosphorylierung von Neurofibromin an 14 einander überlappenden, das ganze Neurofibromin überdeckenden Teilproteinsequenzen 85
3.4.1 Klonierung zweier EGFP-NF1-Teilproteinsequenzen mit und ohne Exon 10a2 in Brown Melanoma- und HeLa-Zellen 85
3.4.2 Untersuchung der Phosphorylierung von Neurofibromin an weiteren 12 einander überlappenden, das ganze Neurofibromin überdeckenden Teilproteinsequenzen 89

4 Diskussion 95
4.1 Die Neurofibrominmenge in Patienten 95
4.2 Die Regulation der Neurofibrominmenge in Zellen 98
4.3 Eine Phosphorylierung von Neurofibromin korreliert mit seiner Halbwertszeit 106
4.4 Untersuchungen an Fusionsproteinen von Neurofibromin 110

5. Zusammenfassung 114

6. Literaturverzeichnis 115

Abkürzungen

AC	Adenylat Cyclase
Ahd I	Restriktionsenzym I von Aeromonas hydrophila
AK3	Adenylatkinase 3
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp-N	Endoproteinase (spaltet N-terminal an Asparaginsäure und Cystein)
AT	Annealingtemperatur
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
bFGF	basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
Bgl II	Restriktionsenzym II von Bacillus globigii
BIC	bFGF-, IBMX- und CT-haltiges Medium zur Melanozytenkultivierung
BM	Brown Melanoma
bp	Basenpaare
BCR	Serinkinase (Produkt des *bcr*-Gens)
BrCN	Bromcyanid
BSA	Rinderserumalbumin
C	CALF
^{14}C	radioaktiver Kohlenstoff
CALF	Café-au-Lait-Fleck
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy desoxy ribonucleic acid
Ci	Curie
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
c-myc	C-terminaler Teil von myc
CSRD	Cystein-Serin reiche Domäne des Neurofibromins
CT	Choleratoxin
CTD	C-terminale Domäne des Neurofibromins
Cys	Cystein
Da	Dalton
2D	zwei dimensional
DC	detergent compatible
DDAH	N^G,N^G-Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle‘s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxy ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ECL	Enhanced chemoluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
E.coli	Escherichia coli
*Eco*RV	Restriktionsenzym V von Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylen-glykol-bis-(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

ER	Endoplasmatisches Retikulum
EVI	ecotropicvirus intergration site
FCS	Fetales Kälberserum
Fsp I	Restriktionsenzym I von Fischerella species
FTI	Farnesyltransferase-Hemmer
g	Gravitationskonstante
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	green fluorescent protein
Gln	Glutamin
Glu-C	Endoproteinase (spaltet C-terminal an Glutamin- und Asparaginsäure)
Glu	Glutaminsäure
GRD	GAP related domain
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
^3H	Tritium (radioaktiver Wasserstoff)
HAUSP	Herpesvirus assoziierte Ubiquitin spezifische Protease
HMB45	Neuroektodermaler Marker für Schwann-Zellen und Melanozyten
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
H_2O	zweifach destilliertes Wasser
Hind III	Restriktionsenzym III von Haemophilus influenzae
HisC	C-terminales Polyhistidin-Epitop
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hsc73	73 kDa heat shock cognate protein
Hsp70	70 kDa heat shock protein
HT	Haut
HWZ	Halbwertszeit
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin Typ G
IGEPAL	(Octylphenoxy)polyethoxyethanol
IκB	Inhibitor des Transkriptionsfaktors NFκB
IP	Immunopräzipitation
IPG	Immobilisierter pH Gradient
IRA	inhibitory regulators of Ras
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
lacZ	*β-Galaktosidase*-Gen
Lamp2	Lysosomen assoziiertes Membranprotein 2
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
LOH	Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity)
LRD	Leucin reiche Domäne des Neurofibromins
Lys	Lysin
Lys-C	Endoproteinase (spaltet C-terminal an Lysin)
M	Molar

mA	Milliampère
MALDI-MS	Matrix associated laser disorption ionisation-mass spectrometry
MAPK	mitogen activated protein kinase
mCi	Millicurie
Mdm2	Eine E3-Ligase (vermittelt die Ubiquitinierung von p53)
Met	Methionin
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MK	Melanozyten von Kontrollpersonen
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MNF	Melanozyten von NF1-Patienten
MPI	Max-Plank-Institut
mRNA	Messenger ribonucleic acid
myc	Transkriptionsfaktor
µCi	Mikrocurie
µF	Mikrofarad
µM	Mikromolar
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NF1	Neurofibromatose Typ 1
NF2	Neurofibromatose Typ 2
NFκB	Nuclear factor Kappa B (Transkriptionsfaktor)
NIH	National Institute of Health (der USA)
nM	Nanomolar
OA	Okadasäure
OD	Optische Dichte
OMPG	Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein
^{32}P	radioaktiver Phosphor
p.A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Peptidylglycine-α-Amidating-Monooxygenase
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	Isotonischer Phosphatpuffer (phosphate buffered salt solution)
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PDF	pigment-dispersing factor
PGA	Protein-G-Agarose
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
Phe	Phenylalanin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
pmol	Pikomol
PP-1	Phosphoprotein-Phosphatase-1

PP-2A	Phosphoprotein-Phosphatase-2A
pRb	Retinoblastom Protein
PVDF	Polyvinylidendifluorid
*Pvu*I	Restriktionsenzym I von Proteus vulgaris
Pwo	Pyrococcus woeseli
Raf-1	Mitogen aktiverte Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK)
Ras	Multifunktionelles Signalprotein
RM1-11	Fusionsproteine mit Teilsequenzen von Neurofibromin, mit c-myc und HisC-Epitop
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion
^{35}S	radioaktiver Schwefel
S100	Neuroektodermaler Marker für Schwann-Zellen und Melanozyten
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SNF	Spinale Neurofibromatose
T	Tumorzellen
Taq	Thermus aquaticus
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TFdiG	Theaflavin-3,3‘-digallate
TGF-β1	Transforming growth Faktor-β1
Thr	Threonin
TIC	PMA-, IBMX- und CT-haltiges Medium zur Melanozytenkultivierung
TLC	Thin layer cellulose
TO	Tetracyclin Operator
TR	Tetracyclin-Repressor
TR-Gen	Tetracyclin-Repressorgen
TREx	Tetracyclin reguliertes Expressionssystem
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRP	Tyrosinase-related Protein
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tyr	Tyrosin
U	Units = Einheit für Enzymaktivität
U/min	Umdrehungen/Minute
UTR	nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Na-Orthovanadat
V	Volt
WB	Westernblot
(+/+)	homozygot für das betreffende Gen
(+/-)	heterozygot für das betreffende Gen
(-/-)	heterozygot defizient für das betreffende Gen

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine Tumorerkrankung, die im Jahre 1882 erstmals ausführlich von dem Pathologen F. D. von Recklinghausen beschrieben und deshalb lange Morbus Recklinghausen genannt wurde. Preiser u. Davenport (1918) konnten zeigen, dass es sich um eine Erbkrankheit handelt, die einem autosomal dominanten Erbgang folgt. Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Neurofibromatose ein einheitliches Krankheitsbild ist und die unterschiedlichen Symptome durch die unterschiedliche Expression des *NF1*-Gens zustande kommen. Im Jahre 1992 schlug Riccardi eine Klassifikation der Neurofibromatose in acht verschiedene Untertypen vor. Die NF1 entspricht der peripheren Form der Neurofibromatose. Sie ist mit 90% die häufigste Form der Neurofibromatosen und mit einer Inzidenz von etwa 1 : 4000 eine der häufigsten autosomal dominant vererbten Krankheiten des Menschen (Huson u. Hughes 1994). In einer Konferenz des „National Institut of Health (NIH)“ wurden im Jahr 1987 die Kriterien zur klinischen Diagnose der NF1 festgelegt (Stumpf et al. 1987). Danach liegt die Erkrankung vor, wenn mindestens zwei der folgenden Symptome ausgeprägt sind:

- ⇨ Sechs oder mehr Café-au-lait-Flecken mit einem größten Durchmesser über 5 mm im präpubertären und über 15 mm im postpubertären Alter
- ⇨ Zwei oder mehr kutane oder subkutane Neurofibrome oder 1 plexiformes Neurofibrom
- ⇨ Gesprenkelte Hyperpigmentierung (Freckles) in der Achselhöhle oder Leistengegend
- ⇨ Optikusgliom
- ⇨ Zwei oder mehr Lisch-Knötchen (Irishamartome)
- ⇨ Eine charakteristische krankhafte Knochenveränderung, wie Keilbeindysplasie oder Dysplasien der langen Röhrenknochen mit oder ohne Pseudarthrose
- ⇨ Ein Verwandter ersten Grades (Eltern, Geschwister oder Nachkommen) mit gesicherter Diagnose der NF1 nach den oben genannten Kriterien

Die meisten Symptome stehen in Beziehung zu Zellen die von der Neuralleiste stammen, wie Neurofibrome aus Schwann-Zellen und Café-au-lait-Flecken, Freckles oder Lisch-Knötchen aus Melanozyten.

Café-au-lait-Flecken (CALF) sind hyperpigmentierte Hautbereiche verschiedener Größe und klinisch meist das erste Symptom der NF1. Sie werden im Verlauf der ersten zwei Lebensjahre sichtbar und nehmen in der Kindheit an Größe und Zahl zu. Bei 10-14% der

gesunden Bevölkerung wurden ebenfalls CALF, meist ein bis drei, jedoch praktisch nie mehr als fünf gefunden (Crowe u. Schull 1953). In der Epidermis von Gesunden werden 36 Keratinozyten von einem Melanozyten mit Melanosomen versorgt. Die Epidermis von NF1-Patienten zeigt eine Veränderung in der Dichte der Melanozyten und eine Anomalie in der Pigmentierungsverteilung. Dabei versorgt bei NF1-Patienten ein Melanozyt nur 29 Keratinozyten und in CALF eines NF1-Patienten nur noch 22 Keratinozyten (Johnson u. Charneco 1970, Frenk u. Marazzi 1984, Martuza et al. 1985). Auch ist die Anzahl an Makromelanosomen in der Epidermis von NF1-Patienten, besonders im CALF, erhöht. Sie beträgt bei NF1-Patienten in der Epidermis 24,2 und im CALF 106,7 pro Melanozyt, bei Gesunden dagegen in der Epidermis nur 0,3 und im CALF 1,2 pro Melanozyt (Martuza et al. 1985). Von den Neurofibromen werden klinisch und histologisch verschiedene Formen unterschieden, die als kutane und subkutane, noduläre oder fusiforme Neurofibrome bezeichnet werden. Die letzteren beiden können sich zu diffusen plexiformen Neurofibromen entwickeln. In Neurofibromen wurden Schwann-Zellen, Fibroblasten, Perineuralzellen, Mastzellen, Kapillarendothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen nachgewiesen (Lassmann et al. 1977). Viele Patienten berichteten, dass sich die Neurofibrome während der Pubertät, der Schwangerschaft oder lang andauernden Stresssituationen vermehrten und/oder vergrößerten.

Der Intelligenzquotient ist bei NF1-Patienten um durchschnittlich 10 Punkte geringer als im Bevölkerungsmittel (Ferner et al. 1996). Auch treten bei NF1-Patienten Skelett- und Gefäßanomalien häufiger auf als bei Gesunden und sie besitzen ein höheres Risiko an malignen Tumoren zu erkranken als nicht NF1-Patienten.

Die Symptome der NF1 unterscheiden sich sowohl inter- als auch intrafamiliär oft recht erheblich (Riccardi u. Kleiner 1977). Als Ursache für die Variabilität der zahlreichen Symptome wird die Wirkung anderer, sogenannter modifizierender Gene diskutiert (Krone 1990, Easton et al. 1993). Möglicherweise gehören auch Gene, deren Produkte in der Lage sind die Neurofibrominmenge in Zellen zu beeinflussen, zu diesen modifizierenden Genen. Ein Hinweis darauf ist, dass bei Nf1-Mäusen, die heterozygot sind für das knockout *Nf1*-Gen und zusätzlich für das knockout *p53*-Gen, die Tumorinzidenz erhöht war. Bei Mäusen, bei denen die knockout Gene in cis lagen war die Zunahme der Tumoren höher und die Überlebensdauer geringer als bei Mäusen, bei denen die knockout Gene in trans lagen. In beiden Fällen wurde in den Tumoren ein LOH („loss of heterozygosity“) beobachtet (Cichowski et al. 1999). Auch epigenetische Faktoren haben einen Einfluss auf Symptome der NF1. Eineiige NF1-Zwillinge sind in Bezug auf die Ausprägung bestimmter NF1-

Symptome nicht konkordant (Bauer et al. 1988, Easton et al. 1993). Auch die vermehrte Bildung von Neurofibromen während der Pubertät, Schwangerschaft oder in Stresssituationen könnte ein Hinweis auf epigenetische Faktoren sein.

1.2 Das *NF1*-Gen und sein Genprodukt Neurofibromin

Das *NF1*-Gen ist an Position 17q11.2 lokalisiert, umfasst 335 kb an genomischer DNA, ist in 61 Exons eingeteilt und codiert für ein Transkript mit einer Größe von 12450 bp (bei Neurofibromin Typ I). Am 3'-Ende der NF1-mRNA befindet sich eine mit 3512 bp relativ große nicht translatierte Region (UTR), die phylogenetisch hoch konserviert ist. Ebenso hoch konserviert ist die 484 kb große 5'UTR der NF1-mRNA (Krone u. Kehrer-Sawatzki 2001).

Es sind neun vorwiegend nicht prozessierte *NF1*-Pseudogene mit über 90% Homologie zum *NF1*-Gen bekannt (Legius et al. 1992, Suzuki et al. 1994a, Cummings et al. 1996, Hulsebos et al. 1996, Kehrer-Sawatzki et al. 1997, Regnier et al. 1997). Im Intron 27b des *NF1*-Gens wurden drei andere Gene, *EVI2A*, *EVI2B* und *OMGP* gefunden, die in Gegenrichtung zum *NF1*-Gen transkribiert werden (Cawthon et al. 1990 u. 1991, Viskochil et al. 1991, Habib et al. 1998a u. 1998b). Im Intron 37 befindet sich auch ein Pseudogen der Adenylatkinase 3 (*AK3*) (Xu G et al. 1992).

Beim Menschen sind mehrere Varianten des NF1-Transkripts bekannt (Krone u. Kehrer-Sawatzki 2001). Die verbreitetsten und ubiquitär exprimierten Genprodukte sind Neurofibromin Typ I, bestehend aus 8454 bp mit 2818 Aminosäuren (AS) und Neurofibromin Typ II, bestehend aus 8517 bp mit 2839 AS (mit dem zusätzliches Spleissprodukt Exon 23a). Zwei weitere bekannte Isoformen sind Typ 3 bestehend aus 8508 bp mit 2836 AS (mit dem zusätzlichen Spleissprodukt Exon 48a), welches überwiegend im Muskel exprimiert wird (Gutmann et al. 1993a) und das Spleissprodukt 9br (Exon 9a mit 30 bp), welches im Gehirn exprimiert ist (Danglot et al. 1995). Daneben sind weitere Isoformen von Neurofibromin bekannt, wovon eine in unserer Arbeitsgruppe entdeckt wurde, welche das Exon 10a2 mit 45 bp enthält. Diese Isoform wurde *in vitro* in allen untersuchten primären humanen Zellen und Tumoren in einem niedrigen Level von 2-4% gefunden und enthält eine potentielle Transmembran Helixdomäne (Kaufmann et al. 2002). Die unterschiedlichen Isoformen werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert (Nishi et al. 1991, Suzuki et al. 1991 u. 1992, Gutmann et al. 1993a u. 1995, Danglot et al. 1995, Skuse et al. 1996, Park et al. 1998, Kaufmann et al. 2002).

Neurofibromin weist Homologien zur Superfamilie der GTPase aktivierenden Proteine einschließlich p120 GAP auf, zu den Proteinen IRA1, IRA2 und sar1 der Hefe, sowie zu dem Protein Gap-1 in Drosophila, die alle ebenfalls bei der Ras vermittelten Signaltransduktion eine Funktion aufweisen (Buchberg et al. 1990, Xu G et al. 1990). Neurofibromin ist ein in der Evolution stark konserviertes Protein und unterscheidet sich zwischen dem Menschen und der Maus nur in 45 AS. Auch das Neurofibromin von Drosophila weist zum Neurofibromin des Menschen auf der AS-Ebene eine Homologie von 60% auf.

Die häufigste Isoform ist Neurofibromin Typ II mit einem aus der AS-Sequenz abgeleiteten Molekulargewicht von 317 kDa. Bei der SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot wurde es in einer Größe von etwa 250 kDa nachgewiesen (Gutmann et al. 1991). Die Abweichung beruht vermutlich auf der Konformation des Neurofibromins, welches während der Wanderung durch das SDS-Gel nicht vollständig entfaltet ist.

1.3 Funktion von Neurofibromin

Die Lokalisation und Funktion von Neurofibromin ist vermutlich bisher nur zum Teil aufgeklärt.

Die Lokalisation von Neurofibromin

Intrazellulär wurde Neurofibromin in NIH3T3-Zellen vorwiegend in der Partikelfraktion (P100) gefunden (DeClue et al. 1991). In Hirnextrakten konnte in der Membran und in partikelhaltigen Fraktionen eine Neurofibromin spezifische Ras-GTPase stimulierende Aktivität nachgewiesen werden (Hattori et al. 1992). Mittels immunozytochemischer Darstellung wurde Neurofibromin in kultivierten Fibroblasten nahe des Kerns, nicht aber mit Mikrotubuli assoziiert gefunden und somit als Signale im Bereich des ER gedeutet (Golubic et al. 1992). In Fibroblasten von Kängururatten wurde Neurofibromin immunozytochemisch jedoch in perinukleären Bereichen mit Mikrotubuli assoziiert gefunden. Auch von Mikrotubuli-Fraktionen, die aus dem Gehirn von Ratten angereichert wurden, konnte Neurofibromin eluiert werden (Gregory et al. 1993). In verschiedenen Zellen konnte eine Assoziation von Neurofibromin mit Mitochondrien gezeigt werden (Roudebush et al. 1997) und in humanen Keratinozyten assoziiert Neurofibromin mit Zytokeratinfilamenten (Koivunen et al. 2000). In Keratinozyten des Stratum spinosum von Rattenfeten wurde Neurofibromin an der Plasmamembran und in mutmaßlichen

Transportvesikeln gefunden (Malhotra u. Ratner 1994). In B- und T-Lymphozyten der Maus wurde Neurofibromin, sowohl diffus verteilt im Zytoplasma als auch im Bereich der Membran nachgewiesen (Boyer et al. 1994).

Neurofibromin als Tumorsuppressor

Aufgrund der Tatsache, dass NF1-Patienten viele gutartige Tumoren (Neurofibrome) haben, wurde die Rolle des *NF1*-Gens als Tumorsuppressor diskutiert und mittels Zellkultur in verschiedenen Versuchen belegt. So bewirkt zum Beispiel die Überexpression von Neurofibromin in NIH3T3-Zellen eine Wachstumshemmung (Johnson et al. 1994) und in einer für Neurofibromin defizienten Melanomzelllinie führt die Transfektion mit NF1-Wildtyp-cDNA zu einer deutlichen Verlangsamung des Wachstums, was als Umkehrung des Tumorphänotyps diskutiert wurde.

Die meisten Mutationen im *NF1*-Gen führen zu einem Verlust der Funktion des mutierten Allels („loss of function“) (Heim et al. 1995, Hoffmeyer et al. 1995, Fahsold et al. 2000) und zur Halbierung der Neurofibrominmenge (Maier B. Diplomarbeit 1995, Griesser J. Dissertation 1996, Müller R. Diplomarbeit 1997). Ein durch Stop-Mutationen resultierendes verkürztes Neurofibromin ließ sich bisher nicht nachweisen (Bäuerle C. Diplomarbeit 1993, Maier B. Diplomarbeit 1995, Griesser J. Dissertation 1996). Auf eine durch Haploinsuffizienz verringerte Tumorsuppressorwirkung deuten Versuche mit Dorsalganglienzellen aus NF1-defizienten Mäuseembryonen hin. Die Zellen überleben ohne die ansonsten notwendigen neurotrophen Faktoren, während normale Neurone absterben (Vogel et al. 1995). Bei Stammzellen der myeloischen Reihe wird das Wachstum um so stärker durch den Granulozyten Makrophagen-Kolonie Stimulierungsfaktor angeregt, je geringer ihr Neurofibromingehalt ist. Dies ist, im Hinblick auf das erhöhte Risiko von NF1-Patienten an juveniler myeloischer Leukämie zu erkranken, von Bedeutung (Shannon et al. 1994, Stiller et al. 1994). Transgene Mäuse, die heterozygot für einen *NF1*-Gendefekt sind, in ihrem Genotyp also den NF1-Patienten entsprechen, sind für die Entwicklung von verschiedenen Tumortypen prädisponiert, entwickeln jedoch keine Neurofibrome oder Café-au-lait-Flecken (Brannan et al. 1994, Jacks et al. 1994, Cichowski et al. 1999, Vogel et al. 1999).

Als wesentliche Ursache für die Entstehung der NF1-Symptome wird entsprechend dem Tumorsuppressormodell der Verlust beider *NF1*-Wildtyp Allele postuliert. So war in einigen Neurofibrosarkomzelllinien von NF1-Patienten keine NF1-mRNA nachweisbar

(Basu et al. 1992, DeClue et al. 1992) und auch in Phäochromozytomen von NF1-Patienten wurde ein Verlust des zweiten Allels (LOH) gefunden (Xu W et al. 1992, Gutmann et al. 1994a). Ob ein LOH auch die Ursache für die Entstehung von CALF oder den Neurofibromen ist, wird gegenwärtig noch diskutiert. So konnte bei Melanozyten aus CALF von NF1-Patienten ein LOH bisher nicht nachgewiesen werden (Stark et al. 1992, Eisenbarth et al. 1995). Mittels Immunopräzipitation und anschließendem Westernblot war Neurofibromin in NF1-Melanozyten aus CALF-Kulturen nachweisbar (Griesser J. Dissertation 1996, Kaufmann et al. 1999) und auch immunozytochemische Befunde zeigten Neurofibromin in Melanozyten und Keratinozyten aus NF1-CALF (Malhotra et al. 1994).

In Neurofibromen, die aus Schwann-Zellen und Fibroblasten bestehen, wurden somatische Mutationen des *NF1*-Gens gefunden. Jedoch konnte nicht gezeigt werden, ob Schwann-Zellen, Fibroblasten und/oder beide Zelltypen den somatischen Verlust des *NF1*-Gens tragen (Colman et al. 1995, Sawada et al. 1996). Nachdem es gelang, humane Fibroblasten und Schwann-Zellen aus Neurofibromen getrennt zu kultivieren, wurden bei der Kultivierung der Schwann-Zellen unter verschiedenen Bedingungen zwei Subpopulationen, *NF1(-/-)*- und *NF1(+/-)*-Schwann-Zellen gefunden (Kluwe et al. 1999, Serra et al. 2000). Die Autoren gehen davon aus, dass Schwann-Zellen, die eine somatische *NF1*-Mutation tragen, für das weitere Wachstum der Neurofibrome zuständig sind. Der LOH entsteht durch mitotische Rekombination und führt zur Homozygotie des *NF1*-Gens in Schwann-Zellen (Serra et al. 2001). Es ist nicht bekannt, wie *NF1*-Mutationen in Schwann-Zellen in einem veränderten Phänotyp resultieren und zur Bildung eines Neurofibroms führen. Von Neurofibromen abgeleitete Schwann-Zellen, ohne signifikante Kontamination durch Fibroblasten, zeigten jedoch eine veränderte Morphologie, heterogenes Wachstum und eine erhöhte Expression des Antigen P0, während andere Eigenschaften normaler humaner Schwann-Zellen beibehalten wurden (Rosenbaum et al. 2000).

Riccardi postulierte, dass umliegende *NF1(+/-)*-Zellen die *NF1(-/-)*-Zellen daran hindern könnten, Neurofibrome auszubilden (Riccardi 1977 u. 1992). Denkbar wäre, dass die Effektivität der Hemmung der umliegenden Zellen von der Neurofibrominmenge der umgebenden *NF1(+/-)*-Zellen abhängig ist. In allen bisher untersuchten Neuralleistenderivaten führte der Verlust von Neurofibromin nicht zu vermehrter Proliferation, sondern zu einer Wachstumshemmung sowie zu morphologischen Veränderungen, Eigenschaften, die auch durch onkogen-aktivierte Ras-Mutanten ausgelöst

werden können (Bar-Sagi et al. 1985, Noda et al. 1985, Guerreo et al. 1986, Borasio et al. 1989, Kim et al. 1995).

p21 Ras-GAP Aktivität von Neurofibromin

Neurofibromin besitzt eine Sequenzhomologie mit dem humanen Ras-GTPase aktivierenden Protein p120 GAP, hat *in vitro* und *in vivo* eine p21 Ras-GAP Aktivität und somit eine Funktion in der p21 Ras vermittelten Signaltransduktion (Ballester et al. 1990, Buchberg et al. 1990, Martin et al. 1990, Xu G et al. 1990). Diese Region im Neurofibromin wird deshalb als GRD („GAP related domain“) bezeichnet (Abbildung 1, Seite 10). Neurofibromin und p120 GAP stimulieren die intrinsische GTPase Aktivität von H, K und N-Ras und dadurch die Hydrolyse von p21 Ras-GTP zu p21 Ras-GDP, wodurch p21 Ras inaktiviert wird. Neurofibromin hat zwar eine höhere Affinität zu p21 Ras-GTP als p120 GAP, jedoch eine geringe Aktivität. Neurofibromin bindet auch an R-Ras, ein weiteres Protein der Ras-Familie, das an der Regulation der Apoptose beteiligt zu sein scheint (Rey et al. 1994). Es wird angenommen, dass die Hauptfunktion von Neurofibromin die negative Regulation der Ras Aktivität ist (Cichowski et al. 2001). In einigen Zelllinien, denen Neurofibromin fehlt, wie z.B. aus Neurofibrosarkomen, wurden erhöhte p21 Ras-GTP Mengen nachgewiesen (Basu et al. 1992, DeClue et al. 1992). Bei transgenen *Nf1(+/-)*-Mäusen, die vergleichbare Lernstörungen wie NF1-Patienten aufweisen, wurden in Zellen des Hippocampus elektrophysiologische Veränderungen nachgewiesen. Das deutet darauf hin, dass Neurofibromin bei der Regulation der Kalzium-Freisetzung in diesen *Nf1(+/-)*-Mäuse-Zellen eine wesentliche Rolle spielt (Silva et al. 1997). Lerndefizite bei *Nf1(+/-)*-Mäusen sollen durch eine erhöhte p21 Ras Aktivität verursacht werden, da sie durch Verringerung der p21 Ras Aktivität, durch einen Farnesyltransferase Inhibitor, abgeschwächt werden (Costa et al. 2002).

Jedoch ist es möglich, dass Neurofibromin seine Tumorsuppressorwirkung auch über eine von der p21 Ras-GAP-Regulation unabhängige Funktion ausüben kann. Denn einige Neurofibromin defiziente Zelllinien weisen keine veränderte Regulation der Aktivität der p21 Ras Proteine auf (Johnson et al. 1993, The et al. 1993, Largaespada et al. 1995). In einer Kolon-Karzinomzelllinie führt die Überexpression von NF1-mDNA, die in der *NF1*-GRD eine inaktivierende Mutation aufweist, zur Tumorsuppression und einem Anstieg der Apoptose (Li et al. 1996). Bestimmte zellbiologische Veränderungen an Nf1-defizienten Schwann-Zellen (Kim et al. 1995) lassen sich ebenso wie Veränderungen von Nf1-

Fibroblasten (Ratner et al. 1999) nicht über Veränderungen der p21 Ras-GAP Regulation erklären. Auch in Melanozyten und Fibroblasten von NF1-Patienten, die eine reduzierte Neurofibrominmenge aufweisen, ist die p21 Ras-GAP Regulation nicht verändert (Böddrich et al. 1995, Griesser et al. 1995), was darauf hindeutet, dass Neurofibromin neben der p21 Ras-GAP Aktivität noch eine andere Funktion hat (Johnson et al. 1994).

p21 Ras-GAP unabhängige Funktionen von Neurofibromin

Bei Drosophila hat Neurofibromin neben der Funktion als p21 Ras-GAP auch eine Funktion als möglicher Regulator der "rutabaga (rut)-encoded adenylyl cyclase" und somit des cAMP-Signalwegs. Die durch ein G-Protein aktivierte Adenylat Cyclase (AC) besteht aus *NF1*-unabhängigen und *NF1*-abhängigen Komponenten. Der *NF1*-abhängige Mechanismus der Aktivierung des Rut-Adenylat Cyclase Signalwegs ist essentiell für das Lernen und das Gedächtnis bei Drosophila (Guo et al. 1997 u. 2000). Die Expression eines humanen *NF1*-Transgens in NF1-defizienten Fliegen beeinflusst die cAMP abhängigen Phänotypen dieser Fliegen, wie kleine Körpergröße und die durch ein G-Protein stimulierte Aktivität der AC. Die Aktivität der AC war im Gehirn von *Nf1(-/-)*-Mäusen geringer als im Gehirn von *Nf1(+/-)*-Mäusen, was zeigt, dass Neurofibromin die Aktivität der AC in Säugetieren und Fliegen reguliert (Tong et al. 2002). Weiterhin führen Nullmutationen des *NF1*-Gens bei Drosophila zu Abnormalitäten im zirkadianen Rhythmus ihrer Bewegungsfähigkeit. Die mutanten Fliegen zeigen eine normale Oscillation der „clock genes period" (per), „timeless" (tim) und ihrer korrespondierenden Proteine, aber veränderte Level eines „clock-controlled reporter". Die „Mitogen-activated protein kinase" (MAPK) Aktivität ist in diesen *NF1*-Mutanten erhöht. Bei zusätzlichen „loss-of-function" Mutationen im Ras/MAPK Signaltransduktionsweg ist der zirkadiane Phänotyp der Doppelknockout Drosophila, (*NF1(-/-)*, *MAPK(-/-)*) normal. Desweiteren gibt es eine zirkadiane Oszillation von Phospho-MAPK in der Umgebung von Nervenenden, die den „pigment-dispersing factor" (PDF) enthalten, ein Sekret außerhalb der „clock Zellen", was auf eine Kopplung von PDF mit Ras/MAPK hindeutet (Williams et al. 2001).
Humane NF1-Melanozyten weisen *in vivo* (Martuza et al. 1985) und *in vitro* (Kaufmann et al. 1989 u. 1991) eine erhöhte Melanogenese auf. Deshalb ist davon auszugehen, dass Neurofibromin in die Regulation der Melanogenese involviert ist. In einem experimentellen Co-Expressionssystem wurde gezeigt, dass die Expression des *NF1*-Gens die Aktivität des Tyrosinase-Promotors beeinflusst (Suzuki et al. 1994b).

Neben der bekannten Ras-GAP-Domäne (GRD) (Abbildung 1, Seite 10) besitzt Neurofibromin in dieser GRD auch eine Bindungsdomäne für Tubulin und wurde mit Mikrotubuli assoziiert gefunden (Gregory et al. 1993). Die Bindung von Neurofibromin an Mikrotubuli führt *in vitro* zu einer Verringerung seiner p21 Ras-GAP Aktivität (Bollag et al. 1993). *In vitro* wird Neurofibromin in Lymphozyten nach Antigen-Stimulation phosphoryliert. Diese sehr schnelle Phosphorylierung korreliert mit einer Veränderung seiner intrazellulären Lokalisation (Boyer et al. 1994). Im Neurofibromin gibt es sechs potentielle cAMP abhängige Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen und eine Tyrosin-Kinase Phosphorylierungsstelle (Abbildung 1, Seite 10). Die Aktivität von Neurofibromin wird möglicherweise über Proteinkinasen reguliert (Marchuk et al. 1991). An diesen Positionen können künstlich hergestellte Proteine von Teilsequenzen des *NF1*-Gens durch die PKA phosphoryliert werden (Izawa et al. 1996). Außerdem besitzt Neurofibromin eine Cystein/Serin reiche Domäne (CSRD), in der drei Cysteinpaare liegen, die vergleichbar sind mit einer von Maru et al. (1991) vorgeschlagenen ATP-Bindungsdomände des BCR-Proteins. In dieser Domäne liegen auch drei der PKA Phosphorylierungsstellen. Weitere zwei der PKA Phosphorylierungsstellen und die Tyrosin-Kinase Phosphorylierungsstelle liegen in der C-terminale Domäne (CTD) (Izawa et al. 1996). C-terminal an die GRD angrenzend liegt eine Leucin reiche Domäne (LRD). In der CSRD und CTD von Neurofibromin bindet N^G,N^G-dimethylarginin Dimethylaminohydrolase (DDAH) (Tokuo et al. 2001), ein zellulärer Regulator der NO-Synthase (Kimoto et al. 1998). Die durch die PKA induzierte Phosphorylierung in der CSRD von Neurofibromin wird durch DDAH dosisabhängig verstärkt (Tokuo et al. 2001). Weiterhin interagiert Neurofibromin in zwei Domänen mit den Heparan Sulfat Proteoglycanen Syndecan 1-4 und zwar in der GRD und in der CTD (J und P in Abbildung 1, Seite 10) (Hsueh et al. 2001). Die Syndecane 1-4 sind Transmembranproteine, die an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) wie Laminin oder Fibronektin binden. Sie sind beteiligt an der Adhäsion der Zellmatrix, der Zellbewegung und der Morphogenese des Gewebes. Die extrazellulären Domänen der Syndecane zeigen wenig Homologie, ihre zytoplasmatische Domäne mit etwa 30 AS ist dagegen hoch konserviert. Die vier C-terminalen Aminosäuren (–EFYA), die in allen Syndecanen konserviert sind, vermitteln die Bindung an CASK, eine Membran assoziierte Guanylat-Kinase (Cohen et al. 1998, Hsueh et al. 1998). Die für die Interaktion mit Neurofibromin wesentliche Sequenz in den Syndecanen ist die von der Membran aus proximale Region RKKDEGSY, wobei die Abfolge der vier Aminosäuren RKKD für die

Interaktion mit Neurofibromin am wichtigsten ist. Neurofibromin, Syndecan und CASK scheinen einen Komplex zu bilden (Hsueh et al. 2001).

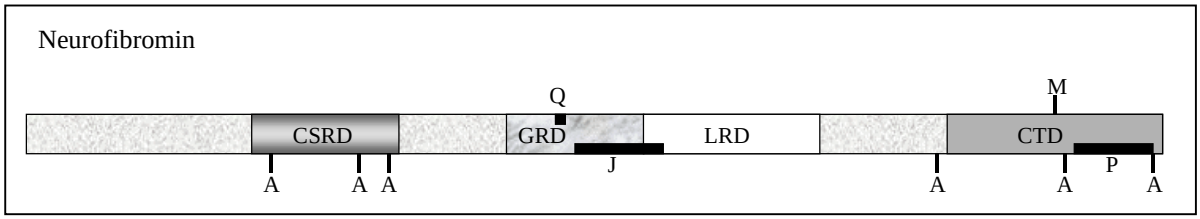

Abbildung 1: Neurofibromin mit bekannten Domänen und Phosphorylierungsstellen. Die wichtigen bekannten Domänen im Neurofibromin sind die CSRD (AS 543-909), LRD (AS 1530-1951), CTD (AS 2261-2818) und GRD (AS 1198-1530), die zwei Syndecanbindungsstellen J (AS 1356-1562) und P (AS 2616-2812) sowie das QKLLD-Motiv Q (AS 1298-1302). In der CSRD und der CTD befinden sich die Bindungsdomänen von DDAH und in der GRD die Tubulinbindungsdomäne. Die beschrieben Phosphorylierungsstellen im Neurofibromin sind die sechs potentiellen cAMP abhängigen Serin/Threonin Phosphorylierungsstellen (A) (AS 583-586, KKLT, AS 815-818, RRMS, AS 873-876, RKGS, AS 2236-2239, KRVS, AS 2573-2576, RKVS und AS 2810-2813, KRNS) und die MAPK Phosphorylierungsstelle (M) (AS 2549-2556, RRVAETDY).

1.4 Ansätze zur Therapie der NF1

Bisher gibt es keine kausale Therapie dieser Erkrankung. Ein denkbarer Ansatz zur Therapie, an dem unsere Arbeitsgruppe forscht, ist die Transfektion von Zellen mit chimären RNA/DNA-Oligonucleotiden (Kmiec 1996), was zu einer Reparatur des *NF1*-Gens durch Konversion der mutierten Base im *NF1*-Gen führen soll.

Die bisherige Therapie der NF1 besteht jedoch in der chirurgischen Entfernung der Neurofibrome oder der Entfernung durch eine Laserbehandlung. Plexiforme Neurofibrome sind oft inoperabel, weil sie oft weitreichend Gewebe durchdringen.

Erste Versuche zur Therapie von Symptomen erfolgten mit einem Antihistaminikum, das die Abgabe von Mitogenen aus Mastzellen verhindert (Riccardi 1992). Dies sollte das Wachstum von Neurofibromen behindern, was nicht den gewünschten Erfolg brachte (Huson u. Hughes 1994). Eine weitere Idee ist der Einsatz eines Farnesyltransferase-hemmers (FTI), der die Lokalisation von p21 Ras-GTP an der Zellmembran und somit seine Aktivität verhindert. Dadurch sollte die Aktivität von p21 Ras-GTP gesenkt werden. Die Inkubation mit Farnesyltransferasehemmern führte jedoch zu einer Reduktion der Expression des *NF1*-Gens (Gutmann et al. 1996). In humanen Melanozyten von gesunden und NF1-Patienten führte ein FTI zu einer Verringerung der Neurofibrominmenge (Kaufmann et al. 1999).

Desweiteren wird vermutet, dass ein Vitamin D3 Analog einen Einfluss auf die Entwicklung von Neurofibromen nehmen könnte (Nakayama et al. 1999).
Meine im Folgenden dargestellten Versuche könnten die Grundlage für einen weiteren Ansatz zur Therapie darstellen. Dabei könnte in Zellen von NF1-Patienten die Menge an Neurofibromin durch die Hemmung seiner Degradation erhöht werden, was dem Entstehen von NF1-Symptomen entgegenwirken sollte.

1.5 Regulation der Expression von Neurofibromin

Die Neurofibrominmenge ist bei NF1-Patienten durch den funktionellen Verlust eines *NF1*-Allels auf etwa 50% reduziert. Diese reduzierte Neurofibrominmenge sowie auch die normale Menge bei Gesunden dürfte einer Varianz unterliegen, da die Regulation der Transkription, Translation oder Degradation von Neurofibromin interindividuell variieren könnte.

Transkriptionelle Regulation des *NF1*-Gens

Die zahlreichen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren und für das cAMP Bindungsprotein in der Promotorregion des *NF1*-Gens deuten darauf hin, dass seine Expression verschiedenartigen Regulationsprozessen ausgesetzt ist (Hajra et al. 1994). So scheint cAMP die Synthese von Neurofibromin zu stimulieren (Cook u. McCormick 1993). In der Zellkultur wirken sich bestimmte Bedingungen auf die Transkriptionsrate des *NF1*-Gens aus. Bei Schwann-Zellen der Ratte führte eine erhöhte Zelldichte zu verstärkter Expression von Neurofibromin (Gutmann at al. 1993b). Die Kultivierung der Fibroblastenlinie Rat-1A unter Konfluenzbedingungen (Norton et al. 1996) und die Auslösung der Muskeldifferenzierung in Mausmyoblastenlinien durch die Kultivierung ohne Serum bewirkte eine Erhöhung der Menge an NF1-mRNA und Neurofibromin (Gutmann et al. 1994b). Die Behandlung humaner Fibroblasten mit PDGF und TGF-β1 führt zu einem Anstieg der NF1-mRNA, wie auch *in vivo* im umliegenden Gewebe von Schnittwunden zu beobachten ist (Ylä-Outinen et al. 1998). Haeussler et al. (2000) nehmen an, dass die Regulation der Stabilität der NF1-mRNA eine wichtige Möglichkeit sein könnte, die Menge an Neurofibromin zu regulieren.

Posttranskriptionelle und posttranslationale Regulation der Neurofibrominmenge

Ein Hinweis auf eine posttranskriptionelle Regulation der Neurofibrominmenge zeigte ein Experiment mit Ratten. Nach der Durchtrennung des Nervus ischiadicus war in den ausgewachsenen Schwann-Zellen nach vier Tagen vermehrt Neurofibromin nachweisbar, ohne dass eine Veränderung der NF1-mRNA Menge zu messen war (Wrabetz et al. 1995). Da die Synthese des primären NF1-Gentranskripts etwa 4 h dauert und die Translation der reifen NF1-mRNA mindestens 1,5 h in Anspruch nimmt, dürfte eine rasch notwendige Änderung der Neurofibrominaktivität eher durch posttranslationale Mechanismen vermittelt werden (Krone u. Kehrer-Sawatzki 2001). Die hierfür möglichen Mechanismen sind die Regulation des Neurofibrominturnovers, welcher möglicherweise durch eine posttranslationale Modifikation reguliert wird und eine Aktivitätsregulation durch die Interaktion mit anderen Molekülen (Griesser at al. 1997, Kaufmann et al. 1999, Krone u. Kehrer-Sawatzki 2001). Bei humanen epidermalen Melanozyten führen Choleratoxin (CT), basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu einer starken Zunahme der Neurofibrominmenge, ohne einen Einfluss auf die Menge an NF1-mRNA zu haben (Griesser et al. 1997, Kaufmann et al. 1999). Der Anstieg der Neurofibrominmenge unter diesen Bedingungen ist auf eine veränderte Halbwertszeit (HWZ) von Neurofibromin zurückzuführen (Griesser et al. 1997, Kaufmann et al. 1999). Die durchschnittlich ermittelte Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten beträgt 25 h und steigt auf bis zu 80 h an (Griesser et al. 1997, Kaufmann et al. 1999). Die Menge an Neurofibromin ist in diesen Neuralleistenzellen also posttranslational durch die Regulation seiner Halbwertszeit zu beeinflussen. Nach der Datenbank der Universität Genf (SwissProt-Expasy) beträgt die berechnete Halbwertszeit von Neurofibromin 30 h. In NIH3T3-Fibroblasten beträgt sie 24-32 h (DeClue et al. 1991) und in einer Neuroblastomzelllinie ist die Halbwertszeit von Neurofibromin bei der Entstehung des malignen Phänotyps von mehr als 24 h auf etwa 3 h reduziert (The et al. 1993).

Posttranslationale Regulation anderer Proteine

Neben dem NF1-Genprodukt kann auch bei anderen Tumorsuppressorgenen die Menge des Genprodukts posttranslational reguliert werden. Zum Beispiel kann bei dem Tumorsuppressor p53 die Proteinmenge über eine Ubiquitin vermittelte Degradation reguliert werden (Kubbutat et al. 1997). So wird p53 z.B. durch die humane E6AP Ubiquitin Ligase in Anwesenheit von E6 Oncoprotein des Papilomavirus ubiquitiniert und

durch Proteasomen degradiert (Scheffner et al. 1993). Andererseits kann p53 durch eine Herpesvirus assoziierte Ubiquitin spezifische Protease (HAUSP) deubiquitiniert und dadurch stabilisiert werden (Li et al. 2002).
Auch die Menge des Tumorsuppressors p27 kann über die Degradation in Proteasomen reguliert werden (Tsvetkov et al. 1999) und der Abbau von p27 soll in kolorektalen Karzinomen eine wesentliche Bedeutung haben (Loda et al. 1997).
In Meningiomen von Neurofibromatose Typ 2 (NF2)-Patienten wurde eine verstärkte proteolytische Aktivität des Calpainsystems nachgewiesen, durch die das NF2-Genprodukt Merlin abgebaut wird (Kimura et al. 1998 u. 2000). Auch in sporadischen Meningiomen ist die Calpain abhängige Proteolyse des NF2-Genprodukts Merlin erhöht. In Zellen dieser sporadischen Meningiome induziert ein oxidativer Stress die Aktivierung von µ-Calpain (Kaneko et al. 2001).

1.6 Regulation der Degradation von Proteinen

Es stellte sich nun die Frage, über welchen Mechanismus die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten beeinflusst wird. Zellen besitzen verschiedene intrazelluläre proteolytische Stoffwechselwege, um falsch gefaltete oder denaturierte Proteine abzubauen. Aber auch native Proteine müssen abgebaut werden, um die Menge der Proteine in der Zelle zu regulieren. Für den Abbau der zellulären Proteine sind intra- und extralysosomale proteolytische Stoffwechselwege verantwortlich.

Extralysosomale proteolytische Stoffwechselwege

Im Zytosol werden Proteine über Ca^{2+} abhängige Proteasen wie Calpain (Mellgren 1987, Saido et al. 1994) und andere, wahrscheinlich ATP unabhängige Proteasen abgebaut, oder im 26S Proteasomen Komplex mit multiplen proteolytischen Aktivitäten, welcher Teil des ATP und ubiquitinabhängigen proteolytischen Systems ist (Hershko u. Ciechanover 1992, Jennissen et al. 1995, Hilt u. Wolf 1996). In der Leber sind extralysosomale proteolytische Stoffwechselwege für den Abbau von Proteinen verantwortlich, die einem hohen Turnover unterliegen, wogegen langlebige Proteine vorwiegend in Lysosomen abgebaut werden (Mortimore et al. 1989, Segen u. Bohley 1992).

Intralysosomale Degradation von Proteinen

Für die intralysosomale Degradation müssen die Proteine erst in die Lysosomen aufgenommen werden. Dabei sind die Prozesse der Makroautophagie, Mikroautophagie, Krinophagie und die selektive Chaperon vermittelte direkte Aufnahme von Proteinen bekannt. In vielen Zelltypen wie z.B. in Fibroblasten, Leber-, Nieren-, Herzmuskelzellen (nicht aber im Skelettmuskel) werden unter Stressbedingungen, wie Entfernung von Serum aus dem Medium, viele zytosolische Proteine für die Degradation direkt in Lysosomen eingeschleust (Wing et al. 1991). Dazu dient die selektive Chaperon vermittelte Aufnahme von Proteinen in die Lysosomen. Proteine, die diesem Prozess folgen, haben eine Sequenz, die dem Motiv KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) ähnlich ist. Die KFERQ ähnliche Pentapeptidsequenz enthält die Aminosäure Glutamin (Q), gefolgt von einer variablen Anordnung basischer (K oder R), saurer (D oder E) und hydrophober AS (F, I, L oder V) (Olson u. Dice 1989, Dice 1990). Etwa 30% aller zytosolischen Proteine besitzen solch ein Motiv (Chiang et al. 1989, Aniento et al. 1993). An diese Peptidsequenz bindet das zytosolische Hitzeschockprotein Hsc73, welches zur Familie der Hsp70 Proteine gehört und im Erkennungsprozess für die Aufnahme in Lysosomen hilft. Nach der Bindung des Komplexes an ein Lysosomen assoziiertes Membranprotein (Lamp2) wird das KFERQ-Motiv enthaltende Protein durch die lysosomale Membran transportiert und steht der intralysosomalen Degradation zur Verfügung (Cuervo u. Dice 1996). Die Kultivierung von Fibroblasten ohne Serum resultiert in einer Aktivierung von Hsc73 und in erhöhter Assoziation mit Lysosomen, so dass die Erkennung des KFERQ ähnlichen Motivs effektiver wird (Cuervo et al. 1995). Viele langlebige Proteine werden bei der Kultivierung ohne Serum lysosomal degradiert und benötigen dafür diese Signalsequenz (Dice 1992, Cuervo u. Dice 1998). Neurofibromin gehört mit einer Halbwertszeit von mindestens 25 h zu den langlebenden zytoplasmatischen Proteinen, besitzt in der GRD an Position 1298 bis 1302 eine ähnliche Pentapeptidsequenz, mit der Abfolge QKLLD und könnte deshalb unter bestimmten Bedingungen über diesen Pathway abgebaut werden.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die posttranslationale Regulation von Neurofibromin untersucht werden. Die Untersuchungen zielen darauf ab, einen Weg zu finden, um *in vivo* in Zellen von NF1-Patienten die Neurofibrominmenge auf einen Level zu bringen, der dem gesunder Personen entspricht. Dies könnte durch eine spezifische Hemmung der

Degradation von Neurofibromin in den haploinsuffizienten Zellen der NF1-Patienten erfolgen, möglicherweise über Beeinflussung einer posttranslationalen Modifikation von Neurofibromin. Die Hoffnung dabei wäre, die Neuentstehung von NF1-Symptomen zu verhindern, die durch haploinsuffiziente Zellen hervorgerufen werden.

Folgende Teilfragen sollen bearbeitet werden:

Führen Mutationen im *NF1*-Gen bei verschiedenen NF1-Patienten zu einer Reduzierung der Neurofibrominmenge, oder führen Mutationen im *NF1*-Gen auch dazu, dass eine wichtige katalytische Domäne des Neurofibromins ausfällt, ohne dass seine Menge reduziert ist. Hierzu sollte die Menge an Neurofibromin in Zellen von NF1-Patienten untersucht und mit der von Gesunden verglichen werden.

Aufgrund der beschriebenen Assoziation von Neurofibromin mit Mikrotubuli (Gregory et al. 1993) und der Verringerung der Neurofibrominmenge nach Depolymerisation der Mikrotubuli mittels Colcemid (Müller R. Diplomarbeit 1997), sollte ermittelt werden, ob die Halbwertszeit von Neurofibromin unter diesen Bedingungen reduziert ist. Das Ergebnis könnte einen Hinweis darüber liefern, ob die Degradation von Neurofibromin durch die Assoziation mit polymerisierten Mikrotubuli verhindert wird.

Die durch PMA induzierte Erhöhung der Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten könnte über die Aktivierung von Proteinkinasen C (PKCs) erfolgen. In Melanozyten, die unter PMA kultiviert wurden, reduzierte sich die Neurofibrominmenge nach Inkubation mit dem PKC-Inhibitor Staurosporin (Müller R. Diplomarbeit 1997). Deshalb sollte ermittelt werden, ob die Reduzierung der Neurofibrominmenge durch die Hemmung von PKCs posttranslational über die Verringerung der Halbwertszeit erfolgt.

Es soll herausgefunden werden über welchen Stoffwechselweg die Degradation von Neurofibromin erfolgt. Dazu sollten Zellen mit Inhibitoren verschiedener proteolytischer Stoffwechselwege kultiviert werden und anschließend deren Einfluss auf die Neurofibrominmenge untersucht werden.

Im weiteren sollte untersucht werden, ob eine posttranslationale Phosphorylierung von Neurofibromin in die Regulation seiner Degradation involviert ist. Dazu wurde die Dephosphorylierung von Neurofibromin gehemmt und die Wirkung auf die Menge sowie die Halbwertszeit von Neurofibromin ermittelt. Anschließend sollte die Phosphorylierung von Neurofibromin unter den Kulturbedingungen untersucht und charakterisiert werden, unter denen die Halbwertszeit von Neurofibromin beeinflusst werden kann.

2 Material und Methoden

Alle im Folgenden nicht beschriebenen Standard-Laborchemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) bezogen und waren in p.A. Qualität oder für die Zellkultur getestet.

2.1 Zellkultur

Die Lösungen und Medien für die Zellkultur wurden mit einem Filter von 0,2 µm Porenweite steril filtriert. Die Kulturgefäße oder Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff waren vom Hersteller sterilisiert. Die mehrfach benutzbaren hitzeresistenten Glasmaterialien wurden 2 h bei 175°C mittels trockener Hitze sterilisiert, die anderen Verbrauchsmaterialien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Das Volumen an Medium, oder Phosphatpuffer (PBS) als Waschlösung, für die Zellen betrug 0,18 ml pro cm^2 Kulturgefäßoberfläche, wenn nicht anders beschrieben.

2.1.1 Verwendete Zelltypen

Primäre humane Zellen von Kontrollen und NF1-Patienten

Die Melanozyten und fibroblastenartigen Zellen von gesunden Kontrollpersonen stammen aus Präputien, die Keratinozyten aus Hautbiopsien. Die Melanozyten und fibroblastenartigen Zellen der NF1-Patienten stammen aus Hautbiopsien (NF HT), aus dem Hautanteil von exzidierten Neurofibromen (NF T) oder aus dem Hautareal der Café-au-lait-Flecken (CALF) (NF C). Die Diagnose NF1 bei den Patienten wurde entspechend der NIH-Kriterien von der Abteilung Dermatologie der Universität Ulm gestellt. Bei den meisten Patienten wurde mittels molekularbiologischer Untersuchungen die konstitutionelle Mutation im *NF1*-Gen gefunden.

Zelllinien

Die *Nf1(-/-)*-Melanozyten der Maus (*Nf1(-/-)*-MMS142-5) wurden aus der Haut eines 11 Tage alten *Nf1(-/-)*-Embryos trächtiger *Nf1(+/-)*-knockout-Mäuse (Jacks et al. 1994) isoliert. Die Melanozyten (MMS-142-6) und fibroblastenartigen Zellen (MS-142-6) einer

gesunden Maus (*Nf1(+/+)*) sowie Melanozyten der *Nf1(+/-)*-Maus (*Nf1(+/-)*-MMS-155-7) wurden ebenfalls aus der Haut von Embryonen trächtiger *Nf1(+/-)*-knockout-Mäuse isoliert. Die Mäuse wurden im Tierforschungszentrum der Universität Ulm gezüchtet. Die Melanozyten aus den Mäusen sind spontan immortalisiert und exprimieren S100 und HMB45, wie durch Immunofluoreszenz Experimente gezeigt wurde. Weitere verwendete Zellen waren HeLa und Brown Melanoma.

2.1.2 Kultivierung der Zellen

Kultivierung der humanen Melanozyten

Das Standardmedium (TIC) zur selektiven Kultivierung der Melanozyten enthielt als Grundmedium Ham F10 (Sigma) mit 8% fetalem Kälberserum (FCS) **(**Pan System, Aidenbach), 8% NU-Serum (Collaborative Research, Heidelberg), 2,5 nM Choleratoxin (CT) (Sigma), 0,1 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Sigma) und 85 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Serva, Heidelberg). In einigen Experimenten wurde PMA durch 1 ng/ml bFGF (basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor) (Roche, Mannheim) ersetzt (BIC). Die Aussaatdichte der Melanozyten betrug 25000 Zellen pro cm^2 in TIC-Medium. Der Medienwechsel bei Melanozyten erfolgte dreimal pro Woche. Die Melanozyten-kulturen wurden durch regelmäßige mikroskopische Kontrolle auf die Kontamination mit Fibroblasten untersucht, die gegebenenfalls durch die Behandlung für drei Tage mit 0,1 mg Geneticin (G418) (Sigma) pro ml Medium entfernt wurden.

Kultivierung der humanen fibroblastenartigen Zellen

Das Standardmedium zur Kultivierung der fibroblastenartigen Zellen (OSMO II) enthielt als Grundmedium DMEM (Biochrom, Berlin) mit 10% FCS. Die Aussaatdichte war 5000 Zellen pro cm^2. Der Medienwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

Kultivierung der humanen Keratinozyten

Die humanen Keratinozyten wurden in Keratinozyten-SFM (Basalmedium) (Invitrogen, Karlsruhe) mit 50 mg Rinderhypophysenextrakt (Invitrogen) und 5 µg rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor (Invitrogen) pro Liter kultiviert. Die Aussaatdichte war 40000 Zellen pro cm^2. Der Medienwechsel erfolgte zweimal pro Woche.

Kultivierung der Zelllinien

Die HeLa- und Brown Melanoma-Zellen sowie die fibroblastenartigen Zellen der gesunden Maus wurden in OSMO II kultivert. Melanozyten von *Nf1(+/+), Nf1(+/-)* und *NF1(-/-)*-Mäuseembryos wurden in TIC oder BIC-Medium kultiviert. Die Aussaatdichte betrug bei HeLa- und Brown Melanoma-Zellen zwischen 10000 und 25000 Zellen pro cm^2.

2.1.3 Kultivierungstechniken

Passagieren der Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Um Mediumreste zu entfernen wurden die Zellen zuerst mit PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, pH 7,2) gewaschen. Dann wurde 50 µl Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) pro cm^2 Kulturoberfläche hinzugegeben und 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Zellen durch tryptischen Verdau abzulösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml Kulturmedium pro cm^2 Kulturoberfläche abgestoppt, die Zellsuspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen herunterzentrifugiert (10 min, 200 g). Dann wurde das Zellsediment mit Medium resuspendiert und erneut auf die Kulturgefäße verteilt. Für die definierte Aussaat der Zellen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels der Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim).

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Etwa 0,5 bis 1 x 10^6 Zellen wurden in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium (5% DMSO in TIC für Melanozyten, 10% DMSO in OSMO II für fibroblastenartige Zellen, Hela- und Brown Melanoma-Zellen) resuspendiert, langsam auf -70°C heruntergekühlt und nach 24 h in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurde die tiefgefrorene Zellsuspension kurz bei 37°C erwärmt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit 9 ml des jeweiligen Kulturmediums versetzt und die Zellen herunterzentrifugiert. Das Sediment wurde in Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche gegeben. Um eventuell verbliebene Reste von DMSO sowie abgestorbene und nicht angeheftete Zellen zu entfernen, wurde das Medium nach 24 h gewechselt.

2.1.4 Kulturbedingungen für die Experimente

Um die unter verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen eines Experiments miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen vor dem eigentlichen Experiment parallel in gleicher Zellzahl ausgesät und fünf Tage unter Standardbedingungen kultiviert.

Standardkultivierung der Zellen für die Experimente

Für die meisten Experimente wurden die Zellen in Petrischalen mit 60 cm^2 Kulturoberfläche ausgesät. Nach der Kultivierung unter Standardbedingungen wurden die Zellen für einen bestimmten Zeitraum unter den spezifischen Bedingungen kultiviert (Protokoll 1) oder vor der Zugabe der spezifischen Substanzen zuerst ein bis vier Tage unter reduzierten Bedingungen (ohne PMA oder ohne bFGF, bzw. ohne CT/IBMX oder in reduziertem Serum) kultiviert (Protokoll 2).

Kulturbedingungen für die Pulse chase Experimente mit Melanozyten

Für die Pulse chase Experimente wurden die Zellen in Petrischalen kultiviert. Nach der Kultivierung der Melanozyten für fünf Tage unter TIC wurden sie für 24 h unter den zu testenden Kulturbedingungen (TIC oder TIC ohne PMA) kultiviert. Anschließend bekamen die Zellen für 6 h 0,15 ml Markierungmedium/cm^2 Kulturoberfläche (RPMI 1640 (ohne Met, Cys, Gln) (Sigma) mit 0,1 mM IBMX, 2,5 nM Choleratoxin, 8% dialysiertes FCS, 8% dialysiertes NU–Serum und 1,6 mM Glutamin (Invitrogen), mit 30 µCi L-[^{35}S]-Promix (Cys/Met) (>1000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) pro ml Medium, mit oder ohne die zu testenden Substanzen (PMA, Colcemid, Staurosporin, Chloroquin oder Okadasäure). Die Dialyse von FCS und NU-Serum erfolgte in einem Dialyseschlauch mit 500 Da Ausschlussvolumen (Spectra/Por, Houston, USA) gegen PBS. Nach der Markierung wurden die Zellen zweimal mit 0,15 ml Ham F10 (mit 10-fach Cys/Met) pro cm^2 Kulturoberfläche bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen für den 0 h Messwert. Die Zellen für den 2. Messwert erhielten das nicht radioaktive Medium mit den spezifischen Bedingungen und wurden nach 48 h lysiert.

Kulturbedingungen für die Phosphorylierungs-Experimente

Nach der Kultivierung unter Standardmedium (Protokoll 1) oder anschließender Differenzierung der Zellen durch Entzug von Wachstumsfaktoren (Protokoll 2) erhielten die Zellen 0,15 ml Markierungmedium (1,5 mM Glutamin, 0,1 mM IBMX, 1,2 nM Choleratoxin, 8% FCS, 8% NU-Serum in RPMI 1640 (phosphatfrei) (Sigma) pro cm^2 Kulturoberfläche mit 50 µCi ^{32}P-Orthophosphate (PBS13, 0,11 pmol/µCi, Hartmann, Braunschweig) pro ml Medium und wurden gleichzeitig mit den zu untersuchenden Substanzen stimuliert. FCS und NU-Serum wurde gegen NaCl/Hepes-Puffer dialysiert (10 mM Hepes/NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl). In einigen Experimenten wurden die Zellen für einen bestimmten Zeitraum in Markierungsmedium mit ^{32}P-Orthophosphate aber ohne CT/IBMX und Serum (oder reduziertem Serumanteil) kultiviert. Anschließend erfolgte die weitere Phosphorylierung für verschiedene Zeiten unter Zugabe der zu untersuchenden Substanzen. Für das Phosphoaminosäure- und Peptidmapping wurden die unter Standardmedium kultivierten Zellen für weitere 24 h ohne die zu untersuchenden Wachstumsfaktoren kultiviert. Dann wurden sie für 12 h mit oder ohne den zu untersuchenden Wachstumsfaktoren mit jeweils 1,5 mCi (Phosphoaminosäuremapping) oder 0,75 mCi (Peptidmapping) ^{32}P-Orthophosphate pro ml Medium markiert.

Eingesetzte Substanzen und deren Wirkung

Die in den verschiedenen Experimenten eingesetzten Substanzen, deren Effekte untersucht wurden, waren

⇨ Choleratoxin (CT). CT erhöht den intrazellulären cAMP Spiegel durch Aktivierung der Adenylatcyclase.

⇨ 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX). IBMX erhöht den intrazellulären cAMP Spiegel durch reversible Hemmung der cAMP Phosphodiesterase.

⇨ Fetales Kälberserum (FCS). Es enthält wichtige Wachstumsfaktoren, die zur Proliferation verschiedener Zelltypen notwendig sind. Um Immunreaktionen gegen menschliche Zellen zu verhindern, wurde das Serum für 30 min bei 56°C inaktiviert. Dabei wurden auch eventuell noch vorhandene Mykoplasmen abgetötet.

⇨ NU-Serum. Dies ist ein steriler Serumersatz, der Insulin, Transferrin, Trijodthyronin, Östrogene und Hydrocortison enthält. Zudem sind auch wesentliche Bestandteile für die Melanozytenkultivierung wie bFGF und Putrescin enthalten.

⇨ Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA). PMA aktiviert bestimmte Subtypen der Proteinkinase C. 1 mg wurde in 0,1 ml DMSO gelöst und mit 39,9 ml sterilem PBS verdünnt (25 µg/ml).

⇨ bFGF: Dieser basische Fibroblasten Wachstumsfaktor wurde in PBS mit 0,2% BSA (A6792, Sigma), 0,002% Heparin (H2149, Sigma) gelöst. Heparin wirkt als Antikoagulans, indem es die Geschwindigkeit der Bildung von irreversiblen Komplexen aus Antithrombin III und den Serinproteasen unter den Gerinnungsfaktoren steigert.

⇨ Colcemid (Invitrogen). Es bindet an lösliches Tubulin und blockiert somit das Wachstum der Mikrotubuli.

⇨Staurosporin (Sigma). Dies ist ein starker Inhibitor von verschiedenen Proteinkinasen und hemmt unter anderem die PKC und die PKA.

⇨ MG132 (Carbobenzoyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) (Sigma). Dieser Proteasomen Inhibitor reduziert die Degradation von Ubiquitin-konjugierten Proteinen durch den 26S Komplex.

⇨ MG115 (Carbobenzoyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norvalinal) (Sigma). Der Proteasomen Inhibitor hemmt 20S und 26S Proteasomen.

⇨ MG 101 (N-Ac-Leu-Leu-norleucinal) (Sigma). Dieser Calpain Inhibitor hemmt Calpain I, Calpain II, Cathepsin B, Cathepsin L, sowie in höherer Konzentration auch Proteasomen.

⇨ E64d ((2S,3S)-trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-3-Methyl-Butane Ethyl Ester) (Sigma) ist ein Cystein Protease Inhibitor.

⇨ Chloroquin (Sigma). Es erhöht als schwache Base den intralysosomalen pH-Wert und hemmt dadurch die sauren Hydrolasen.

⇨ Okadasäure (Calbiochem, Bad Soden). Sie hemmt die Serin-/Threonin- spezifischen Protein-Phosphatasen PP-1 und PP-2A, nicht aber Tyrosin- oder andere Phosphatasen. Sie verursacht eine stark erhöhte Phosphorylierung einer breiten Palette von Proteinen an Serin- und Threonin-Resten.

⇨ Na-Orthovanadat (Sigma). Es verhindert die Phosphorylgruppenübertragung von Phosphatasen und hemmt dadurch Dephosphorylierungen von Proteinen.

2.2 Nachweis von Proteinen aus Zellen

Für den Nachweis der Proteine erfolgte erst die Lyse der Zellen, dann die SDS-PAGE mit einer vorausgehenden Immunopräzipitation (IP) bei Neurofibromin und den Fusionsproteinen. Beim Peptidmapping erfolgte nach der IP erst die Spaltung von Neurofibromin. Beim Aminosäuremapping erfolgte nach der IP und der Spaltung von Neurofibromin die Dünnschichtchromatographie. Nach der SDS-PAGE erfolgte der Nachweis mittels PhosphoImager oder es wurde ein Westernblot durchgeführt. Hier erfolgte dann ein Immunonachweis mit anschließender ECL-Reaktion und Belichtung eines Autoradiographie Films. Zum Vergleich der Sequenzabfolge und der molekularen Masse von Neurofibromin diente die Datenbank der Universität Genf (SwissProt-Expasy).

2.2.1 Lyse der Zellen

Die Lyse erfolgte mit 7,5 µl RIPA-Lysepuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1% IGEPAL (Sigma) und 0,25% Natriumdeoxycholat) pro cm^2 Kulturgefäßoberfläche. Mit diesem Puffer werden die Proteine auch zum größten Teil aus den Membranbestandteilen gelöst. Um die Degradation der Proteine zu verhindern, erfolgte die Lyse bei 4°C in der Anwesenheit von 6 µM Aprotinin, 80 µM Leupeptin, 15 µM Pepstatin (alle von Roche) im Lysepuffer. Für den Nachweis von phosphoryliertem Neurofibromin wurden dem Lysepuffer zusätzlich noch Phosphatase-Inhibitoren (1 mM Na-Orthovanadat, 10 mM NaF, 10 Na-Pyrophosphat und 2 mM p-Nitrophenylphosphat (alle von Sigma) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min mit dem Lysepuffer wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, Newton, USA) vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt, das Zelllysat in ein Reaktionsgefäß überführt, durch Vortexen gründlich gemischt und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugieren sedimentiert (10 min, 13000 g, 4°C). Der Überstand wurde mit 8% Glycerin versetzt und gemischt. Die Lysate wurden direkt verwendet oder bei –20°C gelagert.

2.2.2 Bestimmung der Gesamtproteinmenge

Die Bestimung der Gesamtproteinmenge im Zelllysat erfolgte mit dem von Lowry et al. (1951) entwickelten und hier in verbesserter Form vorliegenden quantitativen Test zur Proteinbestimmung, *DC* Protein Assay (Bio-Rad, München). Wenn die Abweichungen der doppelt bestimmten Messwerte über 10% lagen, wurden die Messungen wiederholt.

2.2.3 Immunopräzipitation von Neurofibromin

Neurofibromin ist im Westernblot zwar nachzuweisen, jedoch aufgrund seiner geringen Expression in den Zellen damit nicht sicher quantifizierbar. Deshalb wurde Neurofibromin vorher mittels einer Immunopräzipitation (IP) angereichert. Bei einer Gesamtproteinmenge von 200-1000 µg waren quantitative Messungen möglich (Müller R. Diplomarbeit 1997).
Das Zelllysat wurde mit 15 µl Protein-A-Sepharose CL-4B-Suspension (PAS) (Amersham Pharmacia Biotech) (1:2 verdünnt in RIPA-Puffer) für 45 min bei 4°C im Überkopftaumler präinkubiert. Durch Zentrifugieren (2 min, 1000 g, 4°C) wurden Bestandteile aus dem Lysat entfernt, welche möglicherweise direkt an PAS binden und dadurch den Nachweis von Neurofibromin im anschließenden Westernblot durch unerwünschten Hintergrund stören. Zum Überstand wurde 2 µg des Antikörpers sc-67 oder sc-68 (beide Santa Cruz, USA) pro mg Gesamtprotein zugesetzt und 2 h im Überkopftaumler bei 4°C inkubiert. Die polyklonalen Antikörper gegen Neurofibromin erkennen die Aminosäuresequenz 509-528 (sc-68) und 2798-2818 (sc-67) im Neurofibromin. Die Spezifität dieser Antikörper wurde von Roudebush et al. (1997) demonstriert. Anschließend wurde je 30 µl der PAS-Suspension (1:2 verdünnt in RIPA-Puffer) zugegeben, 2 h im Überkopftaumler bei 4°C inkubiert und dann zentrifugiert (1 min, 1000 g, 4°C). Danach wurde der im Sediment befindliche Immunokomplex aus Neurofibromin, Antikörper und Protein-A-Sepharose gewaschen (Griesser et al. 1995). Nach dem letzten Waschschritt wurde 30 µl des 1-fach SDS-Probenpuffer (angesetzt als 5-fach SDS-Probenpuffer mit 0,75 g SDS, 1,75 ml Glycerin, 1,25 ml β-Mercaptoethanol, einer kleinen Spatelspitze Bromphenolblau, 1,6 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8) auf das Sediment gegeben und 5 min auf dem Thermomixer bei 95°C unter Schütteln denaturiert. Anschließend wurde die PAS herunterzentrifugiert (2 min, 13000 g) und der Überstand sofort in der SDS-PAGE aufgetrennt oder vorübergehend bei -20°C gelagert. Der Nachweis erfolgte wie unter 2.2.7 und 2.2.8 oder 2.2.9 beschrieben.

2.2.4 Immunopräzipitation der Fusionsproteine EGFP-NF1(±10a2) und RM1 bis 11

Um die Fusionsproteine für die Detektion im Westernblot anzureichern und die Spezifität der Immunodetektion zu erhöhen, wurden die Fusionsproteine, wenn nicht anders beschrieben, wie unter 2.2.3 immunopräzipitiert. Die IP der Fusionsproteine EGFP-NF1(±10a2) (der Plasmide, pEGFP-*NF1(±10a2)*) erfolgte mit 3 µg des aus dem Kaninchen stammenden polyklonalen Antikörper anti-GFP (GFP290, Abcam, Cambridge, UK) pro 1 mg Gesamtprotein und PAS. Die IP des β-Galaktosidase-Fusionsproteins (des Plasmids,

pcDNA/TO/*myc*-HisC/*lacZ*) und der Fusionsproteine (RM 1 bis RM 11) (der Plasmide, pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F*) erfolgte mit den monoklonalen Antikörpern anti-c-myc IgG_1 (M5546, Sigma) (8 µl), anti-myc IgG_1 (R950 Invitrogen) (4 µg), anti-Polyhistidin IgG2a (H1029, Sigma) (8 µl) oder anti-HisC IgG_{2b} (R930, Invitrogen) (4 µg). Die angegebene Menge an Antikörper wurde pro ml Zelllysat eingesetzt. Zur Bindung des Immunokomplex wurde Protein-G-Plus-Agarose (PGA) (sc-2002, Santa Cruz) verwendet, da die Affinität der mitunter zu testenden IgG_1 Antikörper zu PGA stärker ist als für die bisher verwendete PAS. Außerdem liefert die PAS im anschließenden Westernblot Signale bei 42 kDa, die stören könnten, während PAG, ein 30 kDa bis 35 kDa Protein wesentlich unterhalb der nachzuweisenden Fusionsproteine läuft. Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie unter 2.2.3, der Nachweis wie unter 2.2.9 beschrieben.

2.2.5 Co-Immunopräzipitation von Hsp70 mit Neurofibromin

Neurofibromin wurde wie unter 2.2.3 beschrieben immunopräzipitiert und der Immunokomplex gewaschen. Die hier verwendeten Waschpuffer enthielten jedoch kein SDS und nach dem letzten Waschschritt wurde noch zweimal mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von neuem Zelllysat (700 µg Gesamtprotein) der zu untersuchenden Probe zum Immunokomplex, um das Angebot an Substrat (Hsp70) für die Bindung an Neurofibromin zu erhöhen. Nach einer erneuten Inkubation für 2 h wurde der Immunokomplex erneut gewaschen, das Sediment mit 30 µl des 1-fach SDS-Probenpuffer versetzt und wie unter 2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Als Negativkontrolle erfolgte die IP mit dem Antikörper sc-67, dessen Bindungsdomäne vorher durch Präinkubation (2 h bei 4°C) mit dem 20-fachen Konzentrationsüberschuss des korrespondierenden Peptids (sc-67P, Santa Cruz) blockiert wurde. Alternativ erfolgte als Negativkontrolle die IP nur mit PAS oder in Lysat von *Nf1(-/-)*-Mäuse-Zellen, die ja kein Neurofibromin enthalten. Der Nachweis des immunopräzipitierten Neurofibromins und des mit ihm co-immunopräzipitierten Hsp70 erfolgte wie unter 2.2.9 beschrieben.

2.2.6 Subzelluläre Fraktionierung

Hierfür wurden 2 x 10^6 Zellen pro Versuchsbedingung abtrypsiniert, dreimal mit 5 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min, 300 g bei RT). Zum Zellsediment wurde 500 µl eiskalter hypotonischer Puffer (Boyer et al. 1994), mit Proteinase-Inhibitoren (6 µM Aprotinin, 80 µM Leupeptin, 15 µM Pepstatin) zugegeben und die Zellen 20 min bei 4°C

schwellen gelassen. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment in 600 µl eiskalter 0,5 M Sucrose-Lösung, mit Protease-Inhibitoren resuspendiert, mittels eines Teflonstößels und anschließend mit einer Kanüle (0,45 mm Durchmesser, 27 G x 7/8) durch fünfmal auf- und abgesaugen desintegriert. Die ungebrochenen Zellen, Zelltrümmer und Zellkerne wurden mittels Zentrifugation (10 min, 1000 g, 4°C) entfernt. Der 1000 g Überstand wurde dann für 10 min mit 13000 g bei 4°C zentrifugiert, wobei die Fraktion 1 (13000 g Sediment) gewonnen wurde. Der 13000 g Überstand wurde anschließend 1 h mit 100000 g bei 4°C zentrifugiert. Dabei wurden die Fraktion 2 (Sediment = P 100) und Fraktion 3 (Überstand = S 100) gewonnen. Jedes Pellet wurde 2 mal in PBS gewaschen und erneut durch Zentrifugieren sedimentiert. Die Fraktionen 1 und 2 wurden in je 500 µl RIPA-Lysepuffer (mit Protease-Inhibitoren) resuspendiert und für die weitere Lyse 10 min auf Eis inkubiert. Zur Fraktion 3 wurde 5-fach RIPA-Lysepuffer gegeben, um die Proteine unter annähernd gleichen Pufferbedingungen (in 1-fach Lysepuffer) immunopräzipitieren zu können, und diese ebenfalls 10 min auf Eis inkubiert. Von der Fraktion 1 wurden nach der Lyse durch 10 min Zentrifugation mit 13000 g bei 4°C noch restliche Zelltrümmer entfernt. Der Überstand mit den herausgelösten Proteinen wurde zur weiteren Untersuchung in neue Reaktionsgefäße überführt. Zu jeder Fraktion wurde 8% Glycerin zugegeben, gemischt und die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung mittels IP (2.2.3) bei –20°C eingefroren.

2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) in einem Sammelgel (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 4% Acryl-/Bisacrylamid (C=3%), 0,1% TEMED und 0,075% APS in H_2O), gefolgt von einem Trenngel (375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS, x% Acryl-/Bisacrylamid (C=3%), 0,1% TEMED, 0,05% APS in H_2O). Die Gesamtkonzentration (T=x%) an Acryl-/Bisacrylamid variierte je nach der Größe des aufzutrennenden Proteins. Für die Auftrennung von immunopräzipitiertem Neurofibromin wurde ein Trenngel mit T=5,5% verwendet, für die Auftrennung von immunopräzipitiertem Neurofibromin und gleichzeitig das mit ihm co-immunopräzipitierte Hsp70 ein Trenngel mit T=8%. Für die Auftrennung von p120 GAP, β-Tubulin und Hsp70 wurden die zu untersuchenden Zelllysate mit demjenigen Volumen an 5-fach SDS-Probenpuffer versetzt, sodass die Proben in 1-fach SDS-Probenpuffer vorlagen. Die Proben

zum Nachweis von p120 GAP und β-Tubulin wurden 5 min bei 95°C im Thermomixer geschüttelt, kurz anzentrifugiert und in einem Trenngel mit T=10% aufgetrennt. Das immunopräzipitierte EGFP oder die immunopräzipitierten Fusionsproteine EGFP-NF1(+10a2) und EGFP-NF1(-10a2) wurden in einem Trenngel mit T=12% aufgetrennt, das immunopräzipitierte β-Galaktosidase-Fusionsprotein und die immunopräzipitierten Fusionsproteine RM 1 bis RM 11 in einem Trenngel mit T=10%. Der Laufpuffer bestand aus 200 mM Glycin, 25 mM Tris und 0,1% SDS in H_2O. Die Elektrophorese im Sammelgel erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA, im Trenngel bei 30 mA. Die Auftrennung der Fragmente des mit BrCN gespaltenen Neurofibromins erfolgte in einem Trenngel mit T=16,5% und einem Laufpuffer, bestehend aus 100 mM Tris, 100 mM Tricine und 0,1% SDS in H_2O. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA im Sammelgel und bei 20 mA im Trenngel. Als Molekulargewichtsmarker wurden RPN 756 und RPN 800 sowie die [^{14}C]-methylierten Marker CFA 755 und CFA 756 (10-100 µCi/mg Protein) (alle von Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Die SDS-PAGE wurde in den Elektrophoresekammern Multigel-Long G47 (Biometra, Göttingen) oder OWL GE-P1X (Hybaid-AGS, Heidelberg) durchgeführt.

2.2.8 Nachweis der ^{35}S- oder ^{32}P-markierten Proteine

Das Polyacrylamidgel mit den in der SDS-PAGE aufgetrennten, radioaktiv markierten Proteinen wurde auf ein etwa 1,5 mm starkes Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt, mit einer Klarsichthaushaltsfolie bedeckt und im Gel Dryer, Model 543 (Bio-Rad) für 45 min bei 80°C getrocknet. Die getrockneten Gele wurden im PhosphoScreen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) für ein bis sieben Tage exponiert, die Signale im PhosphorImager (Molecular Dynamics) detektiert und mittels ImageQuant (Molecular Dynamics) ausgewertet. Die Ermittlung der Halbwertszeit von Neurofibromin aus den verschiedenen Proben (2.1.4) erfolgte anhand der Intensitätunterschiede.
Unter der Voraussetzung einer exponentiellen Turnover-Kinetik konnte dies mit der Formel $T_{1/2} = - \ln 2 * t / \ln [N(t)/N_0]$ berechnet werden. $T_{1/2}$ ist die HWZ (h), t die Zeit (h) zwischen den Messpunkten, N_0 die Aktivität zum Zeitpunkt 0 h und N(t) die Aktivität zum zweiten Zeitpunkt.

2.2.9 Westernblot und Immunonachweis der Proteine

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine Neurofibromin, p120 GAP, β-Tubulin, Hsp70, EGFP, das β-Galaktosidase-Fusionsprotein sowie die Fusionsproteine EGFP-NF1(+10a2), EGFP-NF1(-10a2) und RM 1 bis RM 11 wurden mittels Tank Blot-Verfahren (Towbin et al. 1979, Khyse-Anderson 1984) auf eine PVDF-Membran (Serva) transferiert. Die PVDF-Membran wurde 5 min mit Methanol benetzt. Anschließend wurde die PVDF-Membran sowie das Trenngel 15 min in vorgekühltem Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin in H_2O) equilibriert. Die Glasfasermatten und zwei 0,3 mm starke Filterpapiere (in der Größe des Trenngels) (Schleicher & Schuell) wurden ebenfalls mit Transferpuffer benetzt. Das anschließend zusammengebaute Blotsandwich wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) eingehängt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt bei 4°C über einen Zeitraum von 3 h. Dann wurde die Blotapparatur auseinandergebaut, die PVDF Membran kurz in PBST (0,05% Tween 20 in PBS) gelegt und anschließend mit 0,5 ml Blockierlösung (5% Magermilchpulver (Töpfer) in PBST) pro cm^2 Membranoberfläche luftblasenfrei in eine Kunststofftüte eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem Taumler bei 4°C, oder 1 h bei RT. Hierbei wurden die auf der Membran unspezifischen Protein-Bindungsstellen abgesättigt. Dann wurde die Blockierlösung abgegossen und durch 0,2 ml Antikörper-Inkubationslösung (1% Magermilchpulver in PBST) pro cm^2 Membran-oberfläche ersetzt, zu der der spezifische Antikörper zugegeben wurde.

Immunonachweis von Neurofibromin

Hierzu wurde 0,1 µg des Antikörpers sc-67 (wenn die IP mit sc-68 durchgeführt wurde) oder 0,1 µg des Antikörpers sc-68 (wenn die IP mit sc-67 erfolgte) pro ml Inkubationslösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf einem Taumler bei 4°C. Danach wurde die Membran in einer Schale zweimal kurz mit H_2O, dann 10 min mit PBST unter Schütteln gewaschen (dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt) und anschließend noch einmal kurz mit PBST. Dann erfolgte die Inkubation mit 0,35 µg des HRP konjugierten anti-Kaninchen IgG (NA934, Amersham Pharmacia Biotech) pro ml Inkubationslösung auf einem Taumler für 1 h bei RT. Nachfolgend wurde, wie vorher beschrieben, gewaschen. Der Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mittels des ECL (enhanced chemoluminescence) Systems (Amersham Pharmacia Biotech) nach Vorschrift. Die Banden des dabei belichteten und anschießend im Hyperprocessor-

Filmentwickler (Amersham Pharmacia Biotech) entwickelten Autoradiographiefilms wurden mit dem videodensitometrischen System der Abteilung Isotopenanwendung (Universität Ulm) quantifiziert. Diese erfolgte mit dem von D. Breitig und W. Warchol entwickelten Programm „Density“.

Immunonachweis von p120 GAP und β-Tubulin

Um die geblotteten Proteine p120 GAP (120 kDa) und β-Tubulin (50 kDa) in getrennten Immunoreaktionen nachzuweisen, wurde die PVDF-Membran in der Höhe des Markerproteins BSA (69 kDa) durchgeschnitten. Der Nachweis von p120 GAP erfolgte mit 0,25 µg des aus der Maus stammenden monoklonalen Antikörper Anti-GAP (Ras-) IgG1 (G12920, Transduction Laboratories, USA) pro ml Inkubationslösung, der gegen die Aminosäuresequenz 381 bis 390 gerichtet ist. Die Detektion von β-Tubulin erfolgte mit dem aus der Maus stammenden monoklonalen anti-β-Tubulin Isotyp I und II (T8535, Sigma) (Verdünnung 1 : 3000). Die Inkubation erfolgte bei beiden Antikörpern für 2 h bei RT auf einem Taumler. Anschließend wurde gewaschen und mit 0,35 µg des HRP konjugierten anti-Maus IgG (NA931, Amersham Pharmacia Biotech) pro ml Inkubationslösung für 1 h auf einem Taumler bei RT inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie beim Immunonachweis von Neurofibromin.

Immunonachweis von Hsp70

Der Nachweis erfolgte mit 0,1 µg des Antikörper sc-24 (Ab-2, Clone W27, Santa Cruz) gefolgt von der Inkubation mit 0,35 µg des HRP konjugierten anti-Maus IgG (NA931, Amersham Pharmacia Biotech) pro ml Inkubationslösung für 1 h auf einem Taumler bei RT. Die weiteren Schritte erfolgten wie beim Immunonachweis von Neurofibromin.

Nachweis der Fusionsproteine

Der Immunonachweis der auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine erfolgte bei EGFP sowie bei den Fusionsproteine EGFP-NF1(±10a2) mit 0,5 µg des aus der Maus stammenden monoklonalen Anti-EGFP IgG2a (JL-8, 8371-2, Clontech, Heidelberg) pro ml Inkubationslösung für 3 h bei RT. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit 0,35 µg des HRP konjugierten anti-Maus IgG (NA931) pro ml Inkubationslösung für 1 h auf einem Taumler bei RT.

Beim β-Galaktosidase-Fusionsprotein und den Fusionsproteinen RM 1 bis RM 11 erfolgte der Nachweis mit 0,5 µl anti-Polyhistidin (H1029, Sigma), 0,3 µg anti-HisC-HRP (R931, Invitrogen), 0,5 µl anti-c-myc (M5546, Sigma), oder 0,3 µg anti-c-myc-HRP (R951, Invitrogen) pro ml Inkubationslösung. Beim Nachweis mit den nicht HRP konjugierten Antikörpern erfolgte nach dem Waschen, wie oben beschrieben, die Inkubation mit dem HRP konjugierten anti-Maus IgG (NA931). Die weiteren Schritte erfolgten wie beim Immunonachweis von Neurofibromin.
Zum Nachweis der geblotteten und mit ^{32}P markierten Fusionsproteine wurde die Membran im PhosphoScreen für ein bis sieben Tage exponiert. Die Signale wurden im PhosphorImager detektiert und mittels ImageQuant ausgewertet.

2.2.10 Nachweis eines möglicherweise verkürzten Neurofibromins

Hierzu erfolgte die IP wie unter 2.2.3 beschrieben mit dem Antikörper gegen die Amino-terminale Domain von Neurofibromin (sc-68). Um ein verkürztes Neurofibromin von unspezifischen Signalen unterscheiden zu können wurde in einem parallelen 2. Ansatz, bei einem Aliquot der gleichen Probe, der Antikörper (sc-68) mit dem entsprechenden Peptid (sc-68P) vorinkubiert. Nach der SDS-PAGE (2.2.7) erfolgte der Westernblot und der Immunonachweis mit demselben Antikörper wie für die IP (sc-68) (2.2.9).

2.2.11 Aminosäuremapping von Neurofibromin

Nach der radioaktiven Markierung der Zellen (2.1.4) wurde Neurofibromin immunopräzipitiert (2.2.3), in der SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.7) und detektiert (2.2.8). Die detektierte Neurofibrominbande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das Neurofibromin mit Elutionspuffer aus dem Gel herausgelöst (van der Geer et al. 1998). Das getrocknete Neurofibromin wurde mittels 5,7 M HCl-Lösung (60 min, 110°C) hydrolysiert, das Hydrolysat getrocknet, die Proben in Ladepuffer aufgenommen und auf einer 100 µm Dünnschicht Zellulose (TLC)-Platte in der HTLE 7000 Dünnschicht Elektrophorese-Apparatur (CBS Scientific) aufgetrennt. Die Trennung erfolgte erst mit Elektrophoresepuffer pH 1,9 (20 min, 1500 Volt), dann in der 2.Dimension mit Elektrophoresepuffer pH 3,5 (16 min, 1300 Volt). Die TLC-Platte wurde anschließend bei 65°C getrocknet und mit Ninhydrin-Lösung besprüht, um die drei Phosphoaminosäure-Marker sichtbar zu machen (van der Geer et al. 1998). Nach anschließender Inkubation der TLC-Platten im PhosphoScreen konnten die radioaktiven Spots im PhosphoImager

detektiert und mittels ImageQuant sichtbar gemacht werden. Die Zuordnung der radioaktiven Spots erfolgte anhand der mittels Ninhydrin sichtbar gemachten nicht radioaktiven Phosphoaminosäuren.

2.2.12 Spaltung von Neurofibromin mittels BrCN

Immunopräzipitiertes Neurofibromin wurde wie unter 2.2.7 beschrieben in der SDS-PAGE aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (2.2.11). Zu den in der Vakuumzentrifuge getrockneten Proben wurde je 100 µl BrCN-Lösung (50 ng BrCN/ml in 70% Ameisensäure) zugegeben, resuspendiert und für 2 h bei RT inkubiert. Dann wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge erneut getrocknet und das Sediment anschließend zweimal mit 50 µl H_2O gewaschen. Das erneut getrocknete Sediment wurde in 30 µl SDS-Probenpuffer gelöst und mittels Dialyseschlauch (500 Da Ausschlussvolumen) (Spectra/Por) über Nacht bei 4°C gegen SDS-Probenpuffer dialysiert. Die Auftrennung erfolgte wie unter 2.2.7, der Nachweis wie unter 2.2.8, beschrieben.

2.3 Weitere Untersuchungen

2.3.1 Messung der Aufnahme von ^{32}P-Orthophosphat in die Zellen

Um die Aufnahme von ^{32}P-Orthophosphat zu untersuchen, wurden die Zellen in 24 Well Platten (Nunc, Wiesbaden) kultiviert, markiert (2.1.4) und anschließend dreimal rasch mit eiskaltem Ham F10 gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 0,5 ml/cm^2 eiskalter 8% TCA-Lösung (Merck) mit anschließender Inkubation für 30 min bei 4°C. Nach Abnahme des TCA-Überstandes und Waschen mit eiskaltem H_2O erfolgte die Zugabe von 0,2 ml/cm^2 5% SDS und anschließend die Inkubation für 15 min bei RT. Der Überstand wurde in ein Szintillationsgefäss überführt, 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard, USA) zugegeben, gemischt und 10 min unter Schütteln inkubiert. Die Messung der darin enthaltenen proteingebundenen Aktivität erfolgte im Primo Liquid Szintillation Counter 1209 (LKB Instruments, Rockville, MD).

2.3.2 Bestimmung der Proliferation der Zellen

Die Proliferation der Zellen wurde über den Einbau an ^{3}H-Thymidin ermittelt. Für alle Messwerte wurde eine 5-fach Bestimmung durchgeführt (Griesser et al. 1997). Die Zellen

wurden in 96 Well Platten (Nunc) in Medium mit dialysiertem Serum kultiviert und mit 5 µCi ^{3}H-Thymidin (80 µCi/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) pro Well für 4 h markiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche abgelöst und mit einem „cell harvester“ (LKB Instruments, Rockville, MD) auf Glasfiberfilter überführt. Die Filter wurden mit H_2O gewaschen, mit Szintillations-flüssigkeit versetzt, in Folien eingeschweißt und die Radioaktivität im Betaplate Liquid Scintillations Counter 1205 (Amersham Pharmacia Biotech) gemessen.

2.3.3 Bestimmung der Melanogenese

Der Nachweis der Melaninmenge erfolgte wie in Kaufmann et al. (1991) beschrieben. Die zu untersuchenden kultiverten Melanozyten wurden abtrypsiniert, gezählt und 10 min mit 300 g bei RT zentrifugiert. Zur Lyse wurde 40 µl 1% Triton X-100 auf das Zellsediment gegeben, 1 h bei RT inkubiert, dann 10 µl DNase (1 mg/ml) zugegeben und nochmals 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Proteine durch Zugabe von 50 µl Proteinase K (0,4 mg/ml) für 48 h bei 45°C verdaut. Anschließend wurde das Melanin durch die Inkubation mit 100 µl 1 M NaOH für 1,5 h bei 95°C gelöst, die Lysate zentrifugiert (20 min, 13000g) und die optische Dichte des Überstandes bei λ=475 nm im Spektralphotometer Ultrospec Plus (Amersham Pharmacia Biotech) gemessen. Als Standard wurde synthetisches Melanin verwendet.

2.3.4 Enzymtest für die lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A/B und Cathepsin D

Die Zellen wurden rasch in 300 bis 500 µl eiskaltem RIPA-Puffer ohne EGTA und ohne Protease-Inhibitoren lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 min, 13000 g, 4°C) und der Überstand für den Enzymtest verwendet. Die Messung der Aktivität der lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A (Cerebroside-sulfatase) und B (N-acetylgalactosamine-4-sulfatase, Chondroitinsulfatase, Condroitinase) erfolgte nach Milsom et al. (1972), die von Cathepsin D nach Turk et al. (1984).

Messung der Enzymaktivität von Cathepsin D

Für die zur Messung der Enzymaktivität von Cathepsin D benötigte Tyrosin Standard-Kurve wurden Konzentrationen von 0 bis 210 nmol L-(-)-tyrosin in jeweils 500 µl einer 200 mM HCl-Lösung hergestellt. Nach Zugabe von 1ml einer 0,5M NaOH-Lösung wurde

je 300 µl 33% Folin-Ciocalteu Reagenz hinzugefügt. Die Messung der Extinktion erfolgte nach 5 min bei λ=750 nm im Spektralphotometer Ultrospec Plus. Für den anschließenden Nachweis der Enzymaktivität von Cathepsin D in den Zellen wurden je 100 µl Lysat zur Bestimmung des Leerwerts bzw. des Messwerts zu 50 mg Hämoglobin, gelöst in 400 µl Acetat-Puffer, gegeben. Zum Leerwert wurde, zur Verhinderung der Reaktion, jeweils gleich 1 ml TCA zugegeben. Die Proben wurden 10 min bei 37°C auf dem Thermomixer geschüttelt (800 U/min), mit 1 ml Trichloressigsäure abgestoppt, geschüttelt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Filtrierung (Filter Nr. 595, Schleicher & Schuell) wurde zu je 500 µl des Filtrats 1000 µl einer 0,5 M NaOH und 300 µl des 33% Folin-Ciocalteu Reagenz zugegeben. Gemessen wurde nach 5 min bei λ=750 nm.

Messung der Enzymaktivität von Arylsulfatase A und B

Zu 100 µl Zelllysat wurde 100 µl Acetatpuffer (0,5 M Na-Acetat/Essigsäure-Puffer, pH 5,5), dann 200 µl Substratlösung (20 mM Dipotassium 2 hydroxy-5-nitrophenylsulfat in Acetatpuffer) gegeben. Zum Leerwert wurde, zur Verhinderung der Reaktion, jeweils gleich 1 ml der 1 M NaOH zugegeben. Dann erfolgte die Inkubation für 15 min bei 37°C. Bei der zu messenden Probe wurde die Reaktion anschließend durch die Zugabe von 1 ml 1M NaOH gestoppt. Die Messung im Spektralphotometer erfolgt innerhalb 1 h bei λ=515 nm. Nach Abzug des Leerwerts des jeweiligen Lysats ergab sich die Extinktion.

2.3.5 Nachweis der Expression von pEGFP und deren Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie

Dazu wurden HeLa-Zellen, die mit pEGFP-N1, pEGFP-*NF1(+10a2)* und pEGFP-*NF1(-10a2)* transfiziert wurden, sowie nicht transfizierte HeLa-Zellen in 8 Well Chamberslides Lab TEK II (Nunc) ausgesät und drei Tage kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült, anschließend 30 min bei RT mit 4% Paraformaldehyd fixiert und danach wieder zweimal mit PBS gewaschen. Die anschließende Eindeckelung erfolgte mit Vecta Shield (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Die Auswertung der EGFP Signale der Zellen erfolgte mittels dem Fluoreszenzmikroskop, Axioskop Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit dem Fluoreszenz-Filtersatz für Fluorescein (Zeiss) und der Bildbearbeitungssoftware Isis 3 (Metasystems, Altlussheim).

2.4 Klonierung und Transfektion der NF1-Sequenzen

Um den Einfluss der Sequenz der Isoform von Neurofibromin zu untersuchen, die durch das neu entdeckte alternativ gespleisste Exon 10a2 entsteht, wurden zwei NF1-cDNA-Sequenzen, mit oder ohne Exon 10a2 vor das EGFP von pEGFP-N1 (Clontech) kloniert. Diese wurden in Brown Melanoama- und HeLa-Zellen transfiziert, welche dann die zwei EGFP-Fusionsproteine mit einer Teilsequenzen von Neurofibromin, ohne (EGFP-NF1(-10a2)), oder mit Exon 10a2 (EGFP-NF1(+10a2)) exprimieren.

Bei den anschließenden Experimenten wurde das durch Tetracyclin induzierbare Expressionssystem (TREx, Invitrogen) verwendet. Hiermit kann die Expression der Fusionsproteins gezielt induziert werden, wodurch toxische Effekte der überexprimierten Fusionsproteine verhindert oder zumindest minimiert werden. Weiterhin kann die Induktion einer posttranslationalen Modifikation, wie eine Phosphorylierung, direkt untersucht werden, ohne dass eine dem Versuch vorausgehende Modifikation durch unbekannte Faktoren im Medium an vorher exprimiertem Fusionsprotein erfolgt, welche die Experimente beeinflussen kann. Das induzierbare Plasmid enthält ein myc- und ein HisC-Epitop sowie einen Tetracyclin regulierten CMV-Promotor. Ein zweites Plasmid exprimiert ein Repressorprotein (TR), das an den Tet-Operator des induzierbaren Plasmids bindet und dessen Expression hemmt. Das zu den transfizierten Zellen zugegebene Tetracyclin interagiert mit dem Repressorprotein und ermöglicht somit die Expression des gewünschten Fusionspropteins. Beide Plasmide werden stabil in eukaryotische Zellen transfiziert. Hiermit sollte eine Phosphorylierungskarte des gesamten Neurofibromins erstellt werden.

2.4.1 Selektion und Vermehrung der Plasmide

Jeweils 20 µg von pEGFP-N1 und von den Plasmiden des TREx-Systems pcDNA6/*TR*, pcDNA4/TO/*myc*-His/*lacZ* sowie pcDNA4/TO/*myc*-HisC (Invitrogen) wurden mit 20 µl sterilem H_2O resuspendiert. Von dieser Plasmid-Lösung (1µg/ml) wurde je 1 µl in der Elektroporation eingesetzt. Von den Plasmiden, in die die gewünschten Sequenzen kloniert wurden, wurde nach erfolgter Ligation je 1–2 µl des Ansatzes in der Elektroporation eingesetzt. Die Elektroporation erfolgte in E. coli XL1 blue (Stratagen, Heidelberg). Die mit pEGFP transfizierten Bakterien wurden mit 30 µg Kanamycin pro ml Medium, die mit den Plasmiden des TREx-Systems transfizierten Bakterien mit 50 µg Ampicillin pro ml Medium selektiert.

Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation

Die E. coli XL1 blue wurden in 5 ml LB-Medium (1% Bacto-Trypton (N-Z Amine A), 0,5% Hefeextrakt, 170 mM NaCl in H_2O, pH 7,5) erst über Nacht bei 37°C, dann nach Zugabe von 200 ml LB-Medium für weitere 3 h bei 37°C im Brutraum unter Schütteln kultiviert. Die anschließend gemessene Extinktion der Bakteriensuspension bei λ=600 nm sollte > 0,6 sein (0,6-1). Nach Inkubation für 30 min auf Eis und Zentrifugation (15 min, 2000 g, 4°C) wurden die Zellen mehrfach mit H_2O gewaschen, insbesondere um Salze, die die Transformation stören würden, zu entfernen. Die Bakteriensedimente wurden in steriler eiskalter 10% Glycerin-Lösung suspendiert, zentrifugiert (15 min, 2000 g, 4°C), in 400 µl steriler eiskalter 10% Glycerin-Lösung resuspendiert, zu 40 µl Portionen aliquotiert und bis zur Elektroporation bei -70°C gelagert.

Elektroporation der Plasmide und Selektion der Bakterienklone

Die aliquotierten Bakteriensuspensionen wurden bei RT aufgetaut, auf Eis mit 1–2 µl Plasmid-Lösung versetzt, in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette überführt und 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte mit dem „Bacterial Electro-Transformation and Pulse Controller“ (2500 V, 25 µF, 200 Ω, 4 bis 5 ms) (BioRad). Nach der Elektroporation wurde sofort 900 µl SOC-Medium (2% Bacto-Trypton (N-Z Amine A), 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgSO_4$, 10 mM $MgCl_2$ und 20 mM Glucose) zugegeben, gemischt, in 10 ml Bakterienröhrchen überführt und 45 bis 60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden davon 100 µl auf LB-Agarplatten (LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar) mit Antibiotikum ausplattiert und die Bakterien auf den Agarplatten über Nacht im Brutraum bei 37°C kultiviert.

Kultivierung der Bakterienklone und Isolierung der Plasmide mittels GFX Micro Plasmid Prep Kit

Aliquots der auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert. Die Bakterienkultur wurde abzentrifugiert und vom Sediment wurde ein Tropfen in 500 µl Einfriermedium gemischt und bei –70°C gelagert. Aus dem Bakteriensediment wurden mittels des GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech) die Plasmide isoliert. Im letzten Schritt wurden die Plasmide durch

Zentrifugation eluiert. Anschließend wurde die DNA-Menge mittels OD-Messung bestimmt. Dazu wurde die Plasmid-Lösung 1 : 50 oder 1 : 100 mit H_2O auf ein Endvolumen von 300 µl verdünnt und die Extinktion bei λ=260 nm gegen λ=280 nm gemessen. Vom Extinktionswert der Probe, bei λ=260 nm, wurde der Extinktionswert von H_2O, bei λ=260 nm, welcher als Leerwert dient, abgezogen. Dieser Wert wurde mit 50 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert, was die DNA-Menge in µg/ml Lösung ergibt.

Kultivierung der Bakterienklone für die Transfektion und Isolierung der Plasmide mittels GFX Micro Plasmid Prep Kit

Für die Experimente mussten die Vektoren vermehrt werden. Dazu wurden die kultivierten und eingefrorenen Bakterien verwendet, die in LB-Medium (mit Antibiotikum) für 12-16 h bei 37°C auf einem Schüttler vermehrt wurden. Die erreichte Bakterienzahl sollte anschließend bei etwa 3-4 x 10^9 pro ml Medium liegen. Diese Kultur wurde anschließend zentrifugiert (15 min, 6000g, 4°C) , das Pellet wenn erforderlich bei –20°C eingefroren, oder die Plasmide nach Vorschrift des GFX Micro Plasmid Prep Kit isoliert. Die Elution der Plasmide erfolgte mit 10 mM Tris/HCl-Lösung, pH 8 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Anschließend wurde die DNA-Konzentration durch OD-Messung, wie oben beschrieben, bestimmt.

2.4.2 Herstellung der NF1(±10a2)-cDNA-Sequenzen und Klonierung in pEGFP-N1

Zur Herstellung der NF1(±10a2)-Sequenzen für die Ligation in das pEGFP-N1 wurde vorhandene humane cDNA verwendet. Diese wurde durch eine RT-PCR an RNA aus Zellen der Kontrollen N25 (für NF1-Sequenz mit 10a2) und MK13 (für NF1-Sequenz ohne 10a2) mit den Primern NF9H und NF10bR amplifiziert. Diese Produkte wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit denselben Primern reamplifiziert (Kaufmann et al. 2002).

Herstellung der NF1(±10a2)-cDNA-Sequenzen

Ausgehend von diesen RT-PCR-Produkten wurden die NF1-cDNA Inserts für die Ligation in den Expressionsvektor hergestellt. Um überlappende 5'-Enden für die Ligation in das mit *Bgl* II und *Hin*d III in der „multiple-cloning-site" geschnittene Plasmid zu erhalten,

wurden die PCR-Produkte mit zwei verschiedenen Primerpaaren reamplifiziert, deren Produkte um 4 Basenpaare versetzt sind (Abbildung 2, Seite 37). Als Primer wurden 10a2N1 (5' GAT CTC GCC ACC ATG GTG TCA GAA TTC ACC TTC T 3') und 10a2N4 (5' TTA GTT TCA CCA TGG AC 3') sowie 10a2N2 (5' TCG CCA CCA TGG TGT CAG AAT TCA CCT TCT 3') und 10a2N3 (5' AGC TTT AGT TTC ACC ATG GAC 3') verwendet. Die Primer lieferten PCR-Produkte mit 320 bp und 365 bp. Im 5'-Bereich besitzen sie eine Kozak-Sequenz, deren ATG mit der Neurofibrominsequenz und der am 3'-Ende folgenden pEGFP-Sequenz im Leserahmen ist. Das NF1-cDNA-Fragment, das mit diesen Primern hergestellt wurde, korrespondiert zu dem NF1-Sequenzbereich von Basenposition 1198-1497 und umfasst 300 bp (ohne 10a2) bzw. 345 bp (mit 10a2). Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler GeneAmp 9700 (PerkinElmer, Boston, MA) in einem 50 µl PCR-Ansatz mit jeweils 5-100 ng cDNA-Templet, 1 U Taq-DNA-Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), 200 µM von jedem dNTP (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), je 250 nM Primer in PCR-Puffer (50 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris/HCl pH 8,3). Die Reaktion erfolgte anfangs mit 3 min bei 94°C, gefolgt von 35 Cyclen mit 93°C für 30 sec, 45°C für 30 sec und 72°C für 30 sec. Der letzte Schritt war 10 min 72°C. Die PCR-Produkte wurden mit 10-fach Probenpuffer versetzt und in einem 2,5% Agarosegel aufgetrennt. Daneben wurde in einer Spur 0,5–2 µg der 100 bp DNA-Leiter (Peqlab, Erlangen) aufgetragen. Der Probenpuffer bestand aus 50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau und 0,25% Xylencyanol in 10 mM EDTA pH 8. Das Agarosegel bestand je nach Anwendung aus 0,8-2,5% Ultrapur Agarose (Invitrogen) und 0,0001% Ethidiumbromid in TBE-Puffer (17,8 mM Tris, 17,8 mM Borsäure, 0,4 mM EDTA pH 8). Die Elektophorese erfolgte bei 15 Volt pro cm^2. Über das mit der DNA interkalierende Ethidiumbromid wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht (λ=302 nm) sichtbar gemacht, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und über den GFX-PCR+DNA+Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach Vorschrift aufgereinigt. Im letzten Schritt wurden die PCR-Produkte mit 50 µl Elutionspuffer (2 mM Tris/HCl pH 8) von der Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (1 min, 13000 g, RT) und für die Blunting/Kinasing Reaktion in der Vakuumzentrifuge auf ein kleineres Volumen eingeengt. In der darauf folgenden mittels Sure clone ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführten Blunting/Kinasing Reaktion wurden die durch die Taq-DNA-Polymerase erzeugten Adenins am 3'-Ende der PCR-Produkte mit dem Klenow-Enzym entfernt und die 5'-Enden für die Ligation in das Plasmid mittels der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert. Anschließend wurden die PCR-Produkte wieder über

den GFX-PCR+DNA+Gel Band Purification Kit aufgereinigt und mit je 50 µl Elutionspuffer (2 mM Tris/HCl pH 8) eluiert.

Um für die anschließende Rekombination der PCR-Produkte jeweils gleiche Mengen einsetzen zu können, musste die Konzentration abgeschätzt werden. Hierzu wurde je ein Aliquot auf einem Agarosegel neben der Low DNA Massen-Leiter (Invitrogen) mit einer definierten Menge an DNA aufgetrennt. Anhand der DNA-Fragmente dieser Massen-Leiter (Fragmente von 100-2000 bp mit 10-200 ng DNA pro 4 µl dieser Mixtur) konnte die Menge der PCR-Produkte abgeschätzt werden. Die in äquimolarer Menge gemischten PCR-Produkte wurden 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend bei RT renaturiert und dann bei 4°C bis zur Ligation gelagert. Somit wurden für die Ligation Inserts in der richtigen Orientierung und überlappenden Enden zu einem Anteil von 25% erhalten.

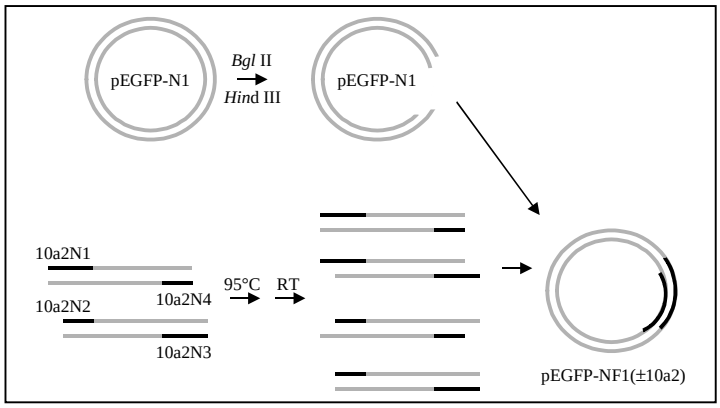

Abbildung 2: Ligation der NF1(±10a2)-cDNA in pEGFP-N1.
Um überhängende 5'-Enden zu erhalten wurde das Plasmid in der „multiple-cloning-site" mit *Bgl* II und *Hin*d III geschnitten. Die PCR Produkte wurden mit zwei verschiedenen Primerpaaren amplifiziert, deren Produkte um 4 Basenpaare versetzt sind (10a2N1 und 10a2N4 sowie 10a2N2 und 10a2N3). Nach der Denaturierung bei 95°C und der Renaturierung bei RT erhält man statistisch zu ¼ das Insert mit den überhängenden Enden in der richtigen Orientierung für die Ligation.

Ligation der NF1(±10a2)-cDNA-Sequenzen in das Plasmid pEGFP-N1

Das, wie unter 2.4.1 beschrieben, vermehrte pEGFP-N1 (4730 bp) wurde in einem Doppelverdau mit je 5 U/µg DNA *Bgl* II und *Hin*d III (NEB, Frankfurt) für 4 h bei 37°C für die Ligation linearisiert. Zur Kontrolle erfolgte parallel ein Verdau der DNA des Phagen λ (MBI Fermentas). Für die anschließende Ligation erfolgte die Kontrolle der Linearisierung und die Mengenabschätzung des pEGFP-N1 durch Auftrennen eines Aliquots in einem 0,8% Agarosegel neben der 1 kb Basenpaar-Leiter (NEB) und der Low DNA Massen-Leiter (Invitrogen). Für die Ligation wurden jeweils ungefähr 100 ng PCR-Produkt als 4-fach molarer Überschuss zum linearisierten Plasmid zugegeben. Die

entsprechenden Mengen an PCR-Produkten und Plasmid wurden in der Vakuumzentrifuge auf so ein Volumen eingeengt, dass nach Zugabe von 2 µl 5-fach Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (Invitrogen) ein Gesamtvolumen von 10 µl erreicht wird. Nach Mischen und Zentrifugieren erfolgte die Ligation für 16 h bei 8°C (Abbildung 2, Seite 37). Dann wurde der Reaktionsansatz bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert.

2.4.3 Herstellung und Klonierung der 12 einander überlappenden NF1-cDNA-Fragmente in pcDNA4/TO/*myc*-HisC

Herstellung der cDNA für die Klonierung

Für die Klonierung der *NF1*-Sequenzen (*F*) in pcDNA/TO/*myc*-HisC wurden Zellen von MK4 mit 700 µl RLT-Lysepuffer (mit 1% β-Mercaptoethanol) auf Eis lysiert, mit einem Zellschaber abgeschabt und die RNA mittels des RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Dann erfolgte die Bestimmung der RNA-Menge mittels OD-Messung (2.4.1). Anschließend wurde, um Reste von DNA zu beseitigen, 5 µg der RNA-Lösung mit 2,5 µl 10-fach Puffer und 2,5 µl DNase I (Invitrogen) versetzt, mit DEPC-Wasser auf 25 µl aufgefüllt, gevortext, herunterzentrifugiert und dann 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 µl EDTA-Lösung (25 mM, pH 8), Vortexen, Zentrifugation und Inkubation für 10 min bei 65°C wurde die Probe auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription mit dem SuperScript Preamplifikation Kit (Invitrogen). Die Reaktion erfolgte im Eppendorf Mastercycler 5330 (Eppendorf, Hamburg) mit 10 min bei 25°C (Primerbindung), gefolgt von 50 min bei 42°C (cDNA-Extension) und dann 15 min bei 70°C (denaturieren). Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt, 1 µl RNase H zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Lagerung erfolgte entweder bis zur PCR auf Eis oder für länger bei -20°C.

Herstellung der NF1-cDNA-Sequenzen

Für die Herstellung der zu ligierenden Sequenzen wurde der jeweilige 5‘Primer um eine Kozak-Sequenz ergänzt und so modifiziert, dass das in der Kozak-Sequenz enthaltene ATG mit der darauffolgenden NF1-Sequenz im Leserahmen ist. Der jeweilige 3‘Primer wurde so modifiziert, dass die NF1-Sequenz mit der in der darauffolgenden myc und HisC-Sequenz des Plasmid im Leserahmen ist. Für die PCR wurde eine Pwo-DNA-Polymerase (Roche) verwendet, da diese aufgrund ihrer 3‘-5‘ Proofreading Aktivität eine etwa 10-fach

höherer Genauigkeit aufweist als andere DNA-Polymerasen (z.B. Taq-DNA-Polymerase). Die Amplifikation erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz mit „hot-start“. Dazu wurden zwei Mix mit je 25 µl hergestellt. Der erste Mix enthielt 200 µM von jedem dNTP, je 300 nM des 5’-Primer und 3’-Primer, desweiteren 0,1 - 0,75 µg Templet in 25 µl H_2O. Der zweite Mix enthielt den PCR-Puffer (50 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 10 mM Tris/HCl pH 8,3) und 2,5 U Pwo-DNA-Polymerase in 25 µl H_2O. Beide Mix wurden zusammenpipettiert, gemischt, herunterzentrifugiert und sofort in den vorgeheizten Thermocycler GeneAmp 9700 gestellt. Das PCR-Programm begann mit 3 min denaturieren bei 94°C, gefolgt von 30 Cyclen bei 94°C für 15 sec, 30 sec Annealing bei individueller Temperatur entsprechend der Primer und einer Elongation zwischen 2 und 3 min je nach zu amplifizierender Produktlänge bei 72°C. Nach dem letzten Cyclus erfolgte eine Elongation von 7 min bei 72°C. Ein Aliquot der PCR-Produkte wurde in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und auf Nebenprodukte überprüft. Waren keine Nebenprodukte vorhanden, wurden die PCR-Produkte direkt mittels GFX-PCR+DNA+Gel Band Purification Kit aufgereinigt. Waren Nebenprodukte vorhanden, wurden die PCR-Produkte in einem 1,5% oder 2% Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und wie oben beschrieben aufgereinigt. Im letzten Schritt wurden die PCR-Produkte mit 50 µl Elutionspuffer (2 mM Tris/HCl pH 8) von der Säule in ein Reaktionsgefäß eluiert (1 min zentrifugieren mit 13000 g bei RT) und für die Kinasing-Reaktion in der Vakuumzentrifuge auf ein kleineres Volumen eingeengt. In der darauffolgenden Kinasing Reaktion wurden die 5‘-Enden für die Ligation in das Plasmid mittels der T4-Polynukleotidkinase des Sure clone ligation Kit phosphoryliert. Nach der Aufreinigung wurde ein Aliquot des jeweiligen PCR-Produkts auf einem Agarosegel neben der Low DNA Massen-Leiter mit einer definierten Menge an DNA aufgetrennt und die Konzentration abgeschätzt (2.4.1).

Tabelle 1: Primer für die Herstellung der Inserts

Fragment 1: (F1)	AT: 59,0° C	PCR-Produkt: 1190 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R5 (hin)	5‘-GGG GAG GAC ATG GCC GCG CAC AGG CCG GTG GAA-3‘	0000-0024
R6 (rück)	5‘-AA GTG TTG GTT GTT GTG AGG GCT TAT-3‘	1156-1182
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 0001-1179 (1179 bp)		
Fragment 2: (F2)	AT: 51,3° C	PCR-Produkt: 1119 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R7 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GCC CAT CCA AGT AAG CCA TTC T-3‘	1076-1093
R8 (rück)	5‘-GA CAC TTC ATC CAC CCC ACA C-3‘	2180-2160
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 1078-2181 (1104 bp)		
Fragment 3: (F3)	AT: 57,4° C	PCR-Produkt: 1191 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R9 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GCC ATG TCC TGT TTC CGC CAC CTC TG-3‘	2119-2141
R10 (rück)	5‘-TT GGC TTC CAT CAA TTC CAC ACC ATC -3‘	3294-3271
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 2116-3297 (1182 bp)		
Fragment 4: (F4)	AT: 54,2° C	PCR-Produkt: 1121 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R11 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GAC CTG ACA GAC TGG GTT ATG G-3‘	3132-3151
R12 (rück)	5‘-AT TCT AGG TGG TGG CTT TTT ATC –3‘	4241-4219
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 3133-4239 (1107 bp)		
Fragment 4a: (F4a)	AT: 54,2° C	PCR-Produkt: 1184 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R11 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GAC CTG ACA GAC TGG GTT ATG G-3‘	3132-3151
R12 (rück)	5‘-AT TCT AGG TGG TGG CTT TTT ATC –3‘	4241-4219
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 3133-4239 (1170bp)		
Fragment 5: (F5)	AT: 54,7° C	PCR-Produkt: 1281 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R13 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GCA CCG TAT GAA GCA GGG ATT T –3‘	4196-4216
R14 (rück)	5‘-GT GTG TTG GGG GAT AGA GTC G -3‘	5464-5445
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 4198-5463 (1266 bp)		
Fragment 6: (F6)	AT: 51,8° C	PCR-Produkt: 1158 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R15 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GTC TGC CTA GTA GAT GAG AAC C –3‘	5310-5329
R16 (rück)	5‘-GC TGA CTT GAC TTT GCT AAT G –3‘	6455-6435
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 5311– 6453 (1143 bp)		
Fragment 7: (F7)	AT: 54,5° C	PCR-Produkt: 1203 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R17 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GCC ACA GGT CCG CTC TC –3‘	6271-6287
R18 (rück)	5‘-GG ATA GGT GGC TGC AAG GTA TCC-3‘	7460-7441
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 6271– 7464 (1194 bp)		
Fragment 8: (F8)	AT: 54,9° C	PCR-Produkt: 1031 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R19 (hin)	5‘-C GAG GAC ATG GAA ACT CAG CCA TGG TCC TCT CC-3‘	7408-7427
R20 (rück)	5‘-CC CAC GAT CTT CTT AAT GCT ATT ACG-3‘	8454-8431
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 7408 – 8454 (1047 bp)		
Fragment 9 : (F9) = (CSRD)	AT: 54,0°C	PCR-Produkt: 1116 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R33 (hin)	5‘-C GAA ACG ATG GCT CAG GAA GCA ATG GAG GCT CTG C-3‘	1624-1648
R34 (rück)	5’-GC CAC TTT CTC ATG GTT ACA CAC-3’	2728-2707
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 1624-2727 (1104 bp)		
Fragment 10: (F10) = (LRD)	AT: 55,0°C	PCR-Produkt:1278 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R35 (hin)	5’-C GAA ACG ATG GCT CAC AAA CCT GTG GCA GAT ACA CA3’	4587-4610
R36 (rück)	5’-C TAA CTC TTT GTC GTT TGG CAT CAT-3’	5851-5828
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 4588-5850 (1264 bp)		
Fragment 11 (F11) = (CTD)	AT: 55,0°C	PCR-Produkt: 1686 bp
Primer		Position im NF1-Gen (bp)
R37 (hin)	5’-C GAA ACG ATG GCT GAC ACT TAC AAC AGT CAA GTT-3’	6782-6804
R20 (rück)	5’-CC CAC GAT CTT CTT AAT GCT ATT ACG-3’	8454-8431
Protein codierende Sequenz im NF1-Gen: 6784-8454 (1671 bp)		

In der Tabelle sind die Sequenzen der Primer zur Herstellung der NF1-Fragmente für die Ligation in das Plasmid, die Annealingtemperaturen (AT) für die jeweiligen Primerpaare, die Länge der PCR-Produkt (bp), die Position der Primer im *NF1*-Gen sowie die für die Neurofibrominfragmente codierenden Sequenzbereiche angegeben. Dass die erhaltene NF1-Sequenz zum Teil länger ist als die replizierte NF1-Sequenz kommt dadurch zustande, dass durch den Übergang vom 3‘-Ende der NF1-Sequenz in die 5’-Sequenz des Plasmids ein degeneriertes Codon entsteht, welches für die der NF1-Sequenz entsprechenden Aminosäure codiert.

Ligation der NF1-cDNA-Sequenzen in pcDNA/TO/*myc*-HisC

Für die Ligation wurde 1 µg des in 10 mM Tris/HCl, pH 8 gelösten pcDNA/TO/*myc*-HisC mit 10 Units des Restriktionsenzyms *Eco* RV (NEB) für 4 h bei 37°C geschnitten. Die Aufreinigung wurde mittels des GFX-PCR+DNA+Gel Band Purification Kit durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 10 mM Tris/HCl, pH 8. Das geschnittene und gereinigte Plasmid wurde mit der alkalischen Phosphatase (CIP) (Roche) am 5‘-Ende dephosphoryliert, um dessen Religation zu verhindern. Hierzu wurde 26 µl von der Lösung mit dem linearisierten Plasmid mit 3 µl 10-fach Puffer und 1 µl CIP gemischt (30 µl Ansatz) und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die erneute Aufreinigung mittels des GFX-PCR+DNA+Gel Band Purification Kit durchgeführt. Die Elution erfolgte mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Für die anschließende Ligation erfolgte die Kontrolle der Linearisierung und die Mengenabschätzung des Plasmides durch Auftrennen eines Aliquots im Agarosegel neben der 1 kb Basenpaar-Leiter und der Low DNA-Massen-Leiter wie in 2.4.2 beschrieben. Die anschließende Ligation der PCR-Produkte in das linearisierte pcDNA/TO/*myc*-HisC erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben.

2.4.4 Kontrolle der Sequenz der Plasmide

Die aus den Bakterien isolierten pEGFP-N1, pEGFP-*NF1(+10a2)* und pEGFP-*NF1(-10a2)* wurden mittels PCR überprüft. Die verwendeten Primer waren 10a2FH (5´ AAC TCC GCC CCA TTG ACG 3´) und 10a2FR (5´ CCT CGC CGG ACA CGC TGA ACT T 3´) und lieferten PCR-Produkte von 276 bp bei pEGFP, von 582 bp bei pEGFP-*NF1(-10a2)* und von 627 bp bei pEGFP-*NF1(+10a2)*. Die Amplifikation erfolgte mit der Tag-DNA-Polymerase, wie unter 2.4.2 beschrieben, in 15 mM Puffer bei einer Annealingtemperatur (AT) von 55°C und 30 Cyclen. Die PCR Produkte von pEGFP-*NF1(+10a2)* und pEGFP-*NF1(-10a2)* wurden von der Firma SequiServe (Vaterstetten) mit denselben Primern sequenziert.

Die mit den verschiedenen NF1-Fragmenten ligierten pcDNA4/TO/*myc*-HisC wurden in E. coli XL1 blue transformiert und die Bakterien auf den LB-Agarplatten selektioniert (2.4.1). Die gewachsenen Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher angestochen (2.4.1) und vor dem Überführen in die Bakterienröhrchen kurz in den vorbereiteten PCR-Ansatz getaucht. Dies stellte das Templet für die PCR dar, die wie unter 2.4.2 beschrieben mit der Tag-DNA-Polymerase bei einer AT von 51,7°C und 30 Cyclen mit den Primer R1 und BGHrev (Tabelle 2, Seite 42 u. Tabelle 3, Seite 43) erfolgte. Die Länge der erwarteten

PCR-Produkte betrug 272 bp + die Länge (bp) des jeweiligen Inserts (Tabelle 3, Seite 43). Die Bakterienklone, die ein PCR-Produkt der richtigen Länge lieferten, wurden hochkultiviert und die Plasmide wie unter 2.4.1 beschrieben isoliert. Diese Plasmide wurden nun mittels PCR auf die richtige Orientierung des Inserts untersucht. Hierzu wurden der Primer R1 und der Rückprimer, mit dem das jeweilige Insert hergestellt wurde, oder der Hinprimer, mit dem das jeweilige Insert hergestellt wurde und der Rückprimer R2His verwendet (Tabelle 1, 2 u. 3). Die Amplifikation erfolgte mit der Taq-DNA-Polymerase, wie unter 2.4.2 beschrieben. Die jeweiligen Annealingtemperaturen (AT) sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Die Kontrolle von pcDNA6/*TR* erfolgte mit den Primern TR-for und TR-rev (AT=51°C), die ein PCR-Produkt von 335 bp lieferten. Die Kontrolle von pcDNA4/TO/*myc*-HisC (234 bp) und pcDNA4/TO/*myc*/HisC/*lacZ* (3265 bp) erfolgte mit den Primern R1 und R2His (AT=54°C) (Tabelle 2, Seite 42). Alternativ wurden die Primer R1 und R2myc verwendet. Plasmide mit den Inserts, welche ein PCR-Produkt richtiger Länge lieferten, sollten ein Insert mit der richtigen Orientierung besitzen und wurden, um die Sequenz zu überprüfen, mit den Primern R1 und BGHrev von der Fa. SequiServe sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Orginalsequenzen verglichen. Um eine genügende Menge des jeweiligem Plasmids für die Transfektion in eukaryotische Zellen zur Verfügung zu haben, wurden die Bakterien, die die Plasmide mit den richtigen Sequenzen enthalten hochkultiviert und die Plasmide mittels des GFX Micro Plasmid Prep Kit (2.4.1) isoliert.

Tabelle 2: Primer für die Kontrolle der in die Plasmide klonierten Sequenzen

Primer	Primer-Sequenz	Position in der Sequenz von pcDNA4/TO/*myc*-HisC (bp)
R1	5'-AGA CGC CAT CCA CGC TGT TTT-3'	900-920
BGHrev	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'	1171-1154
R2His	5'-CAA TGG TGA TGG TGA TGA TGA C-3'	1133-1112
R2myc	5'- CTT CTG AGA TGA GTT TTT GTT CG-3'	1090-1068
Primer	Primer-Sequenz	Position in der Sequenz von pcDNA6/TR (bp)
TR-for	5'-GCT TTG CTC GAC GCC TTA G-3'	1831-1849
TR-rev	5'-GGT GTT TCC CTT TCT TCT TTA G-3'	2165-2144

Bezeichnung und Sequenz der Primer sowie die Position in der Sequenz der Plasmide (bp)

Tabelle 3: Primerpaare und ihre Annealingtemperatur mit erwarteter Produktlänge zur Kontrolle der in die Plasmide klonierten Sequenzen

Hin – Primer	Rück-Primer	AT (°C)	Produktlänge (bp)
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F*			
R1	BGHrev	51,7	Insert + 272
R1	R2His	54,0	Insert + 234
R1	R2myc	54,0	Insert + 191
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F1* = RM1			6337
R1	R6	57,5	1322
R5	R2His	57,0	1292
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F2* = RM2			6266
R1	R8	53,0	1251
R7	R2His	53,0	1221
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F3* = RM3			6338
R1	R10	56,0	1323
R9	R2His	56,0	1293
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F4 (F4a)* = RM4 (4a)			6268 (6331)
R1	R12	52,0	1253 (1316)
R11	R2His	56,0	1223 (1286)
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F5* = RM5			6428
R1	R14	52,0	1413
R13	R2His	57,0	1383
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F6* = RM6			6305
R1	R16	50,0	1290
R15	R2His	55,0	1260
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F7* = RM7			6350
R1	R18	56,0	1335
R17	R2His	56,0	1305
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F8* = RM8			6178
R1	R20	57,0	1163
R19	R2His	55,0	1133
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F9* = RM9			6263
R1	R34	54,0	1248
R33	R2His	54,0	1218
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F10* = RM10			6425
R1	R36	55,0	1410
R35	R2His	55,0	1380
pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F11* = RM11			6833
R1	R20	55,0	1818
R37	R2His	55,0	1788

Primerpaare für die Kontrolle der klonierten Sequenzen in den angegebenen Plasmiden, deren Annealingtemperatur (AT), sowie die Länge des zu erwartenden PCR-Produkts (bp). F ist die Bezeichnung der in das Plasmid klonierten Fragmente (F1-F11), RM ist die Bezeichnung für die von den Plasmiden exprimierten Fusionsproteine (RM1-11), bestehend aus dem vom Fragment (F) gebildeten Protein und dem myc-HisC-Epitop.

2.4.5 Vorbereitung der Plasmide für die Transfektion in eukaryotische Zellen

Die Plasmide pEGFP-*NF1(+10a-2)* und pEGFP-*NF1(-10a2)* sowie als Kontrolle pEGFP-N1 wurden circulär in Brown Melanoma- und HeLa-Zellen transfiziert. Die Plasmide des TREx-Systems, pcDNA6/*TR* und pcDNA/TO/*myc*-His/*lacZ* wurden linearisiert, die der Plasmide pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F* linearisiert (stabil), oder circulär (transient) transfiziert.

Die Plasmide des TREx-Systems wurden im Ampicillin-Resistenzgen geschnitten, das Plasmid pcDNA6/*TR* mit dem Restriktionsenzyms *Fsp* I (NEB) (5 U/µg DNA, 2 h, 37°C), das Plasmid pcDNA/TO/*myc*-HisC/*lacZ* mit *Ahd* I (NEB) (5 U/µg DNA, 2 h, 37°C) die Plasmide pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F* mit *Pvu* I (NEB) (2 U/µg DNA, 2 h, 37°C). Die Unterschiede bei Verwendung der Restriktionsenzyme waren dadurch bedingt, dass *Ahd* I im *NF1*-Gen schneidet und *Pvu* I im *lacZ*-Gen. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des geschnittenen Vektors über den GFX-PCR+DNA+Gel Band Purification Kit. Die Elution erfolgte mit TE-Puffer.

2.4.6 Transfektion in eukaryotische Zellen

Für die Transfektion in Brown Melanoma- und HeLa-Zellen wurden die Zellen einen Tag vorher ausgesät (10000 Zellen/cm^2 Kulturoberfläche). Die Transfektion erfolgte mit Effectene (Qiagen). Nach einer Inkubation der Zellen für 6 bis 18 h erfolgte ein Mediumwechsel. Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen zusätzlich durch die Zugabe von Antibiotikum selektiert.

2.4.7 Selektion und Kontrolle der transfizierten eukaryotischen Zellen

Um die transfizierten Zellen selektionieren zu können, musste zuerst die Konzentration an Antibiotikum ermittelt werden, bei welcher das Wachstum der Zellen innerhalb von zwei Wochen nach der Zugabe des Antibiotikums verhindert wird. Für Brown Melanoma- und Hela-Zellen waren es 1 mg Geneticin (G-418) (Invitrogen) und 3 µg Blasticidin (Invitrogen) pro ml Medium. Bei Zeocin (Invitrogen) waren es 0,2 mg für Hela-Zellen und 0,3 mg für Brown Melanoma-Zellen pro ml Medium.

Selektion und Kontrolle der mit pEGFP-N1, pEGFP-*NF1(+10a2)* und pEGFP-*NF1(-10a2)* transfizierten Zellen

Für die Selektion wurden die mit pEGFP transfizierten Zellen unter Geneticin kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden unter dem Mikroskop ICM 35 (Zeiss, Oberkochen) mittels dem Fluoreszenz-Filtersatz für Fluorescein (Zeiss) kontrolliert. Anhand der grün leuchtenden Signale konnte im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen die Expression der Fusionsproteine kontrolliert werden.

Selektion und Kontrolle der mit pcDNA6/*TR* transfizierten Zellen

Bei den Zellen, welche mit den Plasmiden pcDNA/TO/*myc*-HisC/*lacZ* und pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F* transfiziert werden sollten und bei denen die Expression der Fusionsproteine reguliert werden sollte, erfolgte zuvor die stabile Transfektion mit dem Plasmid pcDNA6/*TR*. Die Selektion auf pcDNA6/*TR* erfolgte mit Blasticidin. Der Nachweis der stabilen Transfektion und Expression des *TR*-Gens erfolgte durch eine RT-PCR (2.4.3) von der gebildeten mRNA mit den Primern TR-for und TR-rev (2.4.4), die im *TR*-Gen binden. Die Kontrolle erfolgte erstmals, nachdem die Zellen der Klone zu einer für die RT-PCR ausreichenden Zahl herangewachsen waren, dann nach drei Monaten Kultivierung mit dem Selektionsantibiotikum und anschließend einen Monat nach weiterer Kultiverung der Zellen ohne dieses Antibiotikum.

Selektion und Kontrolle der mit pcDNA4/TO/myc-His/*lacZ* und pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*F* transfizierten Zellen

Bei den Zellen, die mit den Plasmiden pcDNA/TO/*myc*-His/*lacZ* oder pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F* transfiziert wurden, erfolgte die Selektion mit Zeocin. Die erhaltenen Klone wurden jeweils in neue Kulturgefäße überführt und die Zellen bei Kultivierung unter Zeocin vermehrt. Nachdem sich die Zellen bis zur Konfluenz vermehrten, wurde ein Aliqot der Zellen eingefroren, die anderen für die weiteren Untersuchungen kultiviert. Bei den Zellen, die den Repressor (TR) exprimieren, wurde der Repressor durch die Zugabe von Tetracyclin (Invitrogen) (1 µg/ml Medim) für 24 h kompetitiv gehemmt, bevor der Nachweis der Genprodukte von pcDNA/TO/*myc*-His/*lacZ* oder pcDNA/TO/NF1/myc-HisC/*F* erfolgte. Der Nachweis der Expression der β-Galaktosidase, des in Säuger-Zellen transfizierten *lacZ*-Gens, erfolgte über seine enzymatische Aktivität mittels des β-Gal Staining Set (Roche). Nach Entfernen der Färbelösung und Waschen der Zellen mit PBS wurden die sich noch in PBS befindlichen Zellen unter dem Mikroskop Diavert (Leitz, Wetzlar) analysiert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die gefärbten und nicht gefärbten Zellen ausgezählt. Der Nachweis der Expression der Fusionsproteine von pcDNA/TO/NF1/*myc*-HisC/*F* erfolgte in 3 Schritten.

Erst wurden die Zellen auf das Vorhandensein der gewünschten genomischen DNA untersucht. Dazu wurden die Zellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes abtrypsiniert (2.1.3), das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und die DNA nach dem DNeasy Protocol for cultured animal cells (Qiagen) isoliert. Anschließend wurde die Menge an DNA im

Eluat mittels OD-Messung (2.4.1) ermittelt. An dieser DNA erfolgte der Nachweis der in pcDNA/TO/*myc*-HisC klonierten NF1-cDNA-Sequenzen durch eine PCR. Dazu wurden die Primer R1 und R2His (oder R2myc), R1 und der Rückprimer, mit dem das jeweilige Insert hergestellt wurde, oder der Hinprimer mit dem das jeweilige Insert hergestellt wurde und der Primer R2His verwendet (2.4.4 sowie Tabelle 2 u. 3).
Im 2. Schritt erfolgte der Nachweis des jeweiligen Transkripts in den Zellen. Dazu wurden die Zellen direkt im Kulturgefäß auf Eis lysiert, die RNA mittels RNeasy isoliert, deren Konzentration bestimmt und eine reverse Transkription durchgeführt (2.4.3). Die PCR erfolgte mit den Hinprimern, mit denen das jeweilige Insert hergestellt wurde und R2His (2.4.4 sowie Tabelle 2 u. 3).
Im 3. Schritt erfolgte der Nachweis der Fusionsproteine. Hierzu wurden die Zellen wie unter 2.1.5 und 2.1.7 beschrieben kultivert. Nach der Lyse der Zellen (2.2.1) und Bestimmung der Gesamtproteinmenge (2.2.2) erfolgte die Immunopräzipitation (2.2.4), gefolgt von SDS-PAGE (2.2.7) und dem Westernblot mit Immunonachweis (2.2.9).

2.5 Elektronische Datenbank Information

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/
SwissProt-Expasy, http://www.expasy.ch

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Dissertation war, herauszufinden, über welchen intrazellulären proteolytischen Pathway natives Neurofibromin abgebaut wird. Da Neurofibromin posttranslational phosphoryliert werden kann (Izawa et al. 1996), sollte außerdem untersucht werden, ob eine Phosphorylierung von Neurofibromin in diesen Mechanismus involviert ist. Eine wesentliche Voraussetzung, die dazu nötigen Untersuchungen durchführen zu können, war die Fähigkeit, die Mengen an Neurofibromin vergleichend quantifizieren zu können. Diese Methode wurde von J. Griesser entwickelt (Griesser et al. 1995, Griesser J. Dissertation 1996) und in meiner Diplomarbeit (Müller R. Diplomarbeit 1997) optimiert. Für die Experimente wurden die Zellen unter definierten Bedingungen vorkultiviert (2.1.4). Durch unterschiedliches Wachstum abweichende Zellzahlen wurden dadurch ausgeglichen, dass von den zu vergleichenden Proben jeweils die gleiche Menge an Gesamtprotein eingesetzt wurde. Wie bekannt, haben bestimmte Kulturbedingungen einen Einfluss auf die Neurofibrominmenge. Um zu beweisen, dass diese nicht die Menge aller Proteine einer Zelle beeinflussen, wurde parallel, wenn in früheren Untersuchungen noch nicht gezeigt, deren Wirkung auf die Menge an p120 GAP oder β-Tubulin untersucht.

3.1 Die Unterschiede in der Neurofibrominmenge zwischen Zellen von NF1-Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Die Mehrheit der Mutationen im *NF1*-Gen führen direkt oder indirekt zu einem Stopcodon. Die von diesem Defekt-Allel gebildete NF1-mRNA kann entweder instabil sein, wodurch kein Neurofibromin mehr translatiert werden dürfte, oder die NF1-mRNA ist stabil und es müßte ein verkürztes, möglicherweise aber instabiles Neurofibromin gebildet werden. Bei NF1-Patienten, bei denen die Menge an NF1-mRNA aufgrund instabiler NF1-mRNA im Vergleich zu Gesunden auf etwa 50% reduziert ist, sollte auch die Neurofibrominmenge auf 50% reduziert sein, sofern keine Kompensation durch Verringerung der Degradation des vorhandenen Neurofibromins erfolgt. Bei Patienten mit stabiler NF1-mRNA kann ein möglicherweise verkürztes Neurofibromin nur nachgewiesen werden, wenn es stabil ist. Missensemutationen im *NF1*-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch im Neurofibromin führen, können aufgrund einer Konformationsänderung ebenfalls zu einem instabilen Neurofibromin führen, wodurch die nachweisbare Menge verringert sein dürfte. Eine in diesem Fall nicht verringerte Menge an Neurofibromin sollte bei Vorhandensein klinischer

Symptome des NF1-Patienten auf den Ausfall seiner Funktion zurückzuführen sein. In einem parallelen Projekt der Arbeitsgruppe wurden zahlreiche NF1-Mutationen auf DNA und mRNA Ebene charakterisiert. Aufgrund dieser Zusammenhänge war es notwendig bei einigen NF1-Patienten die Neurofibrominmenge mit der von Gesunden zu vergleichen. Hierdurch konnte herausgefunden werden, ob die Symptome der NF1 mit dem Verlust an Neurofibromin oder dem Verlust seiner Funktion zusammenhängen. Umgekehrt kann, besonders bei Nachkommen von NF1-Patienen, die keine klinischen Symptome der NF1 aufweisen, der Nachweis der Neurofibrominmenge zur Diagnose verwendet werden.

3.1.1 Der Aminosäureaustausch R1276P im Neurofibromin eines NF1-Patienten führt zu keiner verringerten Neurofibrominmenge in Zellen

Bei dem Patient B362 führt eine Transversion im Exon 22 des *NF1*-Gens zum Basenaustausch G3827C in einem Allel des *NF1*-Gens. Da die Menge an NF1-mRNA gegenüber einer Kontrollperson nicht verändert ist, wurde davon ausgegangen, dass die mRNA dieses mutierten *NF1*-Allels stabil ist. Die Missensemutation führt zu dem Aminoäureaustauch R1276P und wurde in allen NF1 betroffenen, nicht aber gesunden Familienmitgliedern gefunden (Klose et al. 1998). Die Aminosäure R1276 in der GAP-Domäne von Neurofibromin ist ein Arginin-Finger, der wesentlich in die Hydrolyse von p21 Ras-GTP involviert ist. Der Austausch dieser Aminosäure sollte, wie eine silico Untersuchung vermuten liess, die Stabilität des Neurofibromins nicht wesentlich verändern (Klose et al. 1998). Eine funktionelle Untersuchung ergab, dass die p21 Ras-GAP Aktivität des mutierten Neurofibromins vollständig verloren geht (Klose et al. 1998). Deshalb untersuchte ich die Neurofibrominmenge zweier betroffener Söhne des Patienten B362 im Vergleich zu der von zwei gesunden Kontrollpersonen. Als weitere Kontrolle dienten die Messungen der Neurofibrominmengen zweier NF1-Patienten mit verschiedenen Mutationen, die zu einem Stopcodon führen (Patient 0550 und 0545).

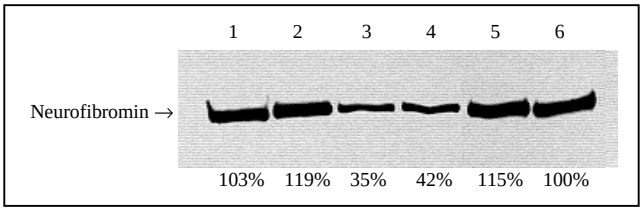

Abbildung 3: Die Neurofibrominmenge ist in Zellen zweier Söhne des NF1-Patienten B362 nicht reduziert. Neurofibrominmenge in lymphoblastoiden Zellen zweier Söhne des NF1-Patienten B362 (Spur 1 und 2) im Vergleich zur Neurofibrominmenge aus zwei NF1-Patienten mit Stopmutationen (Spur 3, Patient 0550 und Spur 4, Patient 0545) und zweier gesunder Kontrollpersonen (Spur 5 und 6).

Es zeigte sich, dass die Neurofibrominmenge bei den Patienten mit dem Aminosäureaustausch R1276P (Abbildung 3, Spur 5 u. 6) im Vergleich zu der in gesunden Kontrollen (Abbildung 3, Spur 1 u. 2) nicht reduziert war. Dies deutet darauf hin, dass das mutante Neurofibromin und das Wildtyp Neurofibromin nebeneinander, in ähnlicher Menge, in den Zellen der Patienten vorhanden ist. Aufgrund dieses Befundes kann davon ausgegangen werden, dass die wesentliche Ursache für die klinischen Symptome der NF1, zumindest bei Patienten mit dieser Mutation, im Verlust der p21 Ras-GAP Aktivität von Neurofibromin liegt.

3.1.2 Die Neurofibrominmenge bei Patienten mit Sonderformen der NF1

Bei einigen Sonderformen der NF1 besitzen die Patienten atypische Symptome, die nicht den diagnostischen NIH-Richtlinien für NF1 entsprechen. Die Bestimmung der Neurofibrominmenge in Zellen dieser Patienten, im Vergleich zu Kontrollen, könnte einen Hinweis auf eine ursächliche Beteiligung des *NF1*-Gens an diesen Krankheitsbildern ergeben.

Bei einem Patienten mit LEOPARD-Syndrom ist die Neurofibrominmenge nicht reduziert

Die Patienten mit LEOPARD-Syndrom (MIM 51100) weisen unter anderem multiple Hyperpigmentierungen, welche etwas kleiner als CALF sind, und Herzveränderungen auf. Das für diese Krankheit ursächliche Gen ist nicht bekannt. In einer Familie mit dieser Erkrankung wurde gezeigt, dass das Syndrom nicht zum *NF1*-Lokus gekoppelt ist (Ahlbom et al. 1995). Hingegen fanden Wu et al. (1996) eine Missensemutation (M1035R) im Exon 18 des *NF1*-Gens in einem Patienten mit LEOPARD-Syndrom. Bei dem LEOPARD-Patienten Leo1, der in der Abteilung Dermatologie der Universität betreut wurde, fanden sich obige Veränderungen auf der Haut, bis auf zwei Körpersegmente. Der Patient ist also ein Mosaik für das LEOPARD-Syndrom. Die molekulare Untersuchung der Arbeitsgruppe auf eine *NF1*-Mutation war ursprünglich nicht erfolgreich. Deshalb wurden vergleichende Untersuchungen zur Neurofibrominmenge durchgeführt. Es wurde die Neurofibrominmenge in Zellen aus Hautarealen, die die für das LEOPARD-Syndrom typischen Hautveränderungen aufwiesen, mit der in Zellen aus einem nicht betroffenem Hautareal verglichen. Über eine Reduktion der Neurofibrominmenge in Zellen eines betroffenen Areals des Patienten könnten seine Symptome dem *NF1*-Gen zugeordnet

werden. Dabei wäre zu erwarten, dass die Neurofibrominmenge des betroffenen Areals gegenüber der des nicht betroffenen Areals reduziert ist. In drei unabhängigen Experimenten wurde die Neurofibrominmenge aus Fibroblasten eines betroffenen (Leo1-I) und nicht betroffenen Areals (Leo1-II) des Patienten Leo1 mit der aus Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen und Fibroblasten aus einem Tumor des Patienten NF71 untersucht. Der Patient NF71 hat eine 5 Basenpaar Deletion in Exon 28 (5123delCCACC) des *NF1*-Gens (Stark et al. 1991 u. 1992). Die Zellen von NF71 exprimieren nur noch das Wildtyp Neurofibromin und dienten somit als Kontrolle für die Neurofibrominmenge in Zellen, die nur von einem *NF1*-Allel gebildet wird.

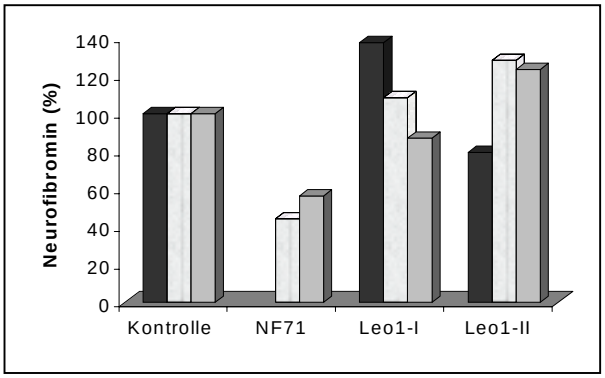

Abbildung 4: Die Neurofibrominmenge ist in Fibroblasten des LEOPARD-Patienten (Leo1) nicht reduziert. Neurofibrominmenge in Fibroblasten eines betroffenen Areals (Leo1-I) und nicht betroffenen Areals (Leo1-II) des Patienten Leo1 im Vergleich zu Fibroblasten von Gesunden sowie Fibroblasten aus dem Tumor des Patienten NF71. Die Säulen schwarz, hellgrau und grau repräsentieren unabhängige Experimente. Zur Veranschaulichung wurde das Verhältnis der Messungen so gewählt, dass die Neurofibrominmenge der Kontrollen 100% beträgt.

Bei diesen Untersuchungen fällt auf, dass bei den verschiedenen Experimenten die Neurofibrominmengen zwischen den Arealen Leo1-I und Leo1-II sehr stark schwanken. Die Neurofibrominmengen in Fibroblasten aus dem nicht betroffenen Areal (Leo II) betrugen 80%, 130% und 125%, die aus dem betroffenen Areal (Leo I) 140%, 110% und 85% im Vergleich zu den Neurofibrominmengen aus den Fibroblasten der gesunden Kontrollpersonen. Dagegen war die Neurofibrominmenge in den Fibroblasten des Patienten NF71T gegenüber der jeweiligen Kontrolle auf 45% bzw. 55% reduziert (Abbildung 4). Inzwischen ist eine Mutation im Exon 13 des *NF1*-Gen gefunden worden, bei der es sich um einen Basenaustausch C2193T handelt (D. Kaufmann, Humangenetik, Universität Ulm, persönliche Mitteilung). Dieser Basenaustausch führt jedoch zu keinem Aminosäureaustausch im Neurofibromin. Die Mutation könnte jedoch einen variablen Einfluss auf das Spleissen der NF1-prä-mRNA haben. Dieser posttranskriptionelle

Mechanismus könnte für die Variabilität der Neurofibrominmenge in den Zellen verantwortlich sein.

Neurofibromin in Patienten von zwei Familien mit spinaler Neurofibromatose

Die Neurofibrominmenge ist bei beiden Patienten mit spinaler NF reduziert

Ob die spinale Neurofibromatose (SNF) eine Subform der NF1 ist, war lange strittig. Als Hauptsymptome wurden verschiedene spinale Tumore beobachtet (MIM 162210). Hier sollten zwei Patienten mit SNF untersucht werden. Die erste untersuchte Person war eine 32 Jahre alte Frau (NF134-3) mit multiplen spinalen Tumoren. Bei ihr wurde von unserer Arbeitsgruppe eine Missensemutation (T6200C) im Exon 33 des *NF1*-Gens gefunden, die zu einem Aminosäureaustausch (L2067P) im Neurofibromin führt. Die NF1-mRNA des mutierten NF1-Allels ist stabil (Kaufmann et al. 2001). Bei der zweiten Patientin (NF138-3) mit multiplen spinalen Tumoren in allen Segmenten des Rückenmarks wurde eine Spleissmutation (IVS31-5A→G) gefunden. Dadurch wird das Exon 32 um 4 Basen verlängert, was zu einem Stopcodon und folglicherweise zu einem Abbruch an Aminosäureposition 1995 des Neurofibromins führt (Kaufmann et al. 2001). Auch bei dieser Patientin war die Menge an NF1-mRNA nicht reduziert, was darauf hindeutet, dass die mutierte NF1-mRNA stabil ist. Deshalb sollte untersucht werden, ob bei der Patientin NF134-3 die Neurofibrominmenge reduziert ist, und ob bei der Patientin NF138-3 ein verkürztes Neurofibromin nachzuweisen ist. Der Nachweis der Neurofibrominmenge erfolgte an Fibroblasten und sollte mit der Menge an Neurofibromin aus Kontrollen und dem Patienten NF71 verglichen werden. Als weitere Kontrolle diente der Nachweis von p120 GAP (Abbildung 5).

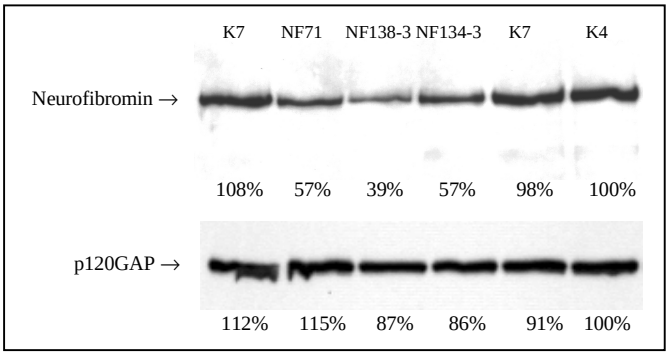

Abbildung 5: Die Neurofibrominmenge ist in Fibroblasten der Patienten NF134-3 und NF138-3 reduziert. Die Menge an Neurofibromin im Vergleich zu p120 GAP in Fibroblasten von NF134-3 und NF138-3 sowie in Fibroblasten der Kontrollen (K4 u. K7) und des Patienten NF71.

Hierbei betrug die Neurofibrominmenge bei NF138-3 etwas weniger als die Hälfte und bei NF134-3 etwa die Hälfte im Vergleich zur gesunden Kontrolle 4 (K4). Die des Patienten NF71 war ebenfalls auf die Hälfte reduziert. Dies deutet darauf hin, dass bei beiden Patienten nur noch dass Wildtyp Neurofibromin in voller Länge gebildet wird. Da sich die Menge an p120 GAP zwischen den Patienten und Kontrollen nicht wesentlich unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen Neurofibrominmengen nicht von eventuell experimentellen Schwankungen herrühren.

Bei keinem dieser beiden Patienten war ein verkürztes Neurofibromin nachzuweisen

Die bei NF138-3 vorliegende Mutation führt zu einem Stopcodon und somit möglicherweiser zu einem auf 1995 AS verkürzten Neurofibromin. Dieses möglicherweise vorhandene und verkürzte Neurofibromin sollte mittels IP und Westernblot bei ungefähr 225 kDa nachgewiesen werden. Der Nachweis eines verkürzten Neurofibromins erfolgte aus Zelllysat der Fibroblasten von K7, NF134-3, NF138-3 und NF71 (Abbildung 6).

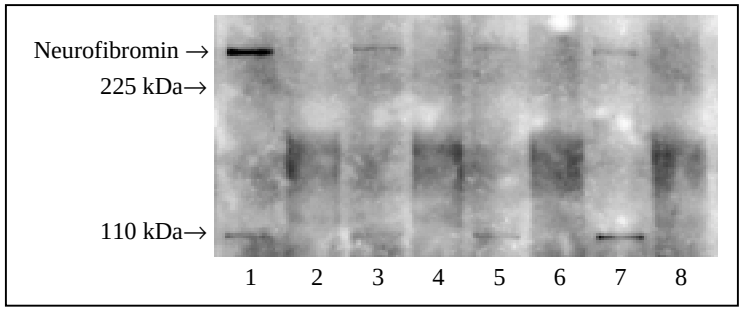

Abbildung 6: In Zellen von NF138-3 ist kein zusätzliches verkürztes Neurofibromin nachzuweisen.
Der Westernblot erfolgte mit sc-68 von ebenfalls mit sc-68 immunopräzipitiertem Neurofibromin. Der Antikörper sc-68 ist gegen den N-Terminus von Neurofibromin gerichtet. Spur 1: K7, Spur 3: NF134-3, Spur 5: NF138-3, Spur 7: NF71. Parallel wurde vor der IP der Antikörper sc-68 mit dem entsprechenden Peptid (sc-68P) vorinkubiert. Diese Ergebnisse sind in Spur 2: K7, Spur 4: NF134-3, Spur 6: NF138-3 und Spur 8: NF71 dargestellt.

Aus Abbildung 6 (Spur 5) ist zu ersehen, dass ein verkürztes Neurofibromin, welches bei der NF1-Patientin NF138-3 bei ungefähr 225 kDa zu erwarten wäre, nicht nachzuweisen war. Das Wildtyp Neurofibromin ist bei etwa 240 kDa zu sehen, die Bande bei 110 kDa ist ein unspezifisches Produkt. Die Mutation im *NF1*-Gen bei NF138-3 führt also ebenso wie bei NF134-3 (Spur 3) zu einer Instabilität des mutierten Neurofibromins. Dies zeigt, dass die *NF1*-Keimbahnmutationen von NF134-3 und NF138-3 Nullmutationen sind und die untersuchten Zellen haploinsuffizient für Neurofibromin sind. Die spinale NF ist zumindest in den beiden hier untersuchten Familien dem *NF1*-Gen zuzuordnen.

Die Neurofibrominmenge in Patienten mit einer späten Form der Neurofibromatose (late onset Neurofibromatosis)

Bei einer Anzahl von NF-Patienten treten die typischen Symptome der NF1 wie CALF oft gar nicht auf. Die ersten Symptome treten erst in relativ spätem Alter in Form von dermalen Neurofibromen auf, die dann sehr rasch an Zahl zunehmen. Diese Form der Neurofibromatose wird als „late onset“ bezeichnet (Riccardi 1992). Es sollte die Neurofibrominmenge von zwei Patienten, die von dieser Form der Neurofibromatose betroffen sind, untersucht werden. Bei der ersten Patientin (NF229), die inzwischen verstorben ist, wurde die Mutation im *NF1*-Gen noch nicht gefunden. Der andere Patient (NF301) hat eine Missensemutation (C4276G) Exon 25 des *NF1*-Gens, die zu einem Aminosäureaustausch Q1426E in der GRD führt. Der Nachweis erfolgte an Fibroblasten in verschiedenen unabhängigen Experimenten im Vergleich zu Kontrollen und dem Patienten NF71.

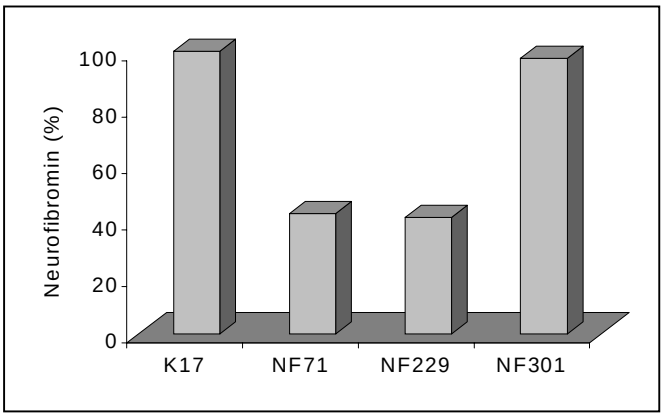

Abbildung 7: Die Neurofibrominmenge ist in Fibroblasten von NF229 reduziert, nicht aber in Fibroblasten von NF301. Die Neurofibrominmenge in Fibroblasten von NF229 und NF301 im Vergleich zu der einer Kontrolle (K17) und des Patienten NF71.

In einem repräsentativen Experiment betrug die Neurofibrominmenge bei NF229 40% im Vergleich zur gesunden Kontrolle (K17, 100%, Abbildung 7). Diese Menge entsprach in etwa derjenigen des Patienten NF71 mit 45% im Vergleich zu K17. Dies deutet darauf hin, dass die Symptome bei NF229 auf die reduzierte Neurofibrominmenge in den Zellen zurückzuführen ist. Dass die Symptome spät auftreten, könnte dem Einfluss modifizierender Gene zuzuschreiben sein. Bei NF301 war keine reduzierte Neurofibrominmenge nachzuweisen. Die Symptome bei NF301 können also aufgrund dieses Experiments nicht auf eine reduzierte Neurofibrominmenge zurückgeführt werden, da das mutierte Neurofibromin stabil zu sein scheint. Es weist jedoch eine deutliche

Reduzierung seiner p21 Ras-GAP Aktivität auf, wie funktionelle Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe R. Ahmadian (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) zeigten. Die in der GRD von Neurofibromin liegende Missensemutation (C4276G) führt zu einer reduzierten Affinität von p21 Ras-GTP an dieses mutierte Neurofibromin. Diese Reduzierung könnte in einem Zusammenhang mit dem späten Auftreten der NF-Symptome bei NF301 stehen.

3.1.3 Vergleichende Messung der Neurofibrominmenge zur Diagnostik der NF1

Bei den meisten NF1-Patienten ist die Neurofibrominmenge gegenüber gesunden Kontrollen auf 50% reduziert. Bei diesen NF1-Patienten kann die vergleichende Messung der Neurofibrominmenge als diagnostisches Kriterium für die NF1 verwendet werden. Dies wurde bei den zwei klinisch gesichtern NF1-Patienten, Mutter (NF17) und Tochter (NF29a), sowie einem weiteren NF1-Patienten (NF302) erprobt. Bei allen dreien war seinerzeit keine Mutation im *NF1*-Gen gefunden worden.

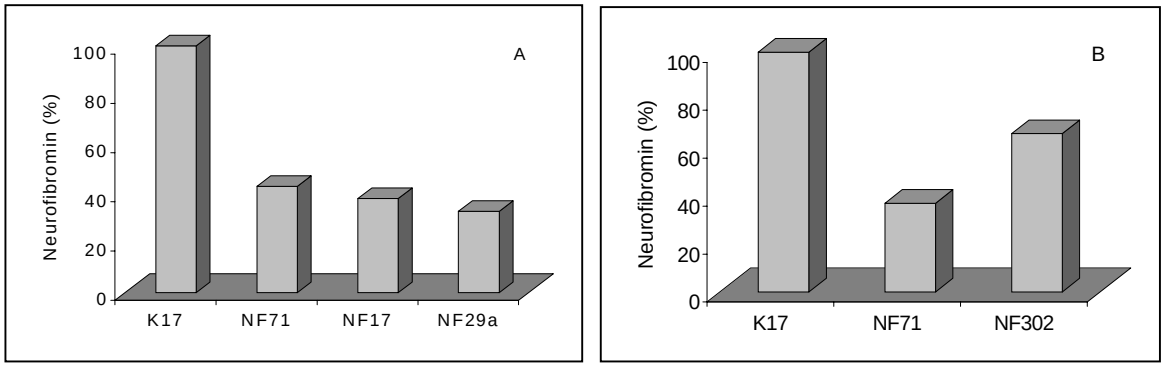

Abbildung 8: A. Neurofibrominmenge der Patienten NF17 und NF29a im Vergleich zum Patienten NF71 und der Kontrolle (K17). B. Neurofibrominmenge in Fibroblasten des Patienten NF302 im Vergleich zur Kontrolle (K17) und dem Patienten NF71.

Hierbei zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment, dass die Neurofibrominmenge bei NF17 (38%) und bei NF29a (33%), wie auch bei NF71 (43%) gegenüber der Kontrolle (K17, 100%) reduziert war (Abbildung 8A). Auch bei dem Patienten NF302 (65%) war die Neurofibrominmenge gegenüber der Kontrolle (K17) reduziert (Abbildung 8B). Eine NF1 Diagnostik wäre also mit diesem Verfahren möglich.

3.2 Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Neurofibrominmenge in Zellen

Untersuchungen zur Neurofibrominmenge in kultivierten Melanozyten zeigten, dass die Neurofibrominmenge nach Stimulation mit PMA erhöht wird. PMA stimuliert die Proliferation von kultivierten Melanozyten (Griesser et al. 1997). Ohne diesen Wachstumsfaktor hören sie auf zu wachsen, dendritisieren und ihr Melaningehalt erhöht sich (Kaufmann et al. 1991). Die durch PMA erhöhte Neurofibrominmenge korreliert mit einer erhöhten Halbwertszeit von Neurofibromin. Es stellte sich die Frage, über welchen Mechanismus die Halbwertszeit von Neurofibromin in verschiedenen Zellen beeinflusst wird.

3.2.1 Die Neurofibrominmenge in Melanozyten korreliert mit der Konzentration an PMA

Zur Kontrolle der in den verschiedenen Proben eingesetzten gleichen Proteinmengen dienten p120 GAP und β-Tubulin. Deshalb sollte die Zuverlässigkeit dieser beiden Proteine als Kontrollen bei der Kultivierung der Melanozyten mit oder ohne PMA untersucht werden. Um auch die Auswirkungen eventueller Schwankungen der Konzentration an PMA im Medium auf die Menge an Neurofibromin, p120 GAP und β-Tubulin zu untersuchen wurden die Melanozyten einer Kontrolle (MK12) ohne PMA vorkultiviert und anschließend ohne PMA oder mit verschiedenen Konzentrationen an PMA kultiviert.

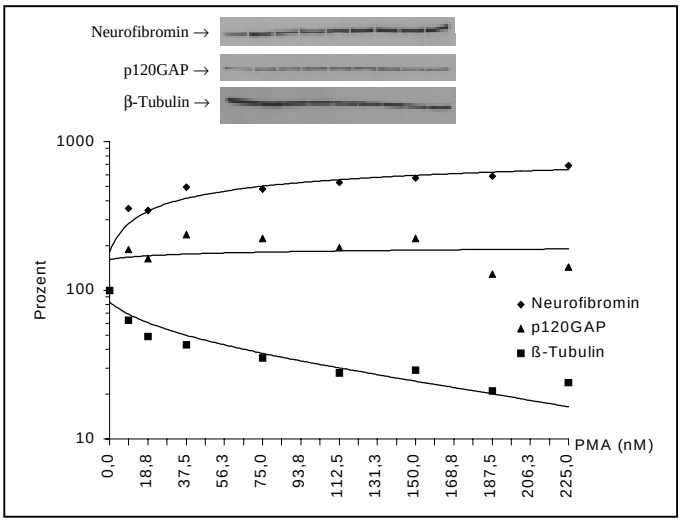

Abbildung 9: Neurofibrominmenge nach Stimulation mit PMA. Die Mengen an Neurofibromin, p120 GAP und β-Tubulin in Melanozyten, die bei verschiedenen Konzentrationen an PMA für 7 Tage kultiviert wurden.

Aus dem in Abbildung 9 dargestellten Experiment geht hervor, dass die Neurofibrominmenge mit zunehmender Konzentration an PMA ansteigt (y=146,06Ln(x)+180,55) und die Zunahme an Neurofibromin dabei einer Sättigung entgegengeht. Diese Sättigung ist bei der von uns im Standardmedium eingesetzten Konzentration von 85 nM PMA schon annähernd erreicht. Experimentell bedingte kleinere Schwankungen in der Menge des eingesetzten PMA wirken sich in diesem Bereich also nicht wesentlich auf die Neurofibrominmenge in Melanozyten aus. Bei der Menge an p120 GAP in Melanozyten ist kaum eine Veränderung durch die Inkubation mit PMA zu beobachten (y=9,0754Ln(x)+160,6). Die Menge an β-Tubulin nimmt dagegen mit zunehmender Konzentration an PMA ab (y= -20,798Ln(x)+83,441) und geht ebenfalls einer Sättigung entgegen, die bei einer Konzentration von 85 nM PMA annähernd erreicht ist. Dieser Versuch zeigt außerdem, dass die Inkubation mit PMA nicht die Menge aller Proteine einer Zelle in gleicher Weise beeinflusst, sondern eine selektive Wirkung aufweist. Der Nachweis von p120 GAP kann somit bei zu vergleichenden Proben, auch bei Kulturbedingungen mit oder ohne PMA, als Marker zur Kontrolle gleicher eingesetzter Gesamtproteinmengen und Zellzahlen verwendet werden.

3.2.2 Die Depolymerisation von Mikrotubuli durch Colcemid beeinflusst die Degradation von Neurofibromin in Melanozyten

Da Neurofibromin eine potentielle Tubulin-Bindungsstelle besitzt und mit Mikrotubuli assoziiert (Gregory et al. 1993, Xu H et al. 1997), könnte diese Interaktion einen Einfluss auf die Halbwertszeit von Neurofibromin haben. Wird der Aufbau von Mikrotubuli durch Colcemid gehemmt, müsste die Halbwertszeit (HWZ) von Neurofibromin abnehmen, wenn mit Mikrotubuli assoziiertes Neurofibromin nicht degradiert wird, oder zunehmen, wenn dadurch die Degradation induziert wird. Frühere Versuche (Müller R. Diplomarbeit 1997) zeigten, dass die Menge an Neurofibromin in Melanozyten, die unter PMA kultiviert wurden, durch Colcemid deutlich reduziert wird. Deshalb wurde als Fortsetzung im Rahmen dieser Arbeit die HWZ von Neurofibromin unter dem Einfluss von Colcemid in Melanozyten einer Kontrolle (MK12) ermittelt. Die HWZ betrug unter PMA 54,5 h. Die zusätzliche Inkubation mit 40 nM Colcemid reduzierte die HWZ von Neurofibromin auf 41,9 h (Abbildung 10). Die Verringerung der HWZ von Neurofibromin durch Colcemid könnte dadurch zustande kommen, dass Neurofibromin, welches nicht mehr mit Mikrotubuli assoziieren kann, frei im Zytoplasma vorliegt und dadurch abgebaut wird.

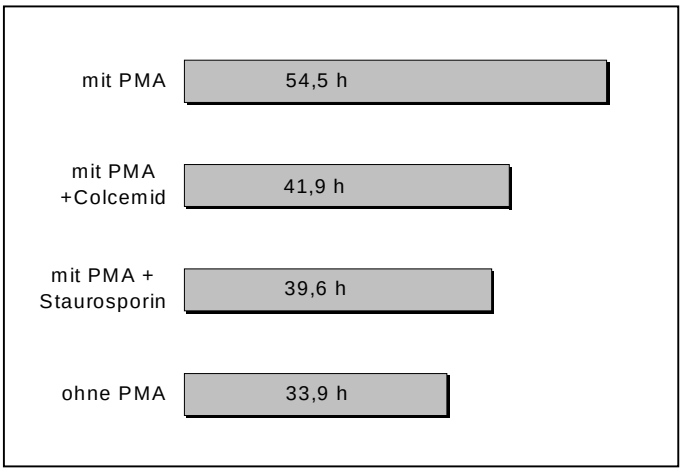

Abbildung 10: Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten einer Kontrolle (MK12).
Die Zellen wurden 3 Tage ohne PMA differenziert, dann 2 Tage mit PMA, mit PMA und 40 nM Colcemid, mit PMA und 10 µM Staurosporin oder ohne PMA kultiviert. Die Ermittlung der Halbwertszeit erfolgte mittels Pulse chase Experimenten.

3.2.3 Staurosporin reduziert die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die durch PMA induzierte Erhöhung der Neurofibrominmenge über die Aktivierung einer PKC läuft. Dies sollte mit Staurosporin, einem Inhibitor bestimmter Subtypen der PKC und der PKA untersucht werden. Bei Melanozyten, die unter PMA kultiviert wurden, reduzierte sich die Neurofibrominmenge nach zusätzlicher Inkubation mit Staurosporin auf etwa die Hälfte (Müller R. Diplomarbeit 1997). Um zu untersuchen, ob diese Reduktion mit einer erhöhten Neurofibromin-Degradation zusammenhängt, wurde die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten einer Kontrolle (MK12) unter dem Einfluss von Staurosporin ermittelt (Abbildung 10, in 3.2.2).

Das Ergebnis zeigt, dass die zusätzliche Inkubation mit 10 µM Staurosporin die HWZ von Neurofibromin von 54,5 h auf 39,6 h reduziert. Dies lässt vermuten, dass die Wirkung von PMA auf die Halbwertszeit von Neurofibromin über die Stimulation der Aktivität einer PKC vermittelt wird.

3.2.4 Der Einfluss von Serum auf die Neurofibrominmenge ist abhängig vom Zelltyp

Bei Mäusezellen nimmt nach der Entfernung von Serum aus dem Medium die Menge an Neurofibromin rasch ab. Diese Abnahme soll über einen durch Ubiquitin vermittelten Abbau in Proteasomen erfolgen (Jacks T. Vortrag, San Franscisco 1999). Ob dieser Befund stimmt, sollte in Mäusezellen und zusätzlich in humanen Zellen untersucht werden.

Dazu wurden die verschiedenen Zellen ohne Wachstumsfaktoren kultivert. An humanen fibroblastenartigen Zellen einer Kontrolle (K17) und humanen fibroblastenartigen Zellen aus einem Neurofibrom eines NF1-Patienten (NF71) wurde, im Vergleich zu fibroblastenartigen Zellen aus der Maus (*Nf1(+/+)*-MS-142-6), der Einfluss von fehlendem Serum im Medium auf die Neurofibrominmenge untersucht. Ebenso wurde der Effekt von fehlendem Serum, CT/IBMX und PMA auf die Neurofibrominmenge in humanen Melanozyten einer Kontrolle (MK12) im Vergleich zu Melanozyten aus der Maus (*Nf1(+/+)*-MS-142-6) untersucht. Die Zellen wurden, für die in Abbildung 11 angegebenen Zeiten, ohne Serum, CT/IBMX und PMA kultiviert.

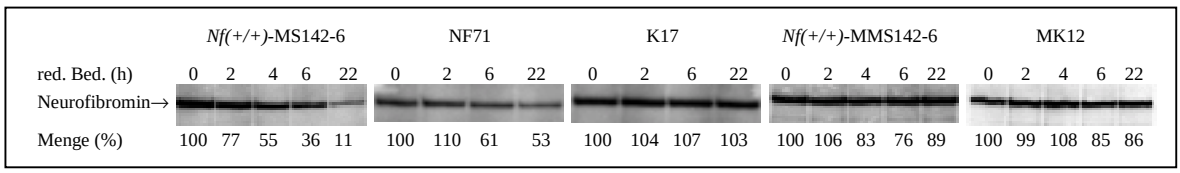

Abbildung 11: Veränderung der Neurofibrominmengen im Laufe von 22 h in humanen Zellen und in Zellen der Maus durch die Kultivierung ohne Wachstumsfaktoren.
Nach der Kultivierung mit Standardmedium erhielten die Zellen für weitere 2 h Standardmedium (0 h, reduzierte Bedingungen), oder für 2 h, 4 h, 6 h oder 22 h reduzierte Bedingungen (red. Bed.). Die reduzierten Bedingungen waren bei den fibroblastenartigen Zellen (*Nf(+/+)*-MS-142-6, NF71, K17) Standardmedium ohne Serum, bei Melanozyten (*Nf(+/+)*-MMS-142-6 und MK12) Standardmedium ohne Serum, ohne CT/IBMX und ohne PMA. Der Nachweis des Neurofibromins erfolgte jeweils aus der gleichen Gesamtproteinmenge.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Neurofibrominmenge in fibroblastenartigen Zellen von Mäusen durch die Kultivierung ohne Serum stark abnimmt, und zwar nach 22 h auf etwa 10% des Ursprungswertes. Bei fibroblastenartigen Zellen aus der menschlichen Dermis der gesunden Kontrollperson ist jedoch keine Abnahme zu beobachten. Die Hautfibroblasten von Mäusen und Menschen unterscheiden sich also bei der Regulation der Neurofibrominmenge unter diesen Kulturbedingungen. Interessanterweise unterscheiden sich auch dermale humane Fibroblasten der Kontrolle (K17) und die fibroblastenartigen Zellen aus einem Neurofibrom des NF1-Patienten (NF71) voneinander. In letzteren führt die Kultivierung ohne Serum zu einer Abnahme von Neurofibromin auf etwa 50% nach 22 h. Wie in menschlichen Melanozyten führt auch in Melanozyten der Maus die Kultivierung ohne Serum sowie ohne Choleratoxin, IBMX und PMA nach 22 h nicht zu einer deutlichen Abnahme an Neurofibromin (Abbildung 11). Diese Experimente zeigen, dass in dermalen Fibroblasten die Degradation von Neurofibromin zwischen Maus und Mensch differiert und dass in Melanozyten von Maus und Mensch die Kultivierung ohne Wachstumsfaktoren nicht zu einer schnellen Degradation von Neurofibromin führt.

Aufgrund dieser Befunde besteht die Möglichkeit, das für die Regulation der Neurofibrominmenge, abhängig vom Zelltyp und der Spezies, verschiedene Abbauwege benutzt werden.

3.2.5 Die Hemmung der Proteasomen und des Calpain-Systems führt zu keiner Erhöhung der Neurofibrominmenge in humanen Melanozyten

Da die Kultivierung der Melanozyten ohne PMA zu einer verringerten Halbwertszeit von Neurofibromin führt, sollte untersucht werden, über welchen Mechanismus die Degradation von Neurofibromin erfolgt. Die Untersuchungen sollten im Wesentlichen an Melanozyten durchgeführt werden, da diese Zellen bei Symptomen der NF1 involviert sind und zuvor detailliert zellbiologisch untersucht worden waren. Zuerst wurde geprüft, ob der über Ubiquitin vermittelte Abbau in Proteasomen oder der durch das Kalzium aktivierbare Calpainsystem bei der Regulation von Neurofibromin in diesen Zellen eine wesentliche Rolle spielen. Dazu wurden Melanozyten einer Kontrolle (MK12) anstelle von PMA mit den Proteasomen-Inhibitoren MG132, MG115, dem Calpain-Inhibitor MG101 oder dem Cystein Protease-Inhibitor E64d kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen weiterhin mit PMA kultiviert. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurde auch ein möglicher Einfluss dieser Substanz auf die Neurofibrominmenge in den Melanozyten untersucht.

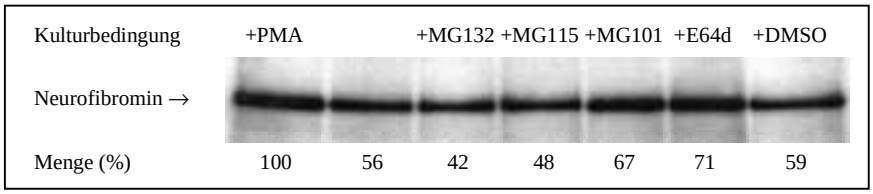

Abbildung 12: Neurofibrominmenge nach der Inkubation mit Inhibitoren des Proteinabbaus.
Neurofibrominmenge in Melanozyten (MK12) die 4 Tage mit PMA, ohne PMA oder ohne PMA mit den Proteasomen-Inhibitoren MG132, MG115, dem Calpain-Inhibitor MG101 oder dem Cystein Protease-Inhibitor E64d kultiviert wurden.

Bei den Melanozyten, die ohne PMA kultiviert wurden, reduzierte sich die Neurofibrominmenge auf 56% gegenüber den unter PMA kultivierten Melanozyten. Die Kultivierung der Melanozyten mit den Proteasomen-Inhibitoren MG132 oder MG115 verringerte die Abnahme der Neurofibrominmenge nicht (Abbildung 12). Auch die Kultivierung mit dem Calpain-Inhibitor MG101 oder dem Cystein Protease-Inhibitor E64d verhinderte die Reduktion der Neurofibrominmenge nicht. Die verwendete Konzentration an DMSO im Medium hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Neurofibrominmenge. Diese

Experimente zeigen, dass das Calpainsystem und die Proteasomen nicht in die Degradation von nativem Neurofibromin involviert zu sein scheinen.

3.2.6 PMA hat keinen Einfluss auf die Aktivität der lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A und B sowie Cathepsin D in Melanozyten

Um zu überprüfen, ob die Abnahme der Neurofibrominmenge in Melanozyten bei Kultivierung ohne PMA mit einer Veränderung der lysosomalen Aktivität assoziiert ist, wurde die Aktivität der lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A und B sowie Cathepsin D unter diesen Bedingungen untersucht. In mehreren unabhängigen Experimenten wurde die enzymatische Aktivität der lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A und B sowie Cathepsin D in Melanozyten einer Kontrolle, die mit und ohne PMA kultiviert wurden, untersucht.

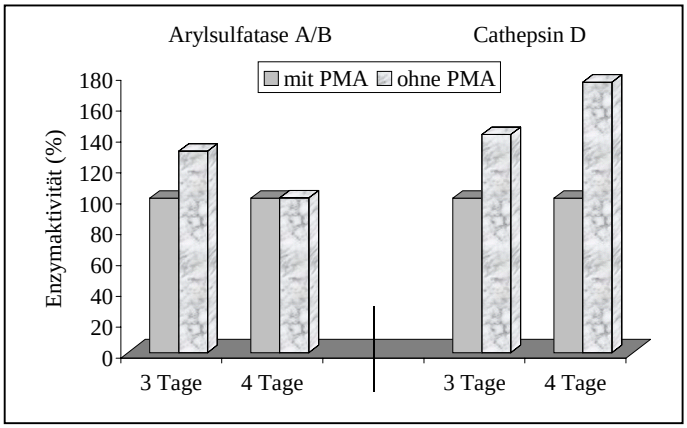

Abbildung 13: Enzymaktivität in Prozent (%) von Arylsulfatase A und B sowie von Cathepsin D in Zelllysat mit je 100 µg Gesamtprotein nach Kultiverung der Melanozyten (MK4) für 3 Tage oder 4 Tage mit oder ohne PMA. Enzymaktivitäten bei Arylsulfatase A und B entsprechend der Extinktion (gemessen bei λ=515 nm) und bei Cathepsin D entsprechend des umgesetzten Substrats (berechnet aus der gemessenen Extinktion bei λ=750 nm, entsprechend einer erstellten Tyrosin-Standardkurve).

Die Aktivität der lysosomalen Enzyme Arylsulfatase A und B in Melanozyten ist nach Kultivierung ohne PMA für drei Tage nur leicht erhöht, nach vier Tagen ist jedoch kein Unterschied zu sehen. Die Enzymaktivität von Cathepsin D steigt nach Kultivierung der Melanozyten ohne PMA an. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PMA zwar einen Einfluss auf die Aktivität der lysosomalen Enzyme hat, dieser jedoch nicht einheitlich für alle lysosomalen Enzyme ist. Andererseits kann die erhöhte lysosomale Enzymaktivität die Neurofibrominmenge nur dann beeinflussen, wenn Neurofibromin unter diesen Bedingungen in Lyososmen vorliegt.

3.2.7 Chloroquin erhöht die Neurofibrominmenge in verschiedenen Zelltypen

Eine selektive lysosomale Degradation von langlebigen Proteinen wird durch den Entzug von Nährstoffen aktiviert und benötigt eine Signalsequenz im Substratprotein (Dice et al. 1990). Neurofibromin gehört zu den langlebigen zytoplasmatischen Proteinen und enthält innerhalb der GRD-Domäne ein Motiv (QKLLD), welches in den Transport von Neurofibromin in Lysosomen involviert sein könnte. Um zu untersuchen, ob die Degradation von Neurofibromin in Zellen über diesen Abbaumechanismus reguliert wird, wurde der intralysosomale Proteinabbau mittels Chloroquin gehemmt. Chloroquin hemmt die in Lysosomen befindlichen, im sauren katalytisch aktiven Hydrolasen durch Erhöhung des intralysosomalen pH-Werts und somit die Degradation von Proteinen in Lysosomen. Die Zellen wurden vorwiegend mit einer Konzentration an Chloroquin kultiviert, die therapeutisch für die Malariaprophylaxe beim Menschen verwendet wird.

Chloroquin erhöht die Neurofibrominmenge in humanen Melanozyten

Der Einfluss von Chloroquin auf die Neurofibrominmenge unter der Kultivierung mit oder ohne PMA wurde an Melanozyten aus der Haut des gesunden Probanden K12, an Melanozyten aus der Haut der Patienten NF25 und NF92 sowie an Melanozyten aus einem CALF des Patienten NF92 untersucht. NF25 hat eine direkte Stopmutation in Exon 27a (G4614A) (Küchler W. Diplomarbeit 1994). NF92 hat eine indirekte Stopmutation durch die Insertion von 5 Basenpaaren in Exon 12b (1998insCCTCT) (Böddrich et al. 1995).

<u>Chloroquin verhindert die Abnahme an Neurofibromin in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert werden</u>

Zuerst sollte untersucht werden, ob Chloroquin die durch Kultivierung ohne PMA verursachte Reduktion der Neurofibrominmenge verhindert und ob dabei Chloroquin einen Einfluss auf die Menge an p120 GAP und β-Tubulin hat. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Zugabe von Chloroquin zum Medium in Melanozyten, die schon unter PMA kultiviert wurden, eine zusätzliche Erhöhung der Neurofibrominmenge bewirkt. Dazu wurden Melanozyten mit oder ohne PMA und ohne PMA mit verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin kultiviert (Protokoll 1) (Abbildung 14 u. 15).

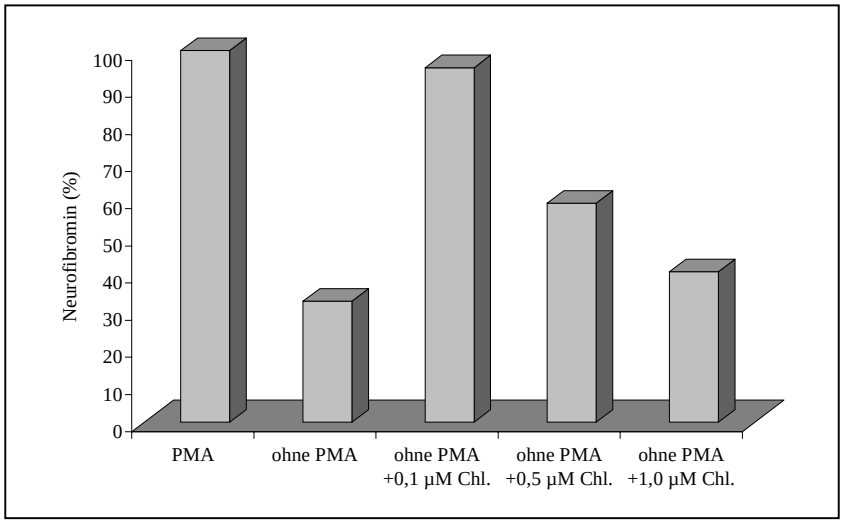

Abbildung 14: Chloroquin hemmt die Degradation von Neurofibromin in Melanozyten einer Kontrolle (MK12), die ohne PMA kultiviert wurden.
Nach der definierten Kultivierung in Standardmedium wurden die Zellen für 7 Tage mit PMA, ohne PMA, oder ohne PMA und den verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin kultiviert. Die Mengen in Prozent beziehen sich jeweils auf die Menge an Neurofibromin der unter PMA kultivierten Zellen, die auf 100% normiert wurden.

Das Experiment in Abbildung 14 zeigt, dass Chloroquin die Abnahme von Neurofibromin, die durch die Kultivierung der Zellen ohne PMA induziert wird, hemmt. Die Neurofibrominmenge war nach der Kultivierung mit 0,1 µM Chloroquin um etwa Faktor 2,9 höher als in den ohne Chloroquin kultivierten Melanozyten und bei 0,5 µM Chloroquin um Faktor 1,8. Dabei hatte Chloroquin keinen wesentlichen Effekt auf die Menge an p120 GAP oder β-Tubulin in den Melanozyten. Konzentrationen über 1 µM Chloroquin hatten keinen stärkeren Effekt auf die Neurofibrominmenge und wirkten sich eher negativ auf das Wachstum der Zellen aus, wie parallel durchgeführte Untersuchungen zur Proliferation ergaben. Analoge Befunde wurden auch an NF1-Melanozyten erhoben.

Die Experimente in Abbildung 15 auf Seite 63 zeigen, dass wie in Melanozyten der Kontrolle (MK12) Chloroquin auch in Melanozyten von Patienten (MNF25HT u. MNF92C) die Abnahme von Neurofibromin, die durch Kultiverung der Zellen ohne PMA ausgelöst wird, hemmt.

Wurden die Zellen von MK12 und MNF25HT mit PMA kultiviert, führte die zusätzliche Inkubation mit Chloroquin zu keiner wesentlichen zusätzlichen Erhöhung an Neurofibromin (Abbildung 15, Seite 63). Eine Erklärung hierfür wäre, dass Neurofibromin unter dem Einfluss von PMA nahezu nicht in Lysosomen eingeschleust wird. Die Hemmung des lysosomalen Abbaus durch Chloroquin hat dann keinen Einfluss auf die Neurofibrominmenge.

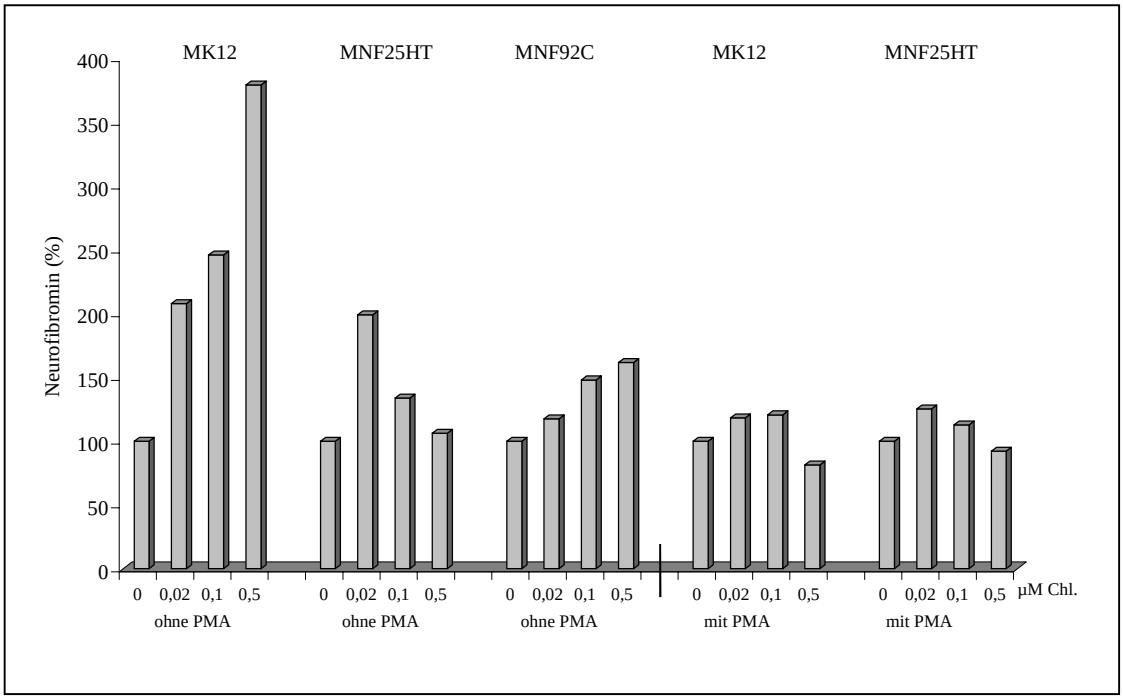

Abbildung 15: Der Einfluss von Chloroquin auf die Neurofibrominmenge in Melanozyten die mit oder ohne PMA kultiviert wurden.
Melanozyten einer Kontrolle (MK12) und eines NF1-Patienten (MNF25HT) sowie Melanozyten aus einem CALF des NF1-Patienten NF92 (MNF92C) wurden nach Kultivierung in Standardmedium für 9 Tage mit oder ohne PMA und verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin (0,02 µM, 0,1 µM und 0,5 µM) kultiviert. Die Neurofibrominmengen der Zellen, die ohne Chloroquin kultiviert wurden, wurden jeweils auf 100% normiert, worauf sich die jeweiligen anderen Werte beziehen.

Chloroquin erhöht auch die Menge an Neurofibromin bei Melanozyten, die sich im Zustand der Differenzierung befinden

Melanozyten können auch längerfristig ohne PMA kultiviert werden. Sie sind dann differenziert und weisen eine niedrigere Neurofibominmenge auf als bei der Kultivierung mit PMA. Dabei stellte sich die Frage, ob bei differenzierten Melanozyten Chloroquin ebenfalls eine Erhöhung der Neurofibrominmenge bewirkt. Weiterhin stellte sich die Frage, ob in differenzierten Melanozyten eine durch PMA induzierte Erhöhung der Neurofibrominmenge, durch die zusätzliche Behandlung mit Chloroquin, noch weiter erhöht wird. Für diese Experimente wurden die Melanozyten differenziert, indem sie fünf Tage ohne PMA kultiviert wurden (Protokoll 2). Dann wurden sie mit oder ohne PMA sowie mit oder ohne PMA und verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin kultiviert (Abbildung 16, Seite 64).

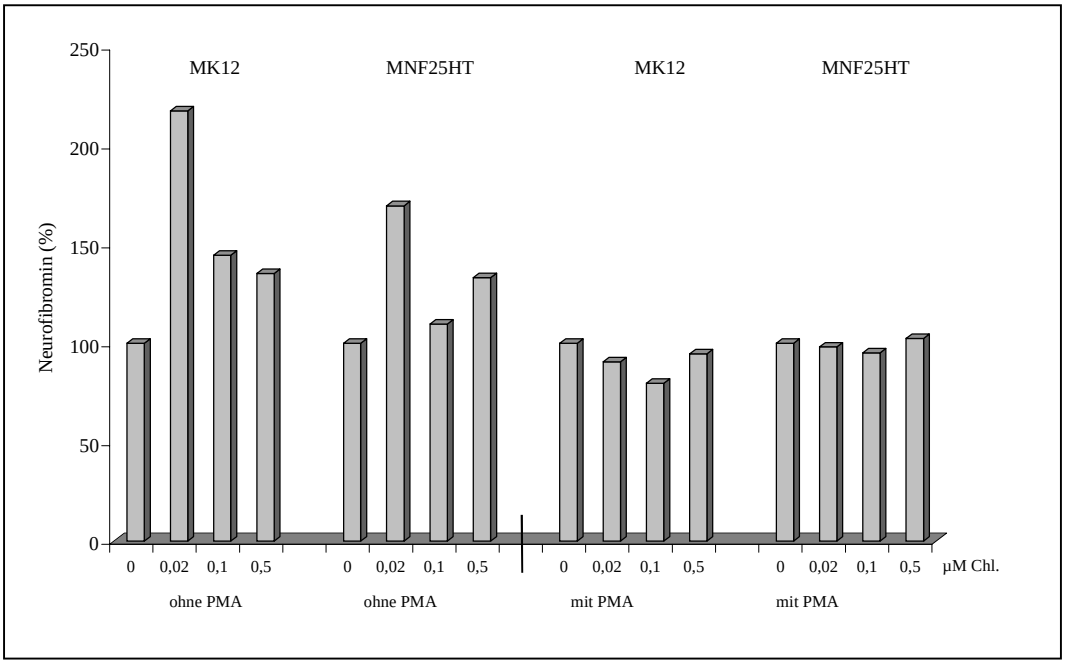

Abbildung 16: Der Einfluss von Chloroquin auf die Neurofibrominmenge in differenzierten Melanozyten.
In vier unabhängigen Experimenten wurden Melanozyten einer Kontrolle (MK12) und eines NF1-Patienten (MNF25HT) 5 Tage ohne PMA kultiviert um die Zellen in den Zustand der Differenzierung zu bringen. Dann wurden die Zellen 7 Tage mit oder ohne PMA und mit verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin (Chl.) (0,02 µM, 0,1 µM und 0,5 µM Chl.) kultiviert. Die Neurofibrominmengen der Zellen, die ohne Chloroquin (0 µM Chl.) kultiviert wurden, wurden jeweils auf 100% normiert, worauf sich die jeweiligen anderen Werte beziehen.

In diesen Experimenten ist zu sehen, dass Chloroquin in differenzierten Melanozyten des gesunden Probanden (MK12) und des NF1-Patienten (MNF25) zu einer Erhöhung der Neurofibrominmenge führt. Diese betrug bei MK12 etwa Faktor 2,6 und bei MNF25HT etwa Faktor 1,5, bei jeweils 0,02 µM Chloroquin. Höhere Konzentrationen hatten hier einen schwächeren Effekt (Abbildung 16). Bei der Inkubation mit PMA war weder bei den Melanozyten der Kontrolle (MK12) noch von denen von NF25 ein Effekt von Chloroquin zu beobachten. Dies könnte, wie oben beschrieben, auf den Einfluss von PMA zurückzuführen sein.

Die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten ist unter Chloroquin erhöht

Da die Inkubation mit Chloroquin die Abnahme der Neurofibrominmenge in Melanozyten hemmt, sollte untersucht werden, ob dies mit einer Veränderung der Halbwertszeit von Neurofibromin korreliert. Die Halbwertszeit von Neurofibromin wurde in Melanozyten des gesunden Probanden MK12, sowie der NF1-Patienten MNF267HT, MNF 52C und MNF92C untersucht.

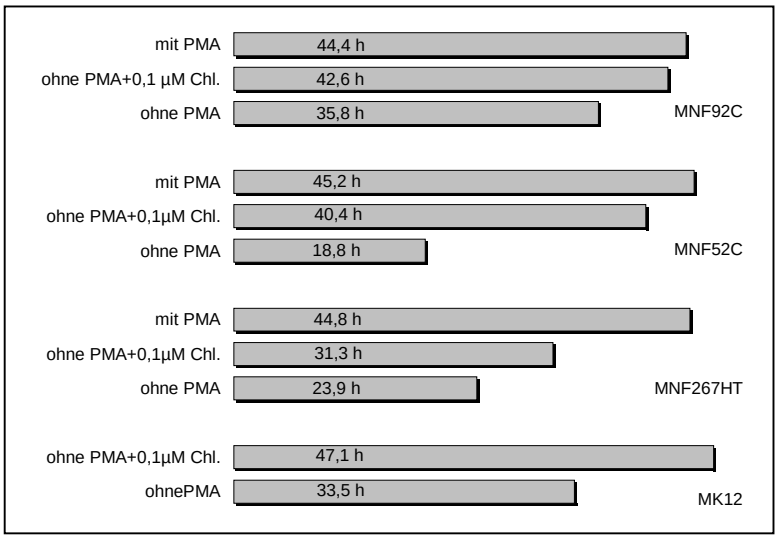

Abbildung 17: Die Kultivierung der Melanozyten mit Chloroquin (Chl.) erhöht die Halbwertszeit von Neurofibromin.
Die Balken zeigen die Halbwertszeiten von Neurofibromin in Zellen von MNF92C, MNF52C, MNF267HT und MK12, die mit PMA, ohne PMA mit 0,1 µM Chloroquin oder ohne PMA kultiviert wurden.

Bei Melanozyten, die mit PMA kultiviert wurden, verringerte sich die Halbwertszeit von Neurofibromin, wenn sie ohne PMA kultivert wurden. Diese Abnahme der Halbwertszeit von Neurofibromin wird durch die Inkubation mit 0,1 µM Chloroquin in allen untersuchten Melanozyten beeinflusst (Abbildung 17). Die Halbwertszeit von Neurofibromin war teilweise so groß wie in Melanozyten, die mit PMA kultiviert wurden. Dies deutet darauf hin, dass in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert werden, Lysosomen in die verstärkte Degradation von Neurofibrom involviert sind.

Die durch Chloroquin induzierte Erhöhung der Neurofibrominmenge beeinflusst nicht den Melaningehalt der Melanozyten

In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Melaninmenge in Melanozyten von NF1-Patienten im Vergleich zu Kontrollmelanozyten erhöht ist (Kaufmann et al. 1991). Es ist wahrscheinlich, dass diese veränderte Melanogenese in Melanozyten von NF1-Patienten durch die auf etwa 50% reduzierte Neurofibrominmenge verursacht wird. Die Kultivierung von Melanozyten ohne PMA führt zu einer Differenzierung, in Form verstärkter Melanogenese und veränderter Zellmorphologie (Kaufmann et al. 1989 u. 1991). Wenn die Erhöhung von Neurofibromin in Melanozyten, die mit Chloroquin kultiviert werden, mit einer erhöhten Aktivität von Neurofibromin korreliert, so sollte der Anstieg der Melaninmenge aufgehoben werden. Um dies zu untersuchen wurden Melanozyten mit oder ohne PMA und mit verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin kultiviert.

Tabelle 4: Melaninmenge in Melanozyten die mit Chloroquin kultiviert wurden

Zellen	MK12							
Kulturbedingungen	9 Tage mit PMA				9 Tage ohne PMA			
Chloroquin (µM)	0	0,02	0,1	0,5	0	0,02	0,1	0,5
Melaninmenge (pg)	1,5	1,4	1,2	1,2	8,1	7,3	11,5	9,1

Zellen	MK12			MNF25HT			MNF92C		
Kulturbedingungen	4 Wochen mit PMA								
Chloroquin (µM)	0	0,01	0,02	0	0,01	0,02	0	0,01	0,02
Melaninmenge (pg)	4,8	4,4	4,0	33,5	42,6	39,1	75,1	79,1	92,9

Melanozyten einer Kontrolle (MK12) wurden 9 Tage mit oder ohne PMA und verschiedenen Konzentrationen an Choroquin kultiviert (oben). Im einem Langzeitversuch wurden Melanozyten derselben Kontrolle (MK12) sowie Melanozyten aus der Haut eines NF1-Patienten (MNF25HT) und aus einem CALF eines NF1-Patienten (MNF92C) für 4 Wochen mit PMA und verschiedenen Konzentrationen (µM) an Chloroquin kultiviert. Die gemessene Melaninmenge ist in pg pro Zelle angegeben.

Der Entzug von PMA für 9 Tage steigert die Melaninmenge in den Kontrollmelanozyten drastisch (von 1,5 pg auf 8,1 pg) (Tabelle 4). Die zusätzliche Inkubation mit Chloroquin beeinflusst diesen Anstieg nicht. Auch in Melanozyten, die mit PMA kultiviert wurden, beeinflusst Chloroquin die Melaninmenge nicht. Die Langzeitinkubation für 4 Wochen mit 0,01 oder 0,02 µM Chloroquin verringert die Melaninmenge weder in Melanozyten des NF1-Patienten NF25HT noch in CALF Melanozyten von NF92 oder in Melanozyten der gesunden Person (K12, Tabelle 4). Die Ursache dürfte daran liegen, dass die durch Chloroquin erhöhte Menge an Neurofibromin inaktiv in den Lysosomen lokalisiert ist.

Chloroquin beeinflusst die Neurofibrominmenge auch in anderen Zelltypen

Weiterhin sollte untersucht werden, ob Neurofibromin auch in anderen Zelltypen in Lysosomen abgebaut wird. Es wurden Hela-Zellen, primäre Keratinozyten eines gesunden Probanden (K6), Brown Melanoma (BM)-Zellen, sowie Melanozyten aus *Nf1(+/-)*-Mäusen untersucht. Dazu wurde die Degradation von Neurofibromin in den Zellen jeweils durch die Kultivierung ohne Serum, PMA oder bFGF (abhängig vom Zelltyp) induziert und gleichzeitig der lysosomale Abbau durch Chloroquin gehemmt.

<u>Chloroquin beeinflusst die Neurofibrominmenge in HeLa-Zellen</u>

Ein in Abbildung 18 dargestelltes repräsentatives Experiment zeigt, dass bei HeLa-Zellen die Reduzierung des Serums im Medium eine Abnahme der Neurofibrominmenge verursacht. Diese Abnahme wirkt sich bei 2% Serum am stärksten aus. Die Zugabe von Chloroquin (Chl.) verringerte bei 2% Serum deutlich die Abnahme der Neurofibrominmenge. Bei 6% Serum und 10% Serum im Medium hatte Chloroquin keinen Effekt. Die

über den ^{3}H-Thymidin Einbau ermittelte Proliferation der Zellen war mit 97% (unter 2% FCS) und 93% (unter 2% FCS mit 0,1 µM Chl.) gegenüber 100% (unter 10% FCS) nicht verändert und korrelierte somit nicht mit dem Einfluss von Chloroquin auf die Neurofibrominmenge. Dies deutet darauf hin, dass Lysosomen auch in HeLa-Zellen in die Degradation von Neurofibromin involviert sein dürften.

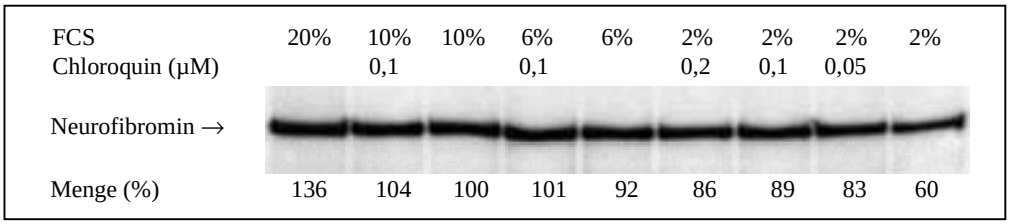

Abbildung 18: Neurofibrominmenge in HeLa-Zellen.
Die unter Standardbedingungen (DMEM mit 10% FCS) kultivierten HeLa-Zellen wurden 9 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an FCS und mit verschiedenen Konzentrationen Chloroquin kultiviert. Die jeweiligen Neurofibrominmengen beziehen sich auf die Neurofibrominmenge der mit 10% FCS kultivierten Zellen, die auf 100% normiert wurde.

Chloroquin beeinflusst die Neurofibrominmenge in Keratinozyten

Bei den Keratinozyten einer gesunden Kontrolle (K6), die mit verschiedenen Konzentrationen Chloroquin (Chl.) kultiviert wurden, erhöhte sich die Neurofibrominmenge dosisabhängig (Abbildung 19). Schon bei 0,02 µM bis 0,1 µM Chloroquin war nahezu eine Verdopplung zu beobachten und bei 0,5 µM bis 1 µM Chloroquin sogar eine Verdreifachung. Die Konzentration von 2 µM Chloroquin hatte keinen stärkeren Effekt. Das zeigt, dass Chloroquin auch in Keratinozyten den Turnover von Neurofibromin beeinflusst. Der ^{3}H-Thymidin Einbau der Keratinozyten war mit 75% (unter 0,02 µM Chl.), 79% (unter 0,1 µM Chl.) und 75% (unter 0,5 µM Chl.) gegenüber 100% (ohne Chl.) nur leicht erniedrigt.

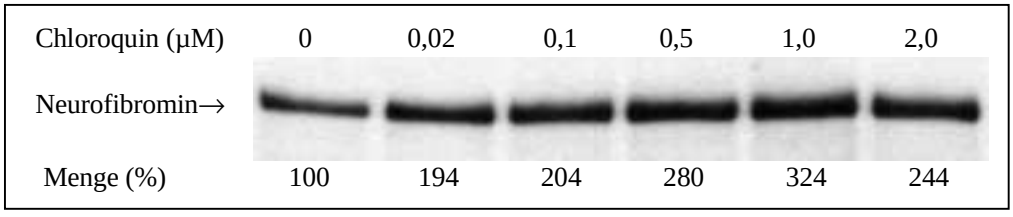

Abbildung 19: Neurofibrominmenge in Keratinozyten.
Die unter Standardbedingungen kultivierten Keratinozyten einer Kontrolle (K6) wurden 4 Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin kultiviert. Die jeweiligen Neurofibrominmengen beziehen sich auf die Neurofibrominmenge der ohne Chloroquin kultivierten Zellen, die auf 100% normiert wurde.

Chloroquin beeinflusst die Neurofibrominmenge in Brown Melanoma-Zellen

Bei einer Zelllinie, die aus einem humanen metastasierenden Melanom gewonnen wurde (Brown Melanoma-Zellen), bewirkt die Reduzierung des Serum im Medium auf 2% im Gegensatz zu HeLa-Zellen eine leichte Zunahme der Neurofibrominmenge. Die Zugabe von 0,1 µM Chloroquin oder auch PMA zu 2% FCS im Medium erhöht die Neurofibrominmenge weiter (Abbildung 20). Die über den ^{3}H-Thymidin-Einbau ermittelte Proliferation der Zellen war mit 69% (unter 2% FCS), 73% (unter 2% FCS mit 0,1 µM Chl.) und 74% (unter 2% FCS mit PMA) gegenüber 100% (unter 10% FCS) leicht verringert. Die leicht verringerte Proliferation wurde aber durch die verringerte Konzentration an FCS verursacht, nicht durch Chloroquin oder PMA und verhält sich bei der Kultivierung der Zellen zwischen 2% FCS und 10% FCS in etwa umgekehrt proportional zur Neurofibrominmenge. Die Degradation von Neurofibromin wird bei Brown Melanoma-Zellen nicht durch die Reduzierung des Serum induziert. Dennoch sind die Lysosomen vermutlich auch hier in die Degradation von Neurofibromin involviert, da PMA und Chloroquin die Neurofibrominmenge erhöhen.

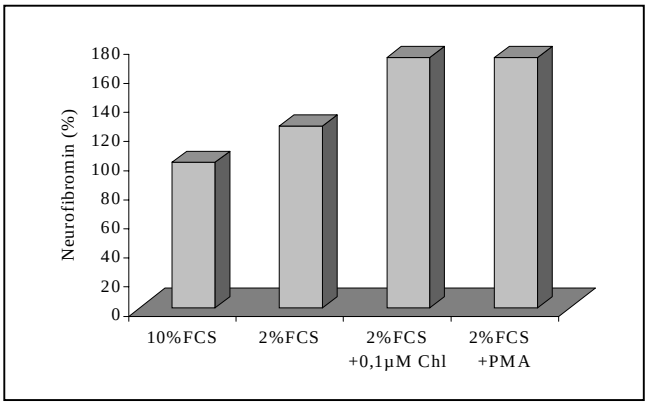

Abbildung 20: Neurofibrominmenge in Brown Melanoma-Zellen. Die unter Standardbedingungen vorkultivierten Brown Melanoma-Zellen wurden 9 Tage mit 10% FCS, 2% FCS, 2% FCS und 0,1 µM Chloroquin (Chl.) oder 2% FCS und PMA kultiviert. Die jeweiligen Neurofibrominmengen beziehen sich auf die Neurofibrominmenge der mit 10% FCS kultiviert Zellen, die auf 100 % normiert wurde.

Chloroquin beeinflusst die Neurofibrominmenge in Mäusezellen

In humanen Melanozyten erhöht die Inkubation mit Chloroquin die Neurofibrominmenge. Im Folgenden soll nun der Einfluss von Chloroquin auf die Neurofibrominmenge in kultivierten Melanozyten der Maus untersucht werden. Wurden die Melanozyten einer *Nf1(+/-)*-Maus mit bFGF, aber nur 2% FCS kultiviert, erhöhte sich die Neurofibrominmenge nach Zugabe von 0,02 µM Chloroquin auf 150%, bei 0,5 µM Chloroquin sogar auf 190%. Durch die Erhöhung der FCS-Konzentration auf 16% war ein Anstieg der Neurofibrominmenge auf 185% zu beobachten (Abbildung 21). Die Inkubation mit

Chloroquin erhöhte die Neurofibrominmenge in den Zellen, die unter 2% Serum kultiviert wurden, auf eine Menge, die durch die Kultivierung mit 16% Serum erreicht wurde. Somit könnte auch in Melanozyten von Mäusen die lysosomale Degradation in den Turnover von Neurofibromin involviert sein. Im Gegensatz zu humanen Melanozyten bewirkt Chloroquin in Melanozyten einer *Nf1(+/-)*-Maus eine Erhöhung der Neurofibrominmenge, wenn die Zellen mit wenig Serum kultiviert werden. In Gegenwart von 16% FCS führte die Kultivierung mit Chloroquin weder in den mit bFGF noch in den ohne bFGF kultivierten Melanozyten einer *Nf1(+/-)*-Maus zu einer erhöhten Neurofibrominmenge. Auch hatte bFGF, im Gegensatz zu humanen Melanozyten, keinen Effekt auf die Neurofibrominmenge.

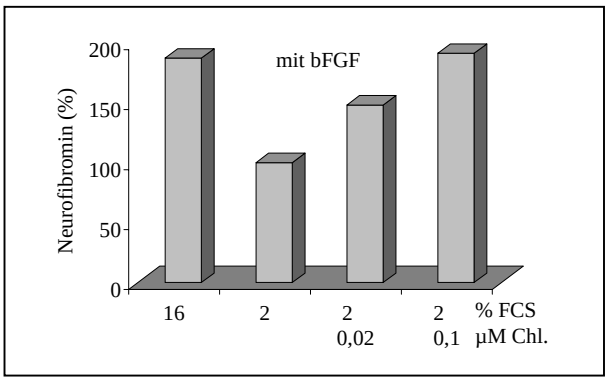

Abbildung 21: Die Wirkung von Chloroquin auf Neurofibrominmenge in Melanozyten der *Nf1(+/-)*-Maus155-7 bei verringerter Serumkonzentration. Die Zellen wurden 2 Tage in Standardmedium mit bFGF, aber nur 2% FCS kultiviert und erhielten dann 12 Tage zusätzlich 0,02 µM oder 0,1 µM Chloroquin (Chl.) oder bekamen Standardmedium (mit 16% FCS). Die Neurofibrominmengen wurden normiert und beziehen sich auf die Neurofibrominmenge der mit bFGF und 2% FCS kultivierten Zellen (100%).

Zusammenfassung:

Betrachtet man alle unter 3.2.7 durchgeführten Experimente, so scheint die Regulation der Degradation von Neurofibromin in Lysosomen ein sehr sensitiver Mechanismus zu sein. Dieser reagiert zelltyp- und speziesabhängig unterschiedlich sensibel auf verschiedene Konzentration an Wachstumsfaktoren und abhängig von der Kultivierungsdauer. In Tabelle 5 ist zusammengefasst, in welchen Zelltypen und unter welchen Kulturbedingungen die Degradation von Neurofibromin gehemmt wird. In allen untersuchten Zellen scheint die lysosomale Degradation von Neurofibromin eine Rolle zu spielen.

Tabelle 5: Induktion und Hemmung der Degradation von Neurofibromin

Zellen	Induktion der Degradation durch:	Hemmung der Degradation durch:
humane Melanozyten	Kultivierung ohne PMA	PMA, Chloroquin
HeLa	Reduktion von Serum	Serum, Chloroquin
humane Keratinozyten		Chloroquin
Brown Melanoma	Serum	Chloroquin, Reduktion von Serum
Nf1(+/-)-Maus-Melanozyten	Reduktion von Serum	Serum, Chloroquin

3.2.8 In Melanozyten, die mit oder ohne PMA kultiviert wurden, ist Neurofibromin unterschiedlich lokalisiert

Es stellte sich die Frage, ob die Kultivierung der Melanozyten mit oder ohne PMA oder ohne PMA mit Chloroquin die intrazelluläre Lokalisation von Neurofibromin beeinflusst. In Melanozyten, die ohne PMA kultivert werden, sollte Neurofibromin in Lysosomen zu finden sein, wenn die Zellen mit Chloroquin kultiviert werden. In der Literatur wurden zwar bisher schon verschiedene Lokalisationen von Neurofibromin in Zellen beschrieben, aber in keiner wurde die Lokalisation von Neurofibromin in Melanozyten, die unter diesen verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, beschrieben. Um dies zu untersuchen, wurde eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurden Melanozyten einer Kontrolle (MK4) unter den verschiedenen Bedingungen kultiviert und wie unter 2.2.6 beschrieben aufgearbeitet. Dabei wurden drei Fraktionen gewonnen, das 13000 g Pellet (Fraktion 1) mit Mitochondrien, Lysosomen, und Peroxisomen, das 100000 g Pellet (P 100) (Fraktion 2) mit den Mikrosomen und der 100000 g Überstand (100 S) (Fraktion 3), die postmikrosomale Fraktion mit den löslichen Proteinen (Abbildung 22).

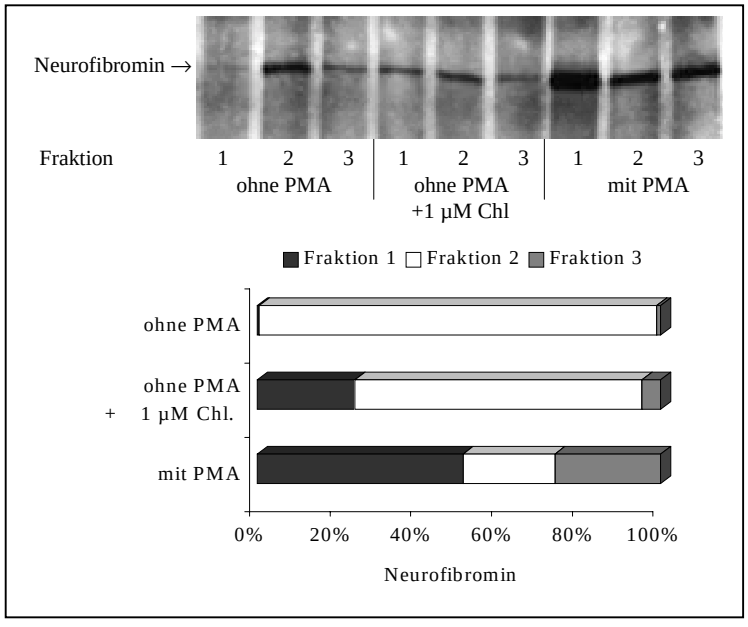

Abbildung 22: Neurofibromin aus verschiedenen subzellulären Fraktionen der Melanozyten.
Die Melanozyten wurden ohne PMA, ohne PMA mit 1 µM Chloroquin oder mit PMA kultiviert. Das Gelbild zeigt jeweils die Fraktionen 1 bis 3 der unterschiedlich kultivierten Melanozyten. Die Balken repräsentieren den prozentualen Anteil an Neurofibromin zwischen den Fraktionen 1, 2 und 3 (entsprechend der densitometrischen Auswertung des Westernblots) der jeweils unterschiedlich kultivierten Melanozyten.

In Abbildung 22 ist das Verhältnis der Neurofibrominmengen zwischen den Fraktionen 1, 2 und 3 dargestellt. Bei den Melanozyten, die ohne PMA kultiviert wurden, wurde das meiste Neurofibromin in der mikrosomalen Fraktion (Fraktion 2) gefunden. Ähnlich

verhielt es sich bei den Melanozyten, die ohne PMA aber mit Chloroquin kultiviert wurden. Hier ist jedoch der Anteil in Fraktion 1 wesentlich höher, in der sich auch die Lysosomen befinden sollten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in Melanozyten, die unter Chloroquin kultiviert werden, Neurofibromin in den Lysosomen nicht abgebaut wird. In den Zellen, die mit PMA kultiviert wurden, war in allen drei Fraktion ähnlich viel Neurofibromin zu finden. Im Gegensatz zu den ohne PMA kultivierten Zellen ist hier sehr viel Neurofibromin in der mitochondrialen (Fraktion 1) und der postmikrosomalen (zytosolischen) Fraktion (Fraktion 3) zu finden. In Melanozyten, die unter PMA kultiviert wurden (sich also in der Proliferation befinden), ist also der Anteil an Neurofibromin im Zytosol wesentlich höher, als in Zellen, die ohne PMA kultiviert wurden (sich also im Zustand der Differenzierung befinden). Dies zeigt, dass die Kultivierung mit PMA einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des Neurofibromins hat.

3.2.9 Hsp70 und Neurofibromin

Hsp70 lässt sich mit Neurofibromin co-immunopräzipitieren

Da Hsp70 in den Prozess der selektiven Aufnahme von langlebigen Proteinen in Lysosomen involviert ist (Cuervo u. Dice 1996, Agarraberes et al. 1997), sollte untersucht werden, ob Hsp70 mit Neurofibromin interagiert. Die Untersuchungen zur Bindung von Hsp70 an Neurofibromin erfolgten mittels Immunopräzipitation (IP) von Neurofibromin aus HeLa-Zellen und anschließendem Westernblot mit einem Antikörper gegen Neurofibromin (Abbildung 23, oberer Membranabschnitt) und Hsp70 (Abbildung 23, unterer Membranabschnitt).

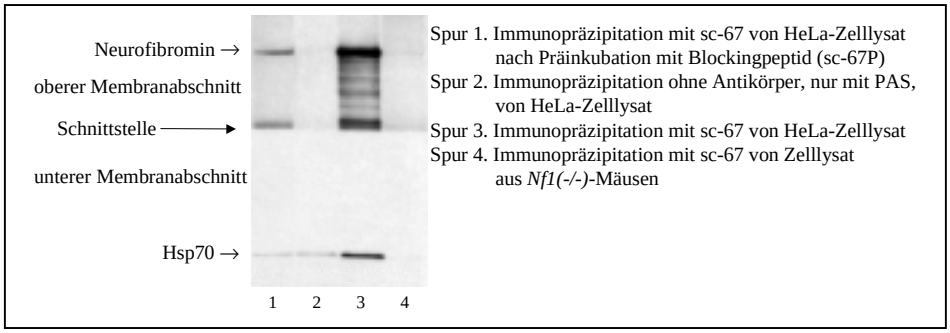

Abbildung 23: Immunopräzipitiertes Neurofibromin und mit ihm co-immunopräzipitiertes Hsp70.
Das immunopräzipitierte Neurofibromin und das mit ihm co-immunopräzipitierte Hsp70 wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet, die Membran durchgeschnitten, und im Immunonachweis mittels den Antikörpern gegen Neurofibromin (sc-68, oberer Membran) oder gegen Hsp70 (sc-24, untere Membran) nachgewiesen. In den Spuren 1-3 wurden Lysat aus HeLa-Zellen verwendet, in Spur 4 Lysat aus Melanozyten von *Nf1(-/-)*-Mäusen.

Bei der IP mit PAS (Spur 2) ist kein Neurofibromin und sehr wenig Hsp70 nachzuweisen. Bei der IP mit einem mit Blockingpeptid vorinkubiertem Antikörper (Spur 1) ist wenig Neurofibromin und deutlich weniger Hsp70 nachzuweisen. Wird Hsp70 mit Neurofibromin co-immunopräzipitiert, erhöht sich die Menge an Hsp70 deutlich (Spur 3). In Zellen der *Nf1(-/-)*-Mäuse (*Nf1(-/-)*MMS142-5), in denen Neurofibromin nicht nachweisbar ist, konnte auch kein Hsp70 mit Antikörpern gegen Neurofibromin co-immunopräzipitiert werden (Spur 4). Dieses Ergebniss zeigt, dass Hsp70 an Neurofibromin bindet.

Die Expression von Hsp70 wird durch PMA und Chloroquin nicht beeinflusst

Da Hsp70 mit Neurofibromin interagiert, sollte nun untersucht werden, ob Bedingungen, die zu einer veränderten Halbwertszeit von Neurofibromin führen, auch einen Einfluss auf die Expression von Hsp70 in Melanozyten haben. Dabei sollte bei Melanozyten die Veränderung der Menge an Hsp70 mit der von Neurofibromin verglichen werden. Dazu wurden Melanozyten einer Kontrolle (MK12) sowie Melanozyten aus einem CALF eines NF1-Patienten (MNF52C) mit oder ohne PMA kultiviert. Bei den Zellen von MK12 wurde auch der Einfluss von Chloroquin auf die Menge an Hsp70 untersucht.

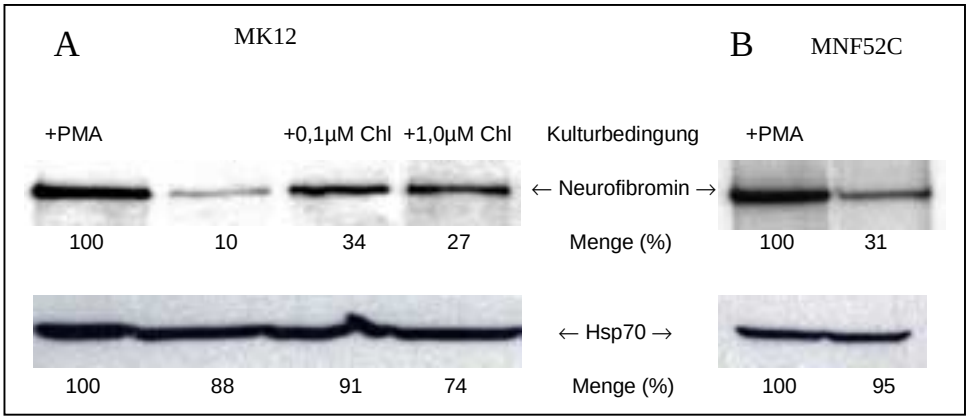

Abbildung 24: Einfluss von PMA und Chloroquin (Chl) auf die Menge an Hsp70 im Vergleich zu Neurofibromin in Melanozyten einer Kontrolle (MK12) (A) sowie der Einfluss von PMA auf die Expression der beiden Proteine in Melanozyten aus einem CALF eines Patienten (MNF52C). Die Zellen wurden 13 Tage mit oder ohne PMA oder ohne PMA mit Chloroquin kultiviert. Die Neurofibrominmengen wurden normiert und beziehen sich jeweils auf die Neurofibrominmenge der mit PMA kultivierten Zellen (100%).

Wie zu erwarten, führt die Kultivierung ohne PMA in den Melanozyten der Kontrolle (MK12) zu einer drastischen Abnahme der Neurofibrominmenge, ein Effekt der durch die Inkubation mit Chloroquin geblockt wird. Unter keiner Kulturbedingung war jedoch ein wesentlicher Unterschied in der Menge an Hsp70 zu sehen (Abbildung 24). Auch bei den

NF1-Melanozyten führte die Kultivierung ohne PMA nicht zu einer Veränderung der Menge an Hsp70. Diese Experimente zeigen, dass die Veränderung der Neurofibrominmenge durch PMA oder Chloroquin nicht mit einer Veränderung der Menge an Hsp70 korreliert.

3.3 Eine spezifische Phophorylierung an Neurofibromin könnte im Zusammenhang mit der Regulation seines Abbaus stehen

Proteine können posttranslational durch eine Phosphorylierung modifiziert werden. Diese Modifikationen können einen Einfluss auf verschiedene Funktionen eines Proteins haben, wie z.B. seine Bindung an bestimmte Zellstrukturen, seine enzymatische Aktivität oder seine Stabilität. Neurofibromin kann *in vitro* an Serin- und Threonin-Resten durch die PKA phosphoryliert werden (Boyer et al. 1994, Izawa et al. 1996). Es wäre denkbar, dass die Phosphorylierung von Neurofibromin ein entscheidender Mechanismus bei der Regulierung seines Abbaus ist. Da es Hinweise gibt, dass die Phosphorylierung eines Proteins seinen Transport zu Lysosomen verhindern kann (Steveson et al. 1999), sollte der Einfluss der Phosphorylierung von Neurofibromin auf seine Halbwertszeit untersucht werden. Diese Experimente erfolgten an Melanozyten gesunder Personen und NF1-Patienten.

3.3.1 Die Phosphatase-Inhibitoren Okadasäure und Na-Orthovanadat erhöhen die Neurofibrominmenge in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert werden, jedoch nicht deren Proliferation

Um zu untersuchen, ob eine Phosphorylierung von Neurofibromin bei der Regulation seiner Halbwertszeit eine wesentliche Rolle spielt, sollte zuerst der Einfluss der Phosphoprotein-Phosphatase-Inhibitoren Okadasäure oder Na-Orthovanadat auf die Neurofibrominmenge in Melanozyten gesunder Personen und NF1-Patienten ermittelt werden. Okadasäure hemmt die Dephosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten, Na-Orthovanadat dagegen die von Tyrosin-Resten. Vorversuche mit Melanozyten zeigten, dass die Abnahme der Neurofibrominmenge, nach der Kultivierung der Zellen ohne PMA, durch Okadasäure nahezu verhindert wird. Dabei hatte die Okadasäure keinen wesentlichen Einfluss auf die Menge an p120 GAP oder β-Tubulin (Müller R. Diplomarbeit 1997). Diese Untersuchungen wurden im folgenden an Zellen von MK4 und

MK13 fortgesetzt. Außerdem sollte untersucht werden, ob Okadasäure oder Na-Orthovanadat die Proliferation der Melanozyten beeinflussen.

Einfluss der Phosphatase-Inhibitoren auf die Neurofibrominmenge in Melanozyten

Um den Einfluss der Phosphatase-Inhibitoren auf die Abnahme der Neurofibrominmenge nach PMA Entzug zu untersuchen, wurden Melanozyten von MK4 und MK13 mit PMA, ohne PMA und ohne PMA mit verschiedenen Konzentrationen an Okadasäure, Na-Orthovanadat oder Okadasäure und Na-Orthovanadat kultiviert (Abbildung 25A). In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss dieser Inhibitoren auf die Neurofibrominmenge in differenzierten Melanozyten untersucht. Dazu wurden Zellen von MK4 in Standardmedium ohne PMA vorkultiviert. Dann wurden sie mit PMA, ohne PMA und ohne PMA mit verschiedenen Konzentrationen an Okadasäure, Na-Orthovanadat oder beiden Substanzen kultiviert (Abbildung 25B).

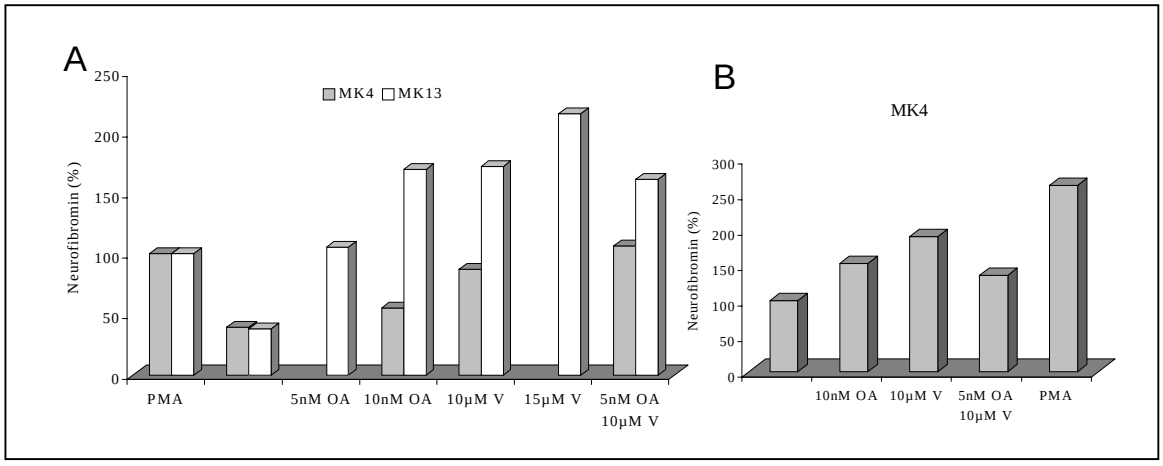

Abbildung 25: Die Inkubation mit Okadasäure (OA) oder Na-Orthovanadat (V) steigert die Neurofibrominmenge in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert werden.
Die Kultivierung erfolgte jeweils ohne PMA zuzüglich der in der Abszisse angegebenen Substanzen.
A: Neurofibrominmenge in Melanozyten von Kontrollen (MK4 und MK13), die für 4 Tage mit den angegebenen Substanzen kultiviert wurden.
B: Neurofibrominmenge in Zellen von MK4, die zuvor 3 Tage ohne PMA und anschließend für 4 Tage ohne PMA, oder ohne PMA mit den angegebenen Substanzen kultiviert wurden.
Die Neurofibrominmengen wurden normiert und beziehen sich jeweils auf die Neurofibrominmenge der mit PMA kultivierten Zellen (A) oder der ohne PMA kultivierten Zellen (B).

Die Experimente in Abbildung 25A zeigen, dass Konzentrationen von 5 nM oder 10 nM Okadasäure die durch Entzug von PMA aus dem Medium verursachte Abnahme der Neurofibrominmenge in Melanozyten vollständig (bei MK13) oder zumindest teilweise (MK4) hemmt. Ein ähnlicher Effekt ist nach der Kultivierung mit Na-Orthovanadat zu beobachten. Okadasäure und Na-Orthovanadat zusammen erhöhten ebenfalls die

Neurofibrominmenge, hatten aber keinen additiven Effekt. Die Neurofibrominmenge in den mit Okadasäure oder Na-Orthovanadat kultvierten Zellen war teilweise höher als unter der Kultivierung mit PMA, in jedem Fall aber höher als in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert wurden (Faktor 2 bis 4). Die Abbildung 25B zeigt, dass auch bei Melanozyten, die sich im differenzierten Zustand befinden, die Zugabe von Okadasäure, Na-Orthovanadat oder Okadasäure und Na-Orthovanadat die Neurofibrominmenge erhöht (Faktor 1,5 bis 2). Als Kontrolle diente die Kultivierung mit PMA, bei der sich die Neurofibrominmenge auf etwa Faktor 2,5 erhöhte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl eine Phosphorylierung an Serin- oder Threonin-Resten als auch an Tyrosin-Resten in die Regulation der Neurofibrominmenge involviert sein könnte.

Einfluss der Phosphatase-Inhibitoren auf die Proliferation von Melanozyten

Parallel sollte untersucht werden, ob Okadasäure oder Na-Orthovanadat die Proliferation der Melanozyten verändern. Dazu wurden Zellen der Kontrolle MK12 sowie des Patienten NF267 in Anwesenheit von ^{3}H-Thymidin im Medium, mit oder ohne PMA sowie ohne PMA mit 10 nM Okadasäure oder ohne PMA mit 15 µM Na-Orthovanadat, kultiviert.

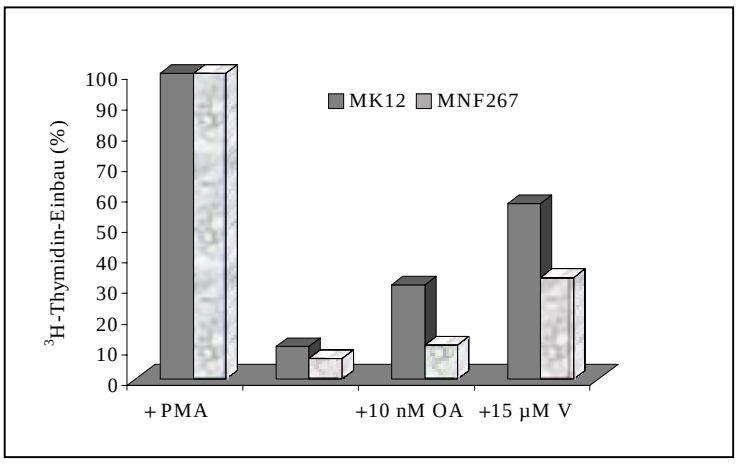

Abbildung 26: Die Proliferation von Melanozyten wird durch Inkubation mit Phosphatase-Inhibitoren beeinflusst.
^{3}H-Thymidin Einbau in kultivierten Melanozyten einer gesunden Kontrollperson (MK12) und eines NF1-Patienten (MNF267HT). Die Mengen des eingebauten ^{3}H-Thymidin sind in Prozent dargestellt und beziehen sich jeweils auf die Menge der mit PMA kultivierten Zellen (100%). Die Kultiverung erfolgte 4 Tage mit PMA, ohne PMA, ohne PMA mit Okadasäure (OA) oder ohne PMA mit Na-Orthovanadat (V). Anschließend erfolgte zusätzlich für 4 h die Markierung mit ^{3}H-Thymidin.

Die Proliferation geht in den ohne PMA kultivierten Melanozyten der Kontrolle und des NF1-Patienten drastisch zurück (Abbildung 26). Dieser Proliferationsrückgang wird durch Okadasäure sowie durch Na-Orthovanadat etwas abgefangen. Die Proliferation der Zellen

wird also durch Okadasäure beeinflusst, jedoch nicht so deutlich wie die Neurofibrominmenge. Dies bedeutet, dass die durch Okadasäure und Na-Orthovanadat verursachte Erhöhung der Neurofibrominmenge in Melanozyten nicht auf eine Steigerung der Proliferation der Zellen zurückzuführen ist.

3.3.2 Der Phosphatase-Inhibitor Okadasäure erhöht die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten

Aufgrund dieser Befunde sollte nun untersucht werden, ob die Inkubation mit einem Phosphatase-Inhibitor einen Einfluss auf die Halbwertszeit von Neurofibromin in Melanozyten hat. Da Na-Orthovanadat vorwiegend die Dephosphorylierung von Thyrosin-Resten hemmt, bei Neurofibromin bisher jedoch keine Phosphorylierung an Thyrosin-Resten beschrieben wurde, erfolgten die weiteren Untersuchungen zuerst mit Okadasäure. Okadasäure hemmt die Dephosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten. Diese Experimente wurden mit Melanozyten einer Kontrolle (MK12) und eines NF1-Patienten (MNF267HT) durchgeführt.

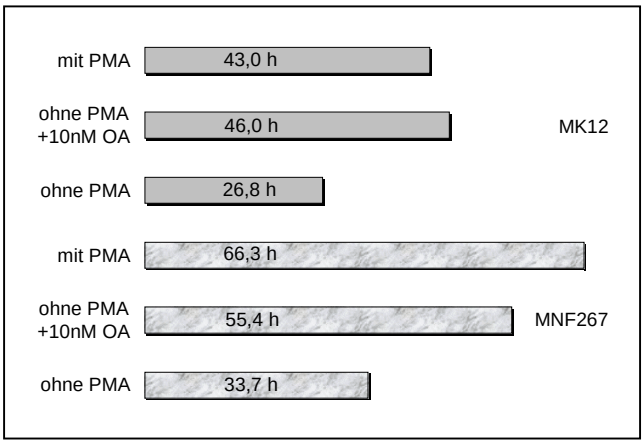

Abbildung 27: Halbwertszeiten von Neurofibromin in Melanozyten einer Kontrolle (MK12) und aus der Haut eines NF1-Patienten (MNF267HT) die mit PMA, ohne PMA mit 10 nM Okadasäure oder ohne PMA kultiviert wurden.

Wie schon in früheren Experimenten gezeigt, verringerte sich auch in diesen Experimenten die HWZ von Neurofibromin in Melanozyten von K12 und NF267 bei der Kultivierung ohne PMA. Wurden die Zellen ohne PMA, aber mit 10 nM Okadasäure kultiviert, ist die Halbwertszeit von Neurofibromin bei MK12 so hoch wie bei der Kultivierung unter PMA und bei MNF267 zumindest wesenlich höher als bei der Kultvierung ohne PMA (Abbildung 27).

3.3.3 Die Phosphorylierung von Neurofibromin ist in Melanozyten nach der Kultivierung mit PMA erhöht

Da Okadasäure die Halbwertszeit von Neurofibromin beeinflusst, könnte eine Phosphorylierung an Neurofibromin in seine Aufnahme und Degradation in Lysosomen involviert sein. Deshalb sollte die Phosphorylierung von Neurofibromin genauer untersucht werden. Da die Untersuchungen zur Halbwertszeit von Neurofibromin bisher fast ausschließlich mit Melanozyten durchgeführt wurden, sollten auch die Experimente zur Phosphorylierung an Melanozyten erfolgen.

Neurofibromin wird auch ohne PMA im Medium phosphoryliert

Um festzustellen, nach welchem Zeitraum eine vollständige Grundphosphorylierung von Neurofibromin erfolgt, wurden Melanozyten von MK5 in Standardmedium ohne PMA kultiviert und dann für verschiedene Zeiten mit ^{32}P-Orthophosphat markiert (Abbildung 28).

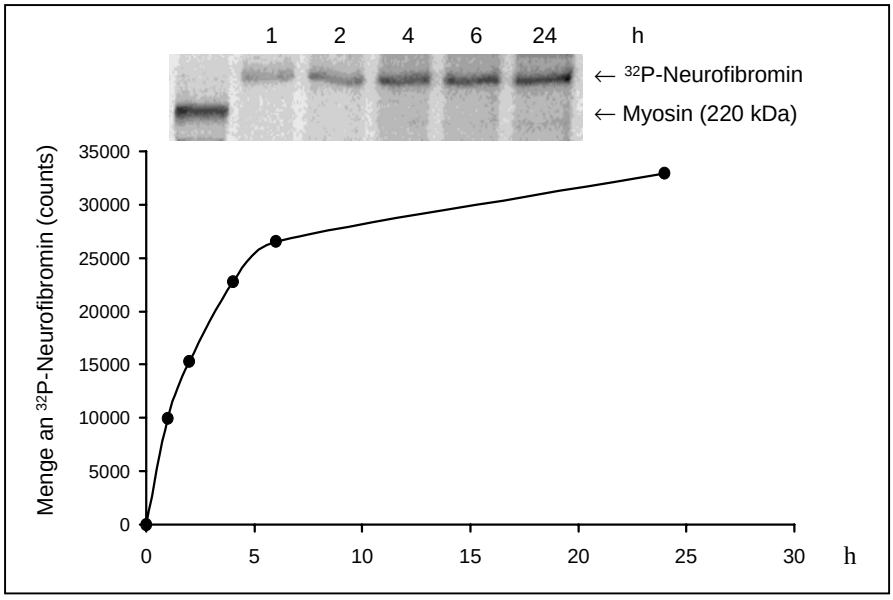

Abbildung 28: Phosphorylierung von Neurofibromin bei Kultivierung ohne PMA innerhalb von 24 h.
Menge an phosphoryliertem Neurofibromin in counts. Die Zellen von MK5 wurden 1 Tag ohne PMA kultiviert und dann für 1 bis 24 h zusätzlich mit ^{32}P-Orthophosphat markiert.

Dieses Experiment zeigt, dass Neurofibromin in Anwesenheit von CT/IBMX und 16% Serum im Medium phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung steigt innerhalb von 6 h rasch an, um dann zwischen 6 h und 24 h abzuflachen (Abbildung 28).

PMA erhöht rasch die Phosphorylierung von Neurofibromin

Nun sollte untersucht werden, wie sich die Stimulation der Zellen mit PMA auf die Phosphorylierung von Neurofibromin auswirkt. Dazu wurden Melanozyten einer Kontrolle (MK5) in Standardmedium (mit CT/IBMX und Serum) ohne PMA mit ^{32}P-Orthophosphat markiert und dann in diesem Medium für verschiedene Zeiten mit 85 nM PMA stimuliert (Abbildung 29).

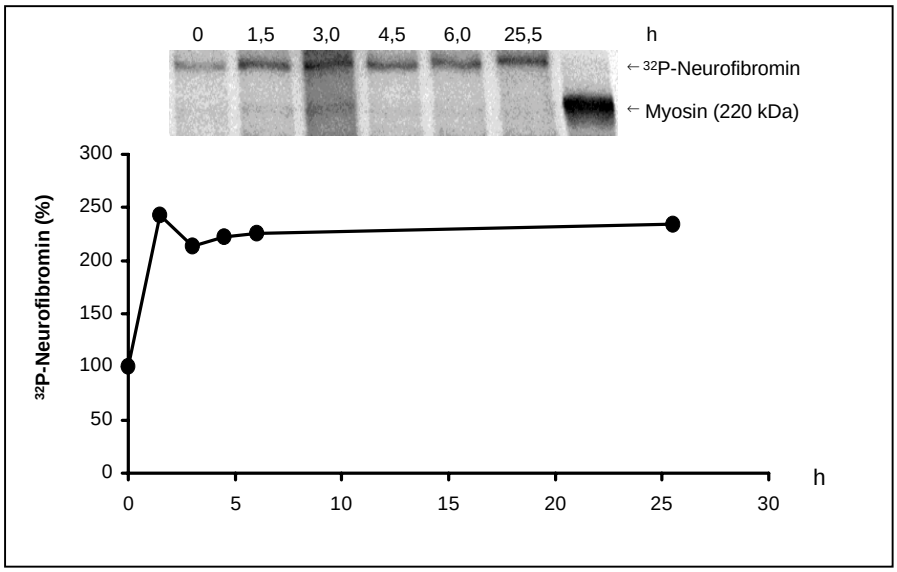

Abbildung 29: Zeitkurve der Phosphorylierung von Neurofibromin nach Inkubation mit PMA.
Melanozyten eines Gesunden wurden 3 Tage in Standardmedium ohne PMA kultiviert, anschließend in diesem Medium für 24 h mit ^{32}P-Orthophosphate markiert und dann zusätzlich mit 85 nM PMA für 1,5 h, 3 h, 4,5 h, 6 h und 25,5 h stimuliert. (Counts der phosphorylierten Neurofibrominbanden in %).

Nach 24 h Inkubation ohne PMA führte die Inkubation mit 85 nM PMA innerhalb von 1,5 h zu einer zusätzlichen Phosphorylierung von Neurofibromin (Abbildung 29).
In diesen Zeitexperimenten zur Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten konnte gezeigt werden, dass in der Anwesenheit von Serum und CT/IBMX Neurofibromin nach ungefähr 24 h fast vollständig phosphoryliert wird und PMA eine rasche zusätzliche Phosphorylierung bewirkt.

PMA erhöht auch die Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten aus einem CALF eines NF1-Patienten

In einem parallelen Experiment sollte die Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten aus einem CALF eines NF1-Patienten untersucht werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob auch bei diesen Zellen eine bei Kultivierung ohne PMA erfolgte Phosphorylierung an Neurofibromin durch die Stimulation mit PMA erhöht werden kann.

Dazu wurden Zellen von MNF92C, sowie als Kontrolle MK4, in Standardmedium, ohne PMA aber mit ^{32}P-Orthophosphat kultiviert und anschließend im selben Medium 6 h mit PMA stimuliert.

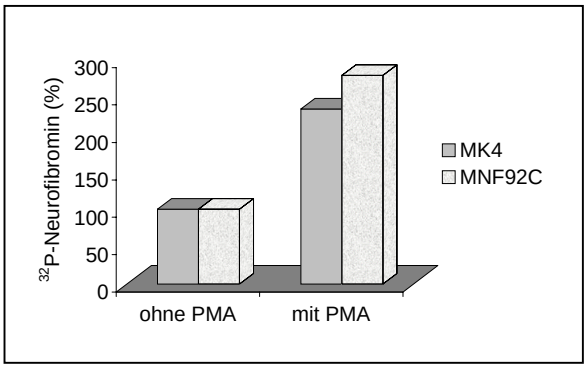

Abbildung 30: Phosphorylierung von Neurofibromin in kultivierten Melanozyten einer Kontrolle (K4) und einem CALF eines Patienten (MNF92C), ohne oder mit Stimulation durch PMA.
Die Zellen wurden 3 Tage in Standardmedium ohne PMA kultiviert und dann 6 h mit ^{32}P-Orthophosphat in Standardmedium ohne oder mit PMA kultiviert. Die in Prozent (%) dargestellte Menge an ^{32}P-Neurofibromin wurde normiert und bezieht sich jeweils auf die Menge der ohne PMA kultivierten Zellen (100%).

Es zeigte sich, dass auch in NF1-Melanozyten aus einem CALF die Kultivierung in Standardmedium, ohne PMA, eine Phosphorylierung von Neurofibromin bewirkt. Diese Phosphorylierung erhöhte sich durch die Stimulation der Zellen mit PMA (Abbildung 30). Die Inkubation mit PMA stimuliert also die Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten von Gesunden und NF1-Patienten in ähnlicher Weise.

3.3.4 Auch die Kultivierung mit CT/IBMX, bFGF oder Okadasäure erhöht die Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten

Da Serum, CT/IBMX, bFGF und Okadasäure einen Einfluss auf die Neurofibrominmenge in Zellen haben, sollte auch ihr Einfluss auf die Phosphorylierung von Neurofibromin untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden die Zellen vor der Stimulation mit Serum, CT/IBMX, bFGF oder Okadasäure, mit einem Minimalmedium, bestehend aus Ham F10 mit 4% Serum (2% FCS, 2% NU) kultiviert.

Einfluss von Serum und CT/IBMX auf die Phosphorylierung von Neurofibromin

Um den Einfluss von Serum und CT/IBMX auf die Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten zu untersuchen, wurden Zellen einer Kontrolle in Minimalmedium vorkultiviert und dann unter Minimalmedium mit ^{32}P-Orthophosphat, mit Serum,

CT/IBMX oder PMA stimuliert. Parallel dazu wurde der Einbau von ^{32}P-Orthophosphat in die Zellen unter den gleichen Kulturbedingungen untersucht (Abbildung 31).

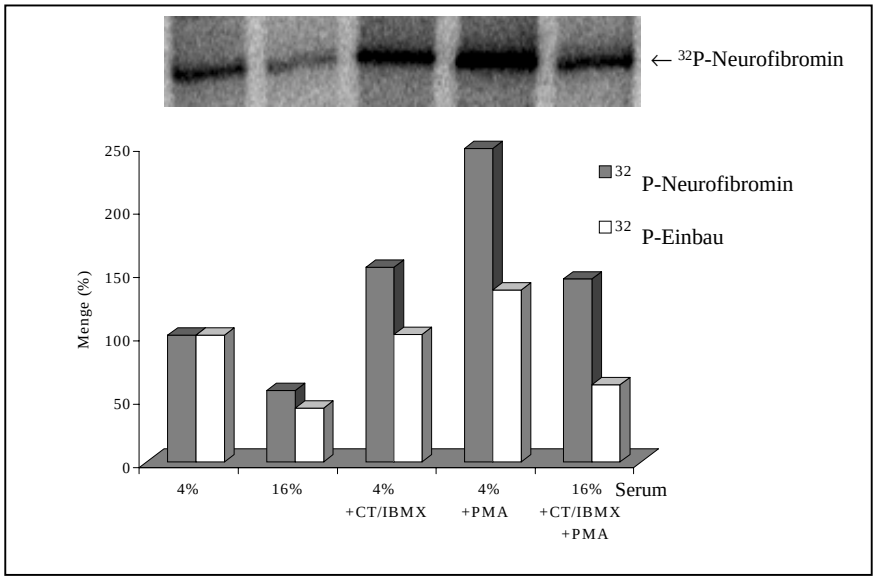

Abbildung 31: Der Einfluss von Serum, CT/IBMX und PMA auf die Phosphorylierung von Neurofibromin sowie auf den Einbau von ^{32}P-Orthophosphat in Melanozyten.
Zellen von MK4 wurden 1 Tag in Ham F10 mit 4% Serum (2% FCS, 2% NU) vorkultiviert und dann für 1 Tag mit ^{32}P-Orthophosphat in Ham F10 mit 4% dialysiertem Serum kultiviert oder 1 Tag durch Erhöhung des dialysierten Serums auf 16 % (8% FCS, 8% NU) , durch Inkubation mit CT/IBMX oder PMA oder PMA, CT/IBMX und Erhöhung des dialysierten Serums auf 16 % (TIC) stimuliert.
In der Graphik sind die gemessenen counts der Banden des Gels (^{32}P-Neurofibromin) sowie die Menge des eingebauten ^{32}P-Orthophosphats (^{32}P-Einbau) in Prozent (%) angegeben. Die gemessenen Mengen (%) wurden auf die unter 4% Serum kultivierten Zellen normiert (100%).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Zugabe von CT/IBMX die Menge an phosphoryliertem Neurofibromin auf 150% ansteigt, durch PMA sogar auf 250%. Die Erhöhung der Serumkonzentration führte dagegen zu einer Abnahme an phosporyliertem Neurofibromin auf 50% gegenüber der Menge der unter 4% Serum kultivierten Zellen. Die Kultivierung mit PMA, CT/IBMX und 16% Serum führte zwar ebenfalls zu einer Erhöhung an phosporyliertem Neurofibromin auf etwa 150%, diese war jedoch niedriger als die, die durch die Stimulation mit PMA alleine erreicht wurde (Abbildung 31, graue Balken). Während die Stimulation der Zellen mit CT/IBMX oder PMA keinen Einfluss auf die Menge an einbautem ^{32}P-Orthophosphat hat, hemmen 16% Serum seinen Einbau (Abbildung 31, helle Balken). Dies zeigt, dass durch CT/IBMX und PMA die Phosphorylierung von Neurofibromin erhöht wird. Die Erhöhung der Serumkonzentration hat jedoch keinen direkten Effekt auf die Phosphorylierung von Neurofibromin, da die unter diesen Bedingungen verringerte Phosphorylierung von Neurofibromin auf einen verringerten Gesamteinbau an ^{32}P-Orthophosphat zurückzuführen ist.

Einfluss von bFGF und Okadasäure auf die Phosphorylierung von Neurofibromin

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss von bFGF und Okadasäure auf die Phosphorylierung von Neurofibomin in Melanozyten untersuchen werden (Abbildung 32). Da in Vorversuchen, vermutlich aufgrund der kürzeren Inkubationszeiten, mit 10 nM Okadasäure kein deutlicher Effekt nachgewiesen werden konnte, wurde die höhere Konzentration von 50 nM Okadasäure eingesetzt.

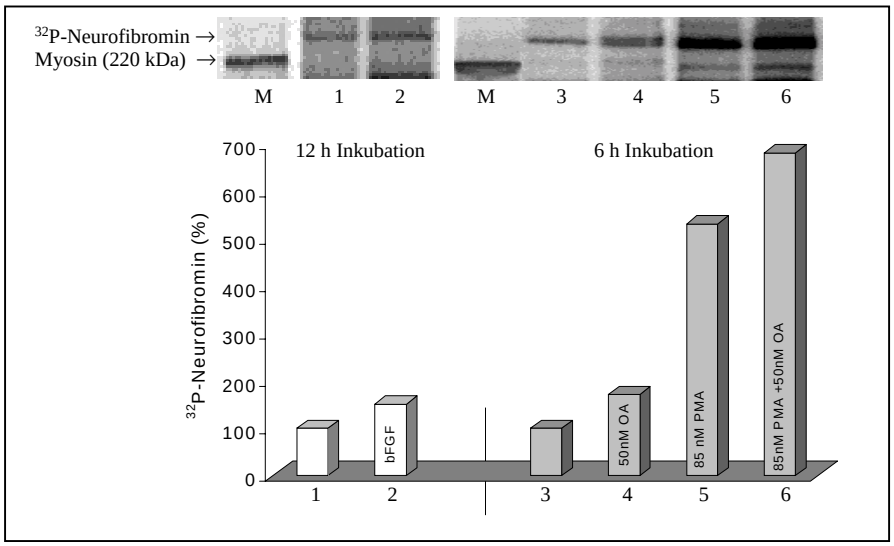

Abbildung 32: Der Einfluss von bFGF und Okadasäure auf die Phosphorylierung von Neurofibromin.
Um den Einfluss von bFGF auf die Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten zu untersuchen, wurden die Melanozyten 5 Tage unter BIC vorkultiviert (Spuren 1-2). Für die Untersuchung des Einflusses von Okadasäure (OA) wurden die Melanozyten 5 Tage unter TIC vorkultiviert (Spuren 3-6). Für das eigentliche Experiment wurden die Melanozyten anschließend 1 Tag in Minimalmedium (Ham F10 mit 4% Serum) vorkultiviert. Dann mit ^{32}P-Orthophosphat für 12 h ohne (1) oder mit bFGF (2), oder für 6 h ohne (3), oder mit 50 nM Okadasäure (4), mit 85 nM PMA (5) (zur Kontrolle), oder mit 50 nM Okadasäure und 85 nM PMA (6) kultiviert. Counts der Neurofibromin Banden in %. Molekulargewichtsmarker Myosin (220 kDa).

Bei Melanozyten, die mit bFGF kultiviert wurden steigt die Phosphorylierung von Neurofibromin an (Abbildung 32, Spuren 1 und 2). Okadasäure führt nach 6 h Inkubation zu einer Erhöhung der Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten um den Faktor 1,7. In Gegenwart von PMA erhöht sich die Phosphorylierung um Faktor 5,3 und in Gegenwart von PMA und zusätzlich Okadasäure sogar um Faktor 6,8 (Abbildung 32, Spuren 3 bis 6). Die Konzentration von 50 nM Okadasäure war in der kurzen Versuchszeit nicht toxisch, jedoch überleben die Zellen bei dieser Konzentration nur ein paar Tage.

3.3.5 Phosphoaminosäuremapping von immunopräzipitiertem Neurofibromin

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist denkbar, dass eine bestimmte Phosphorylierung an Neurofibromin für die Regulation seines Abbaus verantwortlich ist. Deshalb sollte im

Folgenden untersucht werden, welche Aminosäuren (S, T oder Y) des Neurofibromins bei Kultivierung der Melanozyten mit oder ohne PMA bzw. bFGF phosphoryliert sind. Dazu wurde ein Phosphoaminosäuremapping von immunopräzipitiertem Neurofibromin durchgeführt. Die Melanozyten einer Kontrolle (MK12) wurden mit PMA oder bFGF vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen erst mit Minimalmedium, dann mit ^{32}P-Orthophosphat in Medium mit oder ohne PMA sowie mit oder ohne bFGF kultivert.

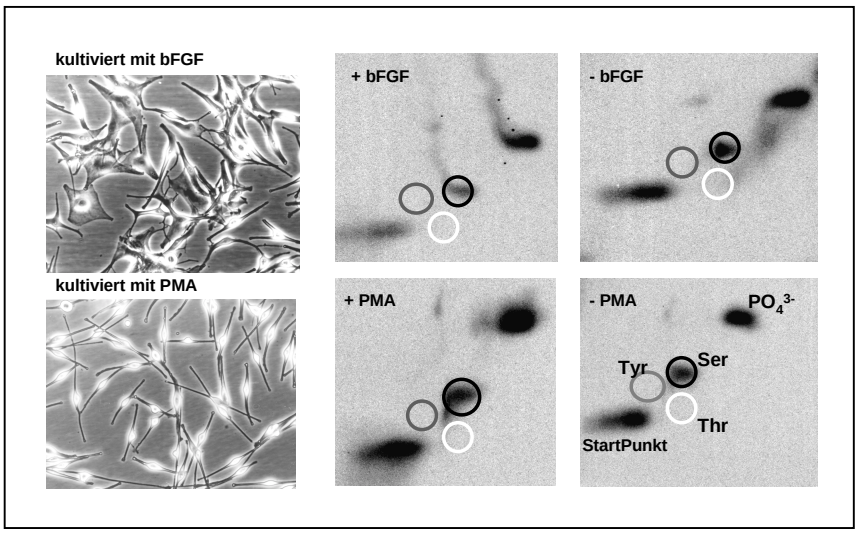

Abbildung 33: Phosphoaminosäuremapping von immunopräzipitiertem Neurofibromin aus Melanozyten. Melanozyten, die mit bFGF kultiviert wurden sind größer und haben mehr Dendriten als die Zellen, die mit PMA kultiviert wurden. Die Melanozyten einer Kontrolle (MK12) wurden 5 Tage mit PMA oder bFGF kultiviert, dann 1 Tag ohne PMA oder ohne bFGF. Anschließend wurden die Zellen für 12 h mit ^{32}P-Orthophosphat in Medium mit oder ohne PMA sowie mit oder ohne bFGF kultivert. Das Neurofibromin wurde immunopräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, Neurofibromin aus dem Gel isoliert, mit HCl in Aminosäuren gespalten und diese mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die radioaktiven Aminosäuren wurden im PhosphoImager detektiert. Die erwarteten Positionen der Aminosäuren sind schwarz (Phosphoserin), grau (Phosphotyrosin) oder weiß (Phosphothreonin) eingekreist.

Hierbei ließ sich in der Anwesenheit oder Abwesenheit von PMA oder bFGF jeweils nur eine Phosphorylierung an Serin-Resten nachweisen, nicht aber an Threonin- oder Tyrosin-Resten (Abbildung 33).

3.3.6 Peptidmapping der durch Spaltung von Neurofibromin mit Bromcyan erhaltenen Fragmente

Nun sollte die Position der durch die Stimulation mit PMA oder bFGF zusätzlich induzierten Serin-Phosphorylierung im Neurofibromin charakterisiert werden. Dazu sollte immunopräzipitiertes ^{32}P-Neurofibromin mit Bromcyan (BrCN) gespalten werden. Bromcyan spaltet Proteine hinter jedem Methionin-Rest, wodurch 82 Spaltprodukte zu erwarten sind. Die verstärkte Phosphorylierung eines 2-dimensional aufgetrennten

Spaltproduktes sollte einen Hinweis auf die Region einer zusätzlichen Phosphorylierung geben. Aufgrund der Größe des Fragments sollte auf die Sequenz geschlossen werden können. Für die Auftrennung der Fragmente des mit BrCN gespaltenen Neurofibromins musste erst die SDS-PAGE etabliert werden. Hierzu wurden verschiedene Markerproteine mit Mokulargewichten zwischen 2,35 kDa und 57 kDa in SDS-Gelen mit verschiedenen Quervernetzungen getestet. Dabei erwies sich ein SDS-Gel mit T=16,5%, C=3% als am besten geeignet. In diesem SDS-Gel konnten die Markerproteine bis zu 3,4 kDa sehr gut aufgetrennt werden. Insgesamt war sogar eine Auftrennung bis zur 2,35 kDa Bande zu sehen. Als Laufpuffer diente der Tris/Tricine Puffer. Erste Versuche zur Auftrennung mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender SDS-PAGE (2D-Elektrophorese) scheiterten an der zu geringen Menge an vorhandenen gespaltenen Neurofibromin-Fragmenten aufgrund geringer Ausgangsmengen und hohen Reinigungsverlusten. Deshalb wurde in weiteren Experimenten auf die isoelektrische Fokussierung verzichtet und die Fragmente nur in der SDS-PAGE aufgetrennt. Hierbei sollte zuerst die Stimulation durch PMA untersucht werden. Dazu wurden 24 x 10^6 Melanozyten einer Kontrolle (MK12) einen Tag ohne PMA kultiviert, dann unter 750 µCi ^{32}P-Orthophosphat pro ml Medium kultiviert und dabei für 12 h mit oder ohne PMA stimuliert. Das Neurofibromin wurde immunopräzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und mit BrCN gespalten. Die Spaltprodukte wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 34).

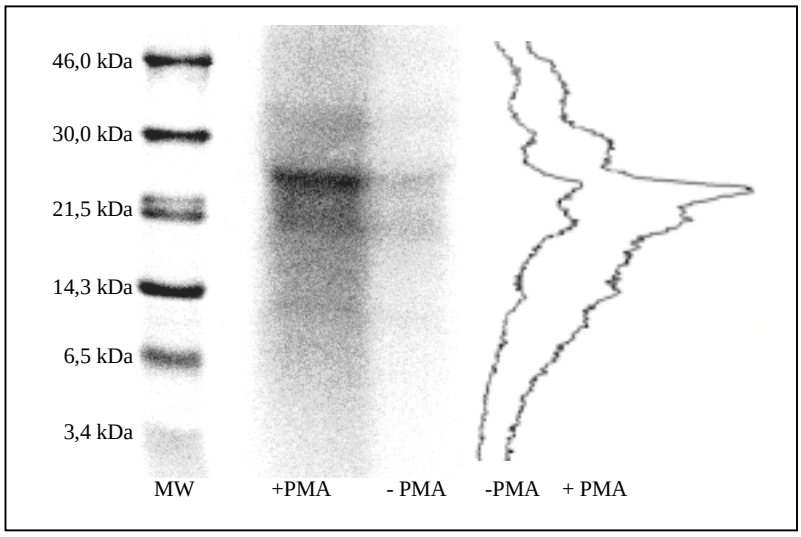

Abbildung 34: ^{32}P-Neurofibromin-Fragmente nach Spaltung von Neurofibromin mit Bromcyan aus mit oder ohne PMA kultivierten Melanozyten.
Auftrennung ^{32}P-Neurofibromin-Fragmente in der SDS-PAGE (T=16,5%; C=3%) neben dem Molekular-gewichtsmarker (CFA 755; MW: 3,4 kDa - 46 kDa). Rechts ist die Auswertung mittels ImageQuant dargestellt.

Dabei zeigte sich bei beiden Proben die gleiche Anzahl an Banden. Die Banden befanden sich bei etwa 35, 27, 20, 17 kDa sowie bei etwa 12 kDa und sehr schwach bei etwa 8 kDa. Zwischen beiden Proben ist das Verhältnis der verschiedenen Banden ungefähr gleich, bis auf die 27 kDa Bande, die in der Probe der mit PMA stimulierten Zellen wesentlich stärker ist. Dies deutet auf eine stärkere Phosphorylierung an diesem Fragment hin (Abbildung 34, Seite 83). Es könnte sein, dass in diesem Fragment die für die Regulation des Neurofibrominabbaus wesentliche Serin-Phosphorylierungstelle liegt. Bei dieser Bande könnte es sich um das Fragment der AS 1574-1813 handeln, mit einem theoretischen Molekulargewicht von 27,4 kDa. In diesem 240 AS-Fragment befinden sich 12 Serine. Von diesen sind vier, TSK (AS 1598-1600), SNR (AS 1651-1653), SKR (AS 1703-1705) und SIK (AS 1754-1756) mögliche PKC Phosphorylierungsstellen. Die nach Kultivierung der Melanozyten unter PMA erhaltene stärker radioaktive Bande könnte daraus resultieren, dass dieses Fragment an einer der vier möglichen PKC Phosphorylierungsstellen durch den Einfluss von PMA zusätzlich oder verstärkt phosphoryliert wird.

Ob eine dieser Positionen, und wenn ja welche, durch den Einfluss von PMA verstärkt phosphoryliert wird, sollte mit einer weiteren Methode identifiziert werden. Dazu sollte dieses Fragment isoliert und mit verschiedenen Endoproteinasen wie Trypsin, Asp-N, Glu-C oder Lys-C erneut gespalten werden. Diese Enzyme können das Fragment in 25, 19, 14 bzw. 10 kleinere Fragmente spalten, die in unterschiedlicher Weise die Serin-Reste betreffen. Nach der jeweiligen Spaltung könnten die ^{32}P-markierten Spaltprodukte mittels 2D-Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden. Durch Vergleich des Auftretens der phosphorylierten Spaltprodukte in den mit oder ohne PMA behandelten Zellen könnten sich die Positionen der phosphorylierten Serine ermitteln lassen. Alternativ könnten diese Fragmente mittels MALDI-MS analysiert werden. Dabei kann die zusätzliche Phosphorylierung durch die Zunahme der Masse analysiert werden. Bei der Durchführung der Versuche zeigte sich jedoch, dass die zur Verfügung stehenden Ausgangsmengen an Neurofibromin zu gering waren. Schon die Charakterisierung dieses einen Fragments lag an der Nachweisgrenze und die Menge war auch für den Nachweis mittels MALDI-MS zu gering. Deshalb wurde zu einer anderen Methode übergegangen. Dabei sollten einzelne Teilsequenzen von Neurofibromin in Zellen kloniert und dort überexprimiert werden.

3.4 Untersuchung der Phosphorylierung von Neurofibromin an 14 einander überlappenden, das ganze Neurofibromin überdeckenden Teilproteinsequenzen.

Da mit den Methoden der vorausgegangenen Experimente die spezifische Phosphorylierung von Neurofibromin nicht charakterisiert werden konnte, sollten Teilfragmente des Neurofibromins für weitere Experimente in Zellen überexprimiert und anschließend auf ihre Phosphorylierbarkeit untersucht werden.

3.4.1 Klonierung zweier EGFP-NF1-Teilproteinsequenzen mit und ohne Exon 10a2 in Brown Melanoma- und HeLa-Zellen

Begonnen wurde mit einem N-terminalen Fragment, das Exon 9 bis 10b umfasst und ein von unserer Arbeitsgruppe neu entdecktes NF1-Spleissprodukt, welches zwischen Exon 10a und 10b liegt, beinhaltet (Abbildung 35, Seite 86). Dieses zusätzliche Exon, genannt Exon 10a2 (+10a2), wurde in allen menschlichen Zellen mit einem niedrigen Level von 2-4% der gesamten NF1-mRNA Menge gefunden (Kaufmann et al. 2002). Die Sequenzanalyse für dieses Motiv zeigte, dass dieses Spleissprodukt für eine Aminosäuresequenz kodiert, die eine Transmembran-Domäne (Score 521) darstellt. Ein solches Motiv findet sich in der Wildtyp *NF1*-Sequenz nicht (Hofman et al. 1993, Schultz et al. 1998). In der Region aufwärts des Exon 10a2 sind drei mögliche PKC und zwei Casein Kinase II Phosphorylierungsstellen zu finden (Abbildung 35, Seite 86). Das Vorhandensein dieses Motivs lässt auf eine Lokalisation dieser Neurofibromin Isoform in einer Zellmembran schließen. Die Phosphorylierung dieses NF1-Fragments wurde vergleichend mit einem Wildtyp-Fragment dieses Bereiches untersucht. Hierzu wurden Plasmide mit dieser Exon 10a2 Sequenz hergestellt und in Zellen transfiziert, die dann ein Fusionsprotein mit dieser Exon 10a2 Sequenz exprimieren. Dazu wurden zwei NF1-cDNA Teilsequenzen, welche die Sequenzen von *NF1(+10a2)* und *NF1(-10a2)* enthalten, in das Plasmid pEGFP-N1 ligiert und mittels Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft. Die Plasmide mit der richtigen Sequenz, pEGFP-*NF1(+10a2)* und pEGFP-*NF1(-10a2)* sowie als Kontrolle pEGFP-N1, wurden in BM- und HeLa-Zellen transfiziert und selektiert. Die erhaltenen Klone wurden in neue Kulturgefäße überführt und die Zellen bei Kultivierung unter Geneticin vermehrt.

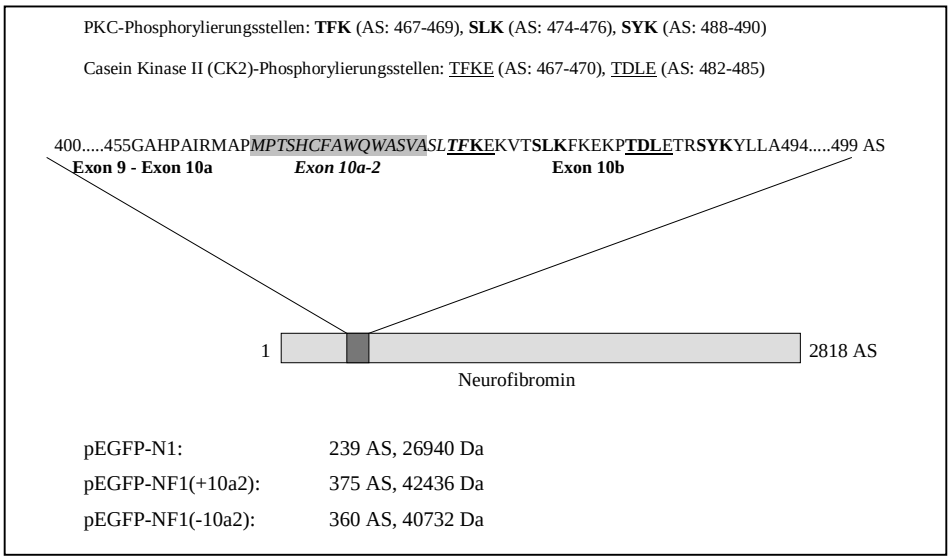

Abbildung 35: EGFP-NF1 Fusionsproteine mit oder ohne Exon 10a2.
Fusionsproteine entsprechend der Position im Neurofibromin (dunkelgrau und Auschnitt), mit Aminosäureteilsequenz und Angabe der Größe. Die dargestellte AS-Sequenz zeigt Exon 10a2 (+10a2) (15 AS) (grau unterlegte Schrift), die Transmembrandomäne (kursiv), die möglichen PKC Phosphorylierungsstellen (fette Schrift) und zwei möglichen Casein Kinase II Phosphorylierungsstellen (unterstrichen).

Expression der Fusionsproteine EGFP-NF1(+10a) und EGFP-NF1(-10a2) in Brown Melanom (BM)- und Hela-Zellen

Für den Nachweis der Fusionsproteine wurden je 600000 von den mit den Plasmiden pEGFP-*NF1(+10a2)* (Klone 2 u. 2-1) sowie pEGFP-*NF1(-10a2)* (Klone 8 u. 8-1) stabil transfizierten BM-Zellen ausgesät und einen Tag kultiviert. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte BM-Zellen und als Positivkontrolle die mit pEGFP-N1 transfizierte BM-Zellen. Alle mit diesen Plasmiden transfizierten Zellen zeigten im Fluoreszenzmikroskop die grün leuchtenden EGFP-Signale. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte durch IP mit dem Antikörper GFP 290 gefolgt von SDS-PAGE, WB und Immunonachweis mit dem Antikörper Anti-EGFP (JL-8). Dabei konnten, wie in Abbildung 36 (Seite 87) zu sehen ist, die Fusionsproteine nachgewiesen werden. Die zusätzliche Expression von EGFP allein kommt vermutlich dadurch zustande, dass die RNA-Polymerase die Kozak-Sequenz der N-terminal befindlichen NF1-Sequenz überspringt und die Transkription bei der Sequenz für das EGFP beginnt, welches eine eigene Kozak-Sequenz besitzt.

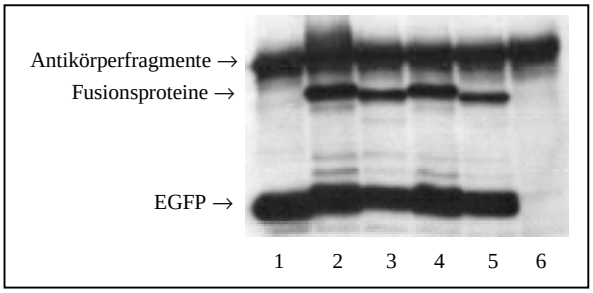

Abbildung 36: Fusionsproteine aus Brown Melanoma (BM)-Zellen.
EGFP (1), EGFP-NF1(+10a-2) (Klon 2-1) (2), EGFP-NF1(-10a-2) (Klon 8-1) (3), EGFP-NF1(+10a-2) (Klon 2) (4), EGFP-NF1(-10a-2) (Klon 8) (5) und Kontrolle (nicht transfizierte BM-Zellen) (6).

Die in Brown Melanoma-Zellen exprimierten Fusionsproteine EGFP-NF1(+10a) und EGFP-NF1(-10a2) werden nicht phosphoryliert

Da sich durch den Einfluss von PMA die Menge an Neurofibromin in BM-Zellen erhöht, und die Fusionsproteine potentielle Phosphorylierungsstellen besitzen, sollte untersucht werden, ob die Inkubation mit PMA einen Einfluss auf die Menge und Phosphorylierung der Fusionsproteine hat.

PMA hat keinen Einfluss auf die Menge der Fusionsproteine

Um den Einfluss von PMA auf die Menge der Fusionsproteine zu untersuchen, wurden transfizierte BM-Zellen (BM-EGFP, BM-EGFP-NF1(+10a2) (Klon 2), BM-EGFP-NF1(-10a2) (Klon 8)) mit oder ohne PMA kultiviert. Hierbei war keine Erhöhung der Menge an Fusionproteinen nach der Kultivierung mit PMA zu sehen (Abbildung 37).

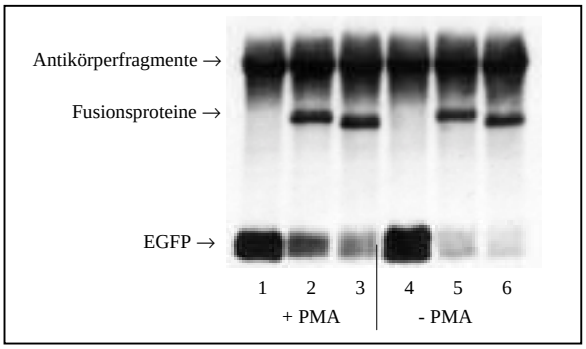

Abbildung 37: NF1-Fusionsproteine aus Brown Melanoma-Zellen die mit oder ohne PMA kultiviert wurden. Je 600000 Zellen wurden mit PMA (EGFP (1), EGFP-NF1(+10a-2) (Klon 2) (2), EGFP-NF1(-10a-2) (Klon 8) (3)) oder ohne PMA (EGFP (4), EGFP-NF1(+10a-2) (Klon 2) (5), EGFP-NF1(-10a-2) (Klon 8) (6)) kultiviert. Der Nachweis erfolgte jeweils aus Lysat mit der gleichen Menge an Gesamtprotein.

Eine Phosphorylierung der Fusionsproteine war nicht nachweisbar

Nun sollte untersucht werden, ob diese Fusionsproteine in Medium ohne PMA phosphoryliert werden, oder ob diese durch PMA induziert oder verstärkt wird. Dazu wurden die transfizierten BM-Zellen (BM-EGFP, BM-EGFP-NF1(+10a2) (Klon 2), BM-EGFP-NF1(-10a2) (Klon 8)) unter ^{32}P-Orthophosphat mit oder ohne PMA kultiviert.

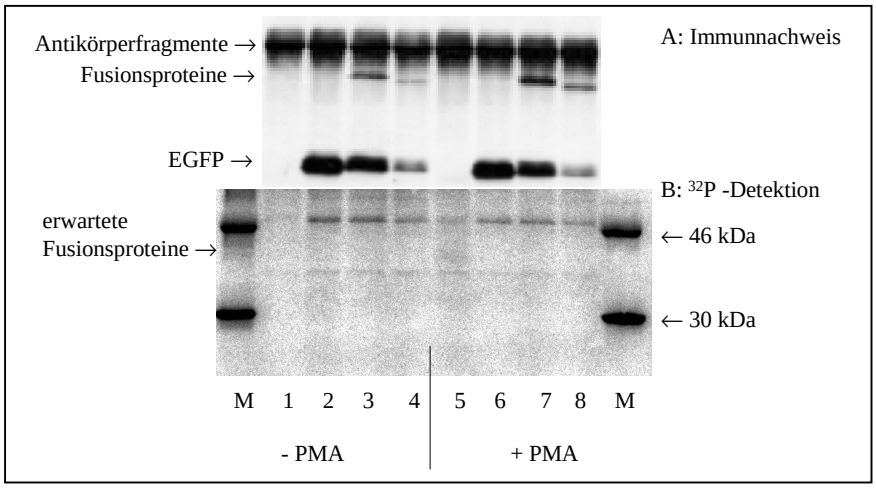

Abbildung 38: Die NF1-Fusionsproteine in den Brown Melanoma (BM)-Zellen waren nicht phosphoryliert. Je 300000 Zellen wurden ohne PMA (Spur 1–4) oder mit PMA (Spur 5–8) kultiviert. BM (1, 5), BM-EGFP (2, 6), BM-EGFP-NF1(+10a2) (3, 7), BM-EGFP-NF1(-10a2) (4, 8). (M= radioaktiver Marker, CFA 755).
A: Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte jeweils aus dem radioaktiven Gesamtlysat mit IP und WB.
B: Zum Nachweis der ^{32}P markierten Fusionsproteine wurde die Membran im PhosphoScreen inkubiert. Die Detektion erfolgte im PhosphoImager.

Im Immunonachweis konnten die Fusionsproteine EGFP-NF1(+10a2) bei 42,4 kDa und EGFP-NF1(-10a2) bei 40,7 kDa, nachgewiesen werden (Abbildung 38A). Nach der Detektion im PhosphoImager und Auswertung mittels ImageQuant waren in gleicher Position jedoch keine Banden zu sehen (Abbildung 38B). Dies zeigt, dass die Fusionsproteine unter diesen Bedingungen nicht phosphoryliert werden.

Intrazelluläre Lokalisation des EGFP-NF1(+10a2) Fusionproteins in Hela-Zellen

Durch die zusätzliche Aminosäure Sequenz von Exon 10a2 entsteht in dieser Isoform von Neurofibromin ein Transmembranmotiv. Dies war der Anlaß, nach Unterschieden in der Lokalisation der Fragmente mit oder ohne dieses Exon in Hela-Zellen zu suchen.

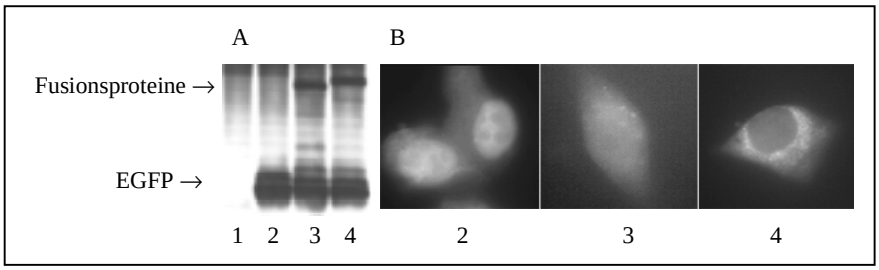

Abbildung 39: Das EGFP-NF1(+10a2) Fusionsprotein ist vorwiegend in perinukleären granulären Strukturen lokalisiert.
A. Nachweis der Fusionsprotein in Lysaten von stabil transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen ohne EGFP (Spur 1), mit EGFP (26.9 kDa) (Spur 2), mit EGFP-NF1(-10a2) (40,7 kDa) (Spur 3) und mit EGFP-NF1(+10a2) (42.4 kDa) (Spur 4). B. HeLa-Zellen, die EGFP (2) bzw. die Fusionsproteine EGFP-NF1(-10a2) (3) oder EGFP-NF1(+10a2) (4) exprimieren.

Dass in den zur Untersuchung der Lokalisation verwendeten Hela-Zellklonen EGFP sowie die Fusionsproteine EFGP-NF1(-10a2) oder EFGP-NF1(+10a2) exprimiert werden, ist in Abbildung 39A gezeigt. Die Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass in Hela-Zellen, die EGFP exprimieren, die Signale im Kern lokalisiert sind (Abbildung 39B (2)). Bei Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-NF1(-10a-2) (Wildtyp-Sequenz) exprimieren, sind zytoplasmatische Signale zu sehen (Abbildung 39B(3)), während Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-NF1(+10a-2) exprimieren, perinukleäre Signale aufweisen (Abbildung 39B(4)). Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der beiden Fusionsproteine ist anzunehmen, dass das Exon 10a2 im Fusionsprotein die Lokalisation an intrazelluläre Membranstrukturen vermittelt.

3.4.2 Untersuchung der Phosphorylierung von Neurofibromin an weiteren 12 einander überlappenden, das ganze Neurofibromin überdeckenden Teilprotein-sequenzen

Um die mit der Halbwertszeit verbundene Phosphorylierung von Neurofibromin zu charakterisieren, sollte die komplette für Neurofibromin kodierende Sequenz in Form von 12 einander überlappende Sequenzen in Plasmide kloniert werden. Diese Plasmide sollten in Zellen transfiziert werden, welche dann die Fusionsproteine für den Nachweis der Phosphorylierung exprimieren. Hierzu wurde das induzierbare TREx-System verwendet. Da sich primäre humane Neuralleistenzellen schwierig klonieren lassen, wurden, obwohl die Untersuchung zur Regulation von Neurofibromin bisher vorwiegend in humanen Melanozyten erfolgte, für die folgenden Experimente die humane Brown Melanoma-Zelllinie verwendet. Bei dieser Zelllinie war zuvor gezeigt worden, dass die

Neurofibrominmenge über die Hemmung der lysosomalen Degradation mittels Chloroquin erhöht werden kann.

Klonierung von 12 einander überlappende Neurofibrominfragmente in Brown Melanom-Zellen mit *TR*-Gen

Zuerst wurden Klone der Brown Melanoma (BM)-Zelllinie hergestellt, die das *TR*-Gen stabil exprimieren. Dazu wurde das Plasmid pcDNA6/TR linearisiert, in die Zellen transfiziert und diese selektioniert. Zur Kontrolle der stabilen Transfektion erfolgte der Nachweis der gebildeten der TR-mRNA mittels RT-PCR. Das erwartete PCR-Produkt konnte bei einer Größe von 335 bp nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass die Zellen stabil mit pcDNA6/TR transfiziert wurden. Die Zellen erhielten die Bezeichnungen BM-TR. Parallel dazu wurden die Plasmide mit den gewünschten NF1-Teilsequenzen hergestellt. Für die Herstellung der zu ligierenden NF1-cDNA Sequenzen wurde mRNA aus Zellen von MK4 verwendet. Die erfolgreiche Ligation und richtige Orientierung des Inserts im Plasmid wurde mittels PCR überprüft. Die Plasmide, die ein PCR-Produkt richtiger Größe und Orientierung lieferten und die richtig inserierte Nukleinsäure-Sequenz aufwiesen wurden linearisiert und in BM-TR-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurden BM-TR-Zellen mit dem linearisierten pcDNA/TO/*myc*-HisC/*lacZ* transfiziert. Die mit diesen Plasmiden transfizierten Zellen wurden mit vorher ausgetesteten Konzentrationen an Zeocin selektioniert um stabil transfizierte Zellklone zu erhalten. Die Bezeichnung der Zellen besteht aus dem Zelltyp BM-TR und dem Fragmentkürzel (RM1–11) gefolgt von der Nummer des Klons (zB. BM-TR(RM2)1). In Abbildung 40 ist die Position der NF1-Teilsequenzen der Fusionsproteine zum Neurofibromin dargestellt. Die Größe der Fusionproteine und der NF1-Teilsequenzen sowie die AS-Position der NF1-Teilsequenzen im Neurofibromin ist auf Seite 91 in Tabelle 6 dargestellt.

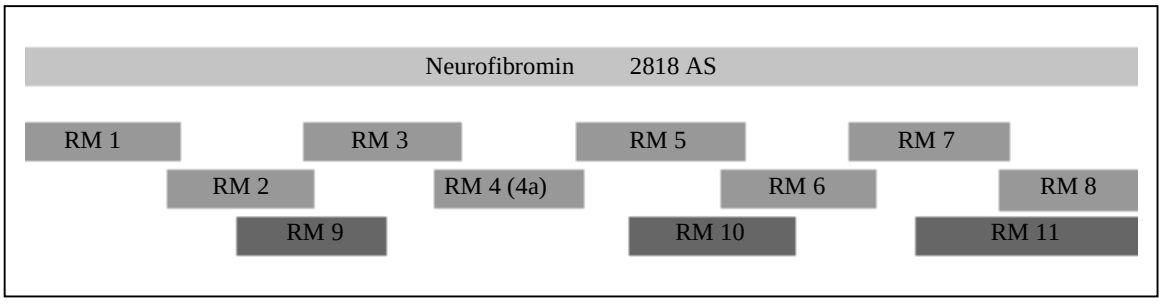

Abbildung 40: Darstellung der Neurofibromin-Fragmente zum Neurofibromin.
RM9 entspricht der Cystein, Serin reichen Domäne (CSRD), RM10 der Leucin reichen Domäne (LRD) und RM11 der C-terminalen Domäne (CTD) des Neurofibromins.

Tabelle 6: Position der einzelnen NF1-Fragmente mit der Anzahl der Aminosäuren und deren Molekulargewicht

Fragment	AS-Position der NF1-Teilsequenzen im Neurofibromin	Anzahl der AS entsprechend der NF1-Teilsequenz	Anzahl der AS der Fusionsproteine	Molekuargewicht der Fusionsproteine in Dalton
β-Gal	---	---	1048	119359
RM1	0001 – 0393	393	427	48364
RM2	0360 – 0727	368	404	45411
RM3	0706 – 1100	395	428	47731
RM4	1045 – 1414	370	405	45551
RM4a	1045 – 1414	391	426	47891
RM5	1400 – 1822	423	458	52369
RM6	1771 – 2152	382	417	46222
RM7	2091 – 2488	398	432	48825
RM8	2470 – 2818	349	385	42816
RM9	0543 – 0909	367	403	44859
RM10	1530 – 1951	422	457	51924
RM11	2261 – 2818	558	593	66479

β-Gal ist das exprimierte Fusionsprotein (β-Galaktosidase) des Plasmids pcDNA/TO/*myc*-HicC/*lacZ*. RM1 bis 11 sind die selbst hergestellten Fusionsproteine. AS (Aminosäuren der Fusionsproteine).

Etablierung des Nachweis der Fusionsproteine

Der Nachweis der Fusionsproteine sollte über eine Kombination von Immunopräzipitation (IP) mit anschließendem Westernblot erfolgen. Dieses Verfahren sollte mittels des β-Galaktosidase-Fusionsproteins etabliert werden. Hierzu wurde erst die stabile Expression des von den BM-TR(lacZ)-Zellen gebildeten β-Galaktosidase-Fusionsproteins mittels der X-Gal-Färbung nachgewiesen. Die BM-TR(lacZ)-Zellen wurden einen Tag in Standardmedium kultiviert und bekamen dann für 24 h zusätzlich 1 µg Tetracyclin pro ml Medium. Anschließend erfolgte die X-Gal-Färbung. Die mikroskopische Auswertung ergab etwa 20% blau gefärbte Zellen, d.h., es wurde eine Transfektionrate von 20% erreicht. Mit diesen Zellen wurde der Nachweis der Fusionsproteine etabliert. Dazu wurden verschiedene Antikörper gegen das myc- oder HisC-Epitop in der IP und im Westernblot getestet. In Lysat von BM-TR(lacZ)-Zellen wurde eine IP mit Antikörpern gegen das myc- oder HisC-Epitop durchgeführt. Der Immunonachweis erfolgte jeweils gegen das andere Epitop des Fusionsproteins, über das nicht immunopräzipitiert wurde. Der Vergleich ergab, dass für den Nachweis der Fusionsproteine die Kombination von IP mit Anti-Polyhistidin (Sigma) und Immunnachweis mit Anti-c-myc HRP (Invitrogen) am besten geeignet war (Abbildung 41, Seite 92).

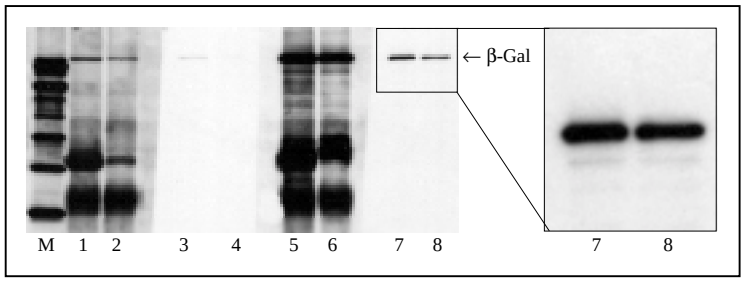

Abbildung 41: Westernblot vom β-Galaktosidase-Fusionsprotein (β-Gal).
Der Nachweis erfolgte aus Lysat der BM-TR(lacZ)-Zellen an dem exprimierten β-Galaktosidase-Fusionsprotein (β-Gal). Je Probe wurde Lysat mit 250 µg Gesamtprotein eingesetzt. Es wurden 4 verschiedene IP mit den Antikörpern Anti-c-myc (Sigma) (8 µl) (Spuren 1 und 3), Anti-c-myc (Invitrogen) (4 µg) (Spuren 2 und 4), Anti-Polyhistidin (Sigma) (8 µl) (Spuren 5 und 7) sowie Anti-HisC (Invitrogen) (4 µg) (Spuren 6 und 8) durchgeführt. Jede Probe wurde mit 60 µl Probenpuffer eluiert und in 2 Aliquots zu je 30 µl in die SDS-PAGE (T=10%) eingesetzt. Nach dem Westernblot erfolgte der Immunonachweis über Nacht mit den Antikörpern Anti-Polyhistidin (Sigma) (0,5 µl/ml) gefolgt vom sekundären Antikörper Anti-Maus-HRP (Spuren 1 und 2), mit Anti-HisC-HRP (Invitrogen) (0,25 µl/ml) (Spuren 3 und 4), mit Anti-c-myc (Sigma) (0,5 µl/ml) gefolgt vom sekundären Antikörper Anti-Maus-HRP (Spuren 5 und 6) und mit Anti-c-myc-HRP (Invitrogen) (0,25µl/ml) (Spuren 7 und 8). M = Marker von Biomol.

Nachweis der Expression der Fusionsproteine

Die stabile Transfektion der Zellen mit den hergestellten Plasmiden stellte sich schwieriger dar als erwartet. Nach der Tranfektion der BM-TR-Zellen wuchsen die meisten Klone erst sehr langsam oder gingen z.T. in die Apoptose über. Einzelne Klone konnten nach längerer Zeit umgesetzt und zu einer höheren Zellzahl hochkultiviert werden. Diese Klone wurden anschließend auf die Expresssion des Fusionsproteins hin getestet. Dabei wurden jeweils 600000 Zellen ausgesät und nach einem Tag für weiter 24 h mit 1 µg/ml Tetracyclin kultiviert. Als Negativkontrollen dienten nicht transfizierte BM-TR-Zellen.

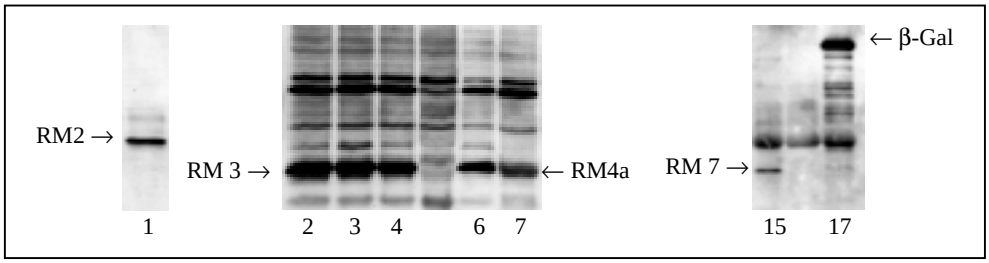

Abbildung 42: Nachweis der NF1-Fusionsproteine RM2, RM3, RM4a und RM7 im Westernblot.
Nachgewiesene Fusionsproteine aus den Zellklonen: BM-TR(RM2)1 (45,4 kDa) (1), BM-TR(RM3)1 (2), BM-TR(RM3)2 (3), BM-TR(RM3)3 (4), BM-TR(RM3)4 (6) (jeweils bei 47,7 kDa), BM-TR(RM4a)1 (47,9 kDa) (7), BM-TR(RM7)1 (48,8 kDa) (15) sowie BM-TR(lacZ)1 (β-Gal, 119,4 kDa) (17). In den nicht bezeichneten Spuren waren von den jeweiligen Klonen keine Fusionsproteine nachzuweisen. BM (Brown Melanoma), TR (Repressor), RM(2, 3, 4a, 7) (Fusionsproteine), (1, 2, 3 oder 4 = Nummern der Klone), β-Gal (β-Galaktosidase).

Die exprimierten Fusionsproteine stammten von den NF1cDNA Sequenzen RM2, RM3, RM4a und RM7 (Abbildung 42). Alle diese erfolgreich transfizierten BM-TR-Zellen verloren nach weiterer Kultivierung die Fähigkeit, diese Fusionsproteine weiterhin zumindest in nachweisbarer Menge zu exprimieren. Eine erneute Subklonierung und Testung ist noch nicht abgeschlossen. Deshalb war es bisher noch nicht möglich, weitere Untersuchungen an diesen Neurofibrominfragmenten zur posttranslationalen Phosphorylierung und Regulation der Neurofibrominmenge durchzuführen.

Eine Phosphorylierung an Fusionsproteinen war bisher nicht nachweisbar

Aufgrund dessen wurde zur Untersuchung der Phosphorylierung damit begonnen, Zellen von BM in größerer Menge transient zu transfizieren. Dazu wurden jeweils zwei Transfektionen für zwei Versuchsbedingungen in jeweils 600000 Zellen mit den nicht linearisierten Plasmiden pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F1*, pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F2* und pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F3* durchgeführt. Einen Tag nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 18 h Kultivierung ohne PMA wurden die Zellen 6 h, mit oder ohne PMA, in Markierungmedium mit ^{32}P-Orthophosphat kultiviert.

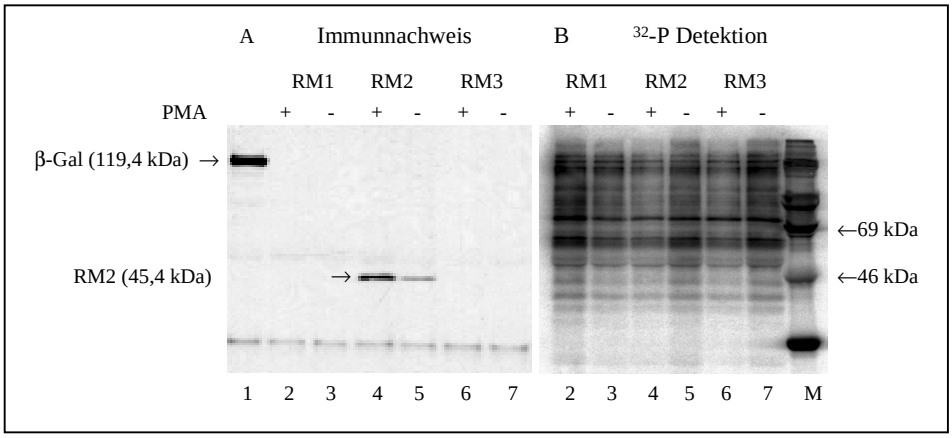

Abbildung 43: Eine Phosphorylierung der Fusionsproteine RM2 konnte nicht nachgewiesen werden.
(A) RM2 der mit pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F2* transfizierten Zellen, kultiviert mit (+) (Spur 4) oder ohne PMA (-) (Spur 5). Nicht nachweisbar waren RM1 aus den mit pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F1* transfizierten Zellen, mit (Spur 2) oder ohne PMA (Spur 3) kultiviert, und RM3 aus den mit pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F3* transfizierten Zellen, mit (Spur 6) oder ohne PMA (Spur 7) kultiviert. Als Kontrolle diente das β-Galaktosidase-Fusionsprotein (β-Gal) aus Lysat von BM-TR(lacZ)-Zellen (Spur 1). Der Nachweis erfolgte jeweils aus dem radioaktiven Gesamtlysat mit IP (Anti-Polyhistidin, Sigma) und Westernblot (WB) (Immunonachweis mit Anti-c-myc-HRP, Invitrogen).
(B) Die ^{32}P markierten Proteine wurden durch Inkubation der Membran im PhosphoScreen und anschließender Detektion im PhosphoImager nachgewiesen. Bei gleichem Molekulargewicht waren keine phosphorylierten Fusionsproteine RM1, RM2 oder RM3 zu detektieren. M (radioaktiver Marker, CFA 755).

Bei den BM-Zellen, die mit pcDNA/TO/*myc*-HisC/*F2* transfiziert wurden, war sowohl nach Kultivierung mit als auch ohne PMA ein Fusionsprotein nach IP und WB nachzuweisen. Die Transfektion mit den beiden anderen Plasmiden war jedoch nicht erfolgreich (Abbildung 43A, Seite 93). Bei den Zellen, die das Fusionprotein RM2 exprimierten, war bei gleicher Zellzahl die Expression bei den mit PMA stimulierten Zellen um ungefähr Faktor 5 höher als bei den ohne PMA kultivierten Zellen. Auf entsprechender Höhe der Banden des Westernblots (Abbildung 43A, Seite 93) waren nach der Inkubation im PhosphoScreen jedoch keine ^{32}P-Banden zu finden (Abbildung 43B, Seite 93). Dies bedeutet, dass die radioaktiven Signale entweder unter der Nachweisgrenze lagen, oder dass am Fusionsprotein RM2 unter diesen Bedingungen keine Phosphorylierung erfolgt.

4 Diskussion

4.1 Die Neurofibrominmenge in Patienten

Bei NF1-Patienten, bei denen Mutationen im *NF1*-Gen gefunden wurden, führen die meisten Keimbahnmutationen zu einem Stop der Translation und somit theoretisch zu einem verkürzten Neurofibromin (Heim et al. 1994, Fahsold et al. 2000). Missense-mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch im Neurofibromin. Durch diese kann die Neurofibrominmenge in Zellen von NF1-Patienten im Vergleich zu Zellen gesunder Personen entweder ebenfalls auf etwa die Hälfte reduziert sein, was auf ein instabiles Neurofibromin hindeutet, oder die Menge ist nicht reduziert, was dann auf ein stabiles aber inaktives Neurofibromin hindeutet.

Die unterschiedlichen Verlaufsformen der Neurofibromatose können nicht allein durch die Reduktion der Neurofibrominmenge oder seiner p21 Ras-GAP Aktivität erklärt werden

Bei dem Patienten B362 führt der Aminosäureaustauch R1276P in der GRD des Neurofibromins zu keiner verringerten Neurofibrominmenge gegenüber gesunden Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass das vom defekten *NF1*-Allel gebildete Neurofibromin stabil ist. Da jedoch die p21 Ras-GAP Aktivität des defekten Neurofibromins vollständig ausfällt, gehen Klose et al. (1998) davon aus, dass der Verlust dieser Aktivität, also die Reduzierung der p21 Ras-GAP-Aktivität von Neurofibromin in den Zellen, für die Entstehung der Symptome bei diesem Patienten verantwortlich ist.
Bei dem Patienten NF301, der an der späten Form der Neurofibromatose („late onset“) leidet, führt die Missensemutation im *NF1*-Gens zum Aminosäureaustausch in der katalytischen Domäne von Neurofibromin von Glutamin an Position 1426 zu Glutaminsäure. Dieses Glutamin ist in den p21 Ras-GAP Proteinen, wie im humanen p120 GAP (AS 938), in IRA1 (AS 1740) und IRA2 (AS 1868) von Saccharomyces cerevisiae, in R-GAP von Bos taurus (AS 520), in GAP-IP4BP von Sus scrofa (AS 520), in GAP von Rattus norvegicus (AS 545), in GAP3 in Mus musculus (AS 520), in GAP von Caenorhabditis elegans (AS 337) und in GAP1 von Drosophila melanogaster (AS 694) konserviert. Die Messung der Neurofibrominmenge zeigte, dass die Mutation die Stabilität des Neurofibromins nicht beeinflusst. Resa Ahmadian (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund) konnte zeigen, dass diese Mutation auch die Sekundärstruktur des mutierten

Neurofibromins nicht beeinflusst. Das mutierte Neurofibromin enthält aber eine saure Seitenkette, die die Bindung an die „saure“ Effektor Region von p21 Ras-GAP behindert. Dabei kommt es möglicherweise zu einer elektrostatischen Abstoßung in dieser Region, die für die Reduktion der Bindungsaffinität und folgedessen zur Reduktion der p21 Ras-GAP Aktivität führt (Ahmadian R. persönliche Mitteilung). In dieser Region von Neurofibromin sind verschiedene andere Missensemutationen publiziert. Gutmann et al. (1993c) konnte zeigen, die Mutation K1423S im Neurofibromin seine Affinität zu p21 Ras-GAP und auch seine p21 Ras-GAP-Aktivität reduziert. Es ist möglich, dass die Reduktion der p21 Ras-GAP Aktivität von Neurofibromin wesentlich zur Entstehung des Krankheitsbildes NF1 beiträgt. Dass diese Überlegungen nicht ganz aufgehen, zeigt die Untersuchung der Patientin NF229, die wie der Patient NF301 von der späten Form der Neurofibromatose betroffen ist. Bei ihr war im Gegensatz zum Patienten NF301 die Neurofibrominmenge auf die Hälfte reduziert. Der Patient NF71 hat im Exon 28 des *NF1*-Gens eine 5 Basenpaar Deletion (5123delCCACC) (Stark et al. 1991 u. 1992), die zu einem theoretisch auf 1734 AS verkürzten Neurofibromin führt. Er zeigt widerum die typischen Symptome der NF1, während die Patientin NF138-3, bei der eine Mutation theoretisch ebenfalls zu einem verkürzten Neurofibromin führt, die Symptome für SNF (Spinale Neurofibromatose) zeigt. Die gleiche Mutation wie bei NF138-3 führt, bei einem zu diesem nicht verwandten Patienten, zu klassischen Symptomen der NF1 (Kaufmann et al. 2001). Eine weitere Patientin, NF134-3, die ebenfalls Symptome für SNF zeigt, besitzt dagegen eine Missensemutation, die zu dem Aminosäureaustausch L2067P führt. Meine Ergebnisse zeigen, dass die Neurofibrominmenge in den Zellen dieser Patientin (NF134-3) auf etwa die Hälfte der eines Gesunden reduziert ist, was bedeutet, dass diese Mutation zu einem instabilen Neurofibromin führt. Weder bei NF71, noch bei NF134-3 oder NF138-3 konnte ein verkürztes Neurofibromin nachgewiesen werden, da entweder die NF1-mRNA instabil ist (NF71) oder das Protein vermutlich schon während oder kurz nach der Translation degradiert wird (NF134-3, NF138-3). Dies zeigt, dass die Symptome der SNF nicht mit einer Restfunktion eines verkürzten Neurofibromins korrelieren.

Durch Mutationen auf einem Allel des *NF1*-Gens, die zur Reduktion der Neurofibrominmenge oder zur Reduktion der p21 Ras-GAP Aktivität führen, können sich also auch Phänotypen ausbilden, die sich vom klassischen NF1-Phänotyp unterscheiden. Die verschiedenen Phänotypen, die bei funktionell gleichen Mutationen ausgebildet werden, könnten durch unbekannte modifizierende Gene (Gene, von denen es allelische Varianten gibt, welche die Wirkung eines „Hauptgens“ qualitativ und/oder quantitativ

verändern) ausgelöst werden, die einige Effekte der Neurofibromindefizienz kompensieren könnten (Krone 1990, Easton et al. 1993).

Die Reduktion einer bestimmten Funktion von Neurofibromin könnte an der Ausbildung des LEOPARD-Syndrom beteiligt sein

Ob das LEOPARD-Syndrom, bei dem einzelne Symptome mit Symptomen der NF1 korrelieren, mit dem NF1-Lokus gekoppelt ist, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Ahlbom et al. (1995), zeigte, dass das LEOPARD-Syndrom nicht zum NF1-Lokus gekoppelt ist, während Wu et al. (1996) eine Mutation in einem Allel des *NF1*-Gens fand, die zu dem Aminosäureaustausch (M1035R) führt. Bei einem von uns untersuchten Patienten (Leo1), der klinisch ein Mosaik für das LEOPARD-Syndrom ist, wurde in Fibroblasten keine reduzierte Neurofibrominmenge gefunden. Die bei diesem Patienten kürzlich gefundene Mutation, die zu keinem Aminosäureaustausch führt, könnte einen Einfluss auf das Spleissen NF1-prä-mRNA haben. Bei einer dadurch veränderten Variante von Neurofibromin könnte die Stabilität oder deren Funktion beeinflusst sein. Ein durch eine Spleissmutation verändertes Neurofibromin ist in der SDS-PAGE wahrscheinlich nicht von den in den Zellen vorwiegend eprimierten Neurofibromin Isoformen Typ I mit etwa 317 kDa und Typ II mit etwa 319 kDa zu trennen. Um dies zu untersuchen, müssten die verschiedenen Spleissvarianten von Neurofibromin aus den verschiedenen Zellen eines betroffenen und nicht betroffenen Areals mittels einer 2D-Elektrophorese aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Dissertation wollte ich eine Methode zur Auftrennung von immunopräzipitierten Neurofibromin Isoformen, sowie deren posttranslational modifizierten Formen, mittels 2D-Elektrophorese etablieren. Dabei sollte Neurofibromin in einem immobilisierten pH Gradienten isoelektrisch fokusiert (IPG-IEF) werden und anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die Auftrennung von Neurofibromin in der isoelektrischen Fokusierung (IEF) scheiterte jedoch an der Größe des Neurofibromins, welches sich nicht in die Polyacrylamid-Matrix des IPG-Gels einquellen ließ. Weiterhin war es schwierig über die IP aus Zelllysat genügend natives, nicht denaturiertes Neurofibromin für diese Untersuchungen zu isolieren. Eine Alternative zur bisher getesteten Methode wäre, Zellen in größerem Massstab zu kultivieren und Neurofibromin über eine Affinitätssäule anzureichern. Die anschließende IEF könnte dann in einer Matrix aus Agarose mit Ampholyten durchgeführt werden. Der Nachteil ist jedoch, dass die IEF mit Ampholyten nicht so reproduzierbar ist, wie mit den Immobilinen.

Nachweis der Neurofibrominmenge zur Diagnostik der NF1

Da die meisten Mutationen im *NF1*-Gen zu einem Stopcodon und viele Missensemutationen zu einem instabilen Neurofibromin führen, weisen die meisten NF1-Patienten eine reduzierte Menge an Neurofibromin auf. Bei etwa 30% der Patienten, die Symptome der NF1 aufweisen, gelingt der Nachweis der Mutation im *NF1*-Gen auf DNA- oder mRNA-Ebene jedoch nicht. Hier könnte der Nachweis einer reduzierten Menge an Neurofibromin die diagnostischen Möglichkeiten erweitern. Ist in Zellen von zu untersuchenden Personen die Neurofibrominmenge im Vergleich zu Zellen einer Kontrolle auf etwa 50% reduziert, so ist dies ein eindeutiger Hinweis auf das Krankheitsbild NF1. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Messung der Neurofibrominmenge eine eindeutige Aussage darüber liefert, ob die Neurofibrominmenge gegenüber gesunden reduziert ist oder nicht. Nur bei einem geringeren Prozentsatz der Patienten ist, wenn vom mutierten Allel ein stabiles Neurofibromin gebildet wird, die Neurofibrominmenge so hoch wie bei Gesunden. Bestimmte Missense- und Spleissmutationen können somit nicht erfasst werden. Ein diagnostisches Problem stellt sich oft bei kleinen Kindern, da die Gewinnung der für die Untersuchung notwendigen Zellen über eine Hautstanze erfolgt und diese bei Kindern nicht immer durchführbar ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass die normale Variabilität der Neurofibrominmenge noch nicht bekannt ist. Deshalb wäre eine breit angelegte Untersuchung der Neurofibrominmengen zwischen verschiedenen Kontrollen notwendig. Vorab wurde das Verfahren in dieser Dissertation an Zellen von drei adulten Patienten erprobt. Bei diesen Patienten NF17, NF29a und NF302, wurde eine gegenüber gesunden Kontrollen auf etwa die Hälfte reduzierte Neurofibrominmenge nachgewiesen, was zeigte, dass die Symptome dieser Patienten mit einem Defekt eines Allels des *NF1*-Gen korrelieren. Bei den verwandten Patienten NF17 und NF29a wurde inzwischen auch die Mutation im Exon 6 des *NF1*-Gens charakterisiert. Es handelt sich um eine Punktmutation (G801A), die zu einem Stopcodon führt (Frei EMB. Diplomarbeit 2000).

4.2 Die Regulation der Neurofibrominmenge in Zellen

Der Proteingehalt einer Zelle wird durch das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteindegradation bestimmt. Die Menge an Neurofibromin kann in verschiedenen kultivierten Zelltypen durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Intensive Untersuchungen an kultivierten Melanozyten zeigten, dass ein durch Wachstumsfaktoren

induzierter Anstieg der Neurofibrominmenge über eine Erhöhung seiner Halbwertszeit (HWZ) erfolgt (Griesser et al. 1997, Kaufmann et al. 1999).

Ein anderes Beispiel dafür, dass die HWZ von Proteinen in Zellen beeinflusst werden kann, ist am Glukokortikoidrezeptor-Protein gezeigt. So beträgt seine HWZ in kultivierten Leberzellen und *in vivo* in der Rattenleber 25 h. In Anwesenheit des Glukokortikoids Dexamethason verringert sich die HWZ des Proteins auf 11 h. In beiden Fällen ist die HWZ der zugehörigen mRNA mit etwa 4,5 h unverändert (Dong et al. 1988). Eine rasche Veränderung der Aktivität von Neurofibromin könnte also über seine Degradation erfolgen.

Beispiele dafür, dass die Aktivität eines Proteins posttranslational reguliert werden kann, sind der Inhibitor von NF_kB (I_kB), dessen Menge über seine Degradation reguliert werden kann (Cuervo et al. 1998) oder das humane β-Cyclin, dessen Abbau während der Mitose dramatisch gesteigert wird (Pines u. Hunter 1989). Auch bei dem Tumorsuppressor p53 kann die Aktivierung oder die Inaktivierung durch einen posttranslationalen Mechanismus erfolgen. So vermittelt Mdm2, eine E3-Ligase, die Ubiquitinierung und folglich die Degradation von p53 (Haupt et al. 1997, Honda et al. 1997). Als Antwort auf DNA Schäden wird p53 an verschiedenen Positionen phosphoryliert und dadurch stabilisiert, indem die Bindung von Mdm2 an p53 verhindert wird (Shieh et al. 1997, Appella et al. 2000). Als Gegenspieler von Mdm2 kann auch die Herpesvirus assoziierte Ubiquitin spezifische Protease (HAUSP) fungieren, die p53 deubiquitiniert (Li et al. 2002).

Über welchen Stoffwechselweg die Menge an Neurofibromin in kultivierten Zellen reguliert wird war die wesentliche Fragestellung dieser Dissertation.

Der Einfluss depolymerisierter Mikrotubuli auf die Neurofibrominmenge

Bei der Regulation der Neurofibrominmenge besteht die Möglichkeit, dass durch eine Interaktion mit anderen Proteinen oder Zellstrukturen die Stabilität von Neurofibromin verändert wird. Da Neurofibromin mit Mikrotubuli assoziiert gefunden wurde (Gregory et al. 1993) und dies zu einer Hemmung seiner p21 Ras-GAP Aktivität führt (Bollag et al. 1993), könnte diese Interaktion auch einen Einfluss auf die Stabilität von Neurofibromin haben. Die Bindung von Proteinen an das Zytoskelett kann ihre unspezifische Aufnahme in Lysosomen und damit ihren Abbau verhindern (Rogers u. Rechsteiner 1988). Die Depolymerisierung der Mikrotubuli durch Colcemid in Melanozyten, die unter PMA kultiviert wurden, führt zu einer Verringerung der Neurofibrominmenge (Müller R.

Diplomarbeit 1997), welche durch die Abnahme seiner HWZ verursacht wird. Die Assoziation von Neurofibromin mit Mikrotubuli könnte zum Transport von Neurofibromin zum Ort seiner Funktion dienen. Wenn die Mikrotubuli depolymerisiert sind, besteht die Möglichkeit, dass dieser Transport nicht mehr erfolgen kann und Neurofibromin somit anderen Interaktionen und/oder dem Abbau zur Verfügung steht. Da Mutationen an den Positionen R1391S, P1400R, K1423S, K1423E oder K1423Q im Neurofibromin die Assoziation mit Mikrotubuli verhindern (Xu et al. 1997), könnten diese auch zu einem Teilverlust seiner Funktion führen. Gutmann et al. (1993c) konnte zeigen, dass durch die Mutation K1423S die Affinität von Neurofibromin zu p21 Ras-GTP und auch die p21 Ras-GAP Aktivität von Neurofibromin reduziert ist.

Der Einfluss der Aktivität der PKC auf die Neurofibrominmenge

Von den Substanzen CT/IBMX, bFGF und PMA, die die HWZ von Neurofibromin erhöhen, steigern CT/IBMX und bFGF die Aktivität der PKA, während PMA die Aktivität der PKC-α, -β, -γ, -δ und -ε steigert (Hecker 1978 u. Hecker et al. 1984), nicht aber die der PKC-ζ (Ono et al. 1989). In kultivierten Melanozyten besteht kein wesentlicher Unterschied in der Expression der PKC-α, -δ, -ε und -ζ zwischen verschiedenen Wachtumsphasen. Dagegen ist die Expression der PKC-βI und -βII, in konfluenten Melanozytenkulturen deutlich erhöht und die PKC-γ wurde in Melanozyten nicht gefunden (Krasagakis et al. 2002). Eine Aktivierung von PKCs erfolgt auch über die Erhöhung des Diacylglycerolspiegels durch die Aktivierung von p21 Ras.

In Melanozyten, die mit PMA kultiviert wurden, verringert sich die Menge an Neurofibromin nach Zugabe des PKC Inhibitor Staurosporin (Müller R. Diplomarbeit 1997). Staurosporin ist ein Inhibitor der PKC-α, -βI, -βII, -γ, -δ, und -ε hemmt bei den von uns getesteten Konzentrationen auch die PKC-ζ. Die Abnahme der Neurofibrominmenge nach der Inkubation mit Staurosporin erfolgte durch die Verringerung seiner HWZ.

Die Hemmung der PKC durch die Behandlung mit Staurosporin hemmt auch die durch PMA verstärkte Phosphorylierung des Rezeptors Interleukin-8 Typ B (Mueller et al. 1995). Dies deutet darauf hin, dass eine der Isoformen der PKC einen Einfluss auf die Erhöhung der Neurofibrominmenge haben könnte. Jedoch scheint dieser Prozess sehr komplex zu sein, da in differenzierten Melanozyten, die mit PMA stimuliert wurden, Staurosporin eher einen gegensätzlichen Effekt zeigte (Müller R. Diplomarbeit 1997). Staurosporin dürfte über die Hemmung verschiedener PKC's in sehr viele und komplexe Prozesse eingreifen.

So erhöht Staurosporin die Aktivität der Tyrosinase und die Menge des TRP (Tyrosinase-related protein) und verursacht morphologische Veränderungen durch Formierung von zahlreichen Dendriten (Maeda et al. 1992). Im Vergleich dazu beeinflusst PMA die Tyrosinase-Aktivität, den TRP Gehalt oder die Formierung von Dendriten nicht wesentlich. Der Effekt von Staurosporin auf die Tyrosinase-Aktivität und die Menge an TRP wird jedoch durch PMA komplett gehemmt, nicht aber die durch Staurosporin induzierten morphologischen Veränderungen (Maeda et al. 1992). Dies deutet darauf hin, dass neben der Neurofibrominmenge auch die Aktivität der Tyrosinase, die Menge an TRP und morphologische Veränderungen der Melanozyten teilweise durch eine PKC beeinflusst werden.

Mechanismus der Degradation von Neurofibromin

In Zellen existieren verschiedene Mechanismen für die Degradation von Proteinen. In dieser Dissertation sollte der Mechanismus der Degradation von Neurofibromin untersucht werden. T. Jacks postulierte (Jacks T. Vortrag, San Franscisco 1999), dass Neurofibromin im Wesentlichen über eine Ubiquitin vermittelte Degradation in Proteasomen abgebaut wird. Er zeigte dies an Fibroblasten aus der Maus, bei denen Neurofibromin nach der Kultivierung ohne Serum rasch abgebaut wird. Dieser Befund konnte hier für Mäusefibroblasten bestätigt werden, für andere Zellen der Maus jedoch nicht. Insbesondere war in humanen Fibroblasten oder Fibroblasten aus Neurofibromen zweier NF1-Patienten dieser Effekt nicht zu sehen. Diese Versuche zeigen jedoch, dass abhängig von der Spezies oder dem Zelltyp anscheinend verschiedene Abbauwege für Neurofibromin vorhanden sind. Der Grund, warum für die Untersuchungen zur Degradation von Neurofibromin vorwiegend humane Melanozyten verwendet wurden, ist, dass die HWZ von Neurofibromin bei diesen Zellen am besten untersucht ist und uns vorwiegend die Regulation der Neurofibrominmenge im Menschen interessiert. Gegen eine Ubiquitinierung und Degradation von nativem Neurofibromin in den humanen Melanozyten spricht, dass die Neurofibrominmenge nach Inkubation mit Proteasomen-Inhibitoren nicht erhöht war. Außerdem weist Neurofibromin in den humanen Melanozyten eine HWZ von mindestens 20 h auf, welche für Proteine, die ubiquitiniert und in Proteasomen abgebaut werden eher zu lang ist (Dice 1987). Auch wurde bisher noch kein Hinweis dafür gefunden, dass natives Neurofibromin ubiquitiniert wird.

Das Calpainsystem scheint, wie in der Einleitung beschrieben, bei der Degradation von Merlin eine wesentliche Bedeutung zu haben (Kimura et al. 1998 u. 2000, Kaneko et al.

2001). Kimura et al. (1998) postuliert, dass therapeutische Applikation von Kalzium Kanal Antagonisten wie Verapamil, Nifedipine, Diltiazem oder verschiedene Calpain Inhibitoren das Wachstum von Schwannomen oder Meningiomen mit abnormaler Proteolyse des Proteins Merlin verhindern und zur Rückbildung der Tumoren führen könnten. Auf die Menge an Neurofibromin in Melanozyten hatte der Kalzium Kanal Antagonist Verapamil jedoch keinen Einfluss, was bei einer Kalzium abhängigen Degradation durch Calpaine zu erwarten wäre (Müller R. Diplomarbeit 1997).

Bei Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation führte auch die Hemmung von Calpainen zu keiner wesentlichen Erhöhung der Neurofibrominmenge in Melanozyten. Deshalb ist anzunehmen, dass neben einem Ubiquitin vermittelten Abbau auch die Calpaine zumindest nicht wesentlich in die Degradation von Neurofibromin in kultivierten Melanozyten involviert sind. Eine selektive lysosomale Degradation von Proteinen mit einer langen HWZ, kann *in vitro* nach Kultivierung von Zellen ohne Serum erfolgen (Dice 1992, Cuervo et al. 1995, Cuervo u. Dice 1998). Zytosolisches Hsc73, welches zur Familie der Hsp70 Proteine gehört, interagiert dabei mit dem Substratprotein an einem KFERQ ähnliches Pentapeptidmotiv (Terlecky u. Dice 1993, Cuervo et al. 1994). Dieser Komplex interagiert mit dem lysosomalen Rezeptor Lamp2 und initiiert den Transmembrantransport in Lysosomen (Cuervo u. Dice 1996). Der Transport ist auch vom intralysosomales Pool an Hsc73 abhängig (Agarraberes et al. 1997). Neurofibromin gehört zu den zytoplasmatischen Proteinen mit einer langen HWZ und enthält in der GRD das Pentapeptidmotiv QKLLD, welches in die selektive Aufnahme von Neurofibromin in Lysosomen involviert sein dürfte.

Meine Daten zeigen, dass in den hier ausführlich untersuchten Melanozyten PMA die lysosomale Degradation von Neurofibromin hemmt, wodurch sich die HWZ von Neurofibromin erhöht. PMA hat dabei keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität der lysosmalen Enzyme, wie am Beispiel von Arylsulfatase A und B sowie Cathepsin D zu sehen ist. In Melanozyten, die ohne PMA kultiviert werden (dadurch also differenziert werden, oder schon differenziert sind), hemmt Chloroquin die Degradation von Neurofibromin. In Melanozyten, die mit PMA kultiviert wurden (sich also im Zustand der Proliferation befinden), führt die Behandlung mit Chloroquin zu keiner weiteren Erhöhung an Neurofibromin. Die Erhöhung der Neurofibrominmenge durch Chloroquin, in Melanozyten aus der Haut von Kontrollen, aus der Haut von NF1-Patienten und aus CALF von NF1-Patienten die ohne PMA kultiviert wurden, wird durch eine Erhöhung seiner HWZ verursacht. Die Ursache für die bei den verschiedenen Experimenten unter den

verschiedenen Konzentrationen an Chloroquin teilweise erheblich variierende Neurofibrominmenge kann dadurch zustande kommen, dass aufgrund vorausgehender unterschiedlicher Kulturbedingungen (Medium mit Unterschieden in der Aktivität von PMA) und bei den verwendeten Zellen (Zellen von verschiedenen Kontrollen und NF1-Patienten) die Menge an Melanin variiert. Chloroquin bindet an Melanin (Larsson u. Tjälve 1979) und bei den verwendeten Konzentrationen an Chloroquin wird keine Sättigung in den Zellen erreicht (Sjölin-Lorsberg et al. 1996). Somit könnte die in den Lysosomen erreichte Konzentration an Chloroquin in den Zellen variieren.

Die Ergebnisse zeigen dennoch deutlich, dass in Melanozyten die Degradation von Neurofibromin in Lysosomen erfolgen muss. Dieser Mechanismus scheint selektiv zu sein, da er vorwiegend in differenzierten Melanozyten nachzuweisen ist. Die lysosomale Degradation von Neurofibromin ist jedoch nicht auf humane Melanozyten beschränkt. So erhöht Chloroquin auch bei HeLa-Zellen und den Melanozyten einer *Nf1(+/-)*-Maus die Neurofibrominmenge. In diesen Zellen wird die Degradation von Neurofibromin durch die Kultivierung ohne Serum induziert. In humanen Melanozyten, die mit PMA kultiviert wurden, oder in Melanozyten der *Nf1(+/-)*-Maus, die mit 16% Serum kultiviert wurden, führt die zusätzliche Inkubation mit Chloroquin zu keiner wesentlichen Erhöhung der Neurofibrominmenge. Dies könnte bedeuten, dass in humanen Melanozyten durch PMA, oder in Melanozyten der *Nf1(+/-)*-Maus durch 16% Serum, der Transport oder die Aufnahme von Neurofibromin in die Lysosomen verhindert wird.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Dice (1992), der bei seinen Untersuchungen über den lysosomalen Abbau von Proteinen eine serumabhängige Degradation fand, die durch Hungerbedingungen induziert wird. Auch in HeLa-Zellen, die mit einer reduzierten Konzentration an Serum kultiviert wurden, erhöht Chloroquin die Neurofibrominmenge. Diese Erhöhung korreliert mit einer erhöhten HWZ von Neurofibromin (Junge I. Diplomarbeit 1998). Ebenso verursacht Chloroquin in Schwann-Zellen von Ratten, in Glioblastoma-Zellen sowie in Zellen aus peripheren Nerven einen Anstieg der Neurofibrominmenge (Junge I. Diplomarbeit 1998). Weitere Untersuchungen von mir zeigten, dass in Keratinozyten und Brown Melanoma-Zellen Chloroquin die lysosomale Degradation von Neurofibromin hemmt, ohne dass eine erhöhte Degradation von Neurofibromin durch die Entfernung von Serum aus dem Medium induziert wird. Ein Grund, warum in den Experimenten mit den Kerationzyten höhere Konzentrationen an Chloroquin verwendet werden mussten, um einen deutlichen Effekt auf die Neurofibrominmenge zu erreichen, kann der sein, dass zwischen verschiedenen Zelltypen,

wie z.B. Melanozyten und Keratinozyten neben der Melaninmenge auch die Aufnahme an Chloroquin in die Zellen variiert. Keratinozyten nehmen bei gleicher Konzentration an Chloroquin im Medium nur etwa ein Zehntel an Chloroquin auf wie Melanozyten (Sjölin-Lorsberg et al. 1996), besitzen dagegen jedoch weniger Melanin.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Degradation von Neurofibromin in Lysosomen, abhängig vom Zelltyp, oft erst durch die Entfernung von Serum und/oder PMA erfolgt und diese Degradation durch Chloroquin gehemmt wird. Dass bei höheren Konzentrationen an Chloroquin die Menge an Neurofibromin oft nicht weiter zunimmt, könnte auf toxische Effekte von Chloroquin bei höheren Konzentrationen in den Zellen zurückzuführen sein. Neurofibromin beeinflusst *in vivo* und *in vitro* die Regulation der Melanogenese (Martuza et al. 1985, Kaufmann et al. 1989 u. 1991). Die durch Chloroquin erhöhte Menge an Neurofibromin verringerte die Melanogenese in Melanozyten aus der Haut von Kontrollen, NF1-Patienten und auch in CALF von NF1-Patienten nicht. Dies ist ein Indiz dafür, dass Neurofibromin zur Degradation in Lysosomen eingeschleust wird, dort aufgrund des durch Chloroquin erhöhten pH-Werts nicht abgebaut werden kann und in diesem Kompartiment der Zellen auch keine katalytische Funktion hat.

In Melanozyten, die mit Chloroquin kultiviert wurden, ist Neurofibromin nach einer differentiellen Zentrifugation im 13000 g Sediment zu finden

In Melanozyten die sich im differenzierten Zustand befinden und Neurofibromin eine niedrige HWZ aufweist, ist Neurofibromin nach differentieller Zentrifugation vorwiegend in der mikrosomalen Fraktion des 100000 g Sediments zu finden. Auch DeClue et al. (1991) fand Neurofibromin in NIH3T3-Zellen vorwiegend in dieser Fraktion. Neurofibromin hat in Melanozyten, die unter diesen Bedingungen kultiviert werden, mit etwa 25 h eine HWZ, die im Bereich derer in NIH3T3 Fibroblasten liegt. Werden die Melanozyten mit Chloroquin kultiviert, so ist Neurofibromin neben der mikrosomalen Fraktion auch zu einem größeren Anteil in der mitochondrialen Fraktion (dem 13000 g Sediment) zu finden, in dem sich auch Lysosomen und Peroxisomen befinden müssten. Wir gehen davon aus, dass dies der nicht abgebaute Anteil an Neurofibromin in den Lysosomen ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nur in den ohne PMA aber mit 0,1 µM Chloroquin behandelten Melanozyten neben zytosolischen Neurofibrominsignalen wie zum Beispiel in der Nähe von Mitochondrien oder freien Ribosomen auch Signale an oder in elektronendichten Strukturen wie Endosomen oder

Lysosomen gefunden wurden (Junge I. Diplomarbeit 1998). Ein Anteil an Neurofibromin in anderen Organellen dieser Fraktion ist jedoch nicht auszuschließen, denn Neurofibromin wurde auch in Assoziation mit Mitochondrien gefunden (Roudebush et al. 1997). Diese Lokalisation von Neurofibromin könnte in Melanozyten, die mit PMA kultiviert werden, verstärkt vorkommen, da unter diesen Kulturbedingungen Neurofibromin relativ ubiquitär und auch in sehr großer Menge in der mitochondrialen Fraktion zu finden ist. In Lysosomen dürfte Neurofibromin unter diesen Kulturbedingungen nicht zu finden sein. Wenn Neurofibromin mit Mikrotubuli assoziiert, müsste es in der zytosolischen Fraktion zu finden sein. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass unter Bedingungen, bei denen Neurofibromin eine hohe HWZ aufweist, es auch eher mit Mikrotubuli assoziiert vorkommt. Dass Neurofibromin, wenn auch zum Teil nur geringfügig, unter allen Bedingungen in der zytosolischen Fraktion vorkommt, könnte auf die dort vorhandenen Ribosomen der Translationsmaschinerie zurückzuführen sein, von der das translatierte Neurofibromin nach der Synthese entlassen wird. Um die Lokalisation von Neurofibromin unter den verschiedenen Bedingungen genauer zu charakterisieren, müsste eine Dichtegradientenzentrifugation von den einzelnen Fraktionen durchgeführt werden.

Neurofibromin interagiert mit Hsp70

Wie schon beschrieben ist die Interaktion von Hsc73, welches zur Famile der Hsp70 Proteine gehört, für die selektive Aufnahme eines Proteins in die Lysosomen wichtig (Terlecky u. Dice 1993, Cuervo et al. 1994). Dabei erfolgt die Bindung von Hsc73 an ein KFERQ ähnliches Motiv im Substratprotein (Cuervo u. Dice 1996, Agarraberes et al. 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Neurofibromin mit einem Protein der Hsp70 Familie interagiert. Weitere Experimente müssten an verschiedenen Zelltypen durchgeführt werden und zusätzlich müsste die Interaktion mit Proteinen der Hsp70 Familie und spezifisch die mit Hsc73 unter verschiedenen Kulturbedingungen quantitativ erfasst werden. Eine Mutation im QKLLD Motiv von Neurofibromin könnte einen Hinweis auf die Bedeutung dieser Domäne im Zusammenhang mit dem Abbau von Neurofibromin liefern. Bisher ist eine Mutation in dieser Domäne noch nicht gefunden worden. Eine Mutation in dieser Domäne, die zum Austausch einer Aminoäure führt, könnte die Neurofibrominmenge in Zellen, über die Hemmung seiner Degradation, erhöhen. Ein Beispiel dafür ist die Aldolase B, die ebenfalls ein Motiv besitzt (IKLDQ), an welches Hsc73 bindet. Das Fehlen von Serum oder AS induziert die rasche Degradation

von Aldolase B in verschiedenen Zellen innerhalb von 30 min. Die Kultivierung der Zellen mit Chloroquin oder die Mutation von Q111 des Motivs IKLDQ hemmt die lysosomale Degradation der Aldolase B (Susan et al. 2001). Bei NF1-Patienten wäre eine Mutation im QKLLD-Motiv von Neurofibromin nicht zu erwarten, da eine erhöhte Menge an Neurofibromin nicht zum Krankheitsbild NF1 führen dürfte, höchstens zu einem anderen Krankheitsbild, mit nicht bekannten Phänotyp. Eventuell könnte bei einem NF1-Patienten eine somatische 2. Mutation in dieser Domäne zu einer Revertierung des Phänotyps kommen.

In der Arbeit von Hsueh et al. (2001) ist gezeigt, dass Syndecane in zwei Domänen (J und P) mit Neurofibromin interagieren. Die in der GRD liegende Domäne J befindet in unmittelbarer Umgebung des Pentapeptidmotivs QKLLD. Deshalb ist in Erwägung zu ziehen, dass die Interaktion mit Syndecan an dieser Domäne J einen Einfluss auf eine mögliche Interaktion mit einem Protein an dem QKLLD-Motiv haben könnte. So könnte die Interaktion mit einem Protein aus der Hsp70 Familie, oder einem anderen Protein, an dem QKLLD-Motiv beeinflusst werden.

4.3 Eine Phosphorylierung von Neurofibromin korreliert mit seiner Halbwertszeit

Die Hemmung der Dephosphorylierung von Neurofibromin erhöht seine Halbwertszeit

Aufgrund meiner bisherigen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Aufnahme von Neurofibromin in Lysosomen durch die Inkubation mit PMA deutlich reduziert wird. Dabei ist es möglich, dass durch PMA eine posttranslationale Modifikation an Neurofibromin induziert wird, die in diese Regulation involviert ist. Neurofibromin enthält mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen (Marchuk et al. 1991) und kann durch die PKA phosphoryliert werden (Izawa et al. 1996). Die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierungen von Neurofibromin ist noch nicht bekannt. Aufgrund der Größe von Neurofibromin und vieler weiterer in ihm befindlichen potentiellen Phosphorylierungsstellen (SwissProt-Datenbank) besteht die Möglichkeit, dass Neurofibromin unter verschiedenen Bedingungen auch noch an anderen Stellen phosphoryliert werden kann. Möglicherweise ist eine Phosphorylierung von Neurofibromin durch eine PKC in die Regulation seiner HWZ involviert. So könnte eine Phosphorylierung von

Neurofibromin die Interaktion mit einem Protein der Hsp70 Familie oder einem anderen Protein hemmen. Dass eine Phosphorylierung die Bindung von Proteinen der Hsp70 Familie verändern kann, ist am Retinoblastom Protein (pRb) gezeigt. So hemmt eine Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins die Assoziation von Hsc73 mit der N-terminal Region von pRb (Inoue et al. 1995).

Weiterhin könnte die Aufnahme von Neurofibromin in Lysosomen durch eine Phosphorylierung am Neurofibromin ähnlich reguliert sein, wie bei der Peptidylglycine-α-Amidating-Monooxygenase (PAM) (Steveson et al. 1999). Die PAM wird *in vitro* durch eine PKC an S937 phosphoryliert und ist perinukleär im endoplasmatischen Reticulum oder im trans Golgi Netzwerk zu finden. Ein an diesem Serin-Rest mutiertes PAM (S937A) wird verstärkt degradiert und ist an den Lysosomen zu finden. In Zellen, die mit PMA stimuliert wurden, steigt die Phosphorylierung an S937 von PAM an. Dieses phosphorylierte PAM akkumuliert in größeren vesikulären Strukturen. Die Autoren gehen davon aus, dass die Phosphorylierung von PAM an S937 wichtig ist, um den Transport der PAM von späten Endosomen zu Lysosomen zu verhindern.

Meine Untersuchungen an Melanozyten zeigten, dass die Phosphatase-Inhibitoren Na-Orthovanadat und Okadasäure die Abnahme der Neurofibrominmenge nach Entfernung von PMA aus dem Medium hemmen oder darüber hinaus sogar einen Anstieg bewirken. Auch in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert wurden, sich also im differenzierten Zustand befanden, führte die Inkubation mit beiden Phosphatase-Inhibitoren zu einem Anstieg der Neurofibrominmenge. Dies bedeutet, dass auch unter diesen Bedingungen Neurofibromin an einer Position phosphoryliert werden dürfte, die für die Stabilität wesentlich ist. Die dafür verantwortlichen Faktoren könnten CT und IBMX sein, welche ebenfalls die Phosphorylierung von Neurofibromin erhöhen. Dabei ist aber nicht auszuschliessen, dass die Inkubation mit Phosphataseinhibitoren über die Hemmung der Dephosphorylierung eines anderen Proteins ebenfalls einen Einfluss auf die Neurofibrominmenge hat. Da Na-Orthovanadat die Dephosphorylierung von Tyrosin-Resten hemmt, eine Phosphorylierung von Neurofibromin an Tyrosin-Resten jedoch nicht bekannt ist und auch in meinen Experimenten nicht gefunden wurde, dürfte der Effekt von Na-Orthovanadat nicht in der Hemmung der Dephosphorylierung von Tyrosin-Resten des Neurofibromins liegen. Wie aus den Experimenten hervorgeht, scheint Okadasäure eine Dephosphorylierung an Neurofibromin selbst zu hemmen und erhöht die HWZ von Neurofibromin in Melanozyten, die ohne PMA kultiviert werden. Meine Experimente zeigen, dass die unterschiedlichen Abbauraten des Neurofibromins nach Inkubation mit

oder ohne PMA mit seiner Phosphorylierung korrelieren, wobei die HWZ von phosphoryliertem Neurofibromin höher sein müsste als von dephosphoryliertem.

Die Halbwertszeit von Neurofibromin korreliert mit seiner Phosphorylierung

Die Kultivierung mit CT/IBMX führt zu einem Anstieg der Phosphorylierung von Neurofibromin in Melanozyten. Dieser Anstieg korreliert mit einer Erhöhung der Neurofibrominmenge und könnte über eine von CT und IBMX induzierte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegel bewirkt werden. Im Neurofibromin befinden sich sechs potentielle cAMP abhängige Phosporylierungsstellen, welche durch die PKA phosphoryliert werden (Izawa et al. 1996). Die Erhöhung der HWZ von Neurofibromin kann jedoch nicht durch eine PKA katalysierte Phosphorylierung von Neurofibromin, die durch die Inkubation mit CT/IBMX induziert werden dürfte, erklärt werden. Denn die durch CT/IBMX induzierte Phosphorylierung steigt in Melanozyten nach Kultivierung mit PMA, welches die HWZ von Neurofibromin stark erhöht, rasch um etwa Faktor 2,5 an. Die Erhöhung der Phosphorylierung von Neurofibromin korreliert jedoch nicht direkt mit einer Erhöhung der Gesamtmenge an Neurofibromin. Denn die Phosphorylierung ist ein rascher Prozess, und aufgrund der langen HWZ von Neurofibromin kann unter diesen Bedingungen die Neurofibrominmenge nicht so rasch ansteigen wie seine Phosphorylierung. Deshalb ist davon auszugehen, dass eine zusätzliche Phophorylierung an Neurofibromin dieses vor seiner Degradation schützt.

Die Halbwertszeit von Neurofibromin korreliert mit einer Phosphorylierung an Serin

Das Phosphoaminosäuremapping zeigte, dass Neurofibromin in Melanozyten sowohl bei Kultivierung mit als auch ohne bFGF oder PMA nur an Serin phosphoryliert ist, nicht aber an Threonin oder Tyrosin. Deshalb nehme ich an, dass eine Phosphorylieung an einem Serin-Rest von Neurofibromin in die Regulation seiner HWZ involviert ist.

Um die spezifische Phosphorylierung zu charakterisieren, wurde mit der Spaltung von Neurofibromin aus Melanozyten begonnen, die mit oder ohne PMA kultiviert wurden. Nach der Spaltung des immunopräzipitierten, ^{32}P-markierten Neurofibromins mittels Bromcyan war eines der gewonnenen Fragmente in Zellen, in denen das Neurofibromin eine lange Halbwertzeit aufweist, etwa doppelt so stark phosphoryliert wie in den Zellen, in denen Neurofibromin eine kürzere HWZ hat. Dieses Fragment dürfte den Bereich der Aminosäuren 1574-1813 des Neurofibromins umfassen, in dem sich 12 Serin-Reste und

vier potentielle PKC Phosphorylierungsstellen befinden. Die unterschiedliche Stärke der Phosphorylierung des Fragmentes könnte dadurch zustandekommen, dass durch die Stimulation mit PMA eine dieser Stellen zusätzlich oder zumindest verstärkt phosphoryliert wird. In diesem Fragment könnte die für die Regulation seines Abbaus wesentliche Serin-Phosphorylierungstelle liegen. Da die Detektion dieses Fragment jedoch schon knapp an der Nachweisgrenze lag, war es nicht möglich, dieses Fragment erneut zu isolieren und zu untersuchen.

Die hypothetische Degradation von Neurofibromin

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse gehe ich davon aus, das PMA eine PKC stimuliert, welche die Phosphorylierung an einem Serin-Rest im Neurofibromin katalysiert. Dadurch könnte die Bindung eines Proteins der Hsp70 Familie an das QKLLD Motiv verhindert werden und Neurofibromin vor dem Abbau geschützt werden. Die möglicherweise durch CT/IBMX induzierte cAMP abhängige PKA Phosphorylierung an Neurofibromin könnte indirekt die Degradation von Neurofibromin, über einen noch nicht bekannten Mechanismus, beeinflussen. Ein hypothetisches Modell der Degradation von Neurofibromin ist in Abbildung 44 dargestellt.

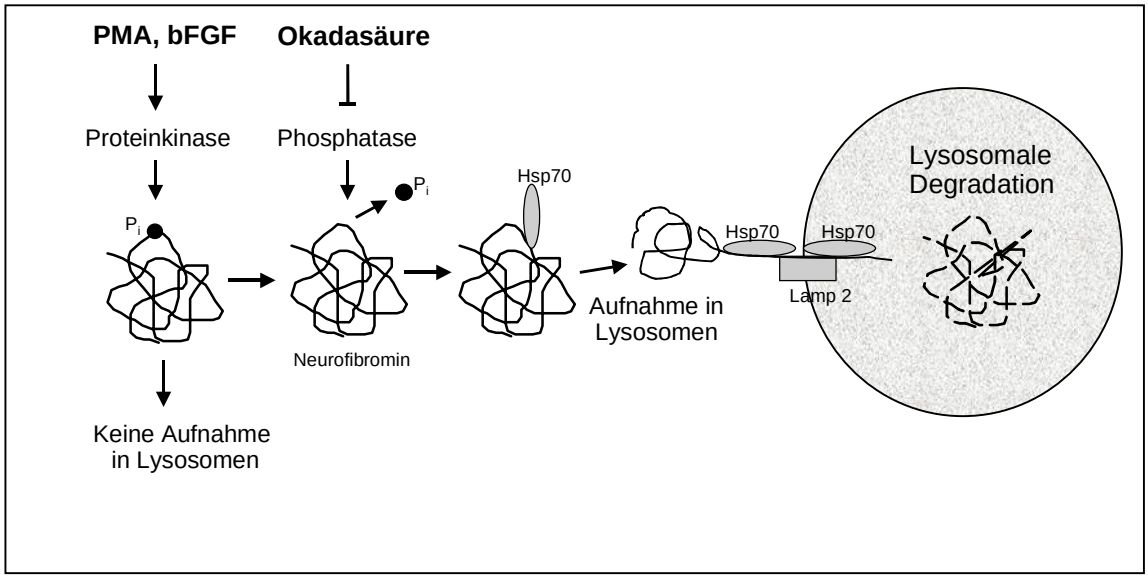

Abbildung 44: Hypothese zur Degradation von Neurofibromin.
Eine durch bFGF oder PMA induzierte spezifische Phosphorylierung (P_i) von Neurofibromin an einem Serin-Rest könnte die Degradation von Neurofibromin verhindern, während die Dephosphorylierung durch eine spezifische Phosphoprotein-Phosphatase an dieser Position ein Signal für die Degradation ist. Das an dieser Stelle dephosphorylierte Neurofibromin könnte mit einem Protein der Hsp70 Familie interagieren, wodurch beide an den lysosomalen Rezeptor Lamp2 binden. Dabei könnte Neurofibromin mit Hilfe eines in den Lysosomen befindlichen Proteins, ebenfalls eventuell Hsp70, in die Lysosomen geschleust und dort degradiert werden.

4.4 Untersuchungen an Fusionsproteinen von Neurofibromin

Erste Untersuchungen an Fusionsproteinen mit Teilsequenzen des Neurofibromins wurden im Rahmen der Fragestellung zur Lokalisation der Isoform von Neurofibromin mit dem neu entdeckten alternativ gespleissten Exon 10a2 durchgeführt. Hierzu wurden EGFP-Fusionsproteine mit zwei Teilsequenzen von Neurofibromin, mit oder ohne Exon 10a2, in Brown Melanoama- und HeLa-Zellen exprimiert. Für die weiteren Untersuchungen zur Phosphorylierung des Neurofibromins sollten 12, das ganze Neurofibromin abdeckende, einander überlappende Fusionsproteine, mittels des TREx-Systems, in Zellen exprimiert werden.

Untersuchungen zur Lokalisation zwei EGFP-Fusionsproteine mit oder ohne den von Exon 10a2 codierten Sequenzen des *NF1*-Gens

Soweit aus der Literatur ersichtlich, ist die intrazelluläre Lokalisation von Neurofibromin noch nicht sehr systematisch untersucht worden. Unsere Untersuchungen zur Lokalisation der beiden Fusionsproteine in HeLa-Zellen zeigten, dass das Fusionsprotein mit dem alternativ gespleissten Exon 10a2, durch welches eine potentielle Transmembrandomäne in dieser Isoform des Neurofibromins entsteht, in perinukleären Strukturen lokalisiert ist, wogegen das Fusionsprotein ohne die Sequenz von Exon 10a2 im Zysoplasma zu finden war. In Dendriten grosser Projektionsneuronen wurde Neurofibromin im Bereich des glatten ER, nachgewiesen (Nordlund et al. 1993), in kultivierten Fibroblasten im ER, nahe des Kerns (Golubic et al. 1992). Auch in NIH3T3-Zellen wurde Neurofibromin perinukleär nachgewiesen (Gregory et al. 1993). Diffus im Zytoplasma verteilt und auch im Bereich der Membran wurde Neurofibromin in B- und T-Lymphozyten der Maus gefunden (Boyer et al. 1994). Auch in Keratinozyten des Stratum spinosum in der Haut eines Rattenfetus wurde Neurofibromin an der Plasmamembran gefunden (Malhotra u. Ratner 1994). In keinem Fall wurde gezeigt, um welche Isoform von Neurofibromin es sich handelt. Neurofibromin könnte dabei durch die Interaktion mit anderen Proteinen, wie Ras oder Syndecanen funktionell an der Zellmembran lokalisiert sein. Dabei könnte die Isoform von Neurofibromin welche die Transmembrandomäne enthält, direkt in intrazellulären Membranen, wie z.B. der Membran des rauhen ER verankert sein.

Untersuchungen zur Phosphorylierung an Fusionsproteinen mit Teilsequenzen von Neurofibromin

Für die Untersuchungen zur Phosphorylierung des Neurofibromins wurden 12, die ganze *NF1*-cDNA abdeckende, einander überlappende NF1-cDNA-Sequenzen in das Plasmid pcDNA4/TO/*myc*-HisC des induzierbaren TREx-Systems kloniert. Diese sollten stabil in Brown Melanoma-Zellen transfiziert werden, die den durch Tetracyclin hemmbaren Repressor exprimieren. Die stabile Transfektion ist wichtig, da für die anstehenden Experimente Zellen benötigt werden, die die Fusionsproteine regulierbar exprimieren. Mit diesen soll eine Phosphorylierungskarte des gesamten Neurofibromins, nach Kultivierung von Zellen mit oder ohne PMA, bFGF, CT/IBMX oder Serum, erstellt werden. Dabei soll auch untersucht werden, ob diese Faktoren die Phosphorylierung und Menge von einem oder mehreren Fusionsproteinen beeinflusst. Für Kontrollexperimente wurde das Plasmid pcDNA4/TO/*myc*-HisC/*lac*Z stabil transfiziert, dessen Expression anhand der Blaufärbung der Zellen durch die β-Galaktosidase-Reaktion gezeigt werden konnte. Der Nachweis der NF1-Fusionsproteine wurde anhand des exprimierten β-Galaktosidase-Fusionsproteins etabliert, welches selektiv durch eine Kombination von Immunopräzipitation über das His-Epitop, gefolgt von einem Westernblot mit dem Immunonachweis gegen das myc-Epitop nachgewiesen werden konnte.

Da die stabile Transfektion der Zellen mit den Plasmiden einer aufwendigen selektiven Kultivierung unterliegt, wurden zwischenzeitlich Experimente durchgeführt, in denen Brown Melanoma-Zellen mit drei Plasmiden transient transfiziert wurden, die die Fusionsproteine RM1, RM2 und RM3 exprimieren sollten. Das Fusionsprotein RM2 wurde exprimiert und seine Menge war in den unter PMA kultivierten Zellen um etwa Faktor 5 höher als bei den ohne PMA kultivierten Zellen. Eine Phosphorylierung war jedoch nicht nachzuweisen. Im Fusionsprotein RM2 (AS: 360-727) befinden sich vier potentielle PKC Phosphorylierungs-stellen, TFK (AS: 467-469), SLK (AS: 474-476), SYK (AS: 488-490), SLR (AS: 657-659) und die PKA Phosphorylierungsstelle KKLT (AS: 583-586). Die ersten drei PKC Phosphorylierungsstellen sowie die PKA Phosphorylierungsstelle sind auch in den Fusionsproteinen EGFP-NF1(±10a2) vorhanden. In Brown Melanoma-Zellen konnte, auch durch die Stimulation mit PMA, keine Phosphorylierung der Fusionsproteine nachgewiesen werden. Diese Daten stehen im Widerspruch zu publizierten Daten. Izawa et al. (1996) konnte mittels eines Fusionsproteins (GST-CSRD) eine durch die PKA induzierte Phosphorylierung am Threonin des Motivs KKLT (AS: 583-586), im Neurofibromin, zuordnen. Das von Izawa et al. (1996) verwendete GST-CSRD

Fusionsprotein entspricht in etwa dem von mir hergestellten Plasmid für das Fusionsprotein RM9 (Abbildung 40, Seite 90 u. Tabelle 6, Seite 91). Derzeit haben wir jedoch noch keine stabil transfizierten Zellen, die das Fusionsprotein RM9 exprimieren. In einem Phosphoaminosäuremapping an Neurofibromin, isoliert aus den humanen Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y, konnte Izawa et al. (1996) eine Phosphorylierung an Serin und Threonin nachweisen. Die experimentellen Daten wurden jedoch nicht gezeigt. Bei den von uns untersuchten Bedingungen fanden wir jedoch mittels Phosphoaminosäuremapping keine Phosphorylierung an einem Threonin-Rest des Neurofibromins. Die mögliche Diskrepanz könnte von den unterschiedlichen Zellkulturbedingungen und der Art der verwendeten Zellen abhängen. Außerdem könnte sich die Phosphorylierung, die von Izawa et al. (1996) mittels eines *in vitro* Kinase Assay an einem aus Zellen isolierten Fusionsprotein und einem Kinase Assay im Gel am selben Fusionsprotein nachgewiesen wurde, von der im nativen Neurofibromin unterscheiden. Allerdings könnte sich auch die Phosphorylierbarkeit des Fusionsprotein GST-CSRD von Izawa et al. (1996) als auch von meinem (RM2) von der des nativen Neurofibromins unterscheiden. Da die Fusionsproteine kürzer sind als Neurofibromin und die zusätzliche Sequenz der Epitope GST oder myc-HisC besitzen, könnten sie eine andere sterische Konformation einnehmen als das native Neurofibromin, wodurch die potentiellen Phosphorylierungsstellen den Kinasen unterschiedlich zugänglich sein könnten.

Zwischenzeitlich konnte eine stabile Expression der Fusionsproteine RM1, RM2, RM3, RM4a und RM7 in den BM-Zellen nachgewiesen werden. Die weitere Selektion der Zellen mit dem Antibiotikum Zeocin führte jedoch dazu, dass sich Zellen anreicherten, die die Fähigkeit, die Fusionsproteine zu exprimieren, verloren hatten. Dies veranlasste uns dazu, in eine Einzelzell-Klonierung überzugehen, die noch nicht abgeschlossen ist. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die inserierten Sequenzen methyliert und dadurch inaktiviert werden (Schumacher et al. 2000). In diesem Fall müssten neue Sequenzen in das Plasmid pcDNA4/TO/*myc*-HisC einkloniert oder andere Plasmide verwendet werden, die einen anderen Promotor und/oder andere Epitope besitzen.

Werden unter den verschiedenen Bedingungen unterschiedlich stark phosphorylierte Fusionsproteine gefunden, sollen diese isoliert, und die Molmasse der durch proteolytischen Verdau erhaltenen Peptide mit MALDI-MS bestimmt und verglichen werden. Dadurch sollte(n) die durch Stimulierung mit PMA oder anderen Substanzen zusätzliche(n) Phosphorylierungsstelle(n) nachgewiesen werden können. Weitere Experimente müssten durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob diese Phosphorylierung

in die Regulation der HWZ von Neurofibromin involviert ist. Dies könnte dadurch erfolgen, dass größere Fusionsproteine hergestellt werden, die diese Phosphorylierungsstelle(n) und das Motiv QKLLD enhalten und die durch die Stimulation mit PMA oder anderen Faktoren eine erhöhte HWZ aufweisen. Verschiedene, selbst generierte Mutationen, könnten zur Aufklärung der Funktion des Motivs führen. So z.B. die Mutation der Serin-Phosphorylierungsstelle, einerseits nach Alanin, andererseits nach Aspartat (Steveson et al. 1999) und jeweils zusätzlich oder alternativ Glutamin im QKLLD Motiv nach Asparagin (Susan et al. 2001). Anschließend sollte die Suche nach Interaktionspartnern von Neurofibromin erfolgen, die in die Regulation der HWZ von Neurofibromin involviert sind.

Diese Untersuchungen könnten bei der Entwicklung einer Methode zur therapeutischen Hemmung der Degradation von Neurofibromin bei NF1-Patienten hilfreich sein. Eine erzielte Erhöhung der Neurofibrominmenge durch Hemmung seines Abbaus könnte dem Entstehen von einigen NF1-Symptomen entgegenwirken. Neurofibrome bestehen aus *NF1(-/-)* und *NF1(+/-)* Schwann-Zellen (Serra et al. 2000) und es wurde vermutet, dass die haploinsuffizienten Zellen in diesen Tumoren das Wachtumsverhalten der *NF1(-/-)* Schwann-Zellen negativ beeinflussen (Rosenbaum et al. 1995). Wie gut dies gelingt, könnte auch von der Höhe des Neurofibrominspiegels in den *NF1(+/-)*-Zellen abhängen. Die unterschiedliche Stärke dieser negativen Regulation könnte eine der Ursachen der intra-, aber auch interfamiliären Variabilität des Auftretens von dermalen Neurofibromen bei der NF1 sein. Somit wären Gene, die einen Einfluss auf die Regulation der Neurofibrominmenge haben können, NF1 modifizierende Gene (Krone 1990, Easton et al. 1993), also auch die Gene, deren Produkte in die Regulation des Abbaus von Neurofibromin involviert sind. Eine negative Beinflussung des Neurofibrominabbaus könnte sich so auf die Biologie der dermalen Neurofibrome auswirken. Möglicherweise lässt sich die bei Neurofibromindefizienz erhöhte p21 Ras Aktivität jedoch auch sehr viel einfacher beeinflussen. So reduziert ein Inhaltsstoff des schwarzen Tees, TFdiG, die phosphorylierte Menge an MEK durch Förderung der Degradation des Raf-1 Proteins in den Lysosomen (Chung et al. 2001).

5 Zusammenfassung

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) ist eine erbliche Tumorerkrankung mit benignen Tumoren, wie Neurofibromen, und einer erhöhten Inzidenz zu malignen Tumoren. Eine wesentliche Funktion von Neurofibromin ist seine p21 Ras-GAP Aktivität, die von der „GAP related domain“ (GRD) katalysiert wird. Die meisten NF1-Keimbahnmutationen sind Nullmutationen und führen zur Reduktion der Neurofibrominmenge.

In vitro kann die Neurofibrominmenge posttranslational über eine Veränderung seiner Halbwertszeit reguliert werden. Neurofibromin enthält in der GRD ein Motiv, QKLLD, welches an der Regulation der selektiven Aufnahme von Neurofibromin in Lysosomen beteiligt sein könnte. Meine Experimente an humanen Melanozyten zeigten, dass der wesentliche Abbau von Neurofibromin in Lysosomen erfolgt. Die Hemmung des lysosomalen Abbaus erhöht die Neurofibrominmenge *in vitro* und korreliert mit seiner längeren Halbwertszeit. Dies zeigt, dass die Halbwertszeit von Neurofibromin über seinen selektiven Abbaus in Lysosomen reguliert wird.

Dabei scheint die Phosphorylierung von Neurofibromin eine regulatorische Bedeutung zu haben, denn eine verstärkte Phosphorylierung korreliert mit seiner erhöhten Halbwertszeit. Untersuchungen zur Position der für den Abbau von Neurofibromin wesentlichen Phosphorylierung wurden durchgeführt. Neurofibromin ist nach Stimulation der Proteinkinasen C an Serin-Resten phosphoryliert. Meine Experimente deuten darauf hin, dass eine Phosphorylierung in einer C-terminal der GRD liegenden Region im Neurofibromin, AS 1574-1813, in die Regulation der Neurofibrominmenge involviert ist. Zur Charakterisierung der verschiedenen Phosphorylierungen an Neurofibromin wurden Teilsequenzen des Neurofibromins in Zellen exprimiert. Bisherige Experimente zeigen, dass ein Fusionsprotein mit einer Sequenz, der die AS-Region 360-727 des Neurofibromins abdeckt, auch nach Stimulation von Proteinkinasen C nicht phosphoryliert wird.

6 Literaturverzeichnis

Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF: An Intralysosomal hsp70 is required for selective pathway of lysosomal protein degradation. J Cell Biol 137: 825-834 (1997)

Ahlbom BE, Dahl N, Zetterqvist P, Annerén G: Noonan syndrome with café-au-lait spots and multiple lentigines syndrome are not linked to the neurofibromatosis type 1 locus. Clin Genet 48: 85-89 (1995)

Aniento F, Roche E, Cuervo AM, Knecht E: Uptake and Degradation of Glycerinaldehyde-3-phosphate Dehydrogenase by rat liver lysosomes. J Biol Chem 268: 10463-10470 (1993)

Appella E, Anderson CW: Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. Pathol Biol 48: 227–245 (2000).

Bäuerle C: Biochemische Untersuchungen über Neurofibromin und p120 GAP an Zellkulturen von NF1-Patienten. Diplomarbeit, Universität Ulm (1993)

Ballester R, Marchuk DA, Boguski M, Saulino AM, Letcher R, Wigler M, Collins FS: The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. Cell 63: 851-859 (1990)

Bar-Sagi D, Feramisco JR: Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. Cell 42: 841-848 (1985)

Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J: Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumor colls from type 1 neurofibromatosis patients. Nature 356: 713-715 (1992)

Bauer M, Lubs H, Lubs ML: Variable expressivity of von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) in identical twins. Neurofibromatosis 1: 323-329 (1988)

Böddrich A, Griesser J, Horn D, Kaufmann D, Krone W, Nürnberg P: Reduced Neurofibromin content but normal GAP activity in a patient with Neurofibromatosis Type 1 caused by five base pair dublication in Exon 12B of the NF1 Gene. Biochem Biophys Res Commun 214: 895-904 (1995)

Bollag G, McCormick F, Clark R: Characterization of full-length neurofibromin: Tubulin inhibits ras GAP activity. EMBO J 12: 1923-1927 (1993)

Borasio GD, John J, Wittinghofer A, Barde YA, Sendtner M, Heumann R: ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. Neuron 2: 1087-1096 (1989)

Boyer MJ, Gutmann DH, Collins FS, Bar-Sagi D: Crosslinking of the surface immunoglobulin receptor in B lymphocytes induces a redistribution of neurofibromin but not p120 GAP. Oncogene 9: 349-357 (1994)

Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, Copeland NG: Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway. Nature 347: 291-294 (1990)

Brannan CI, Perkins AS, Vogel KS, Ratner N, Nordlund ML, Reid SW, Buchberg AM, Jenkins NA, Parada LF, Copeland NG: Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene lead to developmental abnormalities in heart and various neural crest derived tissues. Genes Dev 8: 1019-1029 (1994)

Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, White R: Identification and characterization of transcript from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI 2 and mapping of other transcripts. Genomics 7: 555-565 (1990)

Cawthon RM, Andersen LB, Buchberg AM, Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, Collins FS, White R: cDNA sequence and genomic structure of EVI 2B a gene lying within an intron of the neurofibromatosis Type 1 gene. Genomics 9: 446-460 (1991)

Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF: A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. Science 246: 382–385 (1989)

Chung JY, Park JO, Phyu H, Dong Z, Yang CS: Mechanisms of inhibition of the Ras-MAP kinase signaling pathway in 30.7b Ras 12 cells by tea polyphenols(-)-epigallocathechin-3-galate and theaflavin-3,3'-digallate. FASEB J 11: 2022-2024 (2001)

Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T: Mouse models of tumor development in neurofibromatosis type 1. Science 286: 2172-2176 (1999)

Cichowski K, Jacks T: NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. Cell 104: 593-604 (2001)

Cohen AR, Woods DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM: Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithel cells. J Cell Biol 142: 129-138 (1998)

Colman SD, Williams CA, Wallace MR: Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. Nat Genet 11: 90-92 (1995)

Cook SL, McCormick F: Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. Science 262: 1069-1072 (1993)

Costa RM, Federov NB, Kogan JH, Murphy GG, Stern J, Ohno M, Kucherlapati R, Jacks T, Silva AJ: Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. Nature 415: 526-530 (2002)

Crowe FW, Schull WJ: Diagnostic importance of café au lait spot in neurofibromatosis. Arch Intern Med 91: 758-766 (1953)

Cuervo AM, Terlecky SR, Dice JF, Knecht E: Selective binding and uptake of Ribonuclease A and Glycerinaldehyd-3-phosphate Dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes. J Biol Chem 269: 26374-26380 (1994)

Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF: Activation of a selective pathway of lysosomale proteolysis in rat liver by prolonged starvation. Am J Physiol 269: C1200-C1208 (1995)

Cuervo AM, Dice JF: A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science 273: 501-503 (1996)

Cuervo AM, Dice JF: Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. J Mol Med 76: 6-12 (1998)

Cuervo AM, Hu W, Lim B, Dice JF: IκB is a substrat for a selective pathway of lysosomal proteolysis. Mol Biol Cell 9: 1995-2010 (1998)

Cummings LM, Trent JM, Marchuk DA: Identification and mapping of type 1 neurofibromatosis (NF1) homologous loci. Cytogenet Cell Genet 73: 334-340 (1996)

Danglot G, Regnier V, Fauvet D, Vassal G, Kujas M, Bernheim A: Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. Hum Mol Genet 4: 915-920 (1995)

DeClue JE, Cohen BD, Lowy DR: Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 gene product. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9914-9918 (1991)

DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Fletcher AG, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR: Abnormal regulation of mammalian p21 ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. Cell 69: 265-273 (1992)

Dice JF: Molecular determinants of protein half-lifes in eukaryotic cells. FASEB J 1: 349-357 (1987)

Dice JF: Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. Tibs 15: 305-309 (1990)

Dice JF: Selective degradation of cytosolic proteins by lysosomes. Ann NY Acad Sci 674: 58-64 (1992)

Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, Okret S: Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranscriptional mechanism. Mol Endocrinol 2: 1256-1264 (1988)

Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BAJ: An analysis of variation in expression of Neurofibromatosis type 1 (NF1): Evidence of modifiying genes. Am J Hum Genet 53: 305-313 (1993)

Eisenbarth I, Hoffmeyer S, Kaufmann D, Assum G, Krone W: Analysis of an alternatively spliced exon of the neurofibromatosis type 1 gene in cultured melanocytes from patients with neurofibromatosis 1. Arch Dermatol Res 287: 413-416 (1995)

Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C., Kücükceylan N, Abdel-Nour M, Gewies A, Peters H, Kaufmann D, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P: Minor lesion mutational spectrum of the entire NF1 gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain. Am J Hum Genet 66: 790-818 (2000)

Ferner RE, Hughes RA, Weinman J: Intellectual impairment in neurofibromatosis 1. J Neurol Sci 138: 125-133 (1996).

Frei EMB: Somatische Mutationsanalyse des NF1-Gens in Neurofibromen von Patienten mit Neurofibromatose Typ 1. Diplomarbeit, Universität Ulm (2000).

Frenk E, Marazzi A: Neurofibromatosis of von Recklinghausen: a quantitative study of the epidermal keratinocyte and melanocyte populations. J Invest Dermatol 83: 23-25 (1984)

Golubic M, Roudebush M, Dobrowolski S, Wolfman A, Stacey DW: Catalytic properties, tissue and intracellular distribution of neurofibromin. Oncogene 7: 2151-2159 (1992)

Gregory PE, Gutmann DH, Mitchell A, Park S, Boguski M, Jacks T, Wood DL, Jove R, Collins FS: Neurofibromatosis type 1 gene product (neurofibromin) associates with microtubules. Somat Cell Mol Genet 19: 265-274 (1993)

Griesser J, Kaufmann D, Eisenbarth I, Bäuerle C, Krone W: Ras-GTP regulation is not altered in cultured melanocytes with reduced level of neurofibromin derived from patients with neurofibromatosis1 (NF1). Biol Chem Hoppe-Seyler 376: 91-101 (1995)

Griesser J, Kaufmann D, Maier B, Mailhammer R, Kuehl P, Krone W: Post-transcriptional regulation of neurofibromin level in cultured human melanocytes in response to growth factors. J Invest Dermatol 108: 275-280 (1997)

Griesser J: Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Funktion von Neurofibromin in verschiedenen Zellkulturen. Dissertation, Universität Ulm (1996)

Guerreo I, Wong H, Pellicer A, Burstein DE: Activated N-ras gene induces neuronal differentiation of PC12 rat pheochromocytomas cells. J Cell Physiol 129: 71-76 (1986)

Guo HF, The I, Hannan F, Bernards A, Zhong Y: Requirement of Drosophila NF1 for Activation of Adenylyl Cyclase by PACAP38-Like Neuropeptides. Science 276: 795-798 (1997)

Guo HF, Tong J, Hannan F, Luo L, Zhong Y: A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in Drosophila. Nature 403: 946-947 (2000)

Gutmann DH, Wood DL, Collins FS: Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9658-9662 (1991)

Gutmann DH, Anderson LB, Cole JL, Swaroop M, Collins FS: An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle. Hum Mol Genet 7, 989-992 (1993a)

Gutmann DH, Tennekoon GI, Cole JL, Collins FS, Rutkowski JL: Modulation of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, during Schwann cell differentiation. J Neurosci Res 36: 216-223 (1993b)

Gutmann DH, Boguski M, Marchuk D, Wigler M, Collins FS, Ballester R: Analysis of the neurofibromatosis type 1 (NF1) GAP-related domain by site-directed mutagenesis. Oncogene 8: 761-769 (1993c)

Gutmann DH, Cole JH, Stone WJ, Ponder JAJ, Collins FS: Loss of neurofibromin in adrenal gland tumors form patients with neurofibromatosis type 1. Genes Chromosomes Cancer 10: 55-58 (1994a)

Gutmann DH, Cole JL, Collins FS: Modulation of neurofibromatosis type 1 gene expression during in vitro myoblast differentiation. J Neurosci Res 37: 398-405 (1994b)

Gutmann DH, Geist RT, Wright DE, Snyder WD: Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) isoforms in developing and adult rat tissue. Cell Growth Diff 6: 315-323 (1995)

Gutmann DH, Giordano MJ, Mahadeo DK, Lau M, Silbergeld D, Guha A: Increased neurofibromatosis 1 gene expression in astrocytic tumors: positive regulation by p21-ras. Oncogene 12: 2121-2127 (1996)

Habib AA, Marton LS, Allwardt B, Gulcher JR, Mikol DD, Hognason T, Chattopadhyay N, Stefansson K: Expression of the oligodendrocyte-myelin glycoprotein by neurons in the mouse central nervous system. J Neurochem 70: 1704-1711 (1998a)

Habib AA, Gulcher JR, Högnason T, Zheng L, Stefánsson K: The OMpg gene, a second growth suppressor within the NF1 gene. Oncogene 16: 1525-1531 (1998b)

Haeussler J, Haeusler J, Striebel AM, Assum G, Vogel W, Furneaux H, Krone W: Tumor antigen HuR binds specifically to one of five protein-binding segments in the 3'-untranslated region of the neurofibromin messenger RNA. Biochem Biophys Res Commun 267: 726-732 (2000).

Hajra A, Martin-Gallardo M, Tarle SA, Freedman M, Wilson-Gunn S, Bernards A, Collins FS: DNA sequences in the promoter region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse. Genomics 21: 649-652 (1994)

Hattori S, Maekawa M, Nakamura S: Identifikation of neurofibromatosis type 1 gene product as an insoluble GTPase-activating protein toward ras p21. Oncogene 7: 481-485 (1992)

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

Heim RA, Silverman LM, Farber RA, Kam-Morgan LNW, Luce MC: Screening for truncated NF1 proteins. Nature Genet 8: 218-219 (1994)

Hecker E: Co-carcinogens or modulators of carcinogenesis. New aspects of the etiology of human tumors and of the molecular mechanisms of carcinogenesis Naturwissenschaften 65: 640-648 (1978)

Hecker E, Adolf W, Hergenhahn M, Schmidt R, Sorg B: Irritant diterpene ester promoters of mouse skin: contributions to etiologies of environmental cancer and to biochemical mechanisms of carcinogenesis. Princess Takamatsu Symp 14: 3-36 (1984)

Heim RA, Kam-Morgan LNW, Binnie CG, Corns DD, Cayouette MC, Farber RA, Aylsworth AS, Silverman LM, Luce MC: Distribution of 13 truncating mutations in the neurofibromatosis 1 gene. Hum Mol Genet 4: 975-981 (1995)

Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system for protein degradation. Ann Rev Biochem 61: 761-807 (1992)

Hilt W, Wolf DH: Proteasomes: destruction as a programme. Trends Biochem Sci 21: 96-102 (1996)

Hoffmeyer S, Assum G, Griesser J, Kaufmann D, Nürnberg P, Krone W: On unequal allelic expression of the neurofibromin gene in neurofibromatosis type 1. Hum Mol Genet 4: 1267-1272 (1995)

Hofmann K, Stoffel W: TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol Chem 374: 166 (1993)

Honda R, Tanaka H, Yasuda H: Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. FEBS Lett 420: 25–27 (1997).

Hsueh YP, Yang FC, Kharazia V, Naisbitt S, Cohen AR, Weinberg RJ, Sheng M: Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses. J Cell Biol 142: 139-151 (1998).

Hsueh YP, Roberts AM, Volta M, Sheng M, Roberts RG: Bipartite interaction between neurofibromatosis type I protein (neurofibromin) and syndecan transmembrane heparan sulfate proteoglycans. J Neurosci 21: 3764-70 (2001).

Hulsebos TJ, Bijleveld EH, Riegman PH, Smink LJ, Dunham I: Identification and characterisazion of NF1-related loci on human chromosomes 22, 14, and 2. Hum Genet 98: 7-11 (1996)

Huson SM, Huges RAC: Neurofibromatosis 1: a clinical and genetic overview. In: Huson SM, Huges RAC (Hrsg) The Neurofibromatoses, Chapman and Hall Medical, London, S. 160-204 (1994)

Inoue A, Torigoe T, Sogahata K, Kamiguchi K, Takahashi S, Sawada Y, Saijo M, Taya Y, Ishii S, Sato N, Kikuchi K: 70-kDa heat shock cognate protein interacts directly with the N-terminal region of the retinoblastoma gene product pRb. J Biol Chem 270: 22571-22576 (1995)

Izawa I, Tamaki N, Saya H: Phosphorylation of neurofibromatosis type 1 gen product (neurofibromin) by cAMP-dependent protein kinase. FEBS Lett 382: 53-59 (1996)

Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernards A, Weinberg RA: Tumour predisposition in mice heterozgous for a targeted mutation in NF1. Nature Genet 7: 353-361 (1994)

Jacks T: Vortrag in San Franscisco: Modelling cancer in the mouse. Am J Hum Genet 65: 42 (1999)

Jennissen HP: Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. Eur J Biochem 231: 1-30 (1995)

Johnson BL, Charneco DR: Café au lait spots in neurofibromatosis and in normal individuals. Arch Derm 102: 442-446 (1970)

Johnson MR, Look AT, DeClue, Valentine MB, Lowy DR: Inactivation of the NF1 gene in human melanoma and neuroblastoma cell lines without impaired regulation of GTP-Ras. Proc Natl Acad Sci USA 90: 5539-5543 (1993)

Johnson MR, DeClue JE, Felzmann S, Vass WC, Xu G, White R, Lowy DR: Neurofibromin can inhibit ras-dependent growth by a mechanism independent of its GTPase-accelerating function. Mol Cell Biol 14: 641-645 (1994)

Junge I: Untersuchungen über den Neurofibromin-turnover in unterschiedlichen Zellkulturen. Diplomarbeit (1998).

Kaneko T, Yamashima T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido TC, Nakao M, Saya H, Yamamoto H, Yamashita J : Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas. Cancer 92 : 2662-2672 (2001)

Kaufmann D, Krone W, Hochsattel R, Martin R: A cell culture study on melanocytes from patients with neurofibromatosis-1. Arch Dermatol Res 281: 510-513 (1989)

Kaufmann D, Wiandt S, Veser J, Krone W: Increased melanogenesis in cultured epidermal melanocytes from patients with neurofibromatosis 1 (NF 1). Hum Genet 87: 144-150 (1991)

Kaufmann D, Bartelt B, Hoffmeyer, Müller R: Posttranslational regulation of neurofibromin content in melanocytes of neurofibromatosis type 1 patients. Arch Dermatol Res 291: 312-317 (1999)

Kaufmann D, Müller R, Bartelt B, Wolf M, Kunzi-Rapp K, Hanemann CO, Fahsold R, Hein C, Vogel W, Assum G: Spinal neurofibromatosis without café-au-lait macules in two families with null mutations of the *NF1* gene. Am J Hum Genet 69: 1395-1400 (2001)

Kaufmann D, Müller R, Kenner O, Leistner W, Hein C, Vogel W, Bartelt B: The N-terminal splice produkt *NF1-10a-2* of the NF1 gene codes for a transmembran segment. Biochem Biophys Res Commun 294: 496-503 (2002)

Kehrer-Sawatzki H, Schwickardt T, Assum G, Rocchi M, Krone W: A third neurofibromatosis type 1 (NF1) pseudogene at chromosome 15q11.2. Hum Genet 100: 595-600 (1997)

Khyse-Anderson J: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 10: 203-209 (1984)

Kim HA, Rosenbaum T, Marchionni MA, Ratner N, DeClue JE: Schwann cells from neurofibromin deficient mice exhibit activation of p21 ras, inhibition of cell proliferation and morphological changes. Oncogene 11: 325-335 (1995)

Kimoto M, Miyatake S, Sasagawa T, Yamashita H, Okita M, Oka T, Ogawa T, Tsuji H: Purification, cDNA cloning and expression of human NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Eur J Biochem 258: 863-868 (1998)

Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashima T, Saido TC, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, Nakao M: The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. Nature Medicine 4 (8): 915-922 (1998)

Kimura Y, Saya H, Nakao M: Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. Neuropathology 3: 153-160 (2000)

Klose A, Ahmadian MR, Schuelke M, Scheffzek K, Hoffmeyer S, Gewies A, Schmitz F, Kaufmann D, Peters H, Wittinghofer A, Nürnberg P: Selective disactivation of neurofibromin GAP activity in neurofibromatosis type 1 (NF1). Hum Mol Genet 7: 1261-1268 (1998)

Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF: Loss of NF1 allele in schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. Genes Chromosomes Cancer 24: 283-285 (1999)

Kmiec EB: Genomic targeting and genetic conversion in cancer therapy. Semin Oncol 23: 188-193 (1996)

Koivunen J, Ylä-Outinen H, Korkiamaki T, Karvonen SL, Poyhonen M, Laato M, Karvonen J, Peltonen, S, Peltonen J: New function for NF1 tumor suppressor. J Invest Dermatol 114: 473-479 (2000)

Krasagakis K, Fimmel S, Genten D, Eberle J, Quas P, Ziegler W, Haller H, Orfanos CE: Lack of protein kinase C (PKC)-beta and low PKC-alpha, -delta, -epsilon, and -zeta isozyme levels in proliferating human melanoma cells. Int J Oncol 4: 865-871 (2002)

Krone W: Modellbetrachtungen über Neurofibromatose 1. Ulmensien, Schriftenreihe der Universität Ulm, Band 4: 65-79 (1990)

Krone W, Kehrer-Sawatzki H: Neurofibromatosen. In: Ganten D, Ruckpaul K: Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen. Springer Verlag S. 89-166 (2001)

Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH: Regulation of stability by Mdm2. Nature 387: 299-303 (1997)

Küchler W: Etablierung und Einsatz der Methode der Elektrophorese in denaturierenden Gradienten zur Suche nach Mutationen des Neurofibromin-Gens. Diplomarbeit, Universität Ulm (1994)

Laemmli UK: Cleavage of structural protein during the assembly of the heat bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

Largaespada DA, Shaughnessy JD, Jenkins NA, Copeland NG: Retroviral integration at the Evi-2 locus in BXH-2 myeloid leukemia cell lines disrupts NF1 expression without changes in steady-state Ras-GTP levels. J Virol 69: 5095-5102 (1995).

Larsson B, Tjälve H: Studies on the mechanism of drug-binding to melanin. Biochem Pharmacology 28: 1181-1187 (1979)

Lassmann H, Jurecka W, Lassmann G, Gebhart W, Matras H, Watzek G: Different types of benign nerve sheat tumors. Virchows Arch 375: 197-210 (1977)

Legius E, Marchuk DA, Gall BK, Andersen LB, Wallace MR, Collins FS, Glover TW: NF1-related locus on chromosome 15. Genomics 13: 1316-1318 (1992)

Li Y, White R: Suppression of a human colon cancer cell line by introduction of an exogenous NF1 gene. Cancer Res 56: 2872-2876 (1996)

Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J, Gu W: Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. Nature 416: 648-653 (2002)

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M: Increased proteasome-dependent degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. Nature Medicin 3: 231-234 (1997)

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275 (1951)

Maeda K, Tomita Y, Fukuda M, Tagami H: Effects of staurosporine, PMA and A23187 on human melanocyte cultures with dibutyryl cyclic AMP. Br J Dermatol 126: 118-124 (1992)

Maier B: Untersuchungen zur Expression des Neurofibromins in verschiedenen Zelltypen von Neurofibromatose Typ 1-Patienten und gesunden Vergleichsprobanden. Diplomarbeit, Universität Ulm (1995)

Malhotra R, Ratner N: Localization of neurofibromin to keratinocytes and melanocytes in developing rat and human skin: J Invest Dermatol 102: 812-818 (1994)

Marchuk DA, Saulino AM, Tavakko R, Swaroop M, Wallace MR, Andersen LB, Mitchell AL, Gutmann DH, Boguski M, Collins FS: cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product. Genomics 11: 931-940 (1991)

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, Innis MA, McCormick F: The GAP-related domain of the Neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. Cell 63: 843-849 (1990)

Martuza RL, Phillippe I, Fitzpatrick TB, Zwaan J, Seki Y, Lederman J: Melanin macroglobules as a marker of neurofibromatosis: a quantitative study. J Invest Dermatol 85: 347-350 (1985)

Maru Y, Witte ON: The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. Cell 67: 459-468 (1991)

Mellgren RL: Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? FASEB J 1: 110-115 (1987)

Milsom DW, Rose FA, Dodgson KS: The specific assay of arylsulphatase C, a rat liver microsomal marker enzyme. Biochem J 128: 331-336 (1972).

Mortimore GE, Pösö AR, Lardeux BR: Mechanism and regulation of protein degradation in liver. Diabetes/Metabolism Rev 5: 49-70 (1989)

Mueller SG, Schraw WP, Richmond A: Activation of protein kinase C enhances the phosphorylation of the type B interleukin-8 receptor and stimulates its degradation in non-hematopoietic cells. J Biol Chem 270: 10439-10448 (1995)

Müller R: Untersuchungen zur Regulation der Expression des Neurofibromatose 1 Gens in Melanozyten. Diplomarbeit, Universität Ulm (1997)

Nakayama J, Kiryu H, Urabe K, Matsuo S, Shibata S, Koga T, Furue M: Vitamin D3 analogues improve cafe au lait spots in patients with von Recklinghausen's disease: experimental and clinical studies. Eur J Dermatol 9 (3): 202-206 (1999)

Nishi T, Lee PSY, Oka K, Levin VA, Tanase S, Morino Y, Saya H: Differential expression of two types of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene transcripts related to neuronal differentiation. Oncogene 6, 1555-1559 (1991)

Noda M, Ko M, Ogura A, Liu DG, Amano T, Takano T, Ikawa Y: Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. Nature 318: 73-75 (1985)

Nordlund M, Gu X, Shipley MT, Ratner N: Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. J Neurosci 13: 1588-1600 (1993)

Norton KK, Mahadeo DK, Geist RT, Gutmann DH: Expression of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene during growth arrest. NeuroReport 7: 601-604 (1996)

Olson TS, Dice JF: Regulation of protein degradation rates in eukaryotes. Current opinion in Cell Biol 1: 1194-1200 (1989)

Ono Y, Fujii T, Igarashi K, Kuno T, Tanaka C, Kikkawa U, Nishizuka Y: Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. Proc Natl Acad Sci 86: 4868-4871 (1989)

Park VM, Kenwright KA, Sturtevant DB, Pivnick EK: Alternative splicing of exon 29 and 30 in the neurofibromatosis type 1 gene. Hum Genet 103: 382-385 (1998)

Pines J, Hunter T: Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with $p34^{cdc2}$. Cell 58: 833-846 (1989)

Preiser SA, Davenport CB: Multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen disease) and its inheritance. Am J Med Sci 156: 507 (1918)

Ratner N, Atit R, Sherman LS, Crowe M, Cox AD, Wenstrup R: Evidence in support of Ras-GTP dependent and independent abnormalities in NF1-mutant cells revealed by a new in situ Ras-activation assay and by skin wounding. Med Genet 11: 483 (1999)

Regnier V, Meddeb M, Lecointre G, Richard F, Duverger A, Nguyen VC, Dutrillaux B, Bernheim A, Danglot G: Emergence and scattering of multiple neurofibromatosis (NF1)-related sequences during hominoid evolution suggest a process of pericentromeric interchromosomal transposition. Hum Mol Genet 6: 9-16 (1997)

Rey I, Taylor-Harris P, v.Erp H, Hall A: R-ras interacts with ras GAP, neurofibromin and c-raf but does not regulate cell growth or differentiation. Oncogene 9: 685-692 (1994)

Riccardi VM, Kleiner B: Neurofibromatosis: a neoplastic birth defect with two age peaks of severity. Birth defects 13: 131-138 (1977)

Riccardi VM: Neurofibromatosis: Phenotype, natural history and pathogenesis. 2nd Edition. John Hopkins University Press, Baltimore (1992)

Rogers SW, Rechsteiner M: Degradation of structurally characterized proteins injected into HeLa cells. J Biol Chem 263: 19843-19849 (1988)

Rosenbaum T, Boissy YL, Kombrinck K, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Ratner N: Neurofibromin-deficient fibroblasts fail to form perineurium in vitro. Development 121: 3583-3592 (1995)

Rosenbaum T, Rosenbaum C, Winner U, Müller HW, Lenard HG, Hanemann CO: Long-term culture and characterization of human neurofibroma-derived schwann cells. J Neurosci Res 61: 524-532 (2000)

Roudebush M, Slabe T, Sundaram V, Hoppel CL, Golubic M, Stacey DW: Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells. Exp Cell Res 236: 161-172 (1997)

Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K: Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. FASEB J 8: 814-822 (1994)

Sawada S, Florell S, Purandare SM, Ota M, Stephens K, Viskochil D: Identification of NF1 mutations in both alleles of a dermal neurofibroma. Nature Genet 14: 110-112 (1996)

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM: The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell 75: 495-505 (1993)

Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP: SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. Proc Natl Acad Sci USA 95: 5857-5864 (1998)

Schumacher A, Koetsier PA, Hertz J, Doerfler W: Epigenetic and Genotype-specific Effects on the Stability of *de Novo* Imposed Methylation Patterns in Transgenic Mice. J Biol Chem 48: 37915-37921 (2000)

Seglen PO, Bohley P: Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. Experientia 48: 158-172 (1992)

Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, Lenard HG, Lázaro C: Schwann cells harbor the somatic *NF1* mutaton in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. Hum Mol Gen 9: 3055-3064 (2000).

Serra E, Rosenbaum T, Nadal M, Winner U, Ars E, Estivill X, Lázaro C: Mitotic recombination effects homozygosity for NF1 germline mutations in neurofibromas. Nat Genet 3: 294-296 (2001)

Shannan KM, O'Connel P, Martin GA, Paderanga D, Olsen K, Dinndorf P, McCormick: Loss of the normal allel from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloind disorders. N Engl J Med 330: 597-601 (1994)

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C: DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition MDM2. Cell 91: 325–334 (1997).

Silva AJ, Frankland PW, Marowitz Z, Friedman E, Lazlo G, Cioffi D, Jacks T, Bourtchuladze R: A mouse model for the learning and memory deficits associated with neurofibromatosis type I. Nat Genet 15: 281-284 (1997)

Sjölin-Forsberg G, Berne B, Johannson M, Olsson MJ, Rollmann O: Differential uptake of chloroquine by human keratinocytes and melanocytes in culture. Arch Dermatol Res 288: 211-215 (1996)

Skuse GR, Cappione AJ, Sowden M, Metheny LJ, Smith HC: The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. Nucleic Acid Res 24: 478-486 (1996)

Stark M, Assum G, Krone W: A small deletion and an adjacent base exchange in a potential stem-loop region of the neurofibromatosis 1 gene. Hum Genet 87: 685-687 (1991)

Stark M, Assum G, Kaufmann D, Kehrer H, Krone W: Analysis of segregation and expression of an identified mutation at the neurofibromatosis type 1 locus. Hum Genet 90: 356-359 (1992)

Steveson TC, Keutmann HT, Mains RE, Eipper BA: Phosphorylation of cytosolic domain Ser^{937} affects both biosynthetic and endocytic trafficking of peptidylglycine α-amidating monooxygenase. J Biol Chem 274 (30): 21128-21138 (1999)

Stiller CA, Chessels JM, Fitchett M: Neurofibromatosis and childhood leukaemia/ lymphoma: a population based UKCCSG study. Br J Cancer 70 (5): 969–72 (1994)

Stumpf DA, Alksne JF, Annegers JF, Brown SS, Connealy PM, Housman D, Leppert M, Miller JP, Moss ML, Pileggi AJ, Rapin I, Strohman RC, Swason LW, Zimmermann A: Neurofibromatosis. NIH Consensus Development Conference Statement 6 (12) (1987)

Susan PP, Dunn WA: Starvation-induced lysosmal degradation of aldolase B requires glutamine 111 in a signal sequence for chaperon-mediated transport. J Cell Physiol 187: 48-58 (2001).

Suzuki Y, Suzuki H, Kayama T, Yoshimoto T, Shibahara S: Brain tumors predominantly express the neurofibromatosis type 1 gene transcripts containing the 63 base insert in the region coding for GTPase activating protein-related domain. Biochem Biophys Res Commun 181: 955-961 (1991)

Suzuki H, Takahashi K, Kubota Y, Shibahara S: Molecular cloning of a cDNA coding for neurofibromatosis type 1 protein isoform lacking the domain related to ras GTPase-activating protein. Biochem Biophys Res Commun 187: 984-990 (1992)

Suzuki H, Ozawa N, Taga C, Kano T, Hattori M, Sakagi Y: Genomic analysis of a NF1 related pseudogene on human chromosome 21. Gene 147: 277-280 (1994a)

Suzuki H, Takahashi K, Yasumoto K, Shibahara S: Activation of the tyrosinase gene promoter by neurofibromin. Biochem Biophys Res Commun 205: 1984-1991 (1994b)

Terlecky SR, Dice JF: Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. J Biol Chem 268: 23490-23495 (1993)

The I, Murthy AE, Hannigan GE, Jacoby LB, Menon AG, Gusella JF, Bernards A: Neurofibromatosis type 1 gene mutations in neuroblastoma. Nature Genet 3: 62-66 (1993)

Tokuo H, Yunoue S, Feng L, Kimoto M, Tsuji H, Ono T, Saya H, Araki N: Phosphorylation of neurofibromin by cAMP-dependent protein kinase is regulated via a cellular association of N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. FEBS Lett 494: 48-53 (2001)

Tong J, Hannan F, Zhu Y, Bernards A, Zhong Y: Neurofibromin regulates G protein-stimulated adenylyl cyclase activity. Nat Neurosci 2: 95-96 (2002)

Towbin H, Staehlin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc Natl Acad Sci 76: 4350–4354 (1979)

Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H: p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. Curr Biol 9: 661-664 (1999)

Turk V, Lah T, Kregar I: Cathpesin D, Cathepsin E. In: Methods of Enzymatic Analysis 5. Bergmeyer HU, Hrsg (Verlag Chemie, Weinheim) pp. 211-222 (1984)

van der Geer P, Luo K, Sefton BM, Hunter T: Phosphopeptid Mapping and Phosphoamino Acid Analysis on Cellulose Thin-Layer Plates. In: Celis JE, Hrsg: Cell Biology 4. Academic Press S. 310-333 (1998)

Viskochil DR, Cawthon P, O'Connell G, Xu J, Stevens M, Culver JC, Carey J, White R: The gene encoding the oligodendrocyte-myelin glycoprotein is embedded within the neurofibromatosis type 1 gene. Mol Cell Biol 11, 906-912 (1991)

Vogel KS, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF: Loss of neurofibromin results in neurotrophin-independent survival of embryonic sensory and sympathetic neurons. Cell 82: 733-742 (1995)

Vogel KS, Klesse LJ, Velasco-Miguel S, Meyers K, Rushing KJ, Parada LF: Mouse tumor model for neurofibromatosis type 1. Science 286: 2176-2179 (1999)

von Recklinghausen FD: Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuromen. Hirschwald, Berlin (1882)

Williams JA, Su HS, Bernards A, Field J, Sehgal A: A circadian output in Drosophila mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. Science 293: 2251-2256 (2001)

Wing SS, Chiang HL, Goldberg AL, Dice JF: Proteins containing peptide sequences related to KFERQ are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats. Biochem J 275: 165-169 (1991)

Wrabetz L, Feltri ML, Kim H, Daston M, Kamholz J, Scherer SS, Ratner N: Regulation of neurofibromin expression in rat sciatic nerve and cultured schwann cells. Glia 15: 22-32 (1995)

Wu R, Legius E, Robberecht W, Dumoulin M, Cassiman JJ, Fryns JP. Neurofibromatosis type I gene mutation in a patient with features of LEOPARD syndrome. Hum Mutat 8: 51-56 (1996)

Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R: The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. Cell 62: 599-608 (1990)

Xu G, O'Connell P, Stevens J, White R: Characterization of human adenylat kinase 3 (AK3) cDNA and mapping of the AK3 pseudogen in an intron of the type I neurofibromatosis. Genomics 13: 537-542 (1992)

Xu W, Mulligan LM, Ponder MA, Liu L, Smith BA, Mathew CGP, Ponder BAJ: Loss of NF1 allels in phaeochromocytomas from patients with type 1 neurofibromatosis. Genes Chromosom Cancer 4: 337-342 (1992)

Xu H, Gutmann DH: Mutations in the GAP-related domain impair the ability of neurofibromin to associate with microtubules. Brain Resarch 759: 149-152 (1997)

Ylä-Outinen H, Aaltonen V, Björkstrand A-S, Hirvonen O, Lakkakorpi J, Vähä-Kreula M, Laato M, Peltonen J: Upregulation of tumor suppressor protein neurofibromin in normal human wound healing and *in vitro* evidence for plateled derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) elicted increase in neurofibromin mRNA steady-state levels in dermal fibroblasts. Soc Invest Dermatol 110: 232-237 (1998)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mir während meiner Promotion unterstützend zur Seite gestanden haben, herzlichst bedanken.

Herrn Prof. Dr. Walther Vogel danke ich für Möglichkeit in der neuen Abteilung Humangenetik promovieren zu können und für seine jederzeit freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dieter Kaufmann, für seine gute Betreuung und ständige Hilfsbereitschaft beim Lösen aller offenen Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn PD. Dr. Cordian Beyer für die Übernahme des Koreferats.

Desweiteren möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Zellkultur-Labors, Frau Eva Winkler und Frau Petra Kruse sowie Frau Anna Siegel und Frau Heidrun Götz bedanken, die mich durch ihre Arbeit bei der Zellkultivierung unterstützten. Bei Frau Bärbel Dieske möchte ich mich für die Hilfe bei den molekularbiologischen Experimenten bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Britta Bartelt für ihre Hilfe im Englischen und bei Herrn Oliver Kenner für seine Unterstützung bei der Fluoreszenzmikroskopie.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Abteilung Humangenetik für die gute und freundliche Arbeitsatmosphäre und die über den Laboralltag hinausreichende Hilfsbereitschaft.