

2. Material und Methoden

Eine detaillierte Auflistung der benutzten Chemikalien, Antikörper und Laborgeräte befindet sich im Anhang.

2.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1. p21- und Pim-1-Klonierung

Bei dieser Klonierung wurden die cDNA-Sequenzen von p21 und Pim-1 in insgesamt drei AFP-Expressionsvektoren pECFP-N1, pEGFP-N1 und pEYFP-N1 (Clontech Laboratories) eingefügt. Mittels Punktmutagenese wurden die p21- und Pim-1-Konstrukte weiter modifiziert, um enzymatisch inaktive Mutanten zu erhalten. Hierzu wurden folgende Ausgangsplasmide verwendet:

Ausgangsplasmid für p21:

Bei diesem Plasmid handelte es sich um einen pOTB7-Expressionsvektor (Klon ID: IRALp962C169), der die cDNA von p21 trägt. Der Expressionsvektor wurde von RZPD erworben. Die p21-DNA-Sequenz des pOTB7-Expressionsvektor ist im Anhang 6.2.1 dargestellt.

Ausgangsplasmid für Myc-Pim-1-WT:

Bei diesem Plasmid handelte es sich um den pCMV-tag3-Expressionvektor von Stratagene in dessen „multiple cloning site“ (MCS) die cDNA für Pim-1 (Isoform-2, 34kDa Variante) kloniert wurde. Dem Plasmid wurde am 5'-Ende des Pim-1-Gens ein DNA-Segment eingefügt, das zwei c-Myc-tags kodiert. Dieses Plasmid wurde freundlicher Weise von Frau Dr. Luisella Toschi (Schering AG, Dept. Genomics & Bioinformatics) zur Verfügung gestellt. Die c-Myc-Pim-1-WT-Sequenz des pCMV-tag3-Expressionvektors ist im Anhang 6.2.2 dargestellt.

2.1.1.1. p21- und Pim-1-Klonierung: Amplifikation

Das p21-Gen wurde mittels „polymerase chain reaktion“ (PCR) aus dem pOTB7-Expressionsvektor (IRALp962C169) amplifiziert.

Hierzu wurde ein Primerpaar verwendet, das das Start- (sense) und das Stopkodon (antisense) von p21 umfasst. Der sense-Primer trägt am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII (rot markiert). Am 3'-Ende des antisense-Primers wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Sall (rot markiert) eingefügt.

Die Primer wurden von MWG synthetisiert.

p21-Amplifikationsprimer sense: 5'- gcatgcat**aagctt**gccatgtcagaaccggctggg-3'

p21-Amplifikationsprimer antisense: 5'-atgcatgctg**cgacg**gtagggcttctcttga-3'

Diese Primerkombination ergibt ein berechnetes p21-Amplifikationsfragment von 528bp.

Das Pim-1-Gen einschließlich der KOZAK sowie der beiden c-Myc-Sequenzen wurde mittels PCR aus dem pCMV-tag3 Expressionsvektor amplifiziert. Verwendet wurde ein Primerpaar, das die KOZAK-Sequenz vor dem ersten c-Myc-tag (sense) und das Stopkodon (antisense) von Pim-1 umfasst. Der sense-Primer trägt am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII (rot markiert). Am 5'-Ende des antisense-Primers wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Sall (rot markiert) eingefügt. Außerdem wurde der antisense-Primer so modifiziert, dass das Stopkodon von Pim-1 eliminiert werden konnte.

Die Primer wurden von MWG synthetisiert.

Pim-1-Amplifikationsprimer sense: 5'-gcatgcat**aagctt**gccgcatggagcagaaactc-

Pim-1-Amplifikationsprimer antisense: 5'-atgcatgcccctcgagg**tcgacg**gcttttctgctgg-3'

Diese Primerkombination ergibt ein berechnetes Pim-1-Amplifikationsfragment von 1081bp.

Für die Amplifikation wurde das „Platinum Pfx DNA Polymerase kit“ von Invitrogen verwendet.

PCR-Ansatz:

	<u>Volumen</u>	<u>finale Konzentration</u>
10x Pfx Amplifikationspuffer	5µl	1x
dNTP Mix (10mM)	1,5µl	0,3mM je dNTP
MgSO ₄ (50mM)	1µl	1mM
Sense-Primer (10µM)	1,5µl	0,3µM
Antisense-Primer (10µM)	1,5µl	0,3µM

Template-DNA (20µg/ml)	5µl	100ng
Platinum Pfx DNA Polymerase (2,5U/µl)	0,5µl	1,25U
H ₂ O _{dest}	34µl	

In einem PCR-Kontrollansatz wurde die Template-DNA durch H₂O_{dest} ersetzt. Die Amplifikation wurde mittels Gradienten-PCR durchgeführt, wobei für jeden PCR-Ansatz (6 Proben) folgender Temperaturgradient galt: 47,3°C, 50,2°C, 55,1°C, 60,5°C, 65,1°C und 67,5°C.

PCR-Programm:

2 min	94°C	} 25 Zyklen
15sec	94°C	
30sec	57°C	
↳ Gradient	±10°C	
90sec	68°C	
2min	68°C	
∞	4°C	

Zur Durchführung der PCR-Reaktion diente die PCR-Maschine „Mastercycler“ der Firma Eppendorf.

Die Trennung der Amplifikationsprodukte erfolgte in einem analytischen Agarosegel. Das Pim-1-Amplifikationsprodukt des PCR-Ansatzes 6 (67,5°C) und das p21-Amplifikationsprodukt des PCR-Ansatzes 5 (65,1°C) wurden für den nachfolgenden Restriktionsverdau gewählt. Die Kontroll-PCR ergab keine Amplifikationsprodukte. Um die Amplifikationsprodukte von den verbliebenen freien Primern, Nukleotiden, Pfx-Polymerasen und den hohen Salzkonzentrationen zu befreien, wurden sie mittels „QIAquick PCR purification kit“ (Qiagen) gereinigt. Die Durchführung geschah nach den Angaben des Herstellers. Die p21 und Pim-1 Proben wurden abschließend mit 50µl H₂O_{dest} eluiert.

2.1.1.2. p21- und Pim-1-Klonierung: Restriktionsverdau

Die p21 (Probe 5) und Pim-1 (Probe 6) Amplifikationsprodukte, sowie die drei Targetvektoren pECFP-N1, pEGFP-N1 und pEYFP-N1 wurden zunächst mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten. Dieses Enzym bindet an die DNA Sequenz AAGCTT und schneidet sie nach dem ersten Adenin.

Reaktionsansatz der Amplifikationsprodukte:

Amplifikationsprodukt	45µl
HindIII spezifischer Puffer B	5µl
HindIII (10U/µl)	1µl

Reaktionsansatz der Targetvektoren:

Targetvektor (20µg/ml)	45µl
HindIII spezifischer Puffer B	5µl
HindIII (10U/µl)	1µl

Die Reaktion erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Nach Abschluss des HindIII Restriktionsverdau wurden die Proben mittels „QIAquick PCR purification kit“ (Qiagen) gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Alle Proben wurden abschließend mit 50µl H₂O_{dest} eluiert.

Nach der Reinigung wurden alle Proben mit der Restriktionsendonuklease Sall geschnitten. Dieses Enzym bindet an die DNA Sequenz GTCGAC und schneidet sie nach dem ersten Guanin.

Reaktionsansatz der gereinigten HindIII Restriktionsprodukte:

Eluiertes HindIII Restriktionsprodukt	45µl
Sall spezifischer Puffer H	5µl
Sall (10U/µl)	1µl

Die Reaktion erfolgte für 2 Stunden bei 37°C.

Abschließend wurden alle Restriktionsprodukte mittels präparativer Agarosegelelektrophorese gereinigt. Hierzu wurden die Proben in einem Agarosegel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und die Restriktionsprodukte mit einem DNA Extraktionskit (QIAquick extraction kit von Qiagen) extrahiert. Alle Proben wurden mit

30µl H₂O_{dest} eluiert. Die eluierten Proben wurden in einem analytischen Agarosegel (1,2%) aufgetrennt. In allen Proben konnten die Restriktionsprodukte entsprechender Größe (Pim-1: 1044bp, p21: 505bp und Targetvektoren: ca. 4,7kb) erkannt werden.

2.1.1.3. p21- und Pim-1-Klonierung: Ligation

In diesem Verfahrensschritt wurden die geschnittenen p21- bzw. die Pim-1-Amplifikationsprodukte mit den geschnittenen Targetplasmiden pECFP-N1, pEGFP-N1 (nur Pim-1) und pEYFP-N1 legiert. Für die Ligation wurde eine T4-DNA-Ligase (New England BioLabs) benutzt.

Ligationsansatz:

10x T4-DNA-Ligase Puffer	5µl
T4-DNA-Ligase	1µl
Targetplasmid	4µl
Amplifikationsprodukt	10µl
H ₂ O _{dest}	30µl

Die Ligationsreaktion erfolgte bei 16°C über Nacht. Als Kontrollen wurden die Targetplasmide ohne Amplifikationsprodukt ligiert.

Um die vollständige Ligation der p21- bzw. Pim-1- Fragmente mit den jeweiligen Targetplasmiden zu prüfen, wurden die Ansätze in XL1-Blue superkompetente *E.coli* Zellen (Stratagene) transformiert. Die Targetplasmide besaßen ein Kanamycinresistenzgen zur Selektion transformierter Zellen, das nur bei korrekter Ligation abgelesen werden konnte. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Transformationsansatz auf Eis:

XL1-Blue superkompetente <i>E.coli</i> Zellen	100µl	} Vorinkubation für 10 min auf Eis
β-Mercaptoethanol	1,7µl	
Ligationsansatz	4µl	

Die Transformationsansätze wurden für 30min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock für 30s bei 42°C ausgesetzt. Danach wurden sie nochmals für 3min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 900µl vorgewärmtes LB-Medium

hinzugefügt. Die transformierten Zellen wurden in einem Inkubationsschüttler für 1h bei 37°C inkubiert und je 75µl auf LB-Kanamycin-Agarplatten (Kanamycin 50µg/ml) ausgestrichen. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C im Inkubationsschrank vermehrt. Alle p21- und Pim-1- Transformationsansätze zeigten Kolonien.

2.1.2. Kolonie-PCR

Ziel dieser PCR-Methode war es, Kolonien von transformierten Bakterien zu identifizieren, die die vollständigen p21-AFP- bzw. Pim-1-AFP-Expressionsplasmide trugen. Hierzu wurden Primerpaare gewählt, deren Amplifikationsprodukte nur entstehen, wenn die entsprechenden p21-AFP- bzw. Pim-1-AFP-Expressionsplasmide in den Zellen vorhanden waren.

A. Für die Pim-1-AFP-Konstrukte wurde folgendes Primerpaar gewählt:

Pim-1 sense-Primer: 5'-GGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGG-3'

Pim-1 antisense-Primer: 5'-GCTATTTGCTGGGCCCGGCGAC-3'

Dieses Primerpaar ergibt ein Amplifikationsprodukt von 630bp.

B. Für das p21-CFP-Konstrukt wurden folgendes Primerpaar gewählt:

p21-CFP sense-Primer: 5'-AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC-3'

p21-CFP antisense-Primer: 5'-GGTAGCGGCTGAAGCACTGCAC-3'

Dieses Primerpaar ergibt ein Amplifikationsprodukt von 872bp.

C. Für das p21-YFP-Konstrukt wurden folgendes Primerpaar gewählt:

p21-YFP sense-Primer: 5'-AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC-3'

p21-YFP antisense-Primer: 5'-GTTGTGGCGGATCTTGAAGTTC-3'

Dieses Primerpaar ergibt ein Amplifikationsprodukt von 1112bp.

Es wurden jeweils 10 Klone pro p21-AFP- bzw. Pim-1-AFP-Konstrukt ausgewählt, und eine Kolonie-PCR durchgeführt.

Kolonie-PCR-Ansatz:

PCR-SuperMix (Invitrogen) 25µl

Sense Primer (100pmol/µl) 1µl

Antisense Primer (100pmol/µl) 1µl

Transformierte Bakterien wurden mit einer 100µl Pipettierspitze aufgenommen und einmal in den PCR-Ansatz getaucht .

Als Positivkontrollen wurden folgende Expressionsplasmide benutzt: Für A: Pim-1-pCMV-tag3A, für B: pECFP-N1 und für C: pEYFP-N1.

Kolonie-PCR-Programm:

10min	94°C	
30sec	94°C	} 25 Zyklen
30sec	55°C	
90sec	72°C	
2min	72°C	
∞	4°C	

Für die PCR-Reaktion wurde die PCR-Maschine „Mastercycler“ der Firma Eppendorf benutzt.

Die PCR-Produkte wurden in einem 1,2%-igen analytischen Agarosegel aufgetrennt. Aus jeweils 4 Kolonien mit positiven PCR-Produkten pro p21-AFP- bzw. Pim-1-AFP-Konstrukt wurde eine präparative Plasmidisolierung (5ml Volumen) durchgeführt.

2.1.3. Präparative Plasmidisolierung aus *Escherichia coli* (5ml Volumen)

Zur präparativen Plasmidisolierung aus transformierten *E. coli* wurde das „QIAprep Spin Miniprep kit“ von QIAGEN verwendet. Diese Präparationsmethode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (Birnboim and Doly, 1979). Um die p21-AFP- bzw. Pim-1-AFP-Plasmide in *E. coli* zu vermehren, wurden 5ml LB-Medium (Luria-Bertani), das mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin versetzt wurde (50µg/ml), mit transformierten Bakterien angeimpft. Die Kulturansätze wurden über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator vermehrt und anschließend mittels Zentrifugation geerntet. Die Pellets wurden in 250µl Resuspensionspuffer (P1) aufgenommen. Diesem Puffer wurde RNase A zugefügt, die später im Zellysat vorhandene RNA abbaute. RNA ist wie DNA negativ geladen und kann ebenfalls an die Silicagelmembran binden, aufgereinigt werden und so die DNA Präparation kontaminieren. Die resuspendierten Zellen wurden durch Zugabe von 250µl Lysispuffer (P2) aufgeschlossen. Das im Puffer vorhandene SDS solubilisierte

hierbei Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembran, die dabei aufgebrochen wurde. NaOH denaturierte vorhandene chromosomale DNA, Plasmid DNA und zelluläre Proteine. Die Lösung wurde anschließend mit 350µl Neutralisierungspuffer (P3) neutralisiert. Durch die hohe Salzkonzentration (3M Kaliumacetat) fiel Kalium als Kaliumdodecylsulfat aus und präzipitiert denaturierte Proteine, chromosomale DNA und große Zellbestandteile im entstandenen Salz/Detergenz-Komplex. Die kleinere, ringförmige Plasmid-DNA renaturierte bei diesem Schritt und blieb dabei in Lösung. Die präzipitierten Bestandteile wurden mittels Zentrifugation von der löslichen Plasmid-DNA getrennt. Anschließend wurde der Überstand in prä-equilibrierte (Puffer QBT) DNA-Affinitätssäulchen gegeben, die mit einer Silicagelmembran bestückt waren. Die Membran wurde mit 750µl Waschpuffer (Puffer QC) gewaschen und die gebundene Plasmid DNA abschließend mit 50µl H₂O_{dest} eluiert.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA für 5ml Bakterienkultur betrug ca. 20-30µg.

Lösungen:

P1 : 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

P2 : 200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS

P3 : 2,8 M KOAc, pH 5.5

QBT : 750 mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7, 15% Isopropanol (v/v), 0,15% TritonX-100

QC : 1 M NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol (v/v)

Mittels automatischer, fluoreszenzbasierter Sequenzieretechnik wurden die DNA-Sequenzen von jeweils zwei Proben Pim-1-GFP, Pim-1-CFP, Pim-1-YFP, p21-CFP und p21-YFP bestimmt.

2.1.4. Sequenzierung der p21- und Pim-1-Konstrukte

Das Verfahren der eingesetzten zyklischen Sequenzierungsmethode beruht auf dem Prinzip nach Sanger und arbeitet nach der Kettenabbruchmethode mit Hilfe von Didesoxynucleotiden.

Ausgehend von einer DNA-Sequenz wurde durch Zugabe eines Sequenzierprimers, eines Nucleotidgemisches und einer DNA-Polymerase, die Synthese eines komplementären DNA-Stranges initiiert. Das Nucleotidgemisch enthielt neben den vier 2'-Desoxynucleotiden auch vier synthetische 2'-3'-Didesoxynucleotide,

sogenannte Terminatornucleotide, die zum Abbruch der Elongation führten, da ihnen die OH-Gruppe am 3'-C-Atom fehlte. Der Einbau eines Didesoxynucleotides war dadurch, abhängig von dem Konzentrationverhältnis zu den 2'-Desoxynucleotiden, statistisch verteilt. Die Sequenzierung während einer PCR-basierten Amplifikationsreaktion führte somit zu einem Satz von Amplifikationsfragmenten unterschiedlicher Länge, die alle mit einem Didesoxynucleotid endeten. Die vier unterschiedlichen Didesoxynucleotide waren bei dem hier benutzten Verfahren mit vier verschiedenen Fluorophoren markiert. Die einzelnen Fragmente wurden anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, wobei die jeweiligen Fluorophore mittels Laser angeregt und gemessen wurden. Die Fragmentlänge wurde hierbei auf eine Base genau ermittelt. Anhand der Folge der fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotide wurde abschließend die Nukleotidsequenz der Amplifikationsprodukte bestimmt. Durch die Überlagerung von sequenzüberlappenden Amplifikationsprodukten konnten auf diese Weise auch lange DNA-Sequenzen gelesen werden.

Für die PCR-Reaktion der zyklischen Sequenzierung wurde der „Big Dye v1.1 Cycle Sequencing kit“ von Applied Biosystems benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

PCR-Ansatz der Sequenzierung:

Plasmid-DNA	400ng
Verdünnungspuffer	2µl
BigDye Terminator Mix	4µl
Sequenzierprimer (100pmol/µl)	1µl
ad 20µl H ₂ O _{dest}	

Sequenzier-PCR-Programm:

1 min	96°C	} 25 Zyklen
10sec	96°C	
5sec	50°C	
4sec	62°C	
∞	4°C	

Zur Durchführung der PCR-Reaktion diente die PCR-Maschine „Mastercycler“ der Firma Eppendorf.

Es wurden folgende Primer für die Sequenzierung der p21-AFP- und Pim-1-AFP-Konstrukte benutzt, die von der Firma MWG synthetisiert wurden:

Pim-1-GFP und Pim-1-CFP:

Sense A	5'-AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC-3'
Sense B	5'-GGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGG-3'
Antisense A	5'-CCTCTCGAACCAGTCCAGGAGCC-3'
Antisense B	5'-GGTAGCGGCTGAAGCACTGCAC-3'

Pim-1-YFP:

Sense A	5'-AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC-3'
Sense B	5'-GGCTCCTGGACTGGTTCGAGAGG-3'
Antisense A	5'-CCTCTCGAACCAGTCCAGGAGCC-3'
Antisense B	5'-GCTATTTGCTGGGCCCCGGCGAC-3'
Antisense C	5'-GTTGTGGCGGATCTTGAAGTTC-3'

p21-CFP:

Sense A	5'-AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC-3'
Sense B	5'-GTGCAGTGCTTCAGCCGCTACC-3'
Antisense A	5'-GGTAGCGGCTGAAGCACTGCAC-3'
Antisense B	5'-GGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGG-3'

p21-YFP:

Sense A	5'-AGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC-3'
Sense B	5'-GAACTTCAAGATCCGCCACAAC-3'
Antisense A	5'-GTTGTGGCGGATCTTGAAGTTC-3'
Antisense B	5'-GGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGG-3'

Die Amplifikationsprodukte wurden mittels „sequence reaction cleanup kit“ (Milipore) gereinigt, wobei die Durchführung nach den Angaben des Herstellers erfolgte.

Die Sequenzbestimmung erfolgte mithilfe einer Sequenziermaschine (310 Genetic Analyser, Applied Biosystems) in der Abteilung Genomics & Bioinformatics der Schering AG.

Die Rohsequenzen der einzelnen p21-AFP- und Pim-1-AFP-Sequenzierreaktionen wurden unter Verwendung des Computerprogramms „Vector NTI“ aneinandergesetzt und die Gesamtsequenz der verschiedenen Konstrukte bestimmt. Die Ergebnisse der Sequenzierungen sind im Anhang dargestellt.

2.1.5. Punktmutagenese der p21- und Pim-1-Konstrukte

In diesem Schritt wurden enzymatisch inaktive Varianten der Pim-1 Konstrukte hergestellt. Hierzu wurde das Lys-67 der ATP-Bindungsdomäne in ein Methionin ausgetauscht. Das so modifizierte Pim-1-Konstrukt ist nicht mehr in der Lage ATP effizient zu binden. Zusätzlich wurde eine inaktive Pim-1-Variante hergestellt, indem das Lys-169, das ebenfalls zur ATP-Bindung beiträgt, in ein Methionin ausgetauscht wurde.

Die p21-Konstrukte enthielten nach der Klonierung noch das Stopkodon TAA. Um das vollständige Ablesen des p21 und AFP Genes zu gewährleisten, wurde das Stopkodon in ein Lys-Kodon (AAA) umgewandelt. Außerdem wurde das Thr-145 gegen ein Alanin ausgetauscht, damit die Phosphorylierung von p21 an diesem Aminosäurerest untersucht werden konnte.

Für die Punktmutagenese der p21- und Pim-1-Konstrukte wurde das „QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis kit“ der Firma Stratagene verwendet.

Es wurden folgende Primerpaare benutzt, die von der Firma MWG synthetisiert wurden.

A: Eliminierung des Stopkodons der p21-Konstrukte:

p21-Stopprimer sense: 5'-gaggaagcccaaaccgtcgacggtaccg-3'

p21-Stopprimer antisense: 5'-cggtagcctcgacggtttgggcttctc-3'

B: Austausch des Thr-145 in ein Alanin (T145A):

p21-T145A-Primer sense: 5'-cggcggcaggccagcatgacagatttctacc-3'

p21-T145A-Primer antisense: 5'-ggtagaaatctgtcatgctggcctgccgccg-3'

C: Austausch des Lys-67 in ein Methionin (K67M):

Pim-1-K67M-Primer sense: 5'-gccggtggccatcatgcacgtggagaaggaccg-3'

Pim-1-K67M-Primer antisense: 5'-cggtccttctccacgtgcatgatggccaccgcc-3'

D: Austausch des Lys-169 in ein Methionin (K169M):

Pim-1-K169M-Primer sense: 5'-gtgctacaccgcgacatcatggacgaaaacatccttatcg-3'

Pim-1-K169M-Primer antisense: 5'-cgataaggatgttttcgtccatgatgtcg-cggtgtagcac-3'

Mutagenese-PCR-Programm:

1min	95°C	} 18 Zyklen
50sec	95°C	
50sec	60°C	
5min	68°C	
∞	4°C	

Für die PCR-Reaktion wurde die PCR-Maschine „Mastercycler“ der Firma Eppendorf benutzt.

Die Amplifikationsprodukte wurden in XL 10-Gold ultrakompetente *E.coli* Zellen transformiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die transformierten Zellen wurden in einem Inkubationsschüttler für 1h bei 37°C inkubiert und je 75µl auf LB-Kanamycin-Agarplatten (Kanamycin 50µg/ml) ausgestrichen. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C im Inkubations schrank vermehrt. Alle p21-AFP- und Pim-1-AFP-Transformationsansätze zeigten Kolonien. Positive Klone wurden in 5ml Kulturansätzen vermehrt und die p21-AFP- und Pim-1-AFP-Plasmide mittels präparativer Plasmidisolierung isoliert.

Abschließend wurden alle DNA-Konstrukte nach der oben beschriebenen Methode sequenziert (Sequenzen siehe Anhang 6.2.3 bis 6.2.10)

2.1.6. Präparative Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Um eine ausreichende Menge an reiner Plasmid-DNA für Transformationsexperimente zu erhalten, wurde eine präparative Plasmidisolierung aus einer 250ml Bakterienkultur durchgeführt (Maxi Präparation). Verwendet wurde das „EndoFree Plasmid Maxi kit“ der Firma Qiagen.

Es wurden 250ml LB-Medium (50µg/ml Kanamycin) mit transformierten XL Gold-10 Bakterien angeimpft und über Nacht kultiviert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation in einem GS3-Rotor für 20min bei 5000rpm geerntet. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 10ml P1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen maximal 5min mit 10ml Aufschlußpuffer (P2) lysiert. Der Aufschlußpuffer enthielt SDS und NaOH. Der Zusatz von SDS führte zur Denaturierung zellulärer Proteine, wobei NaOH die Zelllyse und die Denaturierung von chromosomaler DNA und von Plasmid-DNA bewirkte. Durch Zugabe von 10ml kaltem Neutralisationspuffer (P3) wurde die Plasmid-DNA, die unter Hochsalzbedingungen in Lösung blieb, renaturiert. Im Gegensatz dazu konnte die chromosomale DNA auf Grund ihrer Größe nicht renaturieren und verblieb zusammen mit den denaturierten Proteinen im Präzipitat. Der Überstand des Lyseansatzes wurde über eine Säule filtriert. Der filtrierte Überstand wurde mit 2,5ml ER-Puffer („endotoxin removal buffer“) versetzt und anschließend für 30min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt bewirkte den Abbau von im Überstand vorhandenen Endotoxinen. Bei Endotoxinen handelt es sich um Lipopolysaccharide, einer Komponente der Zellmembran von Gram negativen Bakterien. Endotoxine können später die isolierte Plasmid-DNA kontaminieren und mussten deshalb in diesem Schritt entfernt werden. Der Überstand wurde anschließend in eine mit QBT-Puffer äquilibrierte DNA-Affinitätssäule überführt. Die Säule enthielt eine Silikatmatrix, an die die Plasmid-DNA bindet. Nach zweimaligem Waschen mit je 30 ml QC-Puffer wurde die Plasmid-DNA mit 15ml QN-Puffer eluiert. Zu den Elutionsfraktionen wurden 10,5ml Isopropanol gegeben. Der Ansatz wurde in einem SS34-Rotor für 30min bei 15000rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit 5ml 70%-igen Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 400µl TE-Puffer aufgenommen.

Lösungen:

P1 : 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A

P2 : 200mM NaOH, 1% (w/v) SDS

P3 : 2,8M KOAc, pH 5.5

QBT : 750mM NaCl, 50mM MOPS, pH 7, 15% Isopropanol (v/v), 0,15% TritonX-100

QC : 1M NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol (v/v)

QN : 1,6M NaCl, 50mM MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol (v/v)

TE : 10mM Tris-HCL, pH 8,0, 1 mM EDTA

2.2. Biochemische Methoden

Biochemische Analysemethoden wurden angewendet, um die Funktionalität der exprimierten p21-AFP und Pim-1-AFP Fusionsproteine zu analysieren.

2.2.1. Immunpräzipitation der p21- und Pim-1-Konstrukte

Die Immunpräzipitation im „batch“-Verfahren stellt eine schnelle und effiziente Methode dar, um spezifische Proteine aus einem Zelllysat zu gewinnen. Hierbei erkennen Antikörper, die an Agarosekügelchen gekoppelt sind, ein spezifisches Antigen im Lysat, binden es und können anschließend mittels Zentrifugation als Präzipitatkomplex isoliert werden. Diese Methode wurde in dieser Arbeit benutzt, um exprimierte p21-AFP- und Pim-1-AFP-Fusionsproteine aus transfizierten, eukaryotischen Zellen zu gewinnen.

Transfizierte Zellen einer 162cm² großen Zellkulturflasche wurden geerntet (Methode siehe 2.3.1) und in 50ml Röhrchen (TPP) überführt. Mittels Zentrifugation wurden die Zellen für 8min bei 750rpm sedimentiert und mit 10ml PBS gewaschen. Das Zellpellet (ca. 1×10^7 Zellen) wurde mit 500µl RIPA-Puffer (Upstate) aufgenommen. Zusätzlich wurde dem Lysat 50µl Protease-Inhibitorcocktail (Sigma) zugefügt um spezifisch freigesetzte Proteasen und Aminopeptidasen zu inhibieren. Das Lysat wurde für 15min auf Eis inkubiert und danach bei 14.500rpm für 45min bei 4°C in einem SS-34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und anschließend noch einmal bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun alle löslichen Proteine und wurde für die Immunpräzipitationen (IP) eingesetzt.

IP der Pim-1 Konstrukte:

Die Pim-1-Konstrukte wurden über die N-terminalen c-Myc-Anhänge isoliert. Hierzu wurden dem Lysat 25µl Agarose-Beads (BD) zugefügt, an denen monoklonale anti-c-Myc-Antikörper kovalent gebunden waren. Die Antigen/Antikörper-Bindung erfolgte in einem „Überkopf-Schüttler“ für 18h bei 4°C. Danach wurden die Agarose-Beads und die an ihnen gebundenen Pim-1-AFP-IP-Komplexe, mittels Zentrifugation bei 2000rpm für 5min bei 4°C in einer Tischzentrifuge (BioFuge-fresco, Heraeus) sedimentiert und der Überstand abgenommen. Die Agarose-Beads wurden anschließend mit 3ml Waschpuffer gewaschen und bei gleichen Bedingungen noch einmal zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pim-1-AFP IP-Komplexe in 80µl PBS aufgenommen.

Jeweils 1µl der aufgenommenen Pim-1-AFP-IP-Komplexe wurde mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht.

IP der p21 Konstrukte:

Für die IP von p21-AFP wurde ein monoklonaler anti-p21-Antikörpermix (Upstate) verwendet. Die Isolierung des Antigen/Antikörper-Komplexes aus dem Lysat erfolgte über die Interaktion der Fc-Domäne des p21-Antikörpers mit Protein-G, das an Agarose-Beads gekoppelte war (Firestone and Winguth, 1990). Zu diesem Zweck wurden dem Lysat 25µl Protein-G-Agarose-Beads (KPL) und 2µg anti-p21-Antikörper hinzugefügt. Die Antigen/Antikörper/Protein-G-Agarose-Bindung fand in einem „Überkopf-Schüttler“ für 18h bei 4°C statt. Danach wurden die p21-AFP-IP-Komplexe, in einer Zentrifuge (BioFuge-fresco, Heraeus) bei 2000rpm für 5min bei 4°C sedimentiert und der Überstand abgenommen. Die Agarose-Beads wurden anschließend mit 3ml Waschpuffer gewaschen und ein zweites mal bei 2000rpm für 5min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die p21-AFP-IP-Komplexe in 80µl PBS aufgenommen.

Jeweils 1µl der aufgenommenen p21-AFP-IP-Komplexe wurde mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht.

Lösung:

Waschpuffer: PBS (Gibco), 0,1% Trito-x-100 (Merck)

2.2.2. SDS-Gelelektrophorese

Diese Methode wird verwendet, um einzelne Proteine eines Proteingemisches anhand ihrer Größe in einem Gel elektrophoretisch zu fraktionieren. Hierbei wird das negativ geladene Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) eingesetzt, das an die Proteine bindet und so negativ geladene SDS-Proteinkomplexe mit einem konstanten Ladungs- zu Masseverhältnis bildet. Zusätzlich denaturiert SDS die Proteine und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen, was dazu führt, dass sich die SDS-Proteinkomplexe der einzelnen Proteine nur noch in ihrer Größe unterscheiden. Im elektrischen Feld der SDS-Gelelektrophorese wandert der negativ geladene SDS-Proteinkomplex zur Anode. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer durchlässigen Polyacrylamidmatrix die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrer Größe.

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteingemische (p21-AFP und Pim-1-AFP IP-Komplexe) wurden in 4-12%-igen Bis-Tris-Gradientengelen (NuPage-Novex, Invitrogen) aufgetrennt. Nach Einbau der Gele in die entsprechende „XCell SureLock Mini Cell“ Elektrophoresekammer (Invitrogen) wurde diese mit MES-Laufpuffer (Invitrogen) gefüllt.

Proteinansatz:

Proteinprobe	1µl
NuPage LDS 4x Probenpuffer	2,5µl
NuPage 10x Reducing Agent	1µl
H ₂ O _{dest}	5,5µl

Die Proteinansätze wurden für 10min bei 70°C inkubiert. Die denaturierten und reduzierten Proteinproben wurden anschließend auf die Gele geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200V (konstant) für ca. 30 bis 45min.

2.2.3. Western Blot

Beim sogenannten „Blotten“ werden die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran überführt, auf der sie später analysiert werden können. In den durchgeführten Experimenten bestand die Membran aus Nitrozellulose (Invitrogen) mit einer Porengröße von 0,45µm. Das elektrophoretische Verfahren wurde in einem

„XCell II Blot Module“ (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Proteintransfer verlief bei konstanten 30V für eine Stunde.

Vor der Detektion der gesuchten Proteine mussten noch die unbesetzten Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran mit Blockierlösung abgesättigt werden. Hierzu wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit BSA-Blockierlösung inkubiert. Der Nachweis der geblotteten p21-AFP und Pim-1-AFP Fusionsproteine geschah mithilfe des „WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection kit“ (anti-maus und anti-Kaninchen) der Firma Invitrogen. Zunächst wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem gewünschten ersten Antikörper inkubiert und anschließend dreimal für 5min mit 20ml Waschpuffer gewaschen.

Zum Nachweis des gebundenen ersten Antikörpers wurde die Membran für 30min mit einem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt war. Die Detektion des Antigens gelang abschließend über eine Farbreaktion mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (Blake et al., 1984). Hierzu wird die Membran mit einem Entwicklungspuffer inkubiert, der die Substrate Nitroblau-Tetrazolium (NBT) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) der alkalischen Phosphatase enthält. Bei der Umsetzung der Substrate entsteht ein blauviolettes Präzipitat (Indigo/Diazoniumsalz). Die Farbreaktion setzte sofort ein und wurde beim Erreichen der gewünschten Färbung durch waschen mit 10ml Wasser gestoppt.

Pim-1-AFP-Detektion:

1. Antikörper: monoklonaler anti-c-Myc-Antikörper (Klon 9E10) aus der Maus (Sigma, #M 4439)
Verdünnung in Blockierlösung 1:1000, Endkonzentration: 2µg/ml

p21-AFP-Detektion:

1. Antikörper: monoklonaler anti-p21-Antikörpermix aus der Maus (Upstate, #05-345)
Verdünnung in Blockierlösung 1:1000, Endkonzentration: 1µg/ml

Lösung:

BSA-Blockierlösung: PBS (Gibco), 3% BSA (w/v) (Sigma), 0,1% Tween (Sigma)

2.2.4. Phosphorylierungsnachweis mittels Flashplate-Kinaseexperiment

Bei diesem Experiment wurde überprüft, ob die hergestellten Pim-1-WT-AFP Fusionsproteine enzymatisch aktiv sind.

In einer Kinasereaktion wurde ein biotinyliertes Histon-H3-Peptid unter Verwendung von [γ^{33}]-ATP durch Pim-1 phosphoryliert. Als Kinasen wurden dabei rekombinantes Pim-1-WT-GST (Upstate) in unterschiedlichen Konzentrationen bzw. der Pim-1-WT-GFP-IP-Komplex in verschiedenen Mengen verwendet.

Pim-1-WT-GST Kinasereaktionsansatz:

Pim-1	2 μ l
10x Reaktionspuffer	2,5 μ l
ATP-Substrat-Ansatz	5 μ l
H ₂ O _{dest}	15,5 μ l

Es wurde folgende Pim-1-WT-GST-Konzentrationsreihe im Experiment getestet: 0,8nM (1,25ng/25 μ l-Ansatz), 1,6nM (2,5ng/25 μ l-Ansatz), 3,23nM (5ng/25 μ l-Ansatz), 6,45nM (10 ng/25 μ l-Ansatz), 12,9nM (20ng/25 μ l-Ansatz), 25,8nM (40ng/25 μ l-Ansatz)

Pim-1-WT-GFP-IP-Komplex Kinasereaktionsansatz:

Pim-1	1, 5 oder 10 μ l
10x Reaktionspuffer	2,5 μ l
ATP-Substrat-Ansatz	5 μ l
H ₂ O _{dest}	ad 25 μ l

Folgende Mengen des Pim-1-WT-GFP-IP-Komplex wurden im Experiment getestet: 1 μ l IP-Komplex-Suspension, 5 μ l IP-Komplex-Suspension, 10 μ l IP-Komplex-Suspension.

Die Kinasereaktionen wurden als Triplikate in einer 384-Well-Mikrotiterplatte angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurde eine mit Streptavidin beschichtete 384-Well-Szintillationsplatte (Streptavidin FlashPlate HTA-Plus, Perkin Elmer) mit 50 μ l Stopplösung inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l Stopplösung abgenommen. Zum Stoppen der Kinasereaktion wurden 20 μ l des Ansatzes in die mit Stopplösung vorinkubierte FlashPlate überführt. Die Substrat-

Biotin/FlashPlate-Streptavidin Bindung erfolgte für 18h bei Raumtemperatur. Hierbei band mit ^{33}P markiertes biotinyliertes Histon-H3 Peptid an die Streptavidin beschichtete Oberfläche der Szintillationsplatte. Anschließend wurde der Ansatz entfernt, die Wells der Szintillationsplatte dreimal mit 50 μl Waschlösung gewaschen und mit 50 μl PBS gefüllt. Die vom ^{33}P -phosphoryliertem Substratpeptid emittierte radioaktive β^- -Strahlung wurde über die Szintillationsplatte in Fluoreszenzlichtblitze, so genannten „counts“, umgewandelt und mit einem Szintillationszähler gemessen. Die Anzahl der counts pro Minute (cpm) diente als Maß der Pim-1 abhängigen Substratpeptidphosphorylierung. Die Strahlung der Platten wurden für eine Minute mit einem TopCount-NXT (Mikrotiterplatten Szintillations- und Lumineszenzzähler, Packard Biosciences Company) gemessen.

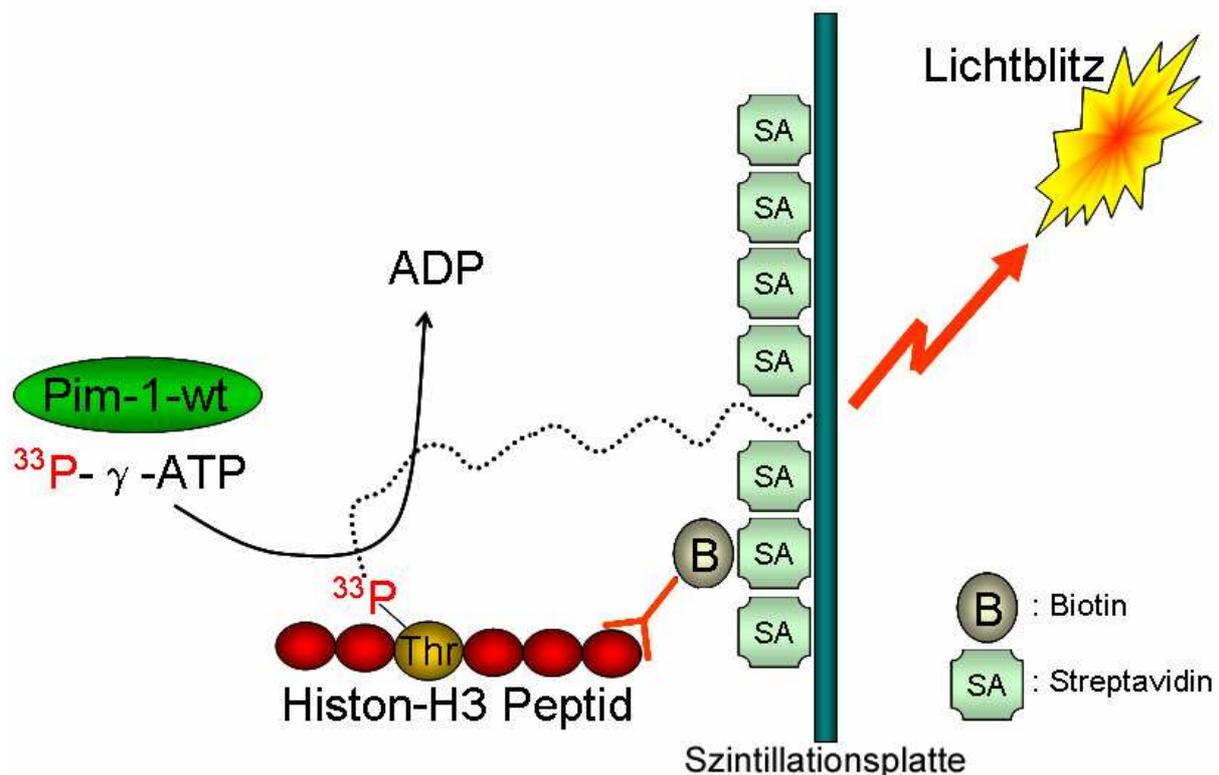


Abb. 4: Schematische Darstellung des FlashPlate Kinase Experimentes

In einer Kinasereaktion wurde ein biotinyliertes Histon-H3 Peptid unter Verwendung von $[\gamma^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ durch Pim-1 phosphoryliert. Anschließend band das biotinylierte Histon-H3 Peptid an die Streptavidin beschichtete Oberfläche einer Szintillationsplatte. Die Anzahl der counts pro Minute (cpm) diente als Maß der Pim-1 abhängigen Substratpeptidphosphorylierung.

10x Reaktionspuffer:

	Konzentration im Puffer	Endkonzentration
Hepes, pH 7,0 (Biochrom KG)	250mM	25mM
MnCl ₂ (Sigma)	10mM	1mM
MgCl ₂ (Sigma)	100mM	10mM
Na-Orthovanadat (Sigma)	1mM	0,1mM
Dithiothreitol (DTT) (Merck)	20mM	2mM
H ₂ O _{dest}	ad 5ml	

Zusätzlich wurde dem 10x Reaktionspuffer eine Proteaseinhibitorcocktail Tablette (complete Mini, EDTA-free, Roche) pro 5ml 10x Reaktionspuffer hinzugefügt.

5x ATP-Substrat-Ansatz:

	Konzentration im Puffer	Endkonzentration
ATP (Amersham Bioscience)	5µM	1µM
[γ ³³]-ATP (Perkin Elmer)	125nCi	25nCi
Histon-H3 Peptid (Upstate)	5µM	1µM
1x Reaktionspuffer	ad 500µl	

2x Stopplösung:

	Konzentration im Puffer	Endkonzentration
Triton-x-100 (Merck)	0,2 % (v/v)	0,1% (v/v)
ATP (Sigma)	50µM	25µM
EDTA (Sigma)	10mM	5mM
PBS (Gibco)	ad 5ml	

Die einzelnen Messpunkte wurden in das Programm „Excell“ (Microsoft) geladen und ausgewertet.

2.2.5. Phosphorylierungsnachweis mittels Autoradiographie

In diesem Experiment wurde die Pim-1 abhängige Phosphorylierung von rekombinantem p21 untersucht. Die Detektion der ³³P-Substratphosphorylierung erfolgte mittels Autoradiographie (Laskey, 1980).

In einer Kinasereaktion wird rekombinantes p21 unter Verwendung von [γ^{33}]-ATP durch Pim-1 phosphoryliert. Als Kinasen wurden dabei rekombinantes Pim-1-WT-GST (Upstate) oder der Pim-1-WT-GFP IP-Komplex verwendet.

Pim-1-WT-GST Kinasereaktionsansatz:

Pim-1	2 μ l (51,6nM Endkonzentration im Ansatz)
10x Reaktionspuffer	2,5 μ l
ATP-Ansatz	5 μ l
Substrat	2 μ l (1,63 μ M Endkonzentration im Ansatz)
H ₂ O _{dest}	13,5 μ l

Pim-1-WT-GFP-IP-Komplex Kinasereaktionsansatz:

Pim-1	10 μ l
10x Reaktionspuffer	2,5 μ l
ATP-Ansatz	5 μ l
Substrat	2 μ l (1,63 μ M Endkonzentration im Ansatz)
H ₂ O _{dest}	5,5 μ l

Die Kinasereaktion wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und mit 7 μ l SDS-Probenpuffer abgestoppt. Anschließend wurde der Ansatz für 10min bei 70°C inkubiert und je 30 μ l auf ein 4-12%i-ges NuPage Bis-Tris Gel aufgetragen und elektrophoretisch fraktioniert. Die Gele wurden unter Vakuum getrocknet und auf einen Film aufgelegt. Der entwickelte Film zeigte die Position der mit 33 P-phosphorylierten Proteine an.

10x Reaktionspuffer:

	Konzentration im Puffer	Endkonzentration
Hepes, pH 7,0 (Biochrom KG)	250mM	25mM
MnCl ₂ (Sigma)	10mM	1mM
MgCl ₂ (Sigma)	100mM	10mM
Na-Orthovanadat (Sigma)	1mM	0,1mM
Dithiothreitol (DTT) (Merck)	20mM	2mM
H ₂ O _{dest}	ad 5ml	

Zusätzlich wurde dem 10x Reaktionspuffer eine Proteaseinhibitorcocktailtablette (complete Mini, EDTA-free, Roche) pro 5ml 10x Reaktionspuffer hinzugefügt.

Substrat-Ansatz:

Rekombinantes p21 (SantaCruz) 1µg/µl
1x Reaktionspuffer

5x ATP-Substrat-Ansatz:

	Konzentration im Puffer	Endkonzentration
ATP (Amersham Bioscience)	62,5µM	1µM
[γ^{33}]-ATP (Perkin Elmer)	100µCi	5µCi
1x Reaktionspuffer	ad 100µl	

SDS-Probenpuffer: NuPAGE LDS Sample Buffer (4X) (Invitrogen)

2.3. Zellbiologische Methoden

Zellbiologische Methoden wurden ausgenutzt, um den zellzyklusabhängigen Phosphorylierungszustand von endogenem p21 und die Interaktion zwischen p21 und Pim-1 in eukaryotischen Zellen zu untersuchen.

2.3.1. Zellkultur

Um endogene als auch rekombinante Proteine in lebenden und fixierten Zellen untersuchen zu können, wurden verschiedene adhärente Zelllinien in Kultur gehalten. Dabei handelte es sich um drei humane Zellkulturlinien: HeLa (aus Zervixkarzinom), PC3 (aus Prostatakarzinom) und MCF-7 (aus Mamakarzinom). Zusätzlich wurden CHO Zellen kultiviert. Diese stammen ursprünglich aus den Ovarien chinesischer Hamster.

Alle Zelllinien wurden in 175cm² Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit vermehrt und bei 80%-iger Konfluenz entsprechend der Teilungsraten 1:5 bis 1:65 gesplittet. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 10ml PBS gewaschen und mit 2ml Trypsin (Gibco) benetzt. Überschüssiges Trypsin wurde entfernt und die Zellen für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Das vollständige Ablösen der behandelten Zellen wurde im Mikroskop überprüft. Anschließend wurden

die Zellen in das zugehörige Kulturmedium aufgenommen und im entsprechenden Volumenverhältnis in neue Zellkulturflaschen transferiert.

HeLa Kulturmedium:

Dulbecco's Medium (Gibco), 2mM Glutamin (Gibco), Penicillin 100U/ml (Gibco), 100µg/ml Streptomycin (Gibco) und 10% (v/v) fötales Kälberserum (PAA)

PC3 Kulturmedium:

RPMI 1640 Medium (Gibco), 2mM Glutamin (Gibco), Penicillin 100U/ml (Gibco), 100µg/ml Streptomycin (Gibco) und 10% (v/v) fötales Kälberserum (PAA)

MCF-7 Kulturmedium:

RPMI 1640 Medium (Gibco), 2mM Glutamine (Gibco), Penicillin 100U/ml (Gibco), 100µg/ml Streptomycin (Gibco) und 10% (v/v) fötales Kälberserum (PAA), 0,1nM Östradiol (Sigma) und 0,2 U/ml Insulin (Sigma)

CHO Kulturmedium:

Ham's F12 Medium (PAA), 2mM Glutamine (Gibco), Penicillin 100U/ml (Gibco), 100µg/ml Streptomycin (Gibco) und 3% (v/v) fötales Kälberserum (PAA)

Kulturmedium für Pim-1-GFP stabil transfizierte CHO Zellen:

Ham's F12 Medium (PAA), 2mM Glutamine (Gibco), Penicillin 100U/ml (Gibco), 100µg/ml Streptomycin (Gibco), 3% (v/v) fötales Kälberserum (PAA) und 1mg/ml Geneticin (Gibco)

2.3.2. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Das Transfektionsverfahren beruht auf der Methode der Lipofektion (Felgner et al., 1987). Hierbei bildet ein Lipidgemisch in wässriger Umgebung Liposomen, die hinzugefügte DNA-Plasmide einschließen. Die DNA-Plasmid tragenden Liposomen können anschließend mit der Plasmamembran von Zellen fusionieren und geben dadurch die DNA-Plasmide an die Zelle weiter. Die auf den Plasmiden kodierten Gene können nun von der Zelle abgelesen und die entsprechenden Proteine exprimiert werden.

HeLa, PC3, MCF-7 oder CHO Zellen wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner µclear Platte) in 200µl des entsprechenden Kulturmediums ausgesät. Die Zellzahl pro Well variierte hierbei zelltypabhängig zwischen 3000 und 10.000 Zellen. Ziel war es, dass die Zellen nach ca. 18h unter Kulturbedingungen den Wellboden zu 50-60% bedeckten. Das Kulturmedium wurde abgenommen, und die Zellen jeweils mit 100µl serumfreien Opti-MEM-I Medium (Gibco) pro Well überschichtet. Anschließend wurden 10µl Transfektionsansatz pro Well (75ng DNA) hinzugegeben und mit 90µl Opti-MEM-I Medium auf ein Gesamtvolumen von 200µl pro Well aufgefüllt. Die Zellen wurden unter Kulturbedingungen für 6h im Brutschrank inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde abgenommen und die Zellen mit 200µl Kulturmedium überschichtet. Die behandelten Zellen wurden abschließend für 18h unter Kulturbedingungen im Brutschrank inkubiert.

Transfektionsansatz (75ng DNA/10µl):

Opti-MEM-I Medium	87,5µl	} 20min Vorinkubation
FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Roche)	2,25µl	
DNA-Plasmid	750 ng in 10µl H ₂ O _{dest}	

Die Kotransfektion von zwei verschiedenen Expressionsplasmiden (Pim-1/p21 Kotransfektion) erfolgte nach derselben Methode. Hierbei wurden jeweils 37,5ng der jeweiligen DNA pro Well verwendet.

2.3.3. Entwicklung von Pim-1-WT-GFP stabil transfizierten CHO Zellen

Mit folgender Methode werden Zellen selektiert, die bei der oben beschriebenen Transfektionsmethode die Plasmid-DNA aufgenommen und stabil in ihr Genom integriert haben. Hierzu muß das verwendete DNA-Plasmid einen dominanten Selektionsmarker besitzen. Dabei handelt es sich um das Gen, das die Aminoglykosid-Phosphotransferase kodiert und nach Expression Resistenz gegen Geneticin vermittelt. Geneticin-G418-Sulfat ist ein Aminoglykosidantibiotikum und in seiner Struktur ähnlich dem Gentamycin, Neomycin und Kanamycin. Als ein Analogon zu Neomycin-Sulfat inhibiert es die Funktion des 80S-Ribosoms und somit die Proteinexpression eukaryotischer Zellen (Wagman et al., 1974; Bar-Nun et al., 1983).

CHO Zellen wurden mit dem Pim-1-WT-GFP-DNA-Plasmid transfiziert und für zwei Tage im Kulturmedium vermehrt. Anschließend wurde dem Kulturmedium Geneticin-G418-Sulfat (Gibco) in einer Konzentration von 1mg/ml für die klonale Selektion hinzugefügt. Die Zellen wurden für 2 Wochen unter Selektionsbedingung kultiviert und dann mittels „limited dilution“ auf 5 Zellen pro ml Selektionsmedium verdünnt. Je 200µl der Zellsuspension wurden in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät, sodass sich theoretisch eine Zelle in einem Well befindet. Die isolierten Zellen konnten auf diese Weise getrennt voneinander weiterkultiviert werden, eigene Kolonien bilden und genetisch einheitliche Zellklone bilden, die mit Pim-1-WT-GFP stabil transfiziert waren.

2.3.4. Fluoreszenzfärbung von Chromatin

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (Invitrogen) wurde zum Anfärben von Chromatin in eukaryotischen Zellen genutzt. Hierbei handelt es sich um einen zellmembranpermeablen Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch in AT-reiche Regionen doppelsträngiger DNA interkaliert und sie so markiert. Der gebundene Farbstoff konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden, (Downs and Wilfinger, 1983).

Fixierte Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit 200µl PBS gewaschen und anschließend mit 50µl Hoechst 33342 Färbelösung (6,5µM) für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Farbstoffmoleküle wurden durch dreimaliges Waschen mit 100µl PBS entfernt und die Zellen in 200µl PBS mit einem Fluoreszenzmikroskop gemessen.

Hoechst 33342 Färbelösung:

Hoechst 33342 (Invitrogen): 4µg/ml in PBS (6,5µM)

2.3.5. Immunfluoreszenzmarkierung zellulärer Proteine

Antigene eukaryotischer Zellen können mit Antikörpern, die mit fluoreszierenden Molekülen konjugiert sind, markiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Bei einer direkten Markierung ist der eingesetzte Antikörper unmittelbar mit dem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Bei einer indirekten Markierung besitzt der gegen das Antigen gerichtete Antikörper kein Farbstoffmolekül. Ein sekundärer,

gegen den Erstantikörper gerichteter Zweitantikörper ist mit einem Fluoreszenzmarker konjugiert und markiert somit indirekt, das gewünschte Antigen. Die kultivierten adhärennten Zellen einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4%-iger Paraformaldehydlösung (PFA) für 30min bei Raumtemperatur fixiert. Hierbei vernetzte PFA die zellulären Proteine durch Methylenbrückenbildung zwischen reaktiven Gruppen der Proteine. Somit wurde der zelluläre Zustand im Moment der Fixierung „eingefroren“. Es handelte sich um eine relativ milde Fixierungsmethode, die Proteinstrukturen weitgehend unverändert liess. Viele der so entstandenen Quervernetzungen zwischen den Proteinen waren reversibel und konnten durch die Behandlung mit nachfolgenden Puffern wieder aufgelöst werden. Um eine irreversible Fixierung zu gewährleisten, wurden die Zellen nach ihrer Permeabilisierung nochmals mit Methanol fixiert. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Permeabilisierungslösung für 10min bei -20°C inkubiert. Die Permeabilisierungslösung enthielt das Detergenz Triton-x-100, das mit zellulären Lipidmembranen interagiert, deren Integrität zerstörte und so die Zelle für große Moleküle wie Antikörper permeabel machte. Nach einer Inkubation für 5min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit -20°C kaltem, 100%-igen Methanol für 5min bei -20°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit Blockierungslösung-I gewaschen. Um unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen während der Antigen-Antikörper-Bindung zu minimieren, wurden freie Interaktionsstellen mit einem Überschuss an Rinderserumalbumin (BSA) abgesättigt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Blockierungslösung-I für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im nachfolgenden Schritt, wurden die Erstantikörper in entsprechenden Konzentrationen (siehe unten) zu den Zellen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Antigen-Antikörper-Bindung wurden die Zellen zweimal mit Blockierungslösung-I gewaschen. Um unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen des Zweitantikörpers mit zellulären Proteinen zu minimieren, wurden freie Interaktionsstellen mit einem Überschuss an unspezifischem Immunglobulin des entsprechenden Wirtstieres des Zweitantikörpers abgesättigt. Hierzu wurden die Zellen mit Blockierungslösung-II für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zweitantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Blockierungslösung-I und PBS gewaschen und das Chromatin mit Hoechst 33342 angefärbt.

Fixierungslösung:

Paraformaldehyd (Sigma) 4% (v/v) in PBS (Gibco) pH 7,4

Permeabilisierungslösung:

Triton-x-100 (Merck) 0,5% (v/v) in PBS (Gibco)

Blockierungslösung-I:

Triton-x-100 (Merck) 0,5% (v/v) in PBS (Gibco)

BSA (Sigma) 1% (w/v)

Primär Antikörper:

monoklonaler anti-p21 Antikörpermix aus der Maus (Upstate, #05-345)

Verdünnung in Blockierungslösung-I 1:100

Endkonzentration: 10µg/ml

polyklonaler anti-p-p21-Thr145 Antikörper aus dem Kaninchen (Santa Cruz, #sc-20220-R)

Verdünnung in Blockierungslösung-I 1:25

Endkonzentration: 8µg/ml

polyklonaler anti-p-p21-Ser146 Antikörper aus der Ziege (Santa Cruz, #sc-12902)

Verdünnung in Blockierungslösung-I 1:25

Endkonzentration: 8µg/ml

monoklonaler anti-c-myc Antikörper aus der Maus (Sigma, #4439)

Verdünnung in Blockierungslösung-I 1:50

Endkonzentration: 40µg/ml

monoklonaler anti- α -Tubulin Antikörper aus der Maus, FITC konjugiert (Sigma, #2168)

Verdünnung in Blockierungslösung-I 1:50

monoklonaler anti- γ -Tubulin Antikörper aus der Maus (Sigma, #6557)

Verdünnung in Blockierungslösung-I 1:50

polyklonaler anti-phospho-Histon-H3 (Ser10) Antikörper aus dem Kaninchen
 (Upstate, #06-570)
 Verdünnung in Blockierungslösung-I 1:200
 Endkonzentration: 10µg/ml

Blockierungslösung-II:

Triton-x-100 (Merck)	0,5% (v/v) in PBS (Gibco)
BSA (Sigma)	1% (w/v)
Immunglobulin (Dianova)	20µg/ml

Sekundär Antikörper:

Sekundär Antikörper Cy2, Cy3 oder Cy5 konjugiert (Jackson ImmunResearch)
 Verdünnung in Blockierungslösung-II 1:50
 Endkonzentration: 20µg/ml

Fluorophore und verwendete Filter:

	Absorptionsfilter	Emissionsfilter
Hoechst 33342	360/40	465/30
pECFP	405/20	465/30
pEGFP	470/35 oder 500/20	535/30 oder 535/60
Cy2	470/35	535/60
pEYFP	500/20	535/30
Cy3	535/40	610/60
Cy5	615/30	700/60

Für die Fluoreszenzaufnahmen im Discovery-1 (Molecular Devices) wurden Filter der Firma Chroma Technologies Corp. verwendet.

2.3.6. Lebendzellbeobachtung transfizierter Zellen

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht, AFP markierte Proteine in lebenden eukaryotischen Zellen unter Kulturbedingungen zu beobachten.

Für die Lebendzellbeobachtung wurden Pim-1-WT-GFP stabil transfizierte CHO Zellen auf 96-Well-Mikrotiterplatten (Greiner, sensoplate) transferiert. Diese Mikrotiterplatten besitzen einen dünnen, planen Glasboden (Dicke von 175µm) mit hoher optischer Transparenz, der für Fluoreszenzmikroskopie geeignet ist. Die

ausgesäten Zellen wurden für 18h unter Kulturbedingungen im Brutschrank vermehrt. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte auf ein Axiovert-200 Fluoreszenzmikroskop aufgesetzt, das mit einer Inkubationskammer für Lebendzellbeobachtung ausgestattet war. Die Lebendzellbeobachtung wurde über einen Zeitraum von 24h durchgeführt, wobei alle 5min ein Phasenkontrastbild und ein GFP-Fluoreszenzbild desselben Bildausschnittes aufgenommen wurden.

2.3.7. Test von Pim-1-Inhibitoren im zellulären Assay

Kleine Moleküle sind in der Lage, an Enzyme (z.B. Kinasen) zu binden und sie zu inaktivieren. Um solche Substanzen zu finden und zu charakterisieren, werden heute meist biochemische *in vitro* Assays eingesetzt. Hierzu wird eine Enzym-Substratreaktion durch definierte experimentelle Bedingungen optimiert und ein entsprechender „read out“ Parameter wie z.B. die Substratphosphorylierung als Maß der Enzymaktivität festgelegt. Der Effekt von Substanzen auf die Enzymaktivität kann anhand von Veränderungen der Substratphosphorylierung erkannt werden.

Um solche Substanzen jedoch auch unter zellulären Bedingungen testen zu können, wurde eine Methode entwickelt, die eine Messung der Enzym-Substratreaktion in lebenden Zellen zulässt. In diesem Experiment wurde der Effekt von Substanzen auf die von Pim-1-WT-GFP abhängige Phosphorylierung des endogenen p21 untersucht. Hierzu wurden zunächst eukaryotische Zellen mit dem Pim-1-WT-GFP Expressionsplasmid in 96-Well-Mikrotiterplatten transfiziert (siehe 2.3.2) und für 18h unter Kulturbedingungen vermehrt. Anschließend wurden pro Well 100µl Kulturmedium abgenommen und 100µl Substanzlösung (gelöst im Kulturmedium) in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Da die Substanzen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst waren, wurde zusätzlich eine DMSO-Kontrolle aufgetragen, um mögliche Effekte des DMSO auf die Enzymreaktion oder die Zelle selbst bestimmen zu können. Die Zellen wurden mit den Substanzen unter Kulturbedingungen für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die behandelten Zellen fixiert, die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung bestimmt, und das Chromatin der Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt (siehe 2.3.4). Jeweils 9 Bildausschnitte pro Well wurden in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen mit einem automatisierten Mikroskop (Discovery-1, Molecular Devices) aufgenommen und die von Pim-1 abhängige Phosphorylierung des endogenen p21 am Thr-145 mittels „High-Content Analysis“ (HCA) Methode

ausgewertet (siehe 2.4.2). Die IC_{50} Werte wurden mithilfe des Programms GraFit 5.0.6 (Erithacus software Limited) bestimmt und graphisch dargestellt.

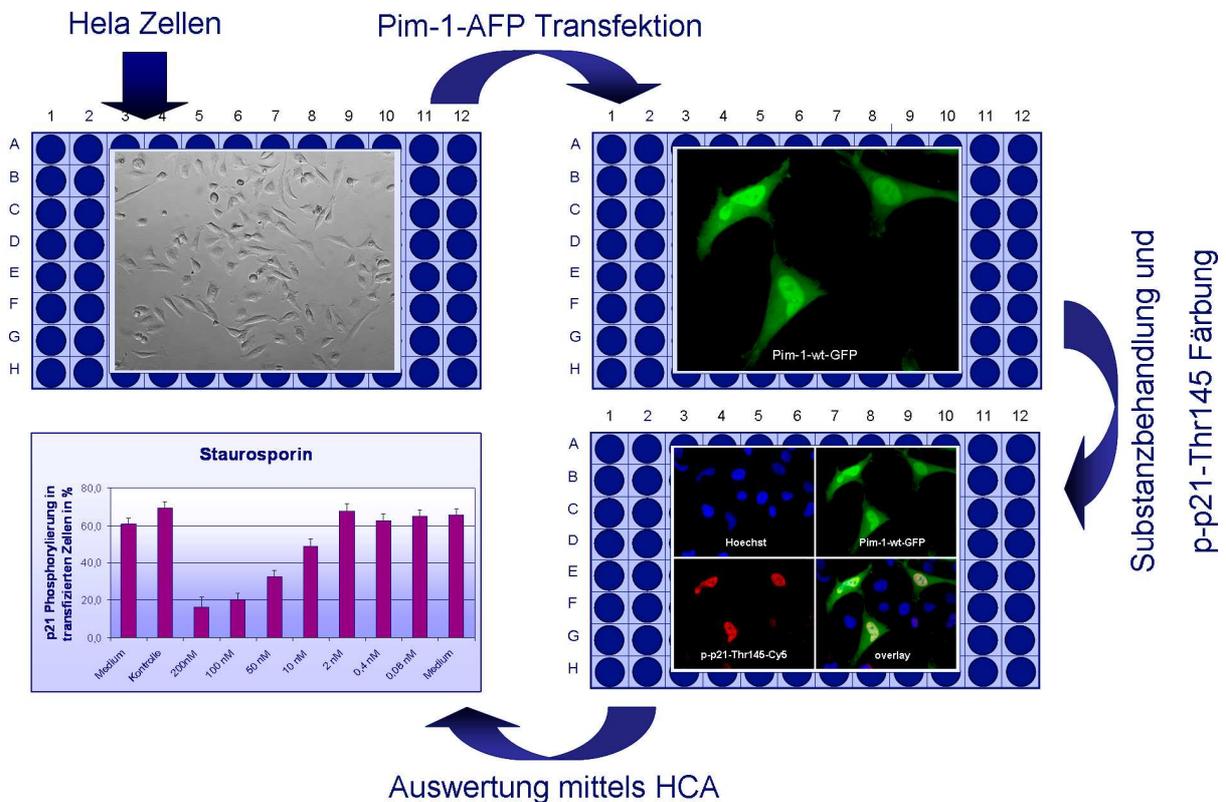


Abb. 5: Test von Pim-1 Inhibitoren im zellulären Assay

HeLa Zellen wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und anschließend mit dem Pim-1-WT-GFP-Expressionsplasmid transfiziert. Die Zellen wurden für 6h mit potentiellen Pim-1 Inhibitoren behandelt und die Phosphorylierung von p21 am Thr-145 mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. Die Phosphorylierung wurde mithilfe von automatisierten Bildanalysealgorithmen ausgewertet und die Wirkung der Inhibitoren bestimmt.

2.4. „High-Content Analysis“

2.4.1. Einleitung

Mit der „High Content Analysis“-Methode (HCA) können zelluläre und subzelluläre Ereignisse statistisch abgesichert quantifiziert werden.

HCA ermöglicht, eine große Anzahl digitaler, hochauflösender Fluoreszenzbilder in einem definierten, automatisierten Mikroskopieprozess aufzunehmen und auszuwerten. Die fundierte Auswertung solcher Bildserien erfolgt über automatisierte Bildanalyseverfahren. Dabei handelt es sich um Computeralgorithmen, die zelluläre Ereignisse aufgrund von Fluoreszenzsignalen erkennen können. Aus einer großen

Zahl von Zellen können einzelne Signale identifiziert und miteinander verglichen werden. HCA liefert eine statistisch abgesicherte Analyse auch seltener zellulärer Ereignisse auf Einzelzellebene.

HCA kann insgesamt in drei Arbeitsprozesse unterteilt werden:

Im ersten Schritt werden zellbiologische Methoden angewendet, mit deren Hilfe Strukturen innerhalb der Zellen markiert werden. Die Qualität dieser fluoreszenzbasierten Färbetechniken ist von entscheidender Voraussetzung für die Qualität der nachfolgenden Bildanalyse. Hierbei muss das Verhältnis von Signalintensität zum Hintergrund bei allen Zellen eines experimentellen Ansatzes möglichst homogen sein, damit sie später durch automatische Bildanalyseverfahren fehlerfrei erkannt werden.

Im zweiten Arbeitsprozess wird das Fluoreszenzsignal mittels automatisierter Fluoreszenzmikroskopie erfasst und als digitales Bild archiviert. Für die digitale Erfassung der Fluoreszenzbilder wird der Mikroskopieprozess automatisiert. Hierzu wird ein inverses Mikroskop benutzt, dessen Einzelkomponenten mithilfe eines Computers gesteuert werden. Zu diesen Komponenten gehört ein automatisierter x/y-Tisch, um definierte Bereiche einer Zellkulturplatte ansteuern zu können, und ein software- oder laserbasierter Autofokusprozess zur Bestimmung der exakten Fokusebene. Für die Aufnahme verschiedener Fluoreszenzsignale eines identischen Bereiches müssen zusätzliche Komponenten, wie Absorptions-, Emissionsfilter und die Fotoblende für die Belichtungseinstellung über den Computer angesteuert werden können. Die Voraussetzung für die computerunterstützte Auswertung zellulärer Fluoreszenzsignale sind hochaufgelöste Digitalbilder, die verschiedene Signalintensitäten exakt darstellen. Hierzu werden gekühlte monochromatische CCD-Kameras (charged-coupled device) verwendet, die Intensitätsunterschiede im 12-bit Modus darstellen und somit 4096 verschiedene Graustufen unterscheiden können. Dies erlaubt eine präzise Darstellung und anschließende Analyse der Fluoreszenzsignale. Alle Einstellungen des Mikroskopieprozesses werden vorher im Steuerprogramm als „Makro“ (Metaprogramm) definiert und danach vom Gerät selbstständig abgearbeitet.

Der dritte Arbeitsschritt umfasst die Entwicklung von Bildanalysealgorithmen zur phänotypischen Signalerkennung und deren statistischen Auswertung. Das Programm Metamorph (Molecular Devices) bietet hierfür eine Arbeitsumgebung zur

Bilddarstellung und Bildbearbeitung, sowie eine Entwicklungsoberfläche zur eigenständigen Programmierung von Bildanalysealgorithmen.

Zunächst wird ein Intensitätsschwellenwert festgelegt, der Signale als „positiv erkannt“ definiert. Signalintensitäten unter diesem Schwellenwert gelten als Hintergrundrauschen. Im nachfolgenden Schritt werden morphologische Parameter definiert. Bildanalysealgorithmen arbeiten mit einer Vielzahl dieser Parameter, die der Benutzer über Variablen definiert. Grundsätzlich sind morphologische Parameter, wie Größe und Form des Signals, von Signalintensitätsparametern, wie Intensitätsstärke und Intensitätsverteilung, zu unterscheiden. Der Algorithmus durchsucht anschließend die gesamte Bilderserie anhand dieser Definition und gibt an, welche und wieviele Zellen in einem Bild bzw. in der gesamten Bilderserie dafür positiv sind. Da in einem digitalen Bild der Ort eines jeden Signals über seine Pixelkoordinaten definiert ist, können unterschiedliche Fluoreszenzsignale derselben Bildkoordinate miteinander korreliert werden. Dazu werden Signale verschiedener Fluoreszenzen im Binärcode übereinander gelegt. Auf diese Weise können Kollokalisationsstudien durchgeführt werden. Es ist aber zu beachten, dass Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlänge eines identischen Ursprungs im optischen System des Mikroskops gebeugt werden. Dadurch fallen sie nicht immer auf die gleichen lichtsensorischen Zellen (Pixel) der digitalen Kamera und werden im digitalen Bild auf zueinander verschobenen Pixeln dargestellt („Pixelshift“). Da die Beugung für jede Wellenlänge immer identisch ausfällt, kann anhand von Korrekturbildern der Pixelshift festgestellt und automatisch für jedes Bild korrigiert werden. Die korrekte Zuordnung von Pixeln verschiedener Fluoreszenzsignale ist somit gewährleistet. Der Ort und die Anzahl definierter Signale mit verschiedenen Morphologie- und Intensitätsparametern sowie ihre Korrelation werden vom Bildanalysealgorithmus protokolliert. Dadurch können verschiedene Signale statistisch untersucht und anhand der definierten Parameter klassifiziert werden. Die Entwicklung solcher Bildanalysealgorithmen und die anschließende Datenanalyse sind in ihrem Aufwand und ihrer Komplexität von der zellbiologischen Fragestellung abhängig.

Grundsätzlich können mit dieser Methode alle Arten von digitalen Bildsignalen analysiert werden, die mit Fluoreszenzmikroskopen erfasst werden können. Kontrastprobleme der transparenten Fluoreszenzsignale und das Auflösungsvermögen der Mikroskope begrenzen die Visualisierung von

(sub-)zellulären Strukturen oder Prozessen. Mit dem Lichtmikroskop lassen sich heute subzelluläre Strukturen mit einer minimalen Größe von 100nm auflösen.

2.4.2. Algorithmus A: Phosphorylierung von endogenem p21 durch Pim-1-AFP

Mit diesem Bildanalysealgorithmus konnte die Thr-145-Phosphorylierung von endogenem p21 durch Pim-1-WT-GFP im Zellkern quantifiziert werden. Der Algorithmus wurde in der Entwicklungsumgebung des Programms MetaMorph 6.2 (Molecular Devices) erstellt. Zusätzlich konnten mit diesem Programm die Wirkungen von Pim-1 spezifischen Inhibitoren untersucht werden (siehe 2.3.7).

Für dieses Experiment wurden HeLa Zellen auf 96-Well-Mikrotiterplatten (μ -clear, Greiner) ausgesät und mit Pim-1-WT-GFP, Pim-K67M-GFP oder GFP-N1 transfiziert (Methode siehe 2.3.2). Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen. Anschließend wurde die Phosphorylierung von endogenem p21 am Thr145 mit einem anti-p-p21-Thr145 Antikörper und einem Cy3 konjugierten Zweitantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit dem Chromatinfarbstoff Hoechst 33342 (Invitrogen) markiert. Mithilfe des automatisierten Fluoreszenzmikroskopes Discovery-1 (Molecular Devices) wurden je 9 Bildausschnitte pro Well in den Fluoreszenzkanälen für Hoechst 33342, pEGFP und Cy3 mit einem 10x Plan Fluor Objektiv (Nikon) aufgenommen. Pro Transfektionsexperiment wurden 10 Wells aufgenommen.

Die erstellten Bilddaten wurden mit dem Bildanalysealgorithmus analysiert, der in den Abbildungen 6 bis 11 erklärt wird:

Kerne werden lokalisiert und eine Kernmaske erstellt

- 1: Threshold Image("HOE", 160, 4095)
- 2: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Substanzen_Kerne_threshold")
- 3: Integrated Morphometry - Measure("HOE", -1)
- 4: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 1, 1)
- 5: Integrated Morphometry - Log Data("HOE", SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
- 6: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 7: Rename Image("IMA Objects Mask", "Kern-Maske")
- 8: Gesamtzellzahl = IMASummary.Count
- 9: Close("HOE")

Abb. 6: Bildanalysealgorithmus A, Teil 1

Dieser Teil des Bildanalysealgorithmus identifizierte Zellkerne aufgrund der Chromatinfärbung. Die Hoechst-Fluoreszenzsignale wurden hierbei über die Signalintensität (160-4095 Signal, 0-159 Hintergrundrauschen) erkannt (Zeile 1). Anschließend wurde ein Metaprogramm geladen (Zeile 2), das anhand von Morphologieparametern die Größe und Form der Zellkerne definierte. Die Anzahl der Zellkerne wurde protokolliert (Zeile 4-5 und 8). Anschließend wurden die Signale in eine binäre Objektmaske umgewandelt („Kern-Maske“, Zeile 7-8).

p21-CY3 wird lokalisiert und eine Objektmaske erstellt

- 10: Threshold Image("Cy32", 270, 4095)
- 11: Configure Object Standards(1500, 0, 255)
- 12: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Substanzen_alle_Signale")
- 13: Integrated Morphometry - Measure("Cy32", -1)
- 14: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 15: Overwrite "vergrößerte p-p21 Signale" = Dilate Image("IMA Objects Mask", WITHCLOSING, 2, 1, DILATECLOSE)
- 16: Rename Image("vergrößerte p-p21 Signale", "p21-wt-Cy3-Maske")
- 17: Close("Cy32")
- 18: Close("IMA Objects Mask")

Abb. 7: Bildanalysealgorithmus A, Teil 2

Dieser Teil des Bildanalysealgorithmus detektierte phosphoryliertes p21 anhand der Cy3-Färbung. Die Fluoreszenzsignale wurden hierbei über ihre Signalintensität (270-4095 Signal, 0-269 Hintergrundrauschen) identifiziert (Zeile 10). Anschließend wurde ein Metaprogramm geladen (Zeile 12), das anhand definierter Morphologieparameter die p-p21-Thr145-Signale erkannte. Zu kleine Signale (z.B. unspezifische Bindung an die Oberfläche der Mikrotiterplatte) und zu große Signale (Zellaggregate) wurden von diesem Programm ausgeschlossen. Die Signale wurden als binäre Objektmaske gespeichert („p21-WT-Cy3 Maske“, Zeile 14-16).

Pim-GFP wird lokalisiert und eine Objektmaske erstellt

- 19: Threshold Image("YFP2", 200, 4095)
- 20: Configure Object Standards(1500, 0, 255)
- 21: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Substanzen_alle Pim Signale")
- 22: Integrated Morphometry - Measure("YFP2", -1)
- 23: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 24: Rename Image("IMA Objects Mask", "Pim-wt-YFP-Maske-Maske")
- 25: Close("YFP2")

Abb. 8: Bildanalysealgorithmus A, Teil 3

Dieser Teil des Bildanalysealgorithmus detektierte Pim-1 transfizierte Zellen anhand der GFP-Signale. Die Fluoreszenzsignale wurden hierbei über ihre Signalintensität (200-4095 Signal, 0-199 Hintergrundrauschen) identifiziert (Zeile 19). Anschließend wurde ein Metaprogramm geladen (Zeile 21), das anhand festgelegter Morphologieparameter Pim-1-GFP transfizierte Zellen erkannte. Die positiven Signale wurden in eine binäre Objektmaske umgewandelt („Pim-WT-YFP-Maske“, irrtümliche Bezeichnung, es handelte sich hierbei trotzdem um die Fluoreszenzsignale der GFP-(Fusions)-Proteine, Zeile 23-24).

Erstellt die Transfektionsrate von Pim-1-GFP

 26: New "Transfektion" = "Kern-Maske" AND "Pim-wt-YFP-Maske-Maske"
 27: Auto Threshold for Light Objects()
 28: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Substanzen_alle_Signale")
 29: Integrated Morphometry - Measure([26: Arithmetic], -1)
 30: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 5)
 31: Integrated Morphometry - Log Data([26: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
 32: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
 33: Rename Image("IMA Objects Mask", "Transfektionsmaske")
 34: Pim_wt_Gesamtzellzahl = IMASummary.Count
 35: Pim_wt_Transfektionsrate = Pim_wt_Gesamtzellzahl / Gesamtzellzahl*100
 36: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 7)
 37: Log Variable(Pim_wt_Transfektionsrate, NONEWLINE, NO HEADER)
 38: Close("Pim-wt-YFP-Maske-Maske")
 39: Close("Transfektion")

Erstellt die Rate der Pim-1 nicht-transfizierten Zellen über Variablen

 40: Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen = Gesamtzellzahl-Pim_wt_Gesamtzellzahl
 41: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 6)
 42: Log Variable(Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

Abb. 9: Bildanalysealgorithmus A, Teil 4

Der vierte Teil des Bildanalysealgorithmus bestimmte die Transfektionsrate Pim-1-WT-GFP, Pim-1-K67M-GFP und GFP-N1 transfizierter Zellen. Hierzu wurden die im Teil 1 und Teil 3 erstellten binären Objektmasken der Zellkerne und der transfizierten Zellen miteinander verglichen (Zeile 26). Als transfizierte Zellen wurden die Signale definiert, die GFP-Fluoreszenzsignale innerhalb der Zellkerne (Kern-Maske) aufwiesen (Zeile 27-31). Die positiven Signale wurden als binäre Objektmaske gespeichert („Transfektionsmaske“, Zeile 32-33). Außerdem wurde die Rate der transfizierten und nicht transfizierten Zellen eines Experimentes berechnet und protokolliert (Zeile 33-37 und 40-42).

Erstellt die Zellzahl und die Rate der p21-wt-Cy3 positiven Zellen

 43: "alle p21 positiven Zellen" = "Kern-Maske" AND "p21-wt-Cy3-Maske"
 44: Auto Threshold for Light Objects()
 45: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Substanzen_alle_Signale")
 46: Integrated Morphometry - Measure([43: Arithmetic], -1)
 47: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 9)
 48: Integrated Morphometry - Log Data([43: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
 49: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
 50: Rename Image("IMA Objects Mask", "Gesamtzahl p21-wt-Cy3")
 51: p21_wt_Gesamt = IMASummary.Count
 52: Gesamtzellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen = p21_wt_Gesamt/Gesamtzellzahl*100
 53: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 11)
 54: Log Variable(Gesamtzellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
 55: Close("p21-wt-Cy3-Maske")
 56: Close([43: Arithmetic])

Erstellt die Zahl der p21-Cy3 negativen Zellen

 57: Zahl_der_p21_neg_Zellen = Gesamtzellzahl- p21_wt_Gesamt
 58: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 10)
 59: Log Variable(Zahl_der_p21_neg_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

Abb. 10: Bildanalysealgorithmus A, Teil 5

Im fünften Teil wurden die Zellen ermittelt, die p-p21-Thr145-Signale im Zellkern aufwiesen und ihr Anteil bestimmt. Hierzu wurden die im Teil 1 und Teil 2 erstellten binären Objektmasken der Zellkerne und der p-p21-Thr-Signale miteinander verglichen und deren Anzahl protokolliert (Zeile 43-48). Als positive Zellen wurden diejenigen definiert, die p-p21-Thr145-Fluoreszenzsignale („p21-WT-Cy3 Maske“) innerhalb der Zellkerne („Kern-Maske“) aufwiesen. Die resultierenden Signale wurden in eine binäre Objektmaske umgewandelt („Gesamtzahl p21-WT-Cy3“, Zeile 49-50). Außerdem wurde der Anteil an Zellen bestimmt, der p-p21-Thr145-Signale aufwies bzw. nicht aufwies (Zeile 51-55 und 57-59).

Erstellt die Zahl der p21-wt-Cy3 positiven Pim-1 transfizierten Zellen

```

60: New "alle p21 positiven Pim-wt-Zellen" = "Transfektionsmaske" AND "Gesamtzahl p21-wt-Cy3"
61: Auto Threshold for Light Objects()
62: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Substanzen_alle_Signale")
63: Integrated Morphometry - Measure([60: Arithmetic], -1)
64: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 13)
65: Integrated Morphometry - Log Data([60: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
66: p21_wt_Cy3_positive_Pim_wt_Zellen = IMASummary.Count
67: Zellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen = p21_wt_Cy3_positive_Pim_wt_Zellen / Pim_wt_Gesamtzellzahl*100
68: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 14)
69: Log Variable(Zellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
70: Close([60: Arithmetic])

```

Zahl der p21-wt-Cy3 negativen Pim-1 transfizierten Zellen

```

71: Zahl_der_p21_wt_Cy3_pos_Pim_neg_Zellen = p21_wt_Gesamt - p21_wt_Cy3_positive_Pim_wt_Zellen
72: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 15)
73: Log Variable(Zahl_der_p21_wt_Cy3_pos_Pim_neg_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

```

berechnet den Anteil an p21 positiven Pim-1 nicht transfizierten Zellen

```

74: Rate_der_p21_pos_Pim_neg_Zellen = Zahl_der_p21_wt_Cy3_pos_Pim_neg_Zellen / Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen*100
75: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 16)
76: Log Variable(Rate_der_p21_pos_Pim_neg_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
77: Close("Gesamtzahl p21-wt-Cy3")
78: Close("Transfektionsmaske")
79: Close("Kern-Maske")

```

**** End of Journal ****

Abb. 11: Bildanalysealgorithmus A, Teil 6

Im letzten Teil des Bildanalysealgorithmus wurde die Zahl der transfizierten Zellen bestimmt, die im Zellkern p-p21-Thr145-Fluoreszenzsignale aufwiesen. Hierzu wurden die im Teil 2 und Teil 3 erstellten binären Objektmasken der transfizierten Zellen und der p-p21-Thr-Signale miteinander verglichen (Zeile 60-65). Als positiv galten Zellen, die p-p21-Thr145-Fluoreszenzsignale („p21-WT-Cy3 Maske“) innerhalb der Zellkerne transfizierter Zellen („Pim-WT-YFP-Maske“) aufwiesen. Anschließend wurde der Anteil der transfizierten Zellen mit und ohne p-p21-Thr-145-Signale bestimmt (Zeile 66-73). Zum Schluss wurde die Rate der nicht transfizierten Zellen mit p-p21-Thr145-Signalen bestimmt und protokolliert (Zeile 74-76).

Mit diesem Bildanalysealgorithmus wurden ca. 30.000 Zellen pro Transfektionsansatz auf Einzelzellebene ausgewertet und die Ergebnisse mithilfe des Programms Excell (Microsoft) grafisch dargestellt.

2.4.3. Algorithmus B: Phosphorylierung von p21-CFP durch Pim-1-YFP

Dieser Bildanalysealgorithmus quantifizierte die Phosphorylierung von transientem p21-CFP am Thr-145 bzw. am Ser-146 durch Pim-1-YFP. Der Algorithmus wurde in der Entwicklungsumgebung des Programms MetaMorph 6.2 (Molecular Devices) erstellt. Dieses Programm wurde eingesetzt, um die Spezifität des anti-p-p21-Thr145- und des anti p-p21-Ser146-Antikörpers nachzuweisen.

Für dieses Experiment wurden HeLa Zellen auf 96-Well-Mikrotiterplatten (μ -clear, Greiner) ausgesät und mit Pim-1-WT-YFP, Pim-K67M-YFP bzw. mit Pim-1-WT-YFP/p21-WT-CFP, Pim-K67M-YFP/p21-WT-CFP oder Pim-1-WT-YFP/p21-T145A-CFP (ko-)transfiziert (siehe 2.3.2). Anschließend wurde die Phosphorylierung am

Thr-145 und am Ser-146 von p21-CFP mithilfe von epitopspezifischen Primärantikörpern und Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit dem Chromatinfarbstoff Hoechst 33342 (Invitrogen) markiert. Mithilfe des automatisierten Fluoreszenzmikroskopes Discovery-1 (Molecular Devices) wurden je 9 Bildausschnitte pro Well in den Fluoreszenzkanälen für Hoechst 33342, pECFP, pEYFP und Cy3 mit einem 10x Plan Fluor Objektiv (Nikon) aufgenommen. Pro Transfektionsexperiment wurden jeweils drei Wells aufgenommen.

Die erstellten Bilddaten wurden mit dem folgenden Bildanalysealgorithmus analysiert, der in den Abbildungen 12 bis 21 erklärt wird:

Kerne werden lokalisiert und eine Kernmaske erstellt

- 1: Threshold Image("HOE", 230, 4095)
- 2: Overwrite "HOE" = Count Nuclei(Src="HOE")
- 3: Auto Threshold for Light Objects()
- 4: Overwrite "KERN" = Binary[[2: Count Nuclei]]
- 5: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_Kerne")
- 6: Integrated Morphometry - Measure[[4: Binary], -1]
- 7: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 1, 1)
- 8: Integrated Morphometry - Log Data[[4: Binary], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
- 9: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 10: Rename Image("IMA Objects Mask", "Kern-Maske")
- 11: Gesamtzellzahl = IMASummary.Count
- 12: Close[[2: Count Nuclei]]
- 13: Close[[4: Binary]]

Abb. 12: Bildanalysealgorithmus B, Teil 1

Dieser Teil des Bildanalysealgorithmus identifizierte Zellkerne aufgrund der Chromatinfärbung. Die Hoechst-Fluoreszenzsignale wurden hierbei über die Signalintensität (230-4095 Signal, 0-229 Hintergrundrauschen) erkannt (Zeile 1). Anschließend wurden zwei Metaprogramme geladen (Zeile 2 und 5), die anhand von Morphologie- und Intensitätsparametern, die Größe, Form und Intensität der Zellkerne definierten. Die Anzahl der so definierten Zellkerne wurde protokolliert (Zeile 7-8 und 11). Anschließend wurden die positiven Signale in eine binäre Objektmasken umgewandelt („Kern-Maske“, Zeile 9-10).

p-p21-Thr145-Cy3 wird lokalisiert und eine Objektmaske erstellt

```

14: Threshold Image("Cy3", 2300, 4095)
15: New "p21-Segmente" = Binary("Cy3")
16: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle p21 Signale")
17: Integrated Morphometry - Measure([15: Binary], -1)
18: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
19: Rename Image("IMA Objects Mask", "p-p21-Thr145-Cy3-Maske")
20: Close([15: Binary])
21: Close("Cy3")

```

Abb. 13: Bildanalysealgorithmus B, Teil 2

Der zweite Teil des Bildanalysealgorithmus detektierte phosphoryliertes p21-CFP (p-p21-Thr145 oder p-p21-Ser146) anhand der Cy3-Antikörperfärbung (siehe 2.3.2). Die Signale wurden hierbei über ihre Signalintensität (2300-4095 Signal, 0-2299 Hintergrundrauschen) identifiziert (Zeile 14). Bei den verwendeten Belichtungszeiten wurden ausschließlich die Fluoreszenzsignale von phosphoryliertem p21-CFP erkannt. Die Phosphorylierungssignale des endogenen p21 lagen im definierten Hintergrundrauschen und wurden vom Algorithmus nicht berücksichtigt. Anschließend wurde ein Metaprogramm geladen (Zeile 16), das aufgrund von Morphologieparametern die p-p21-Thr145-Signale identifizierte. Die positiven Signale wurden in eine binäre Objektmaske umgewandelt („p-p21-Thr145-Cy3 Maske“, Zeile 18-19).

p21-CFP wird lokalisiert und eine Objektmaske erstellt

```

22: Threshold Image("ECFP", 550, 4095)
23: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle p21 Signale")
24: Integrated Morphometry - Measure("ECFP", -1)
25: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
26: Rename Image("IMA Objects Mask", "p21-CFP-Maske")
27: Overwrite "p21-CFP-Maske" = Dilate Image("p21-CFP-Maske", WITHCLOSING, 2, 1, DILATECLOSE)
28: Close("ECFP")

```

Abb. 14: Bildanalysealgorithmus B, Teil 3

Dieser Teil des Bildanalysealgorithmus detektierte p21 transfizierte Zellen anhand der CFP-Fluoreszenzsignale. Dieser Abschnitt des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Abb. 7 beschrieben wurde. Die positiven Signale wurden in eine binäre Objektmaske umgewandelt („p21-CFP-Maske“, Zeile 25-26).

Pim-GFP wird lokalisiert und eine Objektmaske erstellt

```

29: Threshold Image("YFP2", 400, 4095)
30: Configure Object Standards(1500, 0, 255)
31: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle Pim Signale")
32: Integrated Morphometry - Measure("YFP2", -1)
33: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
34: Rename Image("IMA Objects Mask", "Pim-wt-YFP-Maske")
35: Close("YFP2")

```

Abb. 15: Bildanalysealgorithmus B, Teil 4

Der vierte Teil des Bildanalysealgorithmus identifizierte Pim-1 transfizierte Zellen anhand ihrer YFP-Fluoreszenzsignale. Dieser Abschnitt des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Abb. 8 beschrieben wurde.

Erstellt die Transfektionsrate von Pim-1

```

36: New "Pim_Transfektion" = "Kern-Maske" AND "Pim-wt-YFP-Maske"
37: Auto Threshold for Light Objects()
38: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle_Signale")
39: Integrated Morphometry - Measure([36: Arithmetic], -1)
40: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 5)
41: Integrated Morphometry - Log Data([36: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
42: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
43: Rename Image("IMA Objects Mask", "Pim_Transfektionsmaske")
44: Pim_wt_Gesamtzellzahl = IMASummary.Count
45: Pim_wt_Transfektionsrate = Pim_wt_Gesamtzellzahl/ Gesamtzellzahl*100
46: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 7)
47: Log Variable(Pim_wt_Transfektionsrate, NONEWLINE, NO HEADER)
48: Close("Pim-wt-YFP-Maske")
49: Close([36: Arithmetic])

```

Erstellt die Rate der nicht Pim-transfizierten Zellen über Variablen

```

50: Rate_der_nicht_Pim_transfizierten_Zellen = Gesamtzellzahl-Pim_wt_Gesamtzellzahl
51: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 6)
52: Log Variable(Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

```

Abb. 16: Bildanalysealgorithmus B, Teil 5

Der fünfte Teil des Bildanalysealgorithmus bestimmte die Transfektionsrate von Pim-1 transfizierten Zellen. Dieser Abschnitt des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Abb. 9 beschrieben wurde.

Erstellt die Transfektionsrate von p21-CFP

```

53: New "Transfektion" = "Kern-Maske" AND "p21-CFP-Maske"
54: Auto Threshold for Light Objects()
55: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle_Signale")
56: Integrated Morphometry - Measure([53: Arithmetic], -1)
57: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 9)
58: Integrated Morphometry - Log Data([53: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
59: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
60: Rename Image("IMA Objects Mask", "p21-CFP-Transfektionsmaske")
61: p21_CFP_Gesamtzellzahl = IMASummary.Count
62: p21_CFP_Transfektionsrate = p21_CFP_Gesamtzellzahl/ Gesamtzellzahl*100
63: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 11)
64: Log Variable(p21_CFP_Transfektionsrate, NONEWLINE, NO HEADER)
65: Close([27: Dilate Image])
66: Close("Transfektion")

```

Erstellt die Rate der nicht p21-CFP-transfizierten Zellen über Variablen

```

67: Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen = Gesamtzellzahl- p21_CFP_Gesamtzellzahl
68: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 10)
69: Log Variable(Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

```

Abb. 17: Bildanalysealgorithmus B, Teil 6

Der sechste Teil des Bildanalysealgorithmus bestimmte die Transfektionsrate von p21 transfizierten Zellen. Dieser Abschnitt des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Abb. 8 beschrieben wurde. Anstatt der „Pim-1-Maske“ wurde hier die in Teil 3 erstellte „p21-CFP-Maske“ mit der „Kern-Maske“ verglichen. Die resultierende Objektmaske wurde „p21-CFP-Transfektionsmaske“ genannt.

Erstellt die Zellzahl und die Rate der p-p21-Thr145-Cy3 positiven Zellen

```

70: "alle p21 positiven Zellen" = "Kern-Maske" AND "p-p21-Thr145-Cy3-Maske"
71: Auto Threshold for Light Objects()
72: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle_Signale")
73: Integrated Morphometry - Measure([70: Arithmetic], -1)
74: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 13)
75: Integrated Morphometry - Log Data([70: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
76: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
77: Rename Image("IMA Objects Mask", "Gesamtzahl p21-wt-Cy3")
78: p21_wt_Gesamt = IMASummary.Count
79: Gesamtzellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen = p21_wt_Gesamt/Gesamtzellzahl*100
80: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 15)
81: Log Variable(Gesamtzellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
82: Close([70: Arithmetic])
83: Close("p-p21-Thr145-Cy3-Maske")

```

Erstellt die Zahl der p21-Cy3 negativen Zellen

```

84: Zahl_der_p21_neg_Zellen = Gesamtzellzahl - p21_wt_Gesamt
85: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 14)
86: Log Variable(Zahl_der_p21_neg_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

```

Abb. 18: Bildanalysealgorithmus B, Teil 7

Der siebte Teil des Bildanalysealgorithmus identifizierte die Zellen, die p-p21-Thr145-Signale im Zellkern aufweisen. Hierzu wurden die im Teil 1 und Teil 2 erstellten binären Objektmasken der Zellkerne und der p-p21-Signale miteinander verglichen (Zeile 70). Dieser Abschnitt des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Abb. 10 beschrieben wurde.

Schnittmenge "Pim_Transfektionsmaske" gegen "p21-CFP-Transfektionsmaske"

```

87: New "Abgleich Pim_p21 CFP" = "Pim_Transfektionsmaske" AND "p21-CFP-Transfektionsmaske"
88: Auto Threshold for Light Objects()
89: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle_Signale")
90: Integrated Morphometry - Measure([87: Arithmetic], -1)
91: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 17)
92: Integrated Morphometry - Log Data([87: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
93: Abgleich_Pim_p21_CFP = IMASummary.Count
94: Rate_Pim_pos_in_p21CFP_pos_Zellen = Abgleich_Pim_p21_CFP / Pim_wt_Gesamtzellzahl *100
95: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 18)
96: Log Variable(Rate_Pim_pos_in_p21CFP_pos_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
97: Close("Abgleich Pim_p21 CFP")

```

Abb. 19: Bildanalysealgorithmus B, Teil 8

Der achte Teil des Bildanalysealgorithmus überprüfte die Pim-1/p21-Kotransfektion, durch Vergleich der Pim-1-YFP und p21-CFP Transfektionsmasken (Zeile 87). Als kotransfizierte Zellen wurden diejenigen definiert, die Pim-1-Fluoreszenzsignale („Pim-1 Transfektionsmaske“) innerhalb der p21-Fluoreszenzsignale („p21-CFP-Transfektionsmaske“) aufwiesen. Der Anteil der kotransfizierten Zellen wurde bestimmt und protokolliert (Zeile 88-96).

Schnittmenge "Pim_Transfektionsmaske" gegen "p-p21-Thr145-Cy3-Maske"

```

98: New "Abgleich Pim vs endogenes p21 Cy3" = "Pim_Transfektionsmaske" AND "Gesamtzahl p21-wt-Cy3"
99: Auto Threshold for Light Objects()
100: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle_Signale")
101: Integrated Morphometry - Measure([98: Arithmetic], -1)
102: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 20)
103: Integrated Morphometry - Log Data([98: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
104: Abgleich_Pim_vs_endogenes_p21_Cy3 = IMASummary.Count
105: Rate_Pim_pos_in_p21Cy3_pos_Zellen = Abgleich_Pim_vs_endogenes_p21_Cy3/ Pim_wt_Gesamtzellzahl *100
106: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 21)
107: Log Variable(Rate_Pim_pos_in_p21Cy3_pos_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
108: Close("Abgleich Pim vs endogenes p21 Cy3")

```

Abb. 20: Bildanalysealgorithmus B, Teil 9

Der neunte Teil des Bildanalysealgorithmus identifizierte die Zellen, die sowohl Pim-1- als auch p-p21-Thr145-Fluoreszenzsignale aufwiesen. Hierzu wurden die in Teil 5 und Teil 7 erstellten binären Objektmasken für Pim-1 transfizierte Zellen und für p-p21-Thr145-Signale miteinander verglichen (Zeile 98). Als positive Zellen wurden diejenigen definiert, die Pim-1-Fluoreszenzsignale im Bereich der p-p21-Thr145-Signale aufwiesen. Anschließend wurde der Anteil dieser Zellen an allen Pim-1-YFP transfizierten Zellen bestimmt (Zeile 104-107).

Schnittmenge "p21-CFP Transfektionsmaske" gegen "p-p21-Thr145-Cy3-Maske"

```

109: New "Abgleich p21-CFP vs p-p21-Thr145 Cy3" = "p21-CFP-Transfektionsmaske" AND "Gesamtzahl p21-wt-Cy3"
110: Auto Threshold for Light Objects()
111: Integrated Morphometry - Load State("Pim_wt_vs_p21_CFP_p_p21_Thr145_alle_Signale")
112: Integrated Morphometry - Measure([109: Arithmetic], -1)
113: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 23)
114: Integrated Morphometry - Log Data([109: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
115: Abgleich_p21CFP_vs_transientes_p21_Cy3 = IMASummary.Count
116: Rate_p21CFP_in_transienten_p21Cy3_pos_Zellen = Abgleich_p21CFP_vs_transientes_p21_Cy3/ p21_CFP_Gesamtzellzahl *100
117: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 24)
118: Log Variable(Rate_p21CFP_in_transienten_p21Cy3_pos_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
119: Close([109: Arithmetic])
120: Close("p21-CFP-Transfektionsmaske")
121: Close("Pim_Transfektionsmaske")
122: Close("Kern-Maske")
123: Close("Gesamtzahl p21-wt-Cy3")

```

● **** End of Journal ****

Abb. 21: Bildanalysealgorithmus B, Teil 10

Der letzte Teil des Bildanalysealgorithmus identifizierte die Zellen, die sowohl p21-CFP, als auch p-p21-Thr145-Fluoreszenzsignale aufwiesen. Bei einer Kotransfektion von Pim-1-WT-YFP mit p21-CFP sollten in den transfizierten Zellen p-p21-Signale im Zellkern identifiziert werden. Hierzu wurden die im Teil 6 und Teil 7 erstellten binären Objektmasken für die p21-CFP-Signale und für die p-p21-Thr145-Signale verglichen (Zeile 109). Als positive Zellen wurden diejenigen definiert, die p-p21-Thr145-Signale innerhalb der p21-CFP-Fluoreszenzsignale aufwiesen (Zeile 111-112). Anschließend wurde der Anteil dieser Zellen im Vergleich zu allen p21 transfizierten Zellen bestimmt (Zeile 114-118).

Mit diesem Bildanalysealgorithmus wurden ca. 1000 bis 1800 Zellen pro Transfektionsexperiment auf Einzelzellebene ausgewertet und im Programm Excell (Microsoft) grafisch dargestellt.

2.4.4. Algorithmus C: Intrazelluläre Verteilung von p-p21-Thr145

Dieser Bildanalysealgorithmus bestimmte die intrazelluläre Verteilung von p-p21-Thr145 in Pim-1-WT-GFP und Pim-1K67M-GFP transfizierten Zellen. Es wurde zwischen der Lokalisation im Zellkern und im Zytosol unterschieden. Der Algorithmus wurde in der Entwicklungsumgebung des Programms MetaMorph 6.2 (Molecular Devices) erstellt.

Für dieses Experiment wurden HeLa Zellen auf 96-Well-Mikrotiterplatten (μ -clear, Greiner) ausgesät und mit dem Pim-1-WT-GFP- oder dem Pim-K67M-GFP-Expressionsplasmid transfiziert (Methode 2.3.2). Anschließend wurde die Thr-145-Phosphorylierung von endogenem p21 mit dem anti-p-p21-Thr145-Antikörper und einem Cy3 konjugierten Zweitantikörper detektiert (Methode siehe 2.3.5). Die Zellkerne wurden mit dem Chromatinfarbstoff Hoechst 33342 markiert. Mithilfe des automatisierten Fluoreszenzmikroskopes Discovery-1 (Molecular Devices) wurden je 9 Bildausschnitte pro Well in den Fluoreszenzkanälen für Hoechst 33342, pEGFP und Cy3 mit einem 10x Plan Fluor Objektiv (Nikon) aufgenommen. Pro Transfektionsexperiment wurden jeweils drei Wells aufgenommen.

Mit diesem Bildanalysealgorithmus wurden ca. 1000 bis 1800 Zellen pro Transfektionsexperiment auf Einzelzellebene ausgewertet und im Programm Excell (Microsoft) grafisch dargestellt.

Die erstellten Bilddaten wurden mit dem folgenden Bildanalysealgorithmus analysiert, der in Abb. 22 bis 30 erklärt wird:

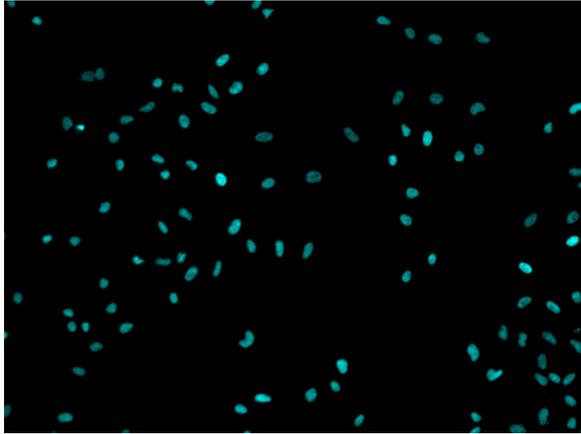
Pixelkorrektur von Cy3

- 1: New "shift-Cy3" = Sub-Pixel Shift("cy3", 0, -19)
Kerne werden lokalisiert und eine Kernmaske erstellt
- 2: Threshold Image("HOE", 330, 2000)
- 3: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_nur_einzelne_Kerne")
- 4: Integrated Morphometry - Measure("HOE", -1)
- 5: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 1, 1)
- 6: Integrated Morphometry - Log Data("HOE", SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
- 7: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 8: Rename Image("IMA Objects Mask", "Kern-Maske")
- 9: Gesamtzellzahl = IMASummary.Count
- 10: Close("HOE")

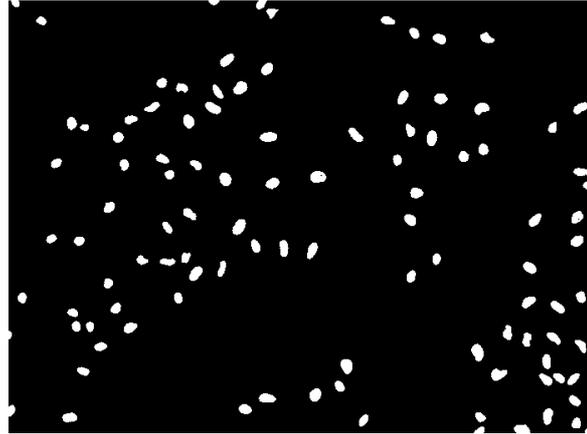
Abb. 22: Bildanalysealgorithmus C, Teil 1

Da die Cy3-Fluoreszenzsignale gegenüber den Hoechst-Fluoreszenzsignalen um einige Pixel verschoben waren, musste der Pixelshift zunächst korrigiert werden (Zeile 1). Anschließend wurden die Zellkerne anhand der Chromatinfärbung identifiziert. Dieser Abschnitt des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Abb. 6 beschrieben wurde.

A: Hoechst 33342 Fluoreszenzbild



B: Binäre Kern-Maske

**Abb. 23: Die Identifizierung der Zellkerne anhand von Beispielbildern**

Der Algorithmus erkannte die Zellkerne anhand der Hoechst-Fluoreszenz (A) und definierten Morphologieparametern. In diesem Beispiel wurden alle Hoechst-Fluoreszenzsignale als Zellkerne erkannt. Die Signale wurden in eine binäre Objektmaske umgewandelt (B, „Kern-Maske“).

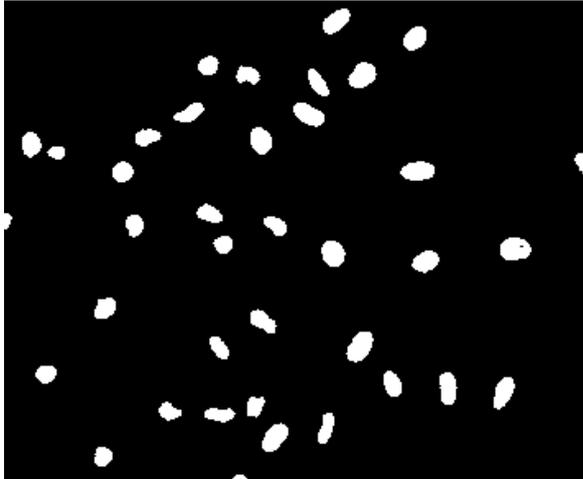
Translokationsmasken

-  11: New "outline-Kern-Maske" = Outline Image("Kern-Maske")
-  12: New "dilate-outline-Kern-Maske" = Dilate Image([11: Outline Image], WITHCLOSING, 1, 1, DILATECLOSE)
-  13: New "Cytosol vs Kern Maske" = [12: Dilate Image] - [11: Outline Image] + 0
-  14: New "Cytosol-Ring Maske" = [13: Arithmetic] - "Kern-Maske" + 0
-  15: New "Kern-Ring-Maske" = [13: Arithmetic] - [14: Arithmetic] + 0
-  16: Close([11: Outline Image])
-  17: Close([12: Dilate Image])
-  18: Close([13: Arithmetic])

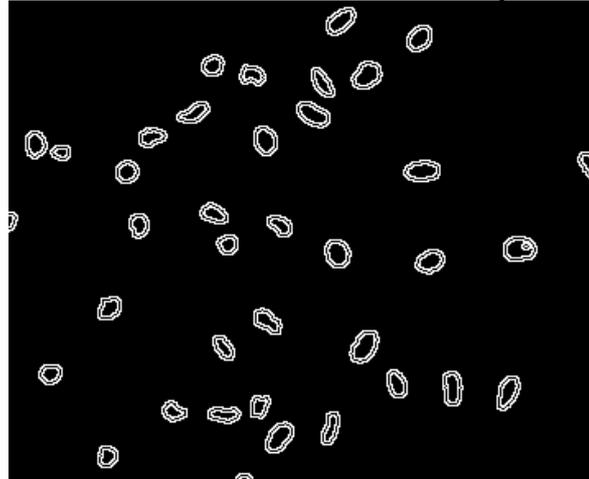
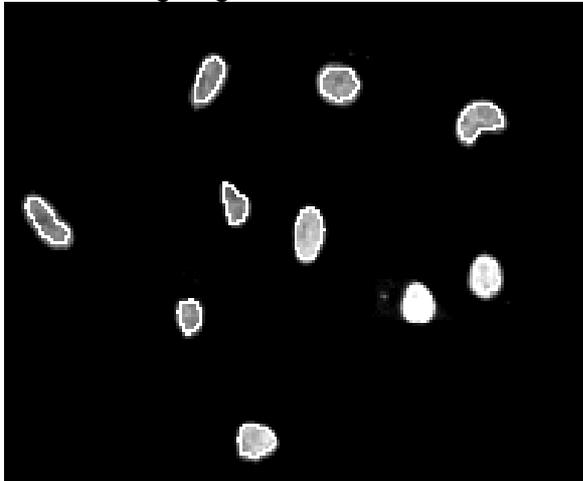
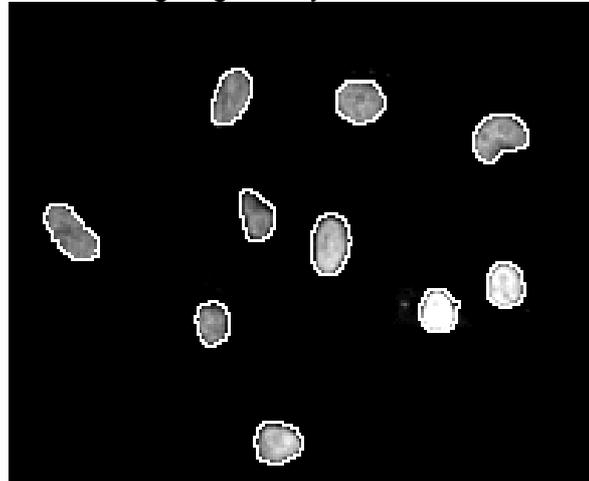
Abb. 24: Bildanalysealgorithmus C, Teil 2

Der zweite Teil des Algorithmus erstellte anhand der binären „Kern-Maske“ eine Pixelringmaske innerhalb des Zellkerns und eine außerhalb im Zytosol („Translokationsmaske Kern-Zytosol“, Beispielbild siehe Abb.25.B). Hierzu wurden die Signale der binäre Kernmaske zunächst bis auf den äußersten Pixelring reduziert („outline-Kernmaske“, Zeile 11). Anschließend wurden die Signale dieser Maske jeweils um einen Pixelring nach innen und außen vergrößert („Dilate-outline Kern-Maske“, Zeile 12). Von dieser Maske wurde die „outline-Kern-Maske“ wieder abgezogen, so dass jeweils die beiden hinzugefügten inneren und äußeren Pixelringe übrig blieben (Translokationsmaske Kern-Zytosol, Zeile 13). Die äußeren Pixelringe wurden als Zytosol-Ring-Maske (Zeile 14) und die inneren Pixelringe als Kern-Ring-Maske (Zeile 15) benannt.

A: Binäre Kern-Maske



B: Translokationsmaske Kern-Zytosol

C: Kern-Ring-Maske:
Pixelring liegt innerhalb des KernsD: Zytosol-Ring-Maske:
Pixelring liegt im Zytosol**Abb. 25: Die Entwicklung der Translokationsmaske anhand von Beispielbildern**

Die binäre Kernmaske zeigte den Ort und die Größe der identifizierten Zellkerne im gewählten Bildausschnitt an (A). Die binären Signale wurden modifiziert, so dass für jedes Signal ein Pixelring im und ein Pixelring kurz außerhalb des Kernsignals entstand (B). Anschließend wurde die „Kern-Ring-Maske“ mit einem Cy3-Fluoreszenzbild des gleichen Bildausschnittes verglichen, in dem endogenes p21 im Zellkern detektiert wurde. Alle Pixel der „Kern-Ring-Maske“ lagen innerhalb des Zellkerns und der Cy3-Fluoreszenzsignale (C). Dagegen lagen alle Pixel der „Zytosol-Ring-Maske“ außerhalb des Zellkerns und überlagerten sich nicht mit Cy3-Fluoreszenzsignalen (D).

Lokalisation von p21-Cy3 im Kern

- 19: New "Cy3-Kern-Ring-Maske" = [1: Sub-Pixel Shift] AND [15: Arithmetic]
- 20: Auto Threshold for Light Objects()
- 21: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation-p-p21-Thr145")
- 22: Integrated Morphometry - Measure([19: Arithmetic], -1)
- 23: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 20)
- 24: Integrated Morphometry - Log Data([19: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
- 25: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 26: Rename Image("IMA Objects Mask", "Kern-Cy3")

Abb. 26: Bildanalysealgorithmus C, Teil 3

Dieser Teil des Programms identifizierte Zellen, die p-p21-Thr145-Cy3-Fluoreszenzsignale im Zellkern aufwiesen. Hierzu wurde die binäre „Kern-Ring-Maske“ mit den um den Pixelshift korrigierten p-p21-Thr145-Cy3-Fluoreszenzsignalen verglichen (Zeile 19). Es wurden nur die p-p21-Thr145-Cy3-Fluoreszenzsignale gewertet, die in der „Kern-Ring-Maske“ lagen. Die Signalintensitäten der einzelnen Pixel wurden addiert und die durchschnittliche Intensität für jeden Pixelring berechnet. Positiv galten die Signale mit einer durchschnittlichen Intensität von min. 750 Graustufen (Zeile 21-22). Die Anzahl der positiven Signale wurde protokolliert (Zeile 23-24) Die resultierenden Signale wurden in eine binäre Objektmaske umgewandelt („Kern-Cy3 Maske“, Zeile 25-26).

Lokalisation von p21-Cy3 im Cytosol

- 27: New "Cy3-Cytosol-Ring-Maske" = [1: Sub-Pixel Shift] AND [14: Arithmetic]
- 28: Auto Threshold for Light Objects()
- 29: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation-p-p21-Thr145")
- 30: Integrated Morphometry - Measure([27: Arithmetic], -1)
- 31: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 24)
- 32: Integrated Morphometry - Log Data([27: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
- 33: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 34: Rename Image("IMA Objects Mask", "Cytosol-Cy3")
- 35: Close([15: Arithmetic])
- 36: Close([14: Arithmetic])
- 37: Close([27: Arithmetic])
- 38: Close([19: Arithmetic])

Abb. 27: Bildanalysealgorithmus C, Teil 4

Dieser Teil des Programms identifizierte Zellen, die p-p21-Thr145-Cy3-Fluoreszenzsignale im Zytosol aufwiesen. Hierzu wurde die binäre „Zytosol-Ring-Maske“ mit den um den Pixelshift korrigierten p-p21-Thr145-Cy3-Fluoreszenzsignalen verglichen (Zeile 27). Es wurden nur die p-p21-Thr145-Cy3-Fluoreszenzsignale gewertet, die in der „Zytosol-Ring-Maske“ lagen. Die Signalintensitäten der einzelnen Pixel wurden addiert und die durchschnittliche Intensität für jeden Pixelring berechnet. Positiv galten die Signale mit einer durchschnittlichen Intensität von min. 750 Graustufen (Zeile 29-30). Die Anzahl der positiven Signale wurde protokolliert (Zeile 31-32) Die resultierenden Signale wurden in eine binäre Objektmaske umgewandelt („Zytosol-Cy3-Maske“, Zeile 33-34).

p21-Cy3 wird lokalisiert und eine Objektmaske erstellt

- 39: Threshold Image([1: Sub-Pixel Shift], 1000, 4095)
- 40: Configure Object Standards(1500, 0, 255)
- 41: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_alle_Signale")
- 42: Integrated Morphometry - Measure([1: Sub-Pixel Shift], -1)
- 43: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 44: Overwrite "vergrößerte p-p21 Signale" = Dilate Image("IMA Objects Mask", WITHCLOSING, 2, 1, DILATECLOSE)
- 45: Rename Image("vergrößerte p-p21 Signale", "p21-wt-Cy3-Maske")
- 46: Close("Cy3")
- 47: Close("IMA Objects Mask")

Pim-GFP wird lokalisiert und eine Objektmaske erstellt

- 48: Threshold Image("EGFP", 450, 4095)
- 49: Configure Object Standards(1500, 0, 255)
- 50: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_alle_Pim_Signale")
- 51: Integrated Morphometry - Measure("EGFP", -1)
- 52: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 53: Rename Image("IMA Objects Mask", "Pim-wt-YFP-Maske-Maske")
- 54: Close("EGFP")

Erstellt die Transfektionsrate von Pim-1

- 55: New "Transfektion" = "Kern-Maske" AND "Pim-wt-YFP-Maske-Maske"
- 56: Auto Threshold for Light Objects()
- 57: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_alle_Signale")
- 58: Integrated Morphometry - Measure([55: Arithmetic], -1)
- 59: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTECOLUMN, 0, 5)
- 60: Integrated Morphometry - Log Data([55: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
- 61: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 62: Rename Image("IMA Objects Mask", "Transfektionsmaske")
- 63: Pim_wt_Gesamtzellzahl = IMASummary.Count
- 64: Pim_wt_Transfektionsrate = Pim_wt_Gesamtzellzahl/ Gesamtzellzahl*100
- 65: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTECOLUMN, 0, 7)
- 66: Log Variable(Pim_wt_Transfektionsrate, NONEWLINE, NO HEADER)
- 67: Close("Pim-wt-YFP-Maske-Maske")
- 68: Close("Transfektion")

Erstellt die Rate der nicht-transfizierten Zellen über Variablen

- 69: Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen = Gesamtzellzahl-Pim_wt_Gesamtzellzahl
- 70: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTECOLUMN, 0, 6)
- 71: Log Variable(Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

Erstellt die Zellzahl und die Rate der p21-wt-Cy3 positiven Zellen

- 72: "alle p21 positiven Zellen" = "Kern-Maske" AND "p21-wt-Cy3-Maske"
- 73: Auto Threshold for Light Objects()
- 74: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_alle_Signale")
- 75: Integrated Morphometry - Measure([72: Arithmetic], -1)
- 76: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTECOLUMN, 0, 9)
- 77: Integrated Morphometry - Log Data([72: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)
- 78: Integrated Morphometry - Create Objects Mask()
- 79: Rename Image("IMA Objects Mask", "Gesamtzahl p21-wt-Cy3")
- 80: p21_wt_Gesamt = IMASummary.Count
- 81: Gesamtzellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen = p21_wt_Gesamt/Gesamtzellzahl*100
- 82: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTECOLUMN, 0, 11)
- 83: Log Variable(Gesamtzellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)
- 84: Close("p21-wt-Cy3-Maske")
- 85: Close([72: Arithmetic])

Erstellt die Zahl der p21 negativen Zellen

- 86: Zahl_der_p21_neg_Zellen = Gesamtzellzahl- p21_wt_Gesamt
- 87: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTECOLUMN, 0, 10)
- 88: Log Variable(Zahl_der_p21_neg_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

Abb. 28: Bildanalysealgorithmus C, Teil 5

Dieser Abschnitt des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Kapitel 2.4.2 Abb. 7 bis 10 beschrieben wurde. Es wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die p-p21-Thr145-Signale aufwiesen und dessen Rate im Bezug auf die Gesamtzellzahl berechnet. Außerdem wurde die Anzahl Pim-1-WT-GFP bzw. Pim-1-K67M-GFP transfizierter Zellen bestimmt und die Transfektionsraten berechnet.

p21-wt-Cy3 positive Pim-wt-Zellen

89: New "alle p21 positiven Pim-wt-Zellen" = "Transfektionsmaske" AND "Gesamtzahl p21-wt-Cy3"

90: Auto Threshold for Light Objects()

91: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_alle_Signale")

92: Integrated Morphometry - Measure([89: Arithmetic], -1)

93: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 13)

94: Integrated Morphometry - Log Data([89: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)

95: p21_wt_Cy3_positive_Pim_wt_Zellen = IMASummary.Count

96: Zellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen = p21_wt_Cy3_positive_Pim_wt_Zellen/ Pim_wt_Gesamtzellzahl*100

97: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 14)

98: Log Variable(Zellzahl_p21_Cy3_positiver_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

99: Close([89: Arithmetic])

Zahl der p21-wt-Cy3 negativen Pim-wt-Zellen

100: Zahl_der_p21_wt_Cy3_pos_Pim_neg_Zellen = p21_wt_Gesamt- p21_wt_Cy3_positive_Pim_wt_Zellen

101: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 15)

102: Log Variable(Zahl_der_p21_wt_Cy3_pos_Pim_neg_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

Rate der p21 positiven Pim-1 negativen Zellen

103: Rate_der_p21_pos_Pim_neg_Zellen = Zahl_der_p21_wt_Cy3_pos_Pim_neg_Zellen/ Rate_der_nicht_transfizierten_Zellen*100

104: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 16)

105: Log Variable(Rate_der_p21_pos_Pim_neg_Zellen, NONEWLINE, NO HEADER)

Abb. 29: Bildanalysealgorithmus C, Teil 6

Dieser Teil des Programms arbeitete nach dem Prinzip, das bereits in Abb. 11 beschrieben wurde. Es wurden alle Pim-1-WT-GFP bzw. Pim-1K67M-GFP transfizierten Zellen identifiziert, die p-p21-Thr145-Signale aufwiesen und die Rate in Bezug auf die Gesamtzellzahl der transfizierten Zellen berechnet.

Schnittmenge zwischen Pim-GFP transfizierten Zellen und Zellen die cytosolisches p21-Cy3 zeigen

106: New "dilate Transfektionsmaske" = Dilate Image("Transfektionsmaske", WITHCLOSING, 2, 2, DILATECLOSE)

107: New "Schnitt zwischen Pim und p21 cyt" = [106: Dilate Image] AND "Cytosol-Cy3"

108: Auto Threshold for Light Objects()

109: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_Pixelringe")

110: Integrated Morphometry - Measure([107: Arithmetic], -1)

111: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 26)

112: Integrated Morphometry - Log Data([107: Arithmetic], SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)

113: Close([107: Arithmetic])

Schnittmenge zwischen Pim-GFP transfizierten Zellen und Zellen die nuclear p21-Cy3 zeigen

114: New "Schnitt zwischen Pim und p21 nuc" = [106: Dilate Image] AND "Kern-Cy3"

115: Auto Threshold for Light Objects()

116: Integrated Morphometry - Load State("Pim_vs_p-p21_Thr145_Translokation_Pixelringe")

117: Integrated Morphometry - Measure([114: Arithmetic], -1)

118: Set Logging Row and Column(SUMMARY, RELATIVEROW and ABSOLUTE COLUMN, 0, 22)

119: Integrated Morphometry - Log Data("Schnitt zwischen Pim und p21 nuc", SUMMARY, CURRENTDATA, 1, 1)

120: Close([114: Arithmetic])

Schließen der übrigen Bilder

121: Close("Kern-Cy3")

122: Close("Gesamtzahl p21-wt-Cy3")

123: Close("Transfektionsmaske")

124: Close("Kern-Maske")

125: Close([106: Dilate Image])

126: Close("Cytosol-Cy3")

• **** End of Journal ****

Abb. 30: Bildanalysealgorithmus C, Teil 7

Der letzte Teil des Bildanalysealgorithmus bestimmte die Anzahl der Pim-1-WT-GFP bzw. Pim-1-K67M-GFP transfizierten Zellen, die p-p21-Thr145-Signale im Zellkern bzw. im Zytoplasma aufwiesen. Hierzu wurde die binäre „Transfektionsmaske“ (siehe Abb. 28) um einige Pixelreihen nach außen vergrößert. Dadurch wurden auch Signale außerhalb des Zellkerns im Zytoplasma erfasst („dilate Transfektionsmaske“, Zeile 106). Die so erweiterten Transfektionsmasken wurden anschließend mit der „Zytoplasma-Cy3-Maske“ (Zeile 106-110) und mit der „Kern-Cy3-Maske“ (Zeile 114-117) verglichen. Die Anzahl der Pim-1-WT-GFP bzw. Pim-1-K67M-GFP transfizierten Zellen mit p-p21-Thr145-Signalen im Zellkern bzw. im Zytoplasma wurde protokolliert (Zeile 111-112 und 118-119).