

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



**Depletion des Myc-interagierenden
Zinkfingerproteins 1 mittels RNA Interferenz
und
Die Rolle von Miz-1 in der zellulären
DNA-Schadensantwort auf UV-Licht**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Dorothee Rogosch geb. Beul

aus Lippstadt

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 06.04.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: Prof. Dr. R. Göke

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
<i>1.1. Krankheit als molekularer Prozess</i>	7
1.1.1. Tumorentstehung	8
1.1.2. DNA-Schadensantwort der Zelle	9
<i>1.2. Die Methode der RNA Interferenz</i>	11
1.2.1. RNA Interferenz – Bedeutung für die Zelle	11
1.2.2. RNA Interferenz – Entdeckung	12
1.2.3. RNA Interferenz – Funktionsmechanismus	14
<i>1.3. Miz-1 – das Myc-interagierende Zinkfingerprotein 1</i>	16
1.3.1. Miz-1 – Struktur und Eigenschaften	16
1.3.2. Miz-1 und das Proto-Onkogen Myc	17
1.3.3. Miz-1 – Interaktionspartner	19
<i>1.4. Zielsetzung der Arbeit</i>	22
2. Material und Methoden	23
<i>2.1. Material</i>	23
2.1.1. Zelllinien	23
2.1.2. Materialien für die Zellkultur	23
2.1.3. Materialien für die Biochemie	24
2.1.3.1. Reagenzien für die Zelllyse	24
2.1.3.2. Reagenzien für die Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.1.3.3. Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
2.1.3.4. Materialien für Westernblot	26
2.1.3.5. Lösungen für die Immunfluoreszenz	26
2.1.3.6. Materialien für die Luziferaseaktivität	27
2.1.3.7. Materialien zur β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung	27
2.1.3.8. Materialien für Northernblot	28
2.1.4. Antikörper	29
2.1.4.1. Primäre Antikörper	29
2.1.4.2. Sekundäre Antikörper	29
2.1.5. Plasmide	30

2.1.6.	Materialien für die Molekularbiologie	30
2.1.6.1.	Bakterienstämme	30
2.1.6.2.	Medien für die Bakterienkultur	31
2.1.6.3.	Allgemeine Puffer	31
2.1.6.4.	Synthetische Oligonukleotide	31
2.1.6.5.	Oligonukleotide für RNAi-Versuche	32
2.1.6.6.	Polymerasekettenreaktion (PCR) und Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	32
2.1.7.	Kit-Systeme	33
2.2.	<i>Methoden</i>	34
2.2.1.	Zellbiologie	34
2.2.1.1.	Zellkulturbedingungen	34
2.2.1.2.	Behandlung von Zellen mit Zeozin	35
2.2.1.3.	Bestrahlung von Zellen mit UVB	36
2.2.1.4.	Behandlung von Zellen mit Hydroxy-Harnstoff	36
2.2.1.5.	Transiente Transfektion von eGFP durch Kalziumphosphat-präzipitation	36
2.2.1.6.	Transiente Transfektion von Zellen durch Lipofektion	37
2.2.1.7.	Transiente Transfektionen für Reporterassays	37
2.2.1.8.	Transfektion von Cy3	38
2.2.2.	Expression und Analyse von Proteinen	39
2.2.2.1.	Herstellung von Zelllysat	39
2.2.2.2.	Proteinbestimmung nach Bradford (Harlow und Lane, 1988)	39
2.2.2.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	40
2.2.2.4.	Analyse von Proteinen durch Western-Blot	40
2.2.2.5.	Bestimmung der Luziferaseaktivität	41
2.2.2.6.	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	41
2.2.2.7.	Indirekte Immunfluoreszenz	41
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.3.1.	Allgemeine molekularbiologische Methoden	42
2.2.3.2.	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	42
2.2.3.3.	Analytische Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien	43
2.2.3.4.	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	43

2.2.3.5.	Isolierung von genomischer DNA	43
2.2.3.6.	Isolierung von RNA	43
2.2.3.7.	RT-PCR	44
2.2.3.8.	Northern-Blot	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	<i>RNA Interferenz in den Säugerzelllinien HaCaT, HeLa und MEF</i>	47
3.1.1.	Transfektions-Effizienz durch Lipofektion in den Zelllinien HaCaT-, HeLa- und MEF	48
3.1.2.	GL2-Reporter-Plasmid-Expression in den Zelllinien HeLa-, HaCaT- und MEF	52
3.1.3.	GL2-Knock-out in den Säurerzelllinien HeLa, HaCaT und MEF mittels RNA Interferenz	54
3.2.	<i>Depletion von Miz-1 mittels RNA Interferenz</i>	57
3.2.1.	Der Miz-1 RNA-Doppelstrang	58
3.2.2.	Miz-1 Depletion durch RNA Interferenz	60
3.2.2.1.	Ermittlung der Miz-1 Proteinkonzentration mittels Immunfluoreszenz	60
3.2.2.2.	Reduktion der Miz-1-RNA mittels RNA Interferenz – Nachweis durch Northern-Blot-Analyse	62
3.2.2.3.	Partielle Miz-1 Depletion mittels RNA Interferenz – Nachweis durch Reverse- Transkriptase-PCR	63
3.3.	<i>Die Rolle von Miz-1 in der p53-abhängigen Antwort auf UV-Bestrahlung</i>	64
3.3.1.	Die Expression von p21 ^{cip1} durch UV-Bestrahlung ist abhängig von Miz-1	65
3.4.	<i>Die Rolle von Miz-1 in der p53-unabhängigen DNA-Schadensantwort</i>	68
3.4.1.	UV-Bestrahlung – gegensätzliche Regulation der Expression von TopBP1 und p15 ^{INK4B}	70
3.4.2.	Zeozin – kein Einfluss auf die Expression von Myc, Miz, TopBP1 und p15 ^{INK4B}	72
3.4.3.	Hydroxy-Harnstoff – unveränderte Expression von Myc, Miz, TopBP1 und p15 ^{INK4B}	74
4.	Diskussion	75

4.1.	<i>RNA Interferenz in den Säugerzelllinien HaCaT, HeLa und MEF</i>	75
4.1.1.	GL2-Knock-down in den Zelllinien HaCaT-, HeLa- und MEF	76
4.1.2.	Depletion des Transkriptionsfaktors Miz-1 durch RNA Interferenz	77
4.1.3.	Perspektiven: RNA Interferenz als molekularbiologisches Werkzeug in Forschung und Therapie	79
4.2.	<i>Miz-1 reguliert die Zellproliferation in der Antwort auf UV-induzierte DNA-Schäden</i>	80
4.2.1.	UV-Schadensantwort – die Bedeutung von Miz-1	80
4.2.2.	DNA-Schadensantwort – abhängig von der Schadensart	83
4.2.3.	Potentielle Bedeutung der Miz-1 abhängigen DNA-Schadensantwort in der Tumorgenese	85
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis	89
7.	Anhang	96
7.1.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	96
7.2.	<i>Akademische Lehrer</i>	99
7.3.	<i>Danksagung</i>	100

1. Einleitung

1.1. Krankheit als molekularer Prozess

In der Medizin ist bis heute eine große Anzahl von Krankheiten entdeckt und benannt worden. Doch trotz enormer Forschungsfortschritte blieben deren Ursachen häufig ungeklärt. So definieren sich immer noch viele Krankheitsbilder lediglich über ihr klinisches Erscheinungsbild und müssen auf Symptomebene behandelt werden.

Der rasche Erkenntnisfortschritt der Molekularbiologie und molekularen Genetik hat auf diesem Gebiet zu einem tiefgreifenden Wandel diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten in der Medizin geführt.

1944 wurde durch ein US-Forscherteam die DNA als Träger der genetischen Information identifiziert (Avery et al., 1944) und 1953 ihre räumliche Doppelhelix-Struktur durch Watson und Crick beschrieben (Watson und Crick, 1953). Rund 50 Jahre später gelingt die Sequenzierung des kompletten menschlichen Genoms (International Human Genome Sequencing Consortium (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001)) und die ersten menschlichen Stammzellen werden geklont (Thomson et al., 1998).

Der analytische Zugang zum genetischen Apparat und zu den ihn steuernden Molekülen erschließt umfangreiche diagnostische Möglichkeiten. Zuvor nur phänotypisch beschriebene Krankheitszustände können durch genotypische Veränderungen erklärt und verstanden werden. Eine Punktmutation eines einzelnen Nukleotids in dem 3 Milliarden Basenpaare umfassenden menschlichen Genom kann unter Umständen die Entwicklung einer Krankheit erklären. Beispielsweise bedeutet der Austausch von Thymin gegen Adenin in der Basensequenz des β -Globin-Gens des menschlichen Hämoglobins die Grundlage der Sichelzellanämie, einer besonders in der afrikanischen Bevölkerung verbreiteten Hämoglobinopathie, die mit hämolytischen Krisen und multiplen Infarktgeschehen einhergeht.

Die moderne Genanalyse macht Krankheiten aber nicht nur zunehmend kausal erklärbar, sondern eröffnet zusätzlich ein neues Feld therapeutischer Angriffspunkte. Es ist vorstellbar, dass in Zukunft die traditionelle Anwendung chemischer Substanzen als Arzneimittel durch die „Transplantation“ informationstragender Moleküle ergänzt wird, die den Körper befähigen, seine eigenen therapeutischen Substanzen zu synthetisieren.

1.1.1. Tumorentstehung

Der Weg der Tumorgenese stellt einen mehrschrittigen Prozess dar. Eine einzelne Mutation reicht in der Regel zur Krebsentstehung nicht aus.

Diese sogenannte Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung beschreibt die Ansammlung von genetischen Veränderungen bis zum Erreichen einer kritischen Gesamtzahl, die zur Karzinomentstehung führt.

Besonders gut dokumentiert ist die Adenom-Karzinom-Sequenz des kolorektalen Karzinoms. Über schrittweisen Verlust von Tumorsuppressorgenen und Mutation von Onkogenen entwickelt sich das normale Darmepithel über ein frühes, intermediäres und schließlich großes Adenom zum Karzinom mit Metastasen.

Zwei wichtige antagonistische Systeme der Tumorentstehung werden von den Onkogenen und den Tumorsuppressorgenen sowie ihren Genprodukten repräsentiert.

Onkogene entstehen aus normalen zellulären Genen, Proto-Onkogenen, deren Expressionsprodukte Proliferation, Differenzierung und Zellmobilität regulieren. Durch Mutation der Proto-Onkogene kommt es zu Überexpression und Kontrollverlust über Wachstumsprozesse. Ein bekanntes Beispiel stellt das in zahlreichen humanen Tumorzellen amplifizierte Proto-Onkogen *Myc* dar.

Tumorsuppressorgene sind ebenfalls normale zelluläre Gene. Ihre Genprodukte haben Wachstums-supprimierende Wirkung. Ihre Mutation bewirkt ebenfalls dereguliertes Wachstum. Hier sei besonders das Tumorsuppressorgen p53 erwähnt, das wegen seiner Funktion Zellzyklusarrest und den programmierten Zelltod, die Apoptose, zu induzieren auch als „Hüter des Genoms“ bezeichnet wird.

DNA-Schäden können spontan entstehen oder zum Beispiel durch Strahlen oder Toxine exogen induziert werden. Normalerweise ist die Zelle in der Lage den Defekt mittels sogenannter DNA-Schadens-Kontrollpunkte zu erkennen und die Schadens-Nachricht über Signaltransduktionsmoleküle an Effektorproteine weiterzuleiten. Diese halten den Zellzyklus an und korrigieren den Fehler. Ist der Schaden irreversibel, wird an dieser Stelle die Apoptose der Zelle eingeleitet. Auf diese Weise ist die Stabilität des Genoms gesichert.

Verliert eine Zelle ihre Fähigkeit auf die beschriebene Weise auf einen DNA-Defekt zu reagieren, wird die genetische Fehlinformation an Tochterzellen weitergegeben.

Kommt es zur Kumulation von Mutationen, verliert die Zelle weitere Kontrollmechanismen zur Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Es entsteht eine Tumorzelle.

Die folgende Arbeit thematisiert die genannten Onko- und Tumorsuppressorgene *Myc* und p53 in Bezug auf ihre Interaktionspartner im Kontext der zellulären Reaktion auf DNA-Schädigung.

1.1.2. DNA-Schadensantwort der Zelle

Auf zellulärer Ebene kann eine Erkrankung als Folge einer Störung des Gleichgewichts der zellulären Prozesse angesehen werden. Gewebs- und Organschädigungen resultieren aus chemisch, physikalisch, mikrobiell oder immunologisch verursachten Defekten der Zellbestandteile. Es resultieren Störung von Syntheseleistung, Zellteilung und -differenzierung bis hin zum Tod der betroffenen Zelle. Da diese auf den gesamten Organismus abgestimmte, spezifische Funktionen erfüllt, muss im Falle eines Defekts die Schadensausbreitung auf Nachbarzellen vermieden werden. Entweder wird die Reparatur des Schadens veranlasst oder die Zelle der Apoptose unterzogen.

Eine in Reparatur befindliche Zelle exprimiert besonders die Gene, die sie zu ihrer Wiederinstandsetzung benötigt. Voraussetzung ist ein Anhalten des Zellzyklus. Über die bereits erwähnten DNA-Schadens-Kontrollpunkte ist die Zelle in der Lage den DNA-Schaden zu erkennen, einen Zellzyklusarrest zu induzieren und den Fehler zu korrigieren.

Bei einem Gen-Schaden, zum Beispiel aufgrund ionisierender Strahlen, wird das Protein p53 als „Hüter des Genoms“ innerhalb weniger Minuten stabilisiert und es akkumuliert (Kastan et al., 1991). Durch p53 werden eine Reihe von Zielgenen aktiviert, die Zellzyklusarrest oder die Apoptose der Zelle einleiten (Vogelstein et al., 2000). P53 defiziente Mäuse sind zwar lebensfähig, erwerben aber in den ersten Lebensmonaten zahlreiche durch Spontanmutation oder exogene DNA-Schadensinduktion entstandene Tumore (Donehower et al., 1992; Harvey et al., 1993). In p53^{-/-}-Fibroblasten konnte eine Akkumulation von DNA-Schäden beobachtet werden (Lowe et al., 1993).

Eine Mutation von p53 stellt den häufigsten genetischen Defekt humaner Tumore dar und konnte in über 50% aller untersuchter Krankheitsfälle nachgewiesen werden (Hollstein et al., 1991).

Denkbar schwere Folgen hat daher eine funktionelle Inaktivierung von p53 mit Störung der Schadensdetektion oder der Signaltransduktionskaskaden.

P53 bindet an DNA und führt als Transkriptionsfaktor zur Expressionsinduktion zahlreicher Gene, die für negative Regulatoren des Zellwachstums oder Mediatoren der Apoptose kodieren (Vousden und Lu, 2002).

Ein solches durch Aktivierung von p53 induziertes Zielgen stellt z.B. *p21^{cip1}* dar. In vivo erhöht DNA-Schädigung die Bindung von p53 an den *p21^{cip1}*-Promotor (Macleod et al., 1995; Seoane et al., 2002).

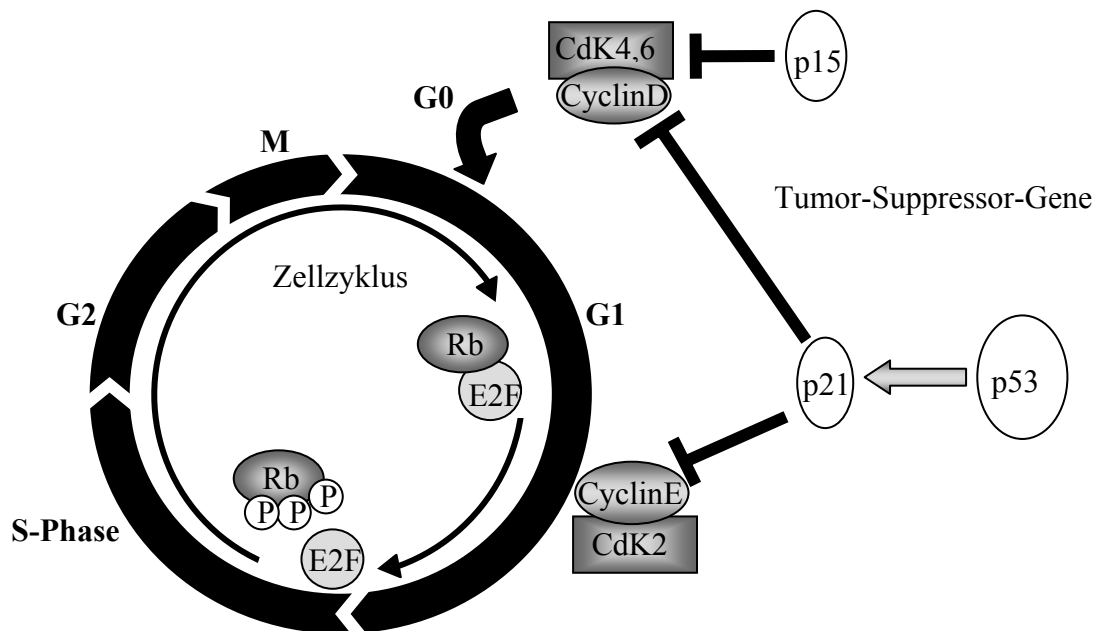


Abbildung 1.1: Modell des Zellzyklusarrest mittels CdK-Inhibition durch die Tumorsuppressorgene p15, p21 und p53

Die Proteine p15 und p21 sind Inhibitoren der Cyclin-abhängigen-Kinasen, CdK. Diese Tumorsuppressorgene hemmen die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins *Rb* durch den jeweiligen Cyclin/Cyclin-abhängige-Kinase-Komplex. Phosphoryliertes *Rb* gibt den Transkriptionsfaktor E2F aus der inhibitorischen Bindung frei. E2F aktiviert Zielgene, die für die Zellzyklusprogression in die S-Phase essentiell sind. Nicht-phosphoryliertes *Rb* hemmt indirekt die Zellzyklusprogression.

P21^{cip1} gehört zur Gruppe der Inhibitoren der Cyclin-abhängigen-Kinasen, CdK, die für die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins *Rb* zuständig sind (Niculescu et al., 1998). Die Phosphorylierung durch den Cyclin-CdK-Komplex resultiert in der Freigabe des an *Rb* gebundenen Transkriptionsfaktors E2F. E2F aktiviert Zielgene, deren Produkte für die Zellzyklusprogression essentiell sind. Hypophosphoryliertes *Rb* bildet einen repressorischen Komplex mit E2F (Sears et al., 1997). *Rb* verhindert so indirekt die Progression der Zelle in die S-Phase. Daraus resultiert ein G1-Phase-Arrest (siehe Abbildung 1.1).

1.2. Die Methode der RNA Interferenz

1.2.1. RNA Interferenz – Bedeutung für die Zelle

Um zu verstehen, welche Bedeutung die Veränderung der Gen-Sequenz für den Gesamtorganismus hat, ist es notwendig, die Funktions- und Struktureigenschaften seines Expressionsproduktes zu kennen.

Nach der Entschlüsselung der Humangenom-Sequenz gilt es, die Funktion der neu entschlüsselten Gene zu klären und diese im Kontext der Physiologie eines Lebewesens zu verstehen. Eine Einschätzung, welche Bedeutung ein bestimmtes Protein für die Zelle hat, erlaubt z.B. ein Vergleich mit homologen Proteinen anderer Organismen, die Analyse seiner intrazellulären Verteilung und die Untersuchung seiner Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Die Bedeutung eines Gens im Gesamt-Organismus lässt sich besonders gut prüfen, wenn die Funktion des Gens dem Organismus fehlt.

Daher untersucht man Organismen, die eine defekte oder vollständig fehlende Nukleotidsequenz des zu untersuchenden Gens, einen sogenannten „Knock-out“, aufweisen, auf zelluläre Prozesse, die unterbrochen oder verändert stattfinden. Methodisch wird dabei die Anzucht einer transgenen Maus verwandt. Solche Mäuse werden auch als Modellsysteme für die Untersuchung genetischer Erkrankungen verwandt.

Der gezielte Knock-out eines Gens im Mausmodell erfordert zunächst die Übertragung mutierter Allele in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) mittels homologer Rekombination. Dann werden die ES-Zellen mit der Mutation eines Allels in Mausembryonen übertragen. Es entwickeln sich sogenannte Chimären, Tiere, deren Gewebe sowohl aus den transplantierten als auch aus eigenen Wirts-Stammzellen entstanden sind. Um festzustellen, ob die Mutation in die Keimbahn gelangt ist, werden die chimären Tiere gekreuzt. Aus Kreuzungen chimärer, für die Knock-out-Mutation heterozygoter Mäuse, erhält man nach mendelschen Regeln 25% homozygote Knock-out-Organismen.

Seit 1998 ist außerdem die RNA Interferenz (ebenfalls bezeichnet als RNAi) als eine weitere Technik des Gen-Knock-out in Organismen nutzbar (Fire et al., 1998). RNA Interferenz ist ein evolutionär konservierter zellulärer Schutz-Mechanismus zur Kontrolle der Expression von Fremdgenen. Es handelt sich dabei um einen Prozess der

sequenzspezifischen post-transkriptionellen Gen-Stillegung in Tier- und Pflanzenzellen basierend auf doppelsträngigen RNA-Elementen.

Eukaryotische Zellen benutzen diese besondere Art des RNA-Abbaus als Abwehrmechanismus gegen RNA-Viren, die im Laufe ihres Replikationszyklus doppelsträngige RNA bilden. Chemisch synthetisierte RNA-Doppelstrang-Oligonukleotide werden inzwischen als bevorzugtes Instrument für Genom-umfassende Analysen von Gen-Funktionen genutzt. Durch die Nutzung kurzer RNA-Elemente, genannt *short interfering* RNA (siRNA), wird die Expression der Ziel-Gene vorübergehend abgeschaltet (Elbashir et al., 2001a). Auch die stabile, anhaltende Suppression eines Gens durch RNA Interferenz ist mittlerweile möglich. Dies gelingt durch die Nutzung sogenannter *short hairpin* RNAs (*shRNA*), bei denen es sich um kurze RNA-Sequenzen handelt, die eine Haarnadel-Wendung zum Doppelstrang eingehen und mittels eines Vektors in der Zelle exprimiert werden können. Der Phänotyp einer solchen Knock-out-Zelle ist damit auch über längere Zeitspannen experimentell zugänglich (Brummelkamp et al., 2002; Hannon, 2002; Paddison et al., 2002).

Die Entdeckung der RNA Interferenz und seiner Bedeutung für die Zelle als Kontrollorgan der Gen-Expression erlangte den Titel „Breakthrough of the year“ des Wissenschaftsjournals Science in 2002.

1.2.2. RNA Interferenz – Entdeckung

1995 versuchten Guo und Kemphues mittels antisense-RNA die Expression des Gens *par-1* zu unterbrechen. Das Gleiche gelang ihnen ebenfalls mit dem entsprechenden sense-Strang (Guo and Kemphues, 1995).

Als 1998 Andrew Fire mit seinen Kollegen versuchte, den Mechanismus der Gen-Suppression durch sense- oder antisense-RNA-Injektionen aufzuklären, wurde dabei durch Zufall die RNA Interferenz entdeckt.

Der Wurm *Caenorhabditis elegans* wurde mit sense- oder antisense-RNA-Einzelsträngen beziehungsweise mit beidem parallel behandelt. Dabei verursachten die in der Mixtur entstandenen sequenz-homologen RNA-Doppelstränge, die später per Elektrophorese nachgewiesen werden konnten, eine effektivere Gen-Inaktivierung als die Injektion der jeweiligen Einzelstränge allein. Des Weiteren konnte Fire durch

Ko-Injektionen verschiedener Doppelstrang-RNA-Moleküle auch die Spezifität des Verfahrens für die angewandte Knock-out Sequenz beweisen (Fire et al., 1998).

Anwendung fand die Technik seitdem in verschiedenen Organismen, wie *Drosophila melanogaster* (Kennerdell and Carthew, 1998), *Trypanosoma brucei* (Ngo et al., 1998), *Trypanosoma planarians* (Sanchez Alvarado and Newmark, 1999), dem Zebrafisch (Wargelius et al., 1999) und Mausembryonen und -oozyten (Wianny and Zernicka-Goetz, 2000).

In Organismen wie *Drosophila* und *C. elegans* wurde außerdem eine Vermehrung der doppelsträngigen RNA-Elemente mittels einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) beobachtet. Dadurch findet ein sich selbst verstärkender Prozess der RNA Interferenz in diesen Zellen statt (Lipardi et al., 2001; Sijen et al., 2001). Säugerzellen besitzen diese Polymerase nicht (Stein et al., 2003). Wichtig ist daher zu beachten, dass unterschiedliche Spezies basierend auf dem evolutionär konservierten Prozess der RNA Interferenz unterschiedliche Mechanismen der Gen-Stillelegung besitzen.

Tuschl veröffentlichte 2001 die ersten Anwendungsbeispiele der RNA Interferenz in verschiedenen Säuger-Zell-Linien, wie HeLa, 293 (humane embryonale Nierenzellen), NIH/3T3 (mouse fibroblast) oder BHK21 (embryonale Hamster-Nierenzellen). Säugerzellen galten bis dahin als ungeeignet für die Anwendung der RNAi-Technik, da die Transfektion langer RNA-Doppelstrangmoleküle (≥ 30 Basenpaare) eine Aktivierung sequenz-unspezifischer Zellantworten auslöst. Beobachtet wurden die allgemeine Blockade der Proteinsynthese, generelle mRNA-Degradation, allgemeiner Translations-Block und Apoptose beruhend auf einer Interferon-abhängigen Aktivierung der Proteinkinase PKR und der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (2',5'-AS) (Minks et al., 1979).

Diese Schwierigkeiten kamen unerwartet, da spezifisches RNAi in Maus-Oozyten und -Embryonen bereits beobachtet wurde (Wianny and Zernicka-Goetz, 2000). Dieses Phänomen klärte sich dadurch, dass es den genannten Zellen an der Interferon-abhängigen Virusabwehr von Säugerzellen mangelt.

Tuschl umging die unspezifischen Effekte durch Transfektion von Doppelstrang-RNA-Molekülen von maximal 21 bis 23 Basenpaaren, die die Interferonantwort nicht aktivieren (Tuschl, 2001).

1.2.3. RNA Interferenz – Funktionsmechanismus

Der Mechanismus der RNA Interferenz beruht auf der Tatsache, dass doppelsträngige RNA sequenzspezifisch durch die Degradation ihrer verwandten mRNA die Expression des homologen Gens verhindert. In Säugerzellen wird die Genexpression dabei nicht komplett unterdrückt, wie es zuvor zum Beispiel bei *Drosophila* beobachtet wurde (Kennerdell and Carthew, 1998), sondern lediglich herabgesetzt (Bass, 2001).

Sobald die doppelsträngige RNA von der Zelle aufgenommen worden ist, lassen sich die weiteren Schritte der RNA Interferenz in einen Initiierungs- und einen Effekt-Schritt unterteilen.

Im Initiierungs-Schritt wird die lange Doppelstrang-RNA zunächst in 21- bis 23-Basenpaar-lange Stücke gespalten, die zwei Nukleotide Überhang am 3'-Ende haben (Zamore et al., 2000). Die Segmente werden als *short interfering* RNA, kurz *siRNA* bezeichnet. Verantwortlich für die Fragmentierung ist ein verarbeitendes Enzym, das zum Typ der RNase-III-Endonukleasen gezählt und als Dicer bezeichnet wird (Elbashir et al., 2001a). Die entstandenen Fragmente dienen nun als Führungs-Strang (Zamore et al., 2000).

In der zweiten Phase werden die Doppelstrang-RNA-Segmente in den sogenannten „*RNA-induced-silencing-complex*“ (RISC) integriert. Damit beginnt der Effekt-Schritt. Der Multiprotein-Komplex, bestehend aus einer Helikase, Endo- und Exonukleasen, wird durch das siRNA-Fragment zur entsprechenden endogenen sequenz-homologen mRNA gelenkt. Durch die Entwindung des RNA-Doppelstranges mittels einer ATP-abhängigen Helikase werden die RISC-Nukleasen aktiviert. RISC bindet die mRNA über Basenpaarung mit dem passenden Einzelstrang der Führungs-RNA. Dann erfolgt die Spaltung und damit die Degradation der mRNA durch eine bislang unidentifizierte RNase (Slicer) an einer Position, die in der Mitte des homologen Sequenzabschnitts liegt (Sharp, 2001; Tijsterman and Plasterk, 2004; Zamore et al., 2000).

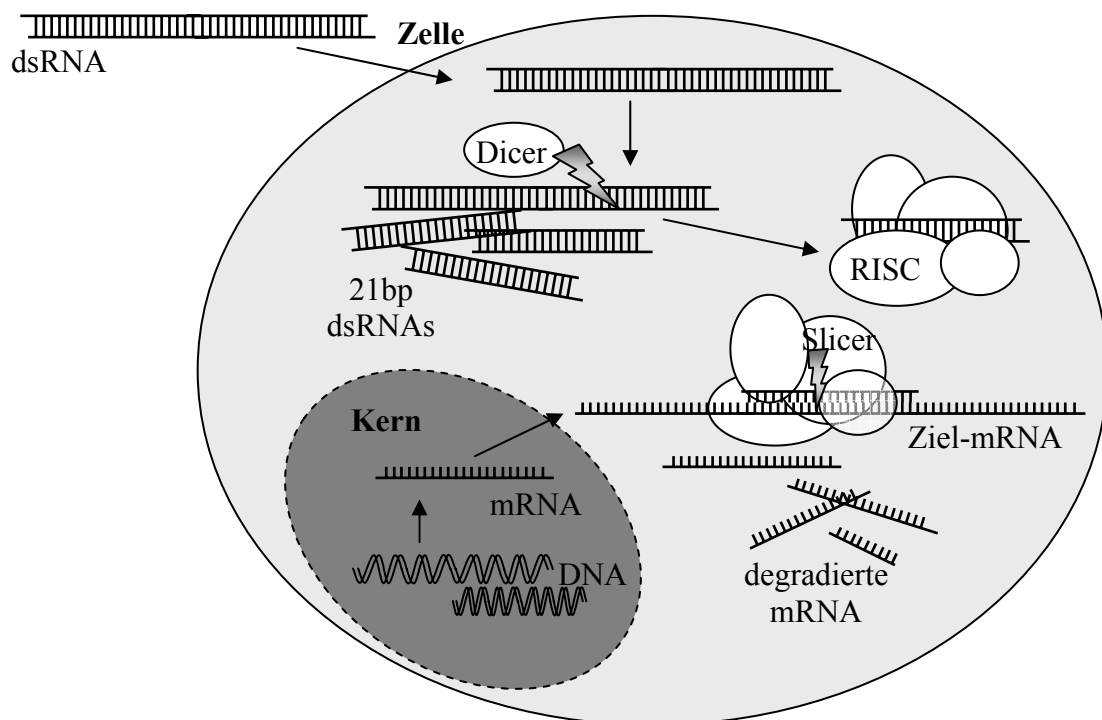


Abbildung 1.2: Mechanismus der Gen-Stillegung durch RNA Interferenz

Der Prozess der RNA Interferenz lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Den Initiierungs-Schritt und den Effekt-Schritt.

In der Initiierungs-Phase wird lange Doppelstrang-RNA durch Dicer, eine RNase-III-Endonuklease, in kurze RNA-Fragmente mit einer Länge von 21 Basenpaaren gespalten. Exogen synthetisierte siRNA umgeht das Dicer-Enzym.

In der Effekt-Phase wird die siRNA in einen Multiproteinkomplex, den *RNA-induced silencing complex* (RISC), integriert, durch eine Helikase entwunden und mit der komplementären Ziel-mRNA assoziiert. Durch eine bislang unidentifizierte RNase (Slicer) des RISC-Komplexes wird die mRNA degradiert.

Die natürliche Funktion dieses Mechanismus ist der Schutz der Zelle vor mobilen invasiven Gen-Elementen wie Transposons oder Viren, die ihr Genom in der Wirtszelle zu vermehren versuchen (Elbashir et al., 2001b).

RNAi ist aber auch als molekularbiologische Methode zur transienten Gen-Stillegung geeignet. Es bietet die Möglichkeit in verschiedenen Organismen Gen-Funktionen zu untersuchen und ist auch als therapeutisches Konzept für die Forschung von großem Interesse.

In dieser Arbeit wird die RNA Interferenz zur Funktionsanalyse des Transkriptionsfaktors Miz-1, einem Interaktionspartner von Myc, angewandt.

1.3. Miz-1 – das Myc-interagierende Zinkfingerprotein 1

1.3.1. Miz-1 – Struktur und Eigenschaften

Miz-1 – das *Myc interacting zinc finger protein 1* – besitzt eine aminoterminal POZ-Domäne (*pox virus* und *zinc finger*) und dreizehn carboxyterminale Zinkfinger (siehe Abbildung 1.3). Zwölf der Zinkfinger liegen in aufeinander folgenden Tandemwiederholungen vor und der dreizehnte ist durch eine Zwischensequenz von 80 Aminosäuren von den anderen getrennt. Diese Region bildet strukturell eine α -Helix aus und ist funktionell verantwortlich für die Protein-Protein-Interaktion mit Myc (Peukert et al., 1997). Die 108 Aminosäuren lange aminoterminal POZ-Domäne bietet ihrerseits eine weitere Protein-Interaktionsfläche, die erfahrungsgemäß auf eine Homodimerisierung hindeutet (Bardwell and Treisman, 1994), welche bei Miz-1 allerdings nicht nachgewiesen werden konnte.

Durch Komplexierung mit Myc erfolgt eine Translokalisierung in den Zellkern, wodurch der Miz/Myc-Komplex seine Löslichkeit verliert und in Kernaggregaten vorliegt (Peukert et al., 1997).

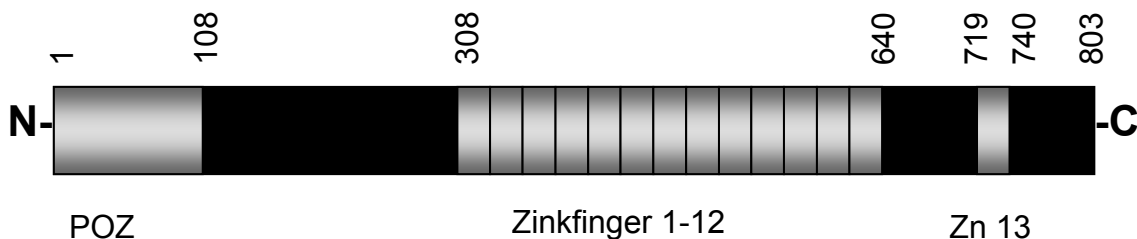


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Proteins Miz-1 (*Myc interacting zinc finger protein 1*)

Die Darstellung zeigt die verschiedenen Domänen des Miz-1 Proteins. Die ersten 108 Aminosäuren des N-terminalen Endes bilden die POZ-Domäne (*pox-virus and zincfinger*). Das Protein besitzt außerdem dreizehn carboxyterminale Zinkfinger. Der dreizehnte Zinkfinger ist durch eine Zwischensequenz von 80 Aminosäuren von den anderen separiert. Diese Trennregion bildet strukturell eine α -Helix und stellt die Interaktionsfläche zwischen Myc und Miz-1 dar.

Das Gen Miz-1 konnte auf dem Chromosom 1(1p36.1-1p36.2) lokalisiert werden (Tommerup and Vissing, 1995). Die Deletion dieser Region 1p36 konnte als eine häufige zytogenetische Aberration eines malignen Tumors der Neuralleiste, dem Neuroblastom, nachgewiesen werden (Brodeur et al., 1977; Fong et al., 1989). Ein

Zusammenhang zwischen dem Fehlen dieses Genmaterials und der Tumorerkrankung lässt sich daher vermuten.

Eine komplette Deletion beider Allele des Miz-1 Gens ist bei Mäusen innerhalb der ersten Woche der Embryonalphase letal. Sie zeigen eine verminderte Expression des Zellzyklusinhibitors $p57^{Kip2}$ im Vergleich zu Wildtypembryonen (Adhikary et al., 2003), während heterozygote Mäuse phänotypisch unauffällig sind (Peukert et al., 1997).

1.3.2. Miz-1 und das Proto-Onkogen Myc

Charakteristischerweise sind Zinkfingerproteine mit POZ-Domänen Repressoren der Transkription (Deweindt et al., 1995). Miz-1 kann jedoch ebenso Gene aktivieren:

Miz-1 bindet und aktiviert unter dem Einfluss weiterer Interaktionspartner die Initiatorregion INR des $p15^{Ink4b}$ -Promotors und induziert die Transaktivierung des CdK-Inhibitors (Staller et al., 2001). Miz-1 bewirkt die transkriptionelle Aktivierung des $p15^{INK4B}$ -Promotors über Bindung eines Koaktivators, $p300$ (Staller et al., 2001). Myc hemmt diese transkriptionelle Aktivierung, indem es die Bindungsstelle des Co-Aktivators $p300$ blockiert (Staller et al., 2001).

In der durch das antimitogene Zytokin TGF- β vermittelten Schadensantwort kommt es infolge einer Reduktion der Myc-Expression zu einer Dissoziation des Myc/Miz-1-Inhibitor-Komplexes und Miz-1 wird zur Transaktivierung des $p15^{Ink4b}$ -Promotors mit Hilfe seiner Co-Aktivatoren frei. Als weiterer Input ist dabei die Rekrutierung der Smad-Proteine 3 und 4 an ihre Bindestelle, die Smad-Binderegion SBR am $p15^{Ink4b}$ -Promotor erforderlich. Der Smad-Komplex kooperiert mit Miz-1 in der Transaktivierung des Promotors (Seoane et al., 2001).

Demgemäß ist die Expression des CdK-Inhibitors $p15^{Ink4b}$ in Miz-1 abhängiger Weise reguliert.

Das Protein $p15^{INK4B}$ gehört zu den CdK (Cyklin dependent Kinase)-Inhibitoren, die im Zellzyklus die Aktivität der Cyklin abhängigen Kinasen herabsetzen. So verhindert $p15^{INK4B}$ indirekt, dass das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein Rb phosphoryliert wird. Wie bereits für den CdK-Inhibitor $p21^{cip1}$ erläutert, wird so der Progress der Zelle im Zellzyklus verhindert. So veranlasst Miz-1 über seine Bindung an den $p15^{INK4B}$ -Promotor einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Staller et al., 2001).

Miz-1 überexprimierende Zellen weisen phänotypisch ein deutlich langsames Wachstum auf (Staller et al., 2001). Myc antagonisiert durch seine Bindung an Miz-1 diesen Effekt. Strukturell konnte die Assoziation von Myc zu Miz-1 auf die Region zwischen dem zwölften und dreizehnten Zinkfinger sowie einem aminoterminalen Bereich vor dem ersten Zinkfinger festgelegt werden (Peukert et al., 1997).

Myc inhibiert die transkriptionelle Aktivierung des $p15^{INK4B}$ -Promotors. Dabei tritt Myc nicht selbst mit dem INR-Element in Interaktion, sondern Miz-1-vermittelt, indem es das Zinkfingerprotein in der gleichen Region bindet, wie dessen Koaktivator $p300$. Eine Koexpression von Myc und Miz führt vermutlich über Verdrängung von $p300$ aus dem Komplex mit Miz zum Verlust der Transaktivierung des $p15^{INK4B}$ -Promotors (Staller et al., 2001).

Die Entwicklung eines Tumors ist auf multiple Störungen im genetischen Programm einer Zelle zurückzuführen. Mutationen des Gens Myc und der Onkoproteine der Myc-Familie gehören zu den häufigsten Mutationen in humanen Tumorzellen.

Das Proto-Onkogen *c-myc* ist das zelluläre Homolog eines viralen Myc-Gens (*v-myc*), das bei Vögeln die Tumorerkrankung Myelocytomatose induziert (Bister and Duesberg, 1979; Sheiness and Bishop, 1979). Zu der Myc-Proteinfamilie gehören außerdem *N-Myc* (Schwab et al., 1984), *L-Myc* (Nau et al., 1985), *B-Myc* (Asker et al., 1989; Resar et al., 1993) und *S-Myc* (Sugiyama et al., 1989), von denen sich besonders *c-*, *L-* und *N-Myc* für die Tumorentstehung beim Menschen von Bedeutung erwiesen haben. Amplifikationen eines Onkogens der Myc-Familie und die daraus resultierende Überexpression des Myc-Proteins kommen in zahlreichen Tumoren vor, wie z.B. dem Neuroblastom (Seeger et al., 1985), dem kleinzelligen Bronchialkarzinom SCLS (Nau et al., 1985), dem Burkitt-Lymphom (Adams et al., 1985), in Prostatatumoren (Jenkins et al., 1997), im Kolonkarzinom (Erisman et al., 1985) und auch in Melanomen (Grover et al., 1997).

Strukturell ordnet sich das Protein in die Familie der Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper (HLH/LZ) Proteine ein (siehe Abbildung 1.4). Es ist mit diesem Transkriptionsfaktortypischen Strukturelement zur Protein-Heterodimerisierung (Landschulz et al., 1988; Murre et al., 1989) und über die benachbarte basische Region (BR) auch zur direkten DNA-Bindung befähigt (Ferre-D'Amare et al., 1993). Die aminoternale TAD-Domäne (*transcription activation domain*) enthält zwei innerhalb der Myc-Familie stark

konservierte Regionen, Myc-Box 1 und Myc-Box 2, die gemeinsam für die Transkriptionsaktivität von Myc notwendig sind (Stone et al., 1987). Für die Kernlokalisierung des Proteins ist das Kernimportsignal an Aminosäureposition 320 verantwortlich (Dang and Lee, 1988).

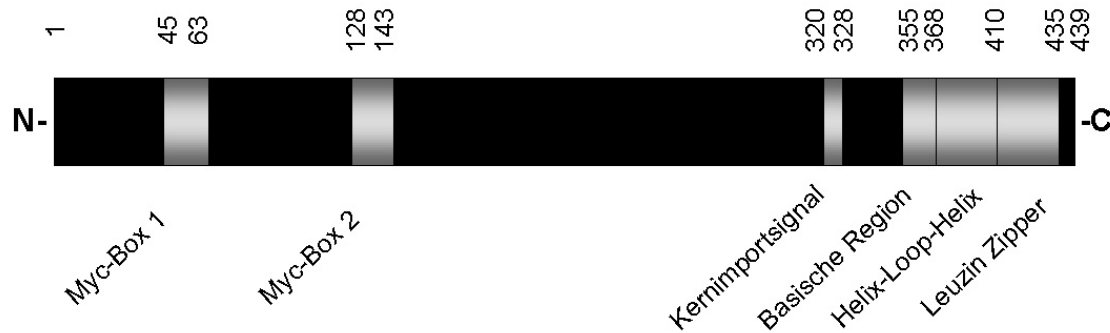


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Proteins Myc

Die Darstellung zeigt die verschiedenen Domänen des Myc-Proteins. Die aminoterminal TAD-Domäne (*transcription activation domain*) enthält zwei innerhalb der Myc-Familie konservierte Regionen, Myc-Box 1 und Myc-Box 2. An Aminosäureposition 320 liegt ein Kernimportsignal. Über die angrenzende basische Region (BR) ist Myc zur unmittelbaren DNA-Bindung fähig. Die Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper- (HLH/LZ-) Domäne ist ein typisches Strukturmerkmal von Transkriptionsfaktoren.

Im Zusammenspiel mit den jeweiligen Interaktionspartnern kann Myc sowohl Genaktivierung als auch Genrepression vermitteln.

Als Heterodimer mit einem weiteren Onkogenprodukt, seinem Partnerprotein Max, welches ebenfalls ein bHLH/LZ-Protein ist, zeigt Myc eine sequenzspezifische DNA-Bindungs Kapazität (Amati et al., 1993). Die Bindung von Myc/Max-Heterodimeren an eine palindromische Sequenz der Zielgen-DNA, die als E-Box bezeichnet wird, führt zur Genaktivierung (Blackwell et al., 1993).

Die Bindung von Myc an Miz-1 mit Verdrängung des Koaktivators *p300* am *p15^{INK4B}*-Initiator-Element (INR) bewirkt wie bereits erläutert eine Genrepression (Staller et al., 2001).

1.3.3. Miz-1 – Interaktionspartner

Als weiterer Interaktionspartner von Miz-1 wurde TopBP1, das Topoisomerase II-bindende Protein 1, identifiziert. Die Interaktion erfolgt über die POZ-Domäne von Miz-1 und führt zur Stabilisierung von TopBP1 (Herold et al., 2002).

TopBP1 enthält acht sogenannte BRCT-Domänen (*BRCA1 carboxyl-terminal*). Dieses Strukturmotiv wurde erstmals im BRCA1-Protein identifiziert (Koonin et al., 1996). Seither wurden mehr als 50 weitere Gene entdeckt, deren Proteine mit einer oder mehrerer dieser Domänen zumeist an der Zellzyklusregulation (BRCA1, p53BP1) oder DNA-Reparaturprozessen (z.B. DNA-LigaseIII) beteiligt sind.

Über seine BRCT-Domänen kann TopBP1 an DNA binden. Dabei bindet das Topoisomerase II-bindende Protein 1 an DNA-Enden, wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche, nicht jedoch an intakte DNA (Yamane and Tsuruo, 1999).

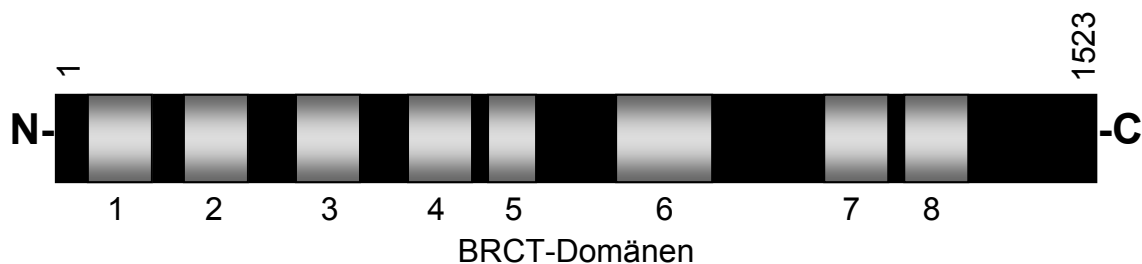


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Proteins TopBP1 (Topoisomerase II-bindendes Protein 1)

Die Darstellung zeigt die einzelnen Domänen des TopBP1-Proteins. TopBP1 besitzt 8 BRCT-Domänen (*BRCA1 carboxyl-terminal*). Über die 7. BRCT-Region wird die Interaktion mit der POZ-Domäne von Miz-1 vermittelt.

Durch Immunfluoreszenzexperimente in HaCaT-Zellen konnte eine homogene Lokalisation von TopBP1 und Miz-1 in ungestressten Zellen nachgewiesen werden. Auf UVB-Bestrahlung reagieren die Zellen mit einer intranukleären Translokation von TOPBP1 in Kernkompartimente, wie mittels der Fluoreszenzaufnahmen dargestellt werden konnte. Im Unterschied dazu verändert Miz-1 seine intrazelluläre Lokalisation nicht (Herold et al., 2002). Daraus lässt sich schließen, dass TopBP1 in der zellulären UV-Antwort aus dem Protein-Komplex mit Miz-1 entlassen werden muss. Diese Annahme konnte durch Koimmunopräzipitations-Experimente belegt werden, in denen eine starke Reduktion von Miz-1-gebundenem TopBP1 durch UV-Licht nachgewiesen werden konnte (Herold et al., 2002).

TopBP1 ist involviert in die zelluläre Antwort auf UV-Strahlen und DNA-Schäden (Yamane et al., 2002).

Wie in Deletionsanalysen gezeigt werden konnte, wird über die 7. BRCT-Region die Interaktion mit der POZ-Domäne von Miz-1 vermittelt (Herold et al., 2002).

UV-Bestrahlung der Zelle (z.B. Maus-Embryo-Fibroblasten) bewirkt eine negative Regulation der Expression des Topoisomerase-bindenden Proteins TopBP1. Dieses liegt wie beschrieben assoziiert an Miz-1 vor und bewirkt so dessen funktionelle Hemmung (Yamane et al., 1997). Durch UV-Bestrahlung wird Miz-1 aus dem inhibitorischen Komplex mit TopBP1 freigesetzt und ist somit transkriptionell aktiv (Herold et al., 2002).

Die Beteiligung von Miz-1 an der DNA-Schadensantwort auf UV-Bestrahlung ist Thema der vorliegenden Arbeit.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Antwort der Zelle auf DNA-Schäden verschiedener Art, der Genexpression von Myc und einigen seiner Interaktionspartner nach DNA-Schädigungen sowie besonders mit der Rolle des Zinkfingerproteins Miz-1 in der zellulären Antwort auf UV-Licht.

Die Thematik konzentriert sich auf die Beantwortung folgender Fragestellungen:

Wie reagieren Zellen hinsichtlich der Expression von Myc und seinen Interaktionspartnern Miz-1, TopBP1 und den CdK-Inhibitoren *p15^{INK4B}* und *p21^{cip1}* auf DNA-Schädigung durch die Zytostatika Hydroxy-Harnstoff oder Zeozin oder auf UV-induzierte DNA-Defekte?

Wie unterscheidet sich die DNA-Schadensantwort in Abhängigkeit von der genetischen Ausstattung der Zelle mit dem für Stabilität des Genoms verantwortlichen p53?

Welche Rolle spielt das Zinkfingerprotein Miz-1 als Interaktionspartner von Myc in der zellulären Antwort auf UV-induzierte DNA-Schäden?

Zur Klärung dieser Frage sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die RNA Interferenz-Technik für das Zinkfingerprotein Miz-1 in den für die DNA-Schadens-Experimente vorgesehenen Zelllinien HeLa (Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie), HaCaT (p53-defiziente, humane Keratinozyten-Zelllinie) und MEF (murine embryonale Fibroblasten-Zelllinie) etabliert werden.

Der Schwerpunkt in der Etablierung der Methode der RNA Interferenz lag in der Konstruktion geeigneter RNA-Doppelstränge, Optimierung der Transfektionseffizienzen für die RNA-Oligonukleotide, der Modifizierung des Transfektionsprotokolls in Anpassung an die genannten Zelllinien und dem Nachweis des RNA-Interferenz-Effektes in Bezug auf die Zielgene.

Die Methode sollte anschließend Anwendung finden in der Untersuchung der Funktion von Miz-1 und seiner Beteiligung an zellulären Schadenskontrollpunkten und Aussagen liefern über die Bedeutung des Zinkfingerproteins im Rahmen der UV-induzierten Zellreaktion auf DNA-Schäden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

HaCaT	Humane Keratinozyten-Zelllinie (freundlicherweise von N.E. Fusenig, Heidelberg zur Verfügung gestellt)
HeLa	Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie (ATCC)
MEF	primäre embryonale Maus-Fibroblasten, mit der Nulldeletion des Gens <i>p19ARF</i> ^{-/-}

2.1.2. Materialien für die Zellkultur

Vollmedium (für HaCaT, HeLa, MEF)	500 ml DMEM (Dulbeccos modified Eagles Medium, Gibco); 50 ml FCS; 5 ml L-Glutamin (200 mM); 5 ml Penicillin/Streptomycin Stammlösung (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin);
Transfektionsmedium	500 ml DMEM (Dulbeccos modified Eagles Medium, Gibco); 50 ml FCS; 5 ml L-Glutamin (200 mM);
Opti-Mem	Invitrogen Life-Technologies
Einfriermedium	DMEM, 20% FCS, 10% DMSO, Penicillin, Streptomycin, Glutamin wie Vollmedium
Trypsin/EDTA	1x Trypsin-EDTA gebrauchsfertige Lösung (Gibco)
Zeozin	Cayla, Stammlösung 10 mg/ml

Hydroxy-Harnstoff	Sigma, Stocklösung 1 M in aqua dest., sterilfiltriert Endkonzentration 1 mM
FluoroLink™Cy3™	Amersham LIFE SCIENCE
PBS pH 7.4	130 mM NaCl 3 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM NaH ₂ PO ₄ ad pH 7.4 mit HCl justiert

Plastikwaren, Kulturschalen und -flaschen sowie andere Einwegartikel für die Zellkultur wurden entweder über die Firmen Greiner oder Nunc bezogen.

2.1.3. Materialien für die Biochemie

2.1.3.1. Reagenzien für die Zelllyse

Lysepuffer	150 nM NaCl 1% (v/v) NP-40 (Sigma) 50 nM Tris- Puffer pH 8 Lagerung : +4°C
------------	---

Dem Lysepuffer wurden folgende Proteaseinhibitoren unmittelbar vor Verwendung zugesetzt :

Proteaseinhibitoren (Stammlösungen)	Aprotinin (Roche Biochemica) 5 mg/ml in PBS pH7.4 Leupeptin (Roche Biochemica) 5 mg/ml in aqua dest. Pepstatin A (Roche Biochemica) 1 mg/ml in Methanol Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma) 0,2 M in Ethanol
--	---

alle Proteaseinhibitoren wurden 1:1000 verdünnt eingesetzt.

2.1.3.2. Reagenzien für die Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) 4,75% (v/v) Ethanol 10% (v/v) <i>Ortho</i> -Phosphorsäure in aqua dest. filtriert und vor Licht geschützt gelagert
Referenz-Stocklösung	BSA (Fraktion V, AppliChem) 1 mg/ml in Lysepuffer
sonstiges	0,15 M Natriumchlorid-Lösung

2.1.3.3. Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6.8 0,4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8.8 0,4% (w/v) SDS 8 mM EDTA
Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8.3 0,2 M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid (Applichem), 0,8% (w/v) N, N'-Methylen-Bisacrylamid (Sigma) in aqua dest. Lagerung: +4°C lichtgeschützt
3x SDS Probenpuffer	4,8 ml 4x Trenngelpuffer 0,6 g SDS 0,426 g Dithiothreitol (DTT) eine Spatelspitze Bromphenolblau 3,5 ml Glycerin ad 10 ml mit aqua dest.
APS	Ammoniumperoxodisulfat 10% (w/v) in aqua dest.
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Gibco)
Isopropanol (Roth) 100%	
Molekulargewichtsmarker	Rainbow-Marker, full range (Amersham)

2.1.3.4. Materialien für Westernblot

Blotpuffer	10-20% (v/v) Methanol 192 mM Glycin 25 mM Tris-Base
Blocklösung	5% (w/v) Magermilchpulver (Merck) 0,2% Tween-20 in TBS
TBS	50 mM Tris/HCl pH7.4 150 mM NaCl
TBS-T	TBS 0,2% (v/v) Tween-20
Methanol	100% (zur Behandlung der PVDF Membran)
Blotting Membran	Immobilon-P, PVDF Transfer Membran (Millipore)
Entwicklung	Sekundäre Antikörper anti-Maus und anti-Kaninchen, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (Amersham), ECL ⁺ -Lösung (Amersham)
Film	ECL Hyperfilm (Amersham)

2.1.3.5. Lösungen für die Immunfluoreszenz

PBS pH 7.4	siehe Materialien für die Zellkultur
Formaldehyd	20% (w/v) Paraformaldehyd in PBS pH 7.4 bei -20°C gelagert zum fixieren 4% Endkonzentration
0,1 M Glycin	Glycin 0,1 M in PBS pH 7.4
0,1% NP-40	NP-40 0,1% (v/v) in PBS pH 7.4
Mounting Medium	70% Glycerin, 0,1% Na-Azid in PBS

2.1.3.6. Materialien für die Luziferaseaktivität

PBS pH 7.4	130 mM NaCl 3 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM NaH ₂ PO ₄ ad pH 7.4 mit HCl justiert
DTT (1,4-Dithiothreitol)	1,5 g DTT (Roth) in 10 ml aqua dest.
Lysepuffer	0,1 M K ₂ HPO ₄ pH 7.8 / 1 mM DTT
Kpi-Puffer	100 mM K ₂ HPO ₄ , pH mit 0,5m KH ₂ PO ₄ auf 7,8 eingestellt
Reaktionspuffer	2 mM ATP pH 7,0; 0,1 M MgSO ₄ ; 25 mM Gly-Gly pH 7,8
Substratmix	0,2 mM D-Luziferin (Applichem); 25 mM Gly-Gly pH 7,8
Luminometer	Lumat LB 9507, Berthold

2.1.3.7. Materialien zur β -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung

Z-Puffer	16,1 g/l Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O 5,5 g/l NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,75 g/l KCl 0,246 g/l MgSO ₄ x 7H ₂ O
ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid)	10mg/1ml Z- Puffer/2,7 μ l 2-Mercaptoethanol
Reaktionspuffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8,0; 10 mM KCl; 50 mM 2-Mercaptoethanol
Substratlösung	4 mg/ml ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) in Wasser

2.1.3.8. Materialien für Northernblot

DEPC	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat
Agarose	Agarose (Biorad)
Etidiumbromid-Lsg.	1% (Roth)
37% Formaldehydlösung	
10x RNA-Laufpuffer	200 mM MOPS pH 7,0 80 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Probenpuffer	50% deionisiertes Dimethylformamid 20% DEPC-Wasser 10x Laufpuffer 20% Formaldehydlösung (37% in Wasser)
10x Ladepuffer	50% Glycerin 1 mM EDTA pH 8,0 0,25% Bromphenolblau
20x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Trinatriumcitratdihydrat ad 1 l mit H ₂ O auffüllen, pH 7,0
Prime-It II-System	Stratagene
α -[³² P]-dCTP	Redivue 3000 Ci/mmol, Amersham
Sephadex G-50 Filtrationssäule	ProbeQuant G-50, Pharmacia
5x Denhardt`s	0,1% Ficoll, 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 0,1% BSA
5x SSC	0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat
Prähybridisierungslösung	50% Formamid 5x Denhardt`s 5x SSC 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6,5 0,1% SDS in DEPC-Wasser + 100 µg/ml Lachssperma-DNA
Hybridisierungslösung	50% Formamid 1x Denhardt`s 5x SSC 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6,5

	0,1% SDS
	10% Dextransulfat
	in DEPC-Wasser
	+ 100 µg/ml Lachssperma-DNA
Waschlösung1	2x SSC, 0,1% SDS bei RT
Waschlösung2	2x SSC, 1%SDS bei 42°C
Waschlösung3	1x SSC, 1% SDS bei 50°C
GS Gene Linker Biorad	

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Primäre Antikörper

anti-Cdk2	polyklonaler Kaninchenantikörper M2 (St. Cruz)
anti-Miz-1	monoklonaler Mausantikörper (Hybridomüberstände) (J. Bartek): 10E2 für Westernblot und Immunfluoreszenz

2.1.4.2. Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen FITC gekoppelt	Affinitätsgereinigter Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin Antikörper (Dianova)
anti-Kaninchen Cy3 TM gekoppelt	Affinitätsgereinigter Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin Antikörper (Dianova)
anti-Maus Cy3 TM gekoppelt	Affinitätsgereinigter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper (Dianova)
anti-Maus FITC gekoppelt	Affinitätsgereinigter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper (Dianova)

anti-Kaninchen Affinitätsgereinigter Esel anti-Kaninchen Immunglobulin
HRP gekoppelt Antikörper (Amersham)

anti-Maus Affinitätsgereinigter Schaf anti-Maus Immunglobulin
HRP gekoppelt Antikörper (Amersham)

2.1.5. Plasmide

pcDNA3(leer) Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV
(Cytomegalievirus) Promotor und T7 Promotor (Invitrogen)

pcDNA3.1(-) eGFP Eukaryontischer Expressionsvektor für das enhanced green
fluorescent protein (EGFP). NheI/AflIII Fragment aus
pd2EGFP-N1 (Clontech) in NheI / AflIII Schnittstellen von
pcDNA3.1(-).

CMV- β -gal Vektor für die Expression von β -Galaktosidase in
eukaryontischen Zellen (von Stefan Gaubatz zur Verfügung
gestellt).

pGL2 Vektor mit dem Luziferase-Reportergen und einem SV 40
Promotor

2.1.6. Materialien für die Molekularbiologie

2.1.6.1. Bakterienstämme

XL1-Blue *E.coli* recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB
lacI^qZ Δ M15 Tn10 (tet^r)]^c

DH5 α *E.coli* F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYAaegF)U169 deoR recA1 endA1
hsdR17 (r_Kⁱ, m_K⁺) phoAsupE44 λ thi-1 gyrA96 relA1

2.1.6.2. Medien für die Bakterienkultur

LB (1000 ml)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 3 g Glucose pH 7.0
LBA-Medium	LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin
SOC-Medium	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM Glucose

2.1.6.3. Allgemeine Puffer

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8.0 100 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8.0
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
STET-Puffer	8% (w/v) Saccharose 0,5% (v/v) Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH 8,0

2.1.6.4. Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg synthetisiert. Sie wurden als Lyophilisat erhalten und in aqua dest. in einer Konzentration von 100 µM aufgenommen.

Primer für die RT-PCR

a) Expressionsanalyse humaner Gene:

GAPDH	5'- primer: 5'- GGGGTGAGGCCGGTGCTGAGTAT -3' 3'- primer: 5'- CATTGGGGGTAGGAACACGGAAGG -3'
Miz-1	5'- primer: 5'- ACCAGGGCAAGGCAGGCATCAAG -3' 3'- primer: 5'- GCAGGCGGGGGACATTCAGGAG -3'
Myc	5'- primer: 5'- GGAATTCAAGAGGCGAACACACAACGTC -3' 3'- primer: 5'- CGGGATCCTTACGCACAAGAGTTCCGTA -3'
<i>p15^{INK4B}</i>	5'- primer: 5'- GGACGACGGGAGGGTAATGAA -3' 3'- primer: 5'- CTGGGGAACCTGGCGTCAGTC -3'

b) Expressionsanalyse muriner Gene:

GAPDH	5'- primer: 5'- GGGGTGAGGCCGGTGCTGAGTAT -3' 3'- primer: 5'- CATTGGGGGTAGGAACACGGAAGG -3'
Miz-1 (LP1)	5'- primer: 5'- AGGGCAAGGCGGGCATCAAGA -3' 3'- primer: 5'- CTCGGCAGGTGGTAGGCAATCAGG -3'
<i>p21^{cip1}</i>	5'- primer: 5'- GAGGCCCGAGAACGGTGGAACTT -3' 3'- primer: 5'- CTCCGTTTTTCGGCCCTGAGATGTT -3'

2.1.6.5. Oligonukleotide für RNAi-Versuche

GL2	sense 5'- CGUACGCGGAAUACUUCGATT -3' antisense 3'- TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU -5'
Miz-1 (murin)	sense 5'- CUGGGCCUCCUCUGUGACUGCdTdT -3' antisense 5'- GCAGUCACAGAGGAGGCCAGdTdT -3'
Miz-1 (human)	sense 5'- CCAGCAGCGGCAGCUGGGGCdTdT -3' antisense 5'- GCCCCAGCUGCCGCUGCUGGdTdT -3'

2.1.6.6. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Agarose	Agarose (Biorad)
Etidiumbromid-Lsg.	1% (Roth)
Desoxynukleotide	Sigma (100 mM je dATP,dCTP,dGTP,dTTP) für PCR Stratagene (je 2,5 mM für reverse Transkription)

Taq-Polymerase	RedTaq, Sigma
Pwo-Polymerase	HYBAID-AGS
Superscript II Reverse Transcriptase	Gibco-Live-Technologies (200 U/ μ l)
DTT (1,4-Dithiothreitol)	1,5g DTT in 10 ml aqua dest.
Oligo-(dT) Primer	Boehringer Mannheim
dNTP-Mix	10 mM (Sigma)

2.1.7. Kit-Systeme

Plasmid Maxi Kit	Qiagen-tip 500 (Qiagen)
RNA-Isolationskit	Qiagen RNeasy (Quiagen)
DNA-Markierung	Prime-It II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) (radioaktiv)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologie

2.2.1.1. Zellkulturbedingungen

Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zellexperimente und Kulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Arbeitsbank (Heraeus HeraSafe) durchgeführt. Alle verwendeten Säugerzelllinien wurden in Adhäsionskultur auf Polystyrol-Zellkulturschalen mit den Durchmessern 6 cm, 10 cm oder 15 cm (Nunc, Greiner) gehalten.

HaCaT-, HeLa- und MEF-Zellen wurden in DMEM-Vollmedium (siehe Material) in Heraeus BBD 6220 Begasungsbrutschränken bei 37°C, 96% relativer Feuchte und 5% CO₂ kultiviert.

Passagieren von Zellen

Je nach Wachstumsrate der Zellen wurden die verwendeten Zelllinien alle 3-5 Tage verdünnt und erneut auf frischen Zellkulturschalen plattiert. Die Verdünnung lag je nach Zelldichte zwischen 1:2 und 1:40. Zum Ablösen der Zellen von den Kulturschalen wurden sie mit einer Trypsin/EDTA Lösung behandelt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen, um die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung 5 min bei 37°C inkubiert, bis sie sich völlig von der Kulturschale gelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen in Medium verdünnt und in Zellkulturschalen überführt, die mit frischem Medium vorbereitet waren.

Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine modifizierte Neubauer-Zählkammer verwandt. Nach Anweisung des Herstellers wurde ein Deckglas auf die Zählkammer geschoben, so dass sogenannte Newtonschen-Ringe zu sehen waren. Anschließend wurde ein Tropfen der trypsinisierten Zellen in die Zählkammer pipettiert und die Zellzahl von 25 Feldern ausgezählt. Der daraus errechnete Mittelwert wurde mit 10⁴ multipliziert um die Zellen pro ml zu ermitteln.

Einfrieren von Zellen

Für die Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Bildung von schädlichen Eiskristallen beim Einfriervorgang zu vermeiden, wurden die Zellen in speziellem Einfriermedium langsam auf die Lagertemperatur gebracht. Dazu wurden die Zellen zunächst trypsinisiert. Danach wurden sie durch Zentrifugation für 5 min in einer Heraeus Minifuge RF bei 1000 rpm vom Kulturmedium abgetrennt. Das Zellpellet wurde in DMEM-Medium mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen (ca. 5×10^6 Zellen/ml). Die erhaltene Zellsuspension wurde in Nunc Cryogefäßen (2 ml) abgefüllt und in Eis bei -80°C über Nacht eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

Auftauen von Zellen

In Stickstoff tiefgekühlte Zellaliquots wurden direkt von -172°C in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad überführt und dort aufgetaut, bis die Zellsuspension gerade flüssig wurde. Die Zellsuspension (1 ml) wurde sofort mit 10 ml Vollmedium gemischt und danach für 5 min in einer Heraeus Minifuge RF bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf 10 cm Platten ausgesät, so dass eine Dichte von 5×10^5 bzw. $1,5 \times 10^6$ Zellen/Platte nicht unterschritten wurde.

2.2.1.2. Behandlung von Zellen mit Zeozin

Zur Provokation von Regulations- und Reparaturprozessen musste zunächst mittels chemischer bzw. physikalischer Noxen das Gleichgewicht der Zellen durch gezielte Schadensinduktion gestört werden. Zu diesem Zweck wurden HaCaT-Zellen mit dem Zytostatikum Zeozin behandelt. Anschließend wurde die RNA der Zellen geerntet, durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und durch eine darauffolgende quantitative PCR mit Gen-spezifischen Primern analysiert.

Um gezielt DNA-Schäden zu induzieren wurden im folgenden Versuch HaCaT-Zellen mit Zeozin behandelt. Dazu wurden die Zellen unter den genannten Bedingungen kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 75% mit $100 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ des Zytostatikums behandelt. Das Experiment wurde als „Time-Course“ gestaltet, d.h. es wurden 0, 2, 4

und 6 Stunden nach der Zeozin-Behandlung je eine behandelte und eine unbehandelte Kontrolle geerntet.

Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus wurden weitere Proben mit UVB-Strahlung behandelt.

2.2.1.3. Bestrahlung von Zellen mit UVB

Im erfolgten Versuch wurden ca. 75% konfluente MEF-Zellen unter einer UV-Handlampe (6 Watt Lampe, UVP) für 60 sec (250 J/m^2) mit UVB-Licht (302/312 nm) bestrahlt. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen das Nährmedium abgenommen und im Falcon aufbewahrt. Die Zellen wurden vor der Strahlenbehandlung mit PBS gewaschen und der Zellkulturschalendeckel abgenommen. Nach der Bestrahlung wurde das Medium zurückgegeben um eine Effektverfälschung durch Medienwechsel zu vermeiden.

Dann wurden die Zellen weiter im 37°C Brutschrank inkubiert und je nach Versuchsdesign transfiziert und geerntet.

2.2.1.4. Behandlung von Zellen mit Hydroxy-Harnstoff

Hydroxy-Harnstoff wurde in einer Konzentration von 1 mM in das Medium gegeben, und die Zellen anschließend 1-10 Stunden damit inkubiert.

2.2.1.5. Transiente Transfektion von eGFP durch Kalziumphosphatpräzipitation

Einen Tag (20 Stunden) vor der eGFP-Transfektion wurden 1×10^6 Zellen auf 10 cm Kulturschalen plattiert. Vier Stunden vor der Transfektion wurden das Medium abgesaugt und die Zellen mit frischem Transfektionsmedium versetzt. Die zu transfizierende pcDNA3.1(-) eGFP-DNA wurde mit aqua dest. auf ein Volumen von 438 μl aufgefüllt und 62 μl einer 2 M CaCl_2 -Lösung wurden zugegeben. In 5 ml Reaktionsgefäßen wurden pro Ansatz 500 μl eines 2x HBS-Puffers (280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 50 mM HEPES-KOH pH 7.05) tropfenweise in die DNA- CaCl_2 -Lösung gegeben, wobei gleichzeitig durch Einblasen von Luft über eine Pasteurpipette gemischt wurde. Das gebildete Präzipitat wurde resuspendiert und tropfenweise gleichmäßig auf den Zellrasen verteilt. Die Zellen wurden über Nacht mit dem

Präzipitat inkubiert und nach 12-16 Stunden zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Die eGFP exprimierenden Zellen konnten nach Inkubation von 12-48 Stunden an einem Leica DMIRB Mikroskop durch Fluoreszenz identifiziert werden.

2.2.1.6. Transiente Transfektion von Zellen durch Lipofektion

Die Lipofektions-Medien Oligofektamin und Lipofektin wurden zur transienten Transfektion von Oligonukleotiden eingesetzt. Die Transfektionen wurden nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt und im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Effizienz in Bezug auf die zu transfizierenden Oligonukleotide verglichen und optimiert.

2.2.1.7. Transiente Transfektionen für Reporterassays

a) Reporterassay: HaCaT, HeLa, MEF (ohne RNAi)

Transiente Transfektionen für Reporterassays wurden in Triplikaten durchgeführt. Jeweils 3×10^5 Zellen wurden in 6 cm Schalen plattiert und wieder 4 Stunden vor Transfektion einem Medienwechsel unterzogen. Die zu transfizierende DNA (3fach) wurde mit aqua dest. auf 585 μ l aufgefüllt und 65 μ l CaCl_2 -Lösung wurden zugegeben. Dazu wurden 650 μ l 2xHBS getropft und schließlich jeweils 400 μ l des Ansatzes auf eines der drei Schälchen gegeben. Zusätzlich wurden als interner Standard 100 ng des Expressionsvektors CMV- β -Gal kotransfiziert und später die Aktivität der β -Galaktosidase im Zellextrakt zusätzlich zur Luziferaseaktivität bestimmt.

b) Reporterassay: HaCaT, HeLa, MEF (mit RNAi)

Die Transfektion wurde unter gleichen Aussaat-Bedingungen, wie unter a) beschrieben, nur diesmal mittels Lipofektion durchgeführt.

Vergleichend wurden diesmal je ein Triplet jeder Zelllinie ohne und eines mit Kotransfektion von gegen das GL2-Plasmid gerichteter siRNA nach folgenden Ansätzen behandelt:

Ansatz A:

(pro 6er Platte):	HaCaT		HeLa		MEF	
siRNA- anti- GL2 (50 nM)	-	+	-	+	-	+
Reporter- Plasmid pGL2	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg	5 µg
Expressions- vektor CMV-β- gal (LacZ)	100ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
Optimem	ad 1 ml					

Ansatz B: **Lipofectin:** 5 µg/µl DNA
(pro 6er Platte) **Optimem:** ad 1 ml

2.2.1.8. Transfektion von Cy3

Zur orientierenden Untersuchung der Transfektionseffizienz der Lipofektion in den verschiedenen angewandten Zelltypen und auch zum Vergleich einiger Lipofektions-Medien wurden Cy3 (FluoroLink™Cy3™) markierte DNA-Einzelstränge transfiziert. Diese sind als Nukleinsäuren in Größe und Verhalten den zur Transfektion anstehenden RNA-Oligonukleotiden am ähnlichsten.

Die Zellen wurden dazu auf Deckgläschen (13 mm Durchmesser) in 6 cm Schalen kultiviert.

Nach den Methoden der Lipofektin- und Oligofectamin-Transfektion wurden sie mit dem Chromophor(Cy3)-Konjugat behandelt und in Anpassung an das verwendete Agens inkubiert.

Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen durch Inkubation mit 4% Paraformaldehydlösung (15 min, Raumtemperatur). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS pH 7,4 wurden die Deckgläschen vorsichtig entnommen und mit Mounting Medium auf einem Objektträger eingebettet um die Proben haltbar zu machen.

Die Auswertung der Experimente erfolgte an einem Leica DMIRB Mikroskop. Die Ergebnisse wurden mit einer Kappa CF 1/8 FMC CCD Kamera am Computer unter

Verwendung der Programme „IP Lab“ und „Adobe Photoshop“ dokumentiert. Des Weiteren wurden konfokalmikroskopische Schnittaufnahmen gefertigt.

2.2.2. Expression und Analyse von Proteinen

2.2.2.1. Herstellung von Zelllysate

Für die meisten Experimente (Westernblot, Reporterassay) wurden die Zellen mit Hilfe der Methode des schnellen Einfrierens und Auftauens ("freeze-thaw") bei Anwesenheit eines milden Detergenz im Lysepuffer aufgeschlossen. Hierfür wurden die mit PBS pH 7,4 gewaschenen Zellen durch mechanisches Entfernen von der Unterlage mit Hilfe eines Zellschabers in Suspension gebracht. Das PBS wurde durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 min bei 4°C entfernt. Das Zellpellet wurde entweder für die spätere Verwendung in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, oder sofort weiterverarbeitet. Für die Weiterverarbeitung wurde zu je 50 µl Zellpellet 250 µl Lysepuffer (NP-40 Puffer + Proteaseinhibitoren) zugegeben, das Pellet sorgfältig resuspendiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Wasserbad bei 37°C wiederaufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt (jeweils 2 min). Das Zelllysate wurde für 15 min bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode durchgeführt. Sofern die Zelllysate nicht sofort verwendet wurden, wurden sie bei -80°C eingefroren.

2.2.2.2. Proteinbestimmung nach Bradford (Harlow und Lane, 1988)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate geschieht über die Messung der Absorptionsmaxima der in Bradford-Reagenz gelösten Proben bei 595 nm.

Mit Hilfe einer BSA-Referenzkurve konnte der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt werden. Dazu wurden 1 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl und 10 µl einer BSA-Lösung (1 mg/ml) bzw. 2 µl des Zelllysates mit 100 µl einer 150 nM NaCl-Lösung und je 1 ml Bradfordreagenz versetzt. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Absorption der Proben (OD₅₉₅) gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Proben konnte anschließend anhand des erstellten BSA-Standards errechnet werden.

2.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Dabei hängt die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld neben der Durchlässigkeit der Matrix nur von deren Molekulargewicht ab. Als Matrix dienten Gele aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid, die aus einem niederprozentigem Sammelgel und einem je nach gewünschtem Auftrennungsbereich 7-15 prozentigem Trenngel bestanden. Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.2.4. Analyse von Proteinen durch Western-Blot

Semidryblot

Die Proteine wurden im *semi-dry* Verfahren aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Die Membran wurde für 1 min in 100% Methanol, dann für 2 min in Wasser und schließlich für mindestens 5 min in Transferpuffer inkubiert, um die Benetzung sicherzustellen. Der Transfer erfolgte in einer Transblot SD Apparatur (Biorad) nach Vorschrift des Herstellers bei 22 V und maximal 4 mA/cm² für 45 min. Dem Transferpuffer (25 mM TrisBase, 192 mM Glycin) wurde 10% Methanol für Proteine > 50 kD und 20% Methanol für Proteine < 50 kD zugesetzt.

Detektion

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Vermeidung unspezifischer Bindungen in Blocklösung (5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-T) für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte 2-4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dreimal 15 min mit TBS-T gewaschen und für zwei Stunden in mit dem sekundären, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper in Blocklösung (1:3000) inkubiert. Nach fünfmaligem 10 Minuten langem Waschen mit TBS-T wurden die spezifischen Banden durch das ECL⁺ Westernblotting Detection System (Amersham) nach Anweisung des Herstellers auf Hyperfilm detektiert.

2.2.2.5. Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die Zellen wurden 36 Stunden nach der Transfektion mit kaltem PBS gewaschen. 1 ml kaltes PBS/1 mM DTT wurde zu den Zellen gegeben und die Zellen mit einem Gummi-schaber geerntet und in der Kühlzentrifuge bei 2000 rpm für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 160 µl 0,1 M K_2HPO_4 pH 7,8/1mM DTT aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min von den unlöslichen Bestandteilen befreit und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 50 µl des Überstands wurden mit 350 µl Reaktionspuffer (2 mM ATP pH 7,0; 0,1 M $MgSO_4$; 25 mM Gly-Gly pH 7,8) versetzt und die Lichtemission im Luminometer nach Zugabe von 150 µl Substratmix (0,2 mM D-Luziferin; 25 mM Gly-Gly pH 7,8) gemessen.

2.2.2.6. Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität in den Lysaten diente dem Abgleich möglicherweise unterschiedlicher Transfektionseffizienzen der einzelnen Proben.

Die β -Galaktosidaseaktivität von Zellen, in die das CMV- β -Gal Expressionsplasmid transfiziert worden war, wurde in einer Farbreaktion bestimmt. Dazu wurden 50 µl des Zelllysats zu 750 µl Reaktionspuffer (60 mM Na_2HPO_4 pH 8,0; 10 mM KCl; 50 mM 2-Mercaptoethanol) in einer Halbmikro-Einmalküvette gegeben. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung (4 mg/ml ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) in Wasser) und Mischen wurden die Küvetten bei 37°C für 1-8 Stunden inkubiert, bis eine deutlich sichtbare Gelbfärbung auftrat. Die Konzentrationsbestimmung des entstandenen Produkts und damit die Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase erfolgte durch Messung der Absorption bei 420 nm.

2.2.2.7. Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Menge und der subzellulären Lokalisation eines bestimmten Proteins in der Zelle wurde die indirekte Immunfluoreszenz angewandt. Die Zellen wurden dazu auf Deckgläschen (13 mm Durchmesser) in 6 cm Schalen kultiviert. Nachdem die Zellen einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen wurden, erfolgte die Fixierung der Zellen auf dem Deckgläschen durch Inkubation (15 min, Raumtemperatur) mit 4%

Paraformaldehydlösung. Zur Neutralisation wurde zweimal mit 0,1 M Glycin in PBS (je 5 min) gewaschen und die Zellen dann mit 0,1% (v/v) NP-40 in PBS (je 10 min) permeabilisiert. Zur Verringerung von unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in Blocklösung (PBS/0,1% NP-40/5% FCS) inkubiert. Die Deckgläschen wurden in eine mit Parafilm ausgekleidete feuchte Kammer überführt und 45 min bei RT mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert. Die Antikörper wurden üblicherweise in einer Verdünnung von 1:50 in Blocklösung eingesetzt. Anschließend wurde dreimal mit Blocklösung gewaschen (5 min, RT). Die sekundären, Fluorophor-gekoppelten Antikörper wurden ebenfalls 1:50 in Blocklösung verdünnt. Die Zellen wurden wiederum 45 min mit dieser Lösung inkubiert. Danach wurde ungebundener Antikörper durch Waschen entfernt, zuerst dreimal 5 min mit PBS 0,1% NP-40, dann einmal mit PBS und abschließend einmal mit Wasser. Die Deckgläschen wurden vorsichtig entnommen, und mit Mounting Medium auf einem Objektträger eingebettet.

Die Auswertung der Experimente erfolgte an einem Leica DMIRB Mikroskop. Die Ergebnisse wurden mit einer Kappa CF 1/8 FMC CCD Kamera am Computer unter Verwendung der Programme „IP Lab“ und „Adobe Photoshop“ dokumentiert.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Photometrische Konzentrationsbestimmungen von DNA- und RNA-Lösungen, Transformationen, Polymerasekettenreaktionen (PCR), Verdau mit Restriktionsendonukleasen, sowie analytische und präparative Agarosegelelektrophorese und Extraktion der DNA aus dem Gel, wurden nach den in Standardwerken veröffentlichten Protokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.3.2. Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

100 µl auf Eis aufgetauter transformationkompetenter Bakterien wurden mit dem zur Transformation vorgesehenen Plasmid (0,1 µg-1 µg DNA) oder dem Ligationsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gelagert, anschließend mit 700 µl

LB-Medium ohne Ampicillin gemischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend auf LB^{Amp}-Agarplatten in geeigneter Verdünnung ausgestrichen oder zur Animpfung einer Übernachtskultur verwendet.

2.2.3.3. Analytische Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien

1 ml einer Übernachtskultur von transformierten Bakterien wurde für 1 min bei 700 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 110 µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5 mg/ml) aufgenommen. Diese Suspension wurde zunächst für 5 min bei RT und anschließend für 1 min bei 95°C inkubiert und schließlich für 15 min bei 13.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Nach Entfernung der Pellets wurde dem Überstand 110 µl Isopropanol zugegeben. In einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde dann einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl aqua dest. resuspendiert.

2.2.3.4. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmidpräparation in präparativem Umfang wurden mit einem System der Firma Qiagen nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt.

2.2.3.5. Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus kultivierten Zellen wurde der QIAamp DNA Mini-Kit der Firma Qiagen benutzt. Zunächst wurden die Zellen mittels eines Plastischabers von der Zellkulturschale abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde gemäß dem vom Hersteller angegebenen Protokoll weiterverarbeitet. Die in aqua dest. eluierte DNA wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3.6. Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde mit dem RNeasy-System (Qiagen) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die in Wasser gelöste RNA wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3.7. RT-PCR

Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit der rekombinanten „Superscript II“ Molony Mouse Leukämia Virus Reversen Transkriptase nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 5 µg RNA mit 2 µl Oligo-(dT) Primer mit DEPC-behandeltem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und anschließend 10 min bei 70°C denaturiert. Für die Synthese wurden zu dem Reaktionsansatz 5 µl First Strand Buffer, 2,5 µl 0,1 M DTT, 1,5 µl dNTP-Mix und 0,5 µl DEPC-H₂O für 2 min im 42°C Wasserbad inkubiert bevor dann 1,5 µl Superscript Reverse Transkriptase II (200 U/µl) beigemischt wurden. Nach 50 min im 42°C Wasserbad und weiteren 15 min im 70°C Heizblock zur Enzymaktivierung wurde die entstandene cDNA dann weiterverwertet oder bei -20°C gelagert.

PCR-Reaktionen

Die PCR dient zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA. Die Amplifikation der cDNA ist die RT-PCR-Reaktion. Diese erlaubt eine Analyse der Expression spezifischer zellulärer Gene und wird wie folgt durchgeführt:

Für jedes Primerpaar wurde ein PCR-Programm bestimmt und so optimiert, dass die Menge des Endprodukts im linearen Bereich lag und eine semiquantitative Analyse zuließ.

Aliquots von 10 µl wurden anschließend auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt, mit Etidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht detektiert.

In einem Primus Thermocycler (MWG) wurden folgende Grundprogramme verwendet:

GAPDH, Miz-1, <i>p21^{cip1}</i> : (Maus)	TOPBP1, <i>p15^{INK4B}</i> : (human)	GAPDH, Miz-1, Myc: (human)
1,5 µl cDNA	2,0 µl cDNA	2,0 µl cDNA
5,0 µl 10x Taq-Puffer *	5,0 µl 10x Taq- Puffer *	5,0 µl 10x Taq- Puffer *
1,0 µl dNTPs (je 10 µM)	1,0 µl dNTPs (je 10 µM)	1,0 µl dNTPs (je 10 µM)
2,0 µl 5' Primer 100 pmol/µl	5,0 µl 5' Primer 100 pmol/µl	5,0 µl 5' Primer 100 pmol/µl
2,0 µl 3' Primer 100 pmol/µl	5,0 µl 3' Primer 100 pmol/µl	5,0 µl 3' Primer 100 pmol/µl
1,0 µl Taq-Polymerase *	0,6 µl Taq-Polymerase *	1,5 µl Taq-Polymerase *
37,5 µl aqua dest.	31,4 µl aqua dest.	30,5 µl aqua dest.
Hotstart bei 95°C	Hotstart bei 95°C	Hotstart bei 95°C
3 min 95 °C	5 min 95 °C	3 min 95 °C
Zykluszahl x 30 sec 95°C	Zykluszahl x 30 sec 94°C	Zykluszahl x 45 sec 95°C
45 sec 50°C	30 sec 49°C	60 sec 53°C
45 sec 72°C	30 sec 72°C	60 sec 72°C
4 min 72 °C	1 min 72 °C	4 min 72 °C
4 °C	4 °C	4 °C
Zykluszahlen:	Zykluszahlen:	Zykluszahlen:
GAPDH 23	TopBP1 25	GAPDH 20
Miz-1 27	<i>p15^{INK4B}</i> 24	Miz-1 30
<i>p21^{cip1}</i> 16		Myc 30

* (von Sigma)

2.2.3.8. Northern-Blot

Alle verwendeten Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, das mit DEPC-Wasser für 12 Stunden bei 37°C vorbehandelt und autoklaviert war. Alle Materialien wurden autoklaviert oder hitzesterilisiert.

Elektrophorese von RNA

1,5 g Agarose wurden in 108 ml DEPC-Wasser aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 25 ml 37%ige Formaldehydlösung und 15 ml 10x RNA-Laufpuffer zugegeben. Das Gel wurde auf einem gereinigten Gelträger (14x14 cm) gegossen.

10 bis 20 µg RNA wurden in einem Eppendorfgefäß mittels speed-vac getrocknet und in 15 µl Probenpuffer aufgenommen und resuspendiert. Nach dem Denaturieren bei 65°C für 10 min wurden 2 µl Ethidiumbromidlösung (400 µg/ml in DEPC-Wasser) und 2 µl 10x Ladepuffer zugegeben. Die Proben wurden auf dem Gel bei 50 V in 1x Laufpuffer für 4-6 Stunden aufgetrennt.

Kapillartransfer auf Nylonmembran (Northern Blotting)

Das Gel wurde zweimal für 20 min in DEPC-Wasser inkubiert. Für die Analyse von RNAs, deren Länge 2,5 kb überschritt, wurde eine partielle Hydrolyse in 50 mM NaOH in DEPC-Wasser für 20 min durchgeführt. Anschliessend wurde zweimal mit DEPC-Wasser gewaschen. Das Gel wurde für zweimal 20 min in 20x SSC inkubiert. Der Kapillartransfer erfolgte über Nacht auf eine Zetaprobe in 20x SSC. Die RNA wurde durch UV-Quervernetzung mit 150 mJoule fixiert.

Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten DNA-Proben

DNA-Fragmente für die Hybridisierung wurden durch die *random-prime* Methode unter Verwendung des „Prime-It II“-Systems und 25 µCi α -[³²P]-dCTP radioaktiv markiert. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers vorgegangen. Die markierte DNA wurde über eine Sephadex G-50 Gelfiltrationssäule aufgereinigt.

Die Membran wurde in einer Prähybridisierungslösung für 4-8 Stunden bei 42°C vorinkubiert.

Die Hybridisierung mit der denaturierten, radioaktiv markierten DNA (mindestens 2×10^6 cpm/ml) erfolgte in der Hybridisierungslösung über Nacht bei 42°C.

Die Membran wurde nacheinander für jeweils 30 min gewaschen in

1. Waschlösung 1 bei RT,
2. Waschlösung 2 bei 42°C,
3. Waschlösung 3 bei 50°C.

Wenn notwendig, wurde der letzte Schritt mit bis zu 55°C wiederholt.

Der Nachweis der hybridisierten RNA erfolgte über ein Autoradiogramm.

3. Ergebnisse

3.1. RNA Interferenz in den Säugerezelllinien HaCaT, HeLa und MEF

RNA Interferenz ist ein Prozess der sequenzspezifischen post-transkriptionellen Gen-Stilllegung in Organismen, der seit 2001 auch für in Kultur befindliche Säugerezellen dokumentiert ist (Tuschl, 2001).

Die Nutzung der Methode der RNA Interferenz als „molekulargenetisches Werkzeug“ eröffnet neue Möglichkeiten zur schnellen und einfachen Analyse von Gen-Funktionen. Allerdings ist die Methode der transienten RNA Interferenz in Säugerezellen weniger zuverlässig und konstant einsetzbar, als in den primär getesteten Organismen wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster*. Kritische Faktoren sind die Sequenzauswahl und Synthese des Doppelstranges, die Entwicklungsphase der Zelle unter Transfektion, sowie die Stabilität des Zielproteins (Kuznicki et al., 2000).

In Säugerezellen wird zumeist kein kompletter Knock-out, sondern lediglich ein Knock-down des Zielgens erreicht und es können leichter sequenz-unspezifische Zellantworten verursacht werden.

Die Schwierigkeiten beim Einsatz der RNA Interferenz in Säugerezellen verlangen die genaue Testung und individuelle Anpassung des Verfahrens an die zu nutzende Zelllinie und die Zielgene, bevor eine wissenschaftliche Nutzung der Methode erfolgen kann.

Die Anwendbarkeit und die Effizienz der Methode der RNA Interferenz wurde für die Zelllinien HeLa (Humane Zervix-Karzinom-Zelllinie mit amplifiziertem c-Myc Gen), HaCaT (Humane Keratinozyten-Zelllinie) und MEF (MEF-ARF^{-/-} murine primäre embryonale Fibroblasten, in denen das ARF-Gen deletiert ist) getestet.

Vorbereitend auf den Knock-out mittels RNA Interferenz wurde die Effizienz der Transfektion eines Oligonukleotids in die verschiedenen Zelllinien getestet und optimiert.

3.1.1. Transfektions-Effizienz durch Lipofektion in den Zelllinien HaCaT-, HeLa- und MEF

Um die Methode des RNAi-Gen-Knock-out verwenden zu können, musste die doppelsträngige sequenzspezifische RNA mit hoher Effizienz in die Zellen transfiziert werden. Um die Wirkung der Transfektion sichtbar zu machen, wurden deshalb zunächst anstatt der RNA-Oligonukleotide Cy3-markierte DNA-Einzelstränge verwandt, die aufgrund ihrer Struktur und Größe ein den RNA-Oligonukleotide ähnliches Verhalten zeigen. Mit dem Oligonukleotid transfiziert wurden die drei Zelllinien HaCaT-, HeLa- und MEF-Zellen. Die Ergebnisse werden jeweils anhand einer der Zelllinien repräsentativ dargestellt.

Entsprechend wurde durch Analyse der Trefferquoten die Transfektionsmethode optimiert.

Das Chromophor(Cy3)-Konjugat leuchtet durch den Fluoreszenzfarbstoff in den getroffenen Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop, einer UV-Lichtquelle mit einem speziellen Wellenlängenfilter, rot auf. Nicht durch die Transfektion erreichte Zellen zeigen keine Fluoreszenzmarkierung.

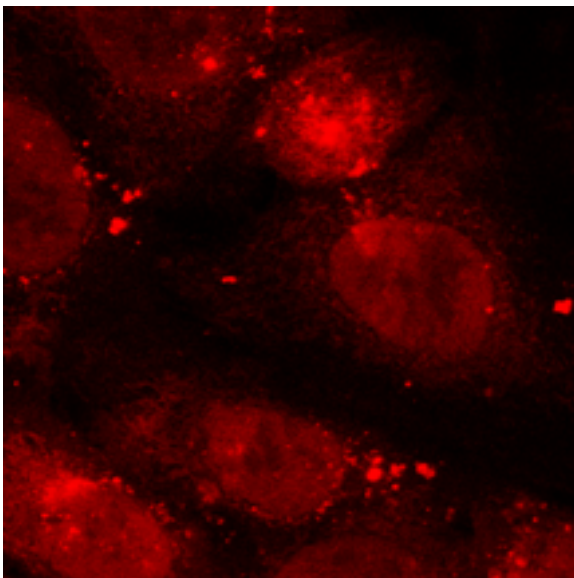


Abbildung 3.1: Cy3-Oligonukleotid transfizierte HaCaT-Zellen, Fluoreszenz-Mikroskop-Darstellung

Die HaCaT-Keratinocyten sind nach Transfektion unterschiedlich stark von dem Chromophor(Cy3)-Konjugat durchsetzt. HaCaT-Zellen zeigen eine besonders intensive Kernfärbung. Im abgebildeten Ausschnitt sind alle auf dem Deckglas befindlichen Zellen gefärbt. Insgesamt sind auf dem Präparat etwa 85% der Zellen transfiziert (repräsentativ ausgezählt).

Die Fluoreszenz-mikroskopische Abbildung zeigt Cy3-markierte HaCaT-Zellen, die sowohl im Zytoplasma als auch im Kern rot fluoreszieren (Abbildung 3.1). In den HaCaT-Keratinocyten ist besonders der Zellkern intensiv von den Chromophor(Cy3)-Konjugaten durchsetzt. Zur Quantifizierung der intrazellulär mit dem Transfektionsverfahren erreichten Zellen wird im folgenden zunächst eine konfokal-

mikroskopische Technik und schließlich die Auszählung der transfizierten Zellen im Vergleich zweier Transfektionsmedien angewandt.

Laser-Scan-Konfokalmikroskopie

Bei der Konfokalmikroskopie konzentriert sich der Laser auf einen Punkt im dreidimensionalen Untersuchungsobjekt, der Zelle, und scannt so jede Präparatebene zeilenweise ein. Die gemessenen Signale ergeben am Computer ein zweidimensionales Monitorbild der Schnittfläche einer Zelle.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den detektierten Signalen nicht nur um Auflagerungen an der Zelloberfläche in Form von Cy3-Präzipitaten handelt, wurden so mittels des Konfokalmikroskops verschiedene Schnittebenen der Zellen fotografiert. So konnte gezeigt werden, dass die fluoreszierenden Moleküle tatsächlich eine intrazelluläre Lokalisation besitzen.

Die Abbildung 3.2 zeigt zwei für die Transfektion repräsentative MEF-Zellen in konfokal-mikroskopischen Schnittaufnahmen. Die Schnittführung verläuft im Präparat von oben nach unten. Die Fluoreszenz-markierten Zellen werden in der Abbildung in verschiedenen Schichten dargestellt, wobei erkennbar ist, dass sie sowohl im Zytoplasma als auch im Kern rot fluoreszieren. In diesen Zellen ist das Chromophor(Cy3)-Konjugat demnach intrazellulär zu finden.

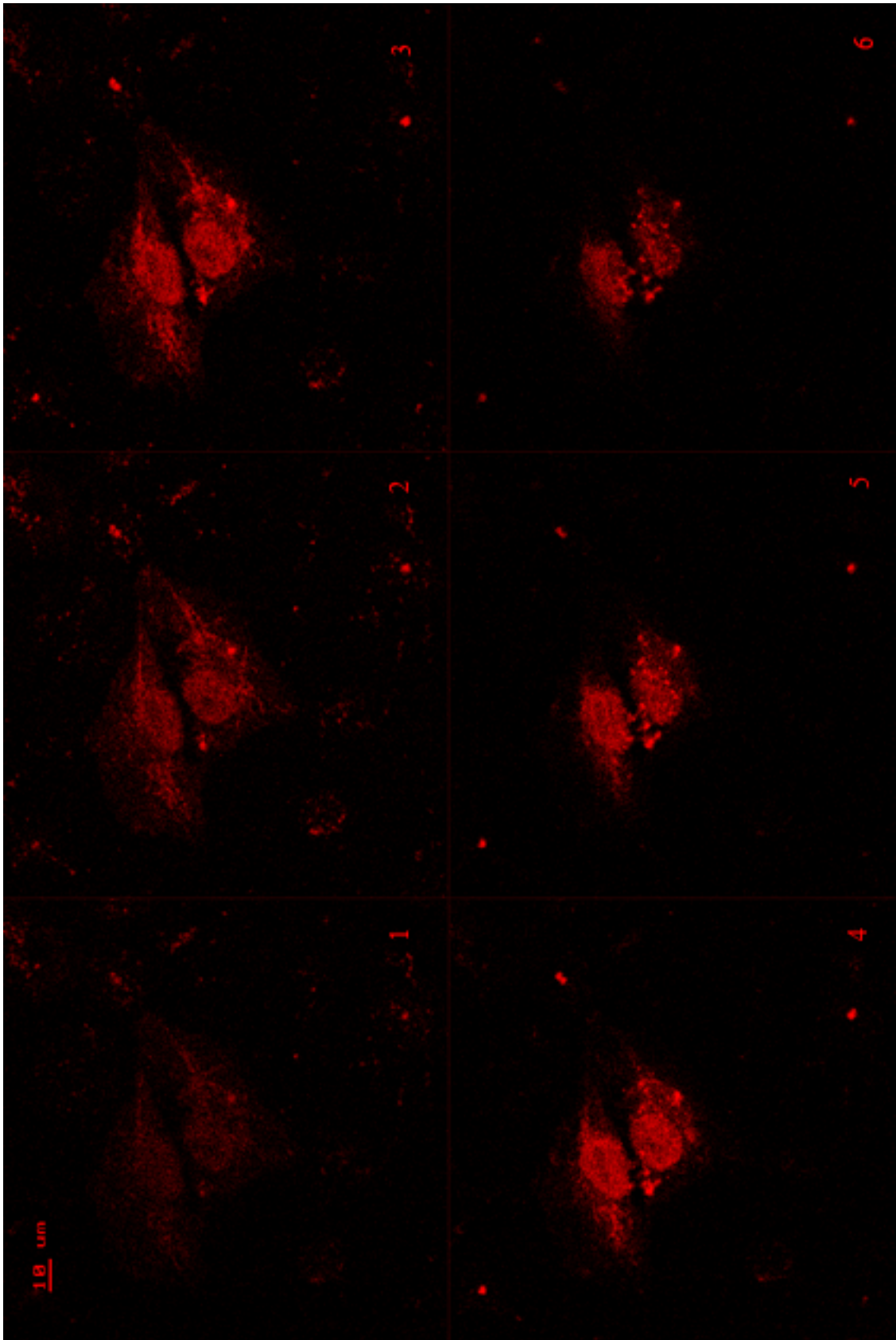


Abbildung 3.2: Cy3-Oligonukleotid transfizierte MEF-Zellen, konfokal-mikroskopische Schnittaufnahmen, Fluoreszenz-Laser-Scan-Konfokalmikroskopie

Die Abbildung zeigt Cy3-Oligonukleotid transfizierte Maus-Embryo-Fibroblasten. Das dreidimensionale Untersuchungsobjekt wurde in Laser-Scan-Technik in sechs Schittebenen der Zelle (Bildbeschriftung 1-6) aufgenommen, und verdeutlicht die intrazelluläre Lokalisation der Chromophor(Cy3)-Konjugate.

Vergleich der Lipofektions-Reagenzien Oligofektamin und Lipofektin

Die Effizienz der Transfektion differiert mit dem Zelltyp, der Passagezahl und der Konfluenz der Zellen. Aber auch die Formung der Liposomenkomplexe ist ein kritischer Teilschritt, weshalb das Transfektionsreagenz sorgfältig ausgewählt werden sollte. Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden hier die Lipofektions-Reagenzien Oligofektamin (entsprechend dem „siRNA user guide“, T. Tuschl, 2001, (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>)) und Lipofektin unter gleichen Kultur-Bedingungen angewandt und anschließend der Cy3-Einschluss der Zellen im Fluoreszenzlicht verglichen und quantifiziert.

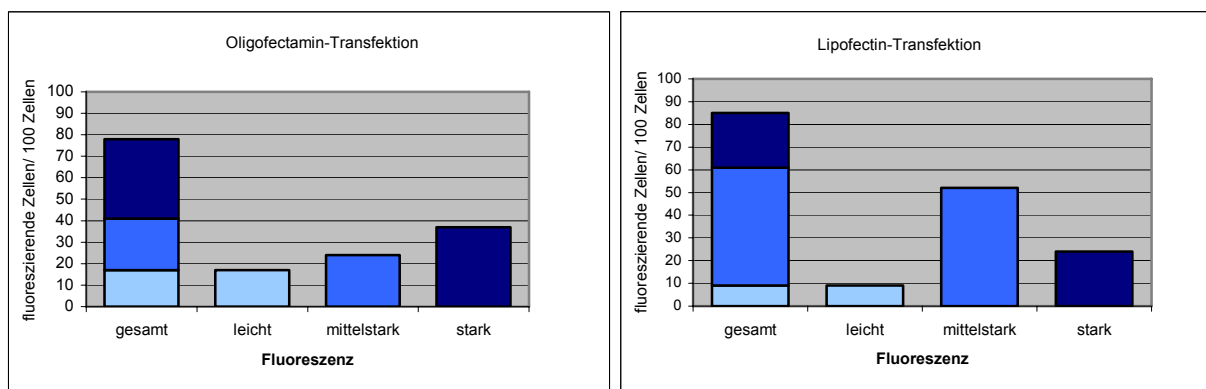


Abbildung 3.3: Beurteilung der Transfektions-Effizienz nach Lipofektion – Vergleich der Lipofektions-Reagenzien Oligofektamin und Lipofektin

Die Abbildung stellt die Anzahl fluoreszierender Zellen bezogen auf 100 Gesamtzellen in Form eines Säulendiagramms dar. Die Quantifizierung der Transfektions-Effizienz erfolgte durch Auszählung der Cy3-markierten Zellen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Fluoreszenz-Intensitäten von leichter bis starker Intensität (leicht: hellblau – mittel: mittelblau – stark: dunkelblau). Bei beiden Lipofektions-Reagenzien, Oligofektamin und Lipofektin, lag die Gesamtzahl transfizierter Zellen bei ca. 80-85%

Die Quantifizierung der Transfektions-Effizienz durch das Auszählen der Cy3-markierten Zellen war nicht möglich, da die Zellen nach der Behandlung Fluoreszenzen zeigten, die sich stark in ihrer Intensität unterschieden. Um die Ergebnisse zu objektivieren, wurde daher der Fluoreszenzzustand der einzelnen Zellen in der Bewertung der Trefferquoten berücksichtigt. Zur Veranschaulichung wurden für das Diagramm drei Kategorien gewählt, die schwache, mittlere und starke Fluoreszenzen einbeziehen.

Die Transfektions-Effizienzen der beiden Reagenzien Oligofektamin und Lipofektin lagen bei beiden Substanzen konstant bei 78-85%. Trotz Befolgung der Anwendungsempfehlungen durch die jeweiligen Hersteller starben etwa 25-30% der

ursprünglich ausgesäten Zellen durch die Oligofektamin-Behandlung, wohingegen Lipofektin kaum Zellverluste verursachte.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das im weiteren Verlauf der Arbeit verwandte Transfektions-Protokoll geändert.

Zum Nachweis eines sequenzspezifischen Knock-out durch RNA Interferenz wurde das Fluoreszenz induzierende Glühwürmchen-Luziferase kodierendes Reporter-Plasmid GL2 als Zielgen ausgewählt und transfiziert. Zunächst wurde die Luziferase-Aktivität für die verschiedenen Zelllinien im Luminometer gemessen. Eine zu geringe wie auch eine zu starke Expression des Gens sollte ausgeschlossen werden, da durch zu geringe Differenz bei niedrigem Ausgangswert oder durch zu intensive Expression des Reporter-Plasmids die Darstellbarkeit des Knock-outs im Assay erschwert wäre.

3.1.2. GL2-Reporter-Plasmid-Expression in den Zelllinien HeLa-, HaCaT- und MEF

GL2 ist ein Luziferase kodierendes Reporter-Plasmid. 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion weisen die Plasmid tragenden Zellen eine signifikant über den Basalwert hinausreichende Luziferase-Aktivität auf, so dass sich die Lichtemission mittels eines Luminometers messen und im Luziferase-Assay darstellen lässt.

Zunächst wurde die Expression des GL2-Luciferase-Plasmids nach Transfektion der Zelllinien HaCaT, HeLa und MEF getestet. Außerdem wurde für den jeweiligen Zelltyp der Zeitpunkt der maximalen GL2-Genexpression nach Transfektion ermittelt und so der optimale Zeitpunkt zum Einsatz der Doppelstrang-RNA eingegrenzt.

Zum Abgleich unterschiedlicher Transfektions-Ergebnisse wurde als interner Transfektions-Standard der Vektor CMV- β -Gal kotransfiziert und die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität der Proben durchgeführt.

Unterschiedliche Proteinabsolutmengen wurden durch eine Bradford-Protein-Bestimmung ermittelt und die Luziferase-Aktivitäten hinsichtlich der Proteinmenge normalisiert. Alle Proben wurden als Triplikate ausgesät und die Standardabweichungen durch Fehlerbalken dargestellt.

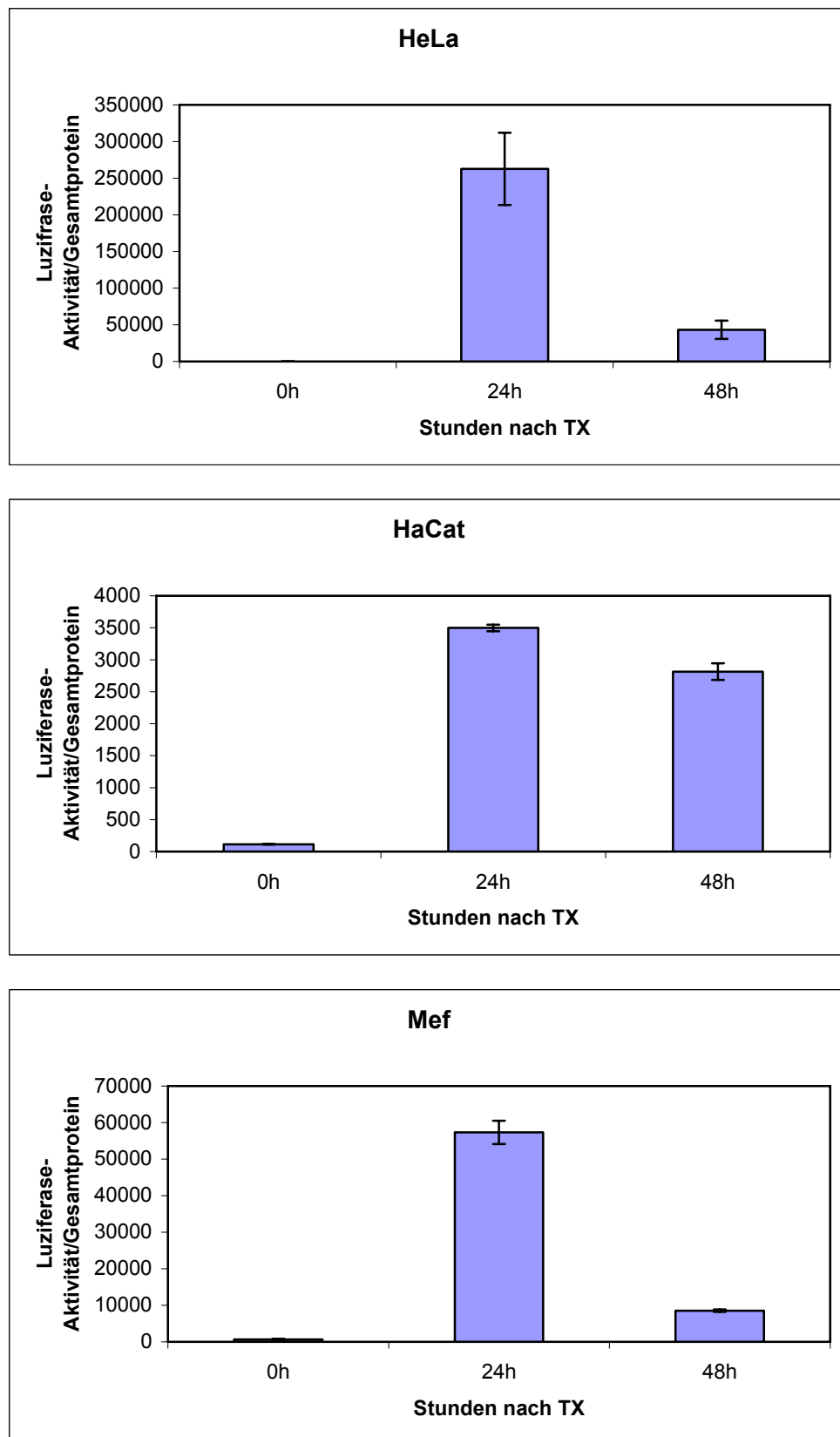


Abbildung 3.4: Expression des GL2-Luciferase-Plasmids in den Zelllinien HaCaT, HeLa und MEF

Die Abbildung zeigt die Expression des Luziferase-Reporter-Plasmids 0, 24 und 48 Stunden nach Transfektion für die Zelllinien HaCaT, HeLa und MEF. Die Luziferase-Aktivität wurde hinsichtlich der Proteinmenge normalisiert. Alle Proben wurden als Triplikate ausgesät und die Standardabweichung der Expressions-Werte durch Fehlerbalken dargestellt. Alle drei Zelllinien exprimieren das Luziferase kodierende Gen 24 Stunden nach Transfektion am stärksten.

Bei der Messung der Lichtemission im Luminometer zeigte sich in allen drei Zelllinien ein Zuwachs der Luziferase-Aktivität um ein Vielfaches im Vergleich zur Basal-Aktivität.

HaCaT-, HeLa- und MEF-Zellen zeigen etwa 24 Stunden nach Transfektion die stärkste Expression des Luziferase-Reporter-Plasmids und nach 48 Stunden bereits nachlassende Lumineszenzwerte.

Die Aktivität der nicht-transfizierten Kontrollen entspricht den ermittelten Werten zum Zeitpunkt 0 Stunden. Diese Säulen sind der Übersichtlichkeit halber nicht in die Darstellung aufgenommen worden.

Den Ergebnissen entsprechend induziert die Transfektion des GL2-Plasmids ein Vielfaches der basalen Luciferase-Aktivität. Anhand der restlichen Gen-Expression nach Depletion der GL2-Sequenz durch RNA Interferenz, die sich durch Messung der Lumineszenz im Luziferase-Assay leicht quantifizieren lässt, soll der Effekt der RNA Interferenz in den drei Zelllinien beurteilt werden.

3.1.3. GL2-Knock-out in den Säuerzelllinien HeLa, HaCaT und MEF mittels RNA Interferenz

Der zuvor demonstrierte Luciferase-Effekt soll durch Transfektion einer anti-GL2-Doppelstrang-RNA mittels RNA Interferenz gehemmt werden. Die mRNA des Luciferase-Expressions-Plasmids wird dabei degradiert und somit dessen Proteinsynthese verhindert. Als Konsequenz daraus ist eine verminderte Lichtemission im Luminometer zu erwarten.

Durch den Knock-out Luziferase-induzierender Reporter-Plasmide gelang Thomas Tuschl 2001 der Nachweis, dass RNA Interferenz durch Transfektion kurzer 21-Basenpaar-langer RNA-Oligonukleotide auch in Säugerzellen möglich ist.

Analog zu Tuschls Assay, der verschiedene Plasmide testete, wurde für den folgenden Versuch ein GL2-Reporter-Plasmid – ebenfalls Glühwürmchen-Luziferase kodierend – mit einem SV40 Promotor ausgewählt. Dazu passend wurde das sequenzhomologe RNA-Doppelstrang-Element synthetisiert (Elbashir et al., 2001a).

GL2-RNA-Doppelstrang:

5'- CGUACGCGGAAUACUUCGATT -3'

3'- TTGCAUGCGCCUUAUGAAGCU -5'

Doppelstrang-Konstrukt (Elbashir et al., 2001a)

Zur Frage der Spezifität des Knock-downs – GL2-RNA-Doppelstrang zu GL2-Reporter-Plasmid – setzte Tuschl weitere nicht-homologe RNA-Doppelstränge ein. Die Expression des GL2-Plasmids konnte durch einen anderen Doppelstrang nicht in entsprechender Weise reduziert werden, wie durch die sequenz-spezifische RNA.

Für den folgenden Luziferase-Reporterassay wurden HeLa-, HaCaT- und MEF-Zellen ausgesät und mit dem GL2-Luziferase-Reporter-Plasmid transfiziert. Eine Probenanzahl erhielt zusätzlich die sequenzhomologe anti-GL2-Doppelstrang-RNA beziehungsweise ein Nonsense-RNA-Oligonukleotid (aus Übersichtsgründen nicht in die Darstellung aufgenommen, siehe (Elbashir et al., 2001a). Wegen einer zu erwartenden Aktivitätsdauer der RNA-Oligonukleotide von 72 Stunden wurde orientierend an den Luziferase-Aktivitäten im Vorversuch der jeweilige RNA-Doppelstrang und das GL2-Luziferase kodierende Reporter-Plasmid kotransfiziert.

Als interner Transfektions-Standard wurde erneut der Vektor CMV- β -Gal und die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität eingesetzt und für unterschiedliche Proteinabsolutmengen die Bradford-Bestimmung verwandt. Die erhaltenen Luziferase-Aktivitäten wurden hinsichtlich der Proteinmenge normalisiert. Alle Proben wurden als Triplikate ausgesät und ausgewertet um zufällige Variationsbreiten abzufangen. Die Standardabweichung wurde durch einen Fehlerbalken dargestellt.

Das Diagramm 3.5 zeigt die Luziferase-Expression der Zellextrakte 24 und 48 Stunden nach der Transfektion relativ zur Proteinabsolutmenge, mit jeweils einer unbehandelten Kontrolle zur Bestimmung der Basalaktivität.

Die Aktivität der allein mit Transfektionsmedium behandelten und demnach nicht-transfizierten Kontrollen entsprach zu jedem Messpunkt den ermittelten Werten zum Zeitpunkt 0 Stunden. Die Säulen sind der Übersichtlichkeit halber nicht ins Diagramm aufgenommen worden.

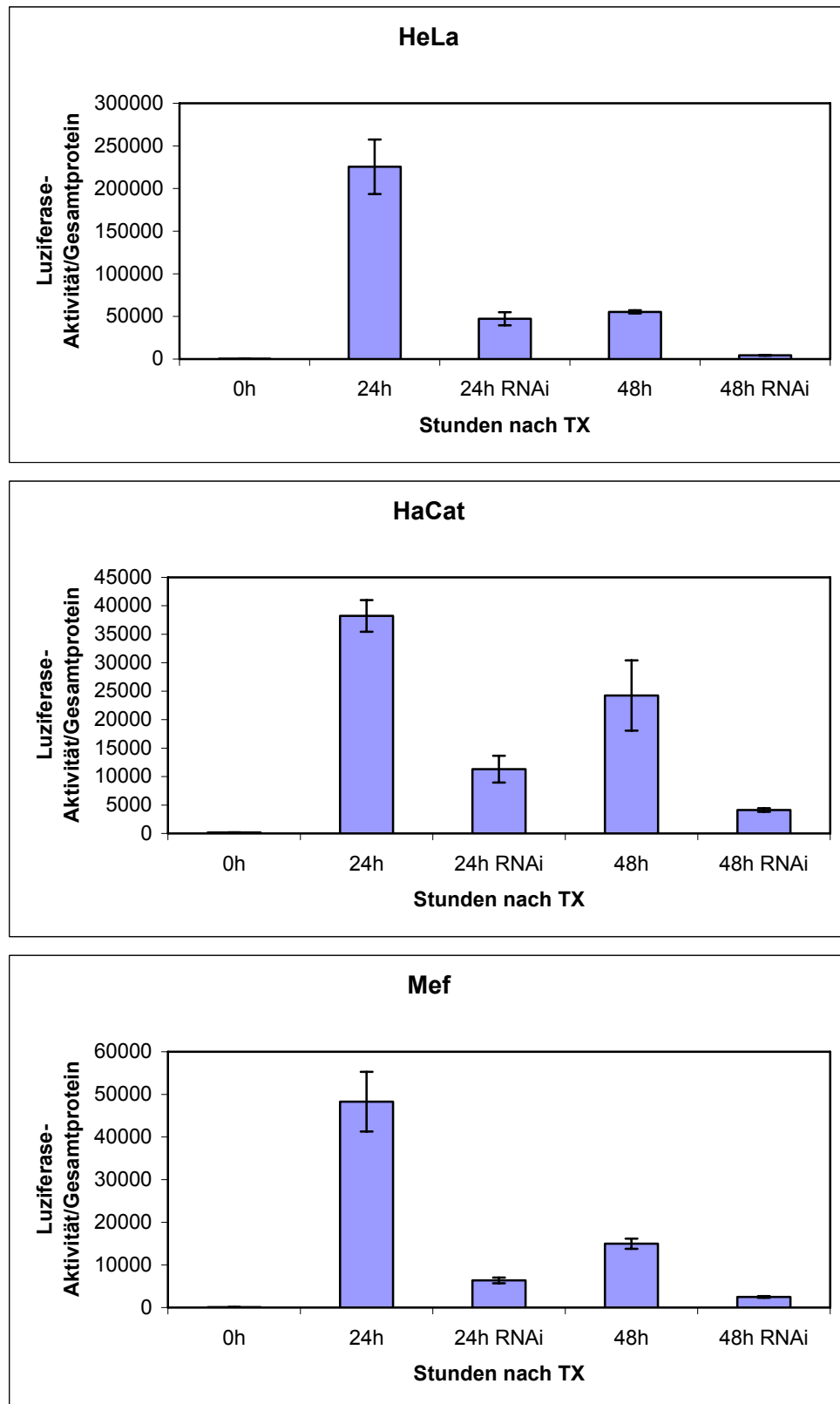


Abbildung 3.5: Depletion des Glühwürmchen-Luziferase kodierenden GL2-Reporter-Plasmids in den Säuerzellen HeLa, HaCaT und MEF mittels RNA Interferenz

Die Abbildung zeigt die Expression des Luziferase-Reporter-Plasmids 0, 24 und 48 Stunden nach Transfektion, sowie die entsprechende Expression der parallel mit RNA Interferenz behandelten Zellen für die Zelllinien HaCaT, HeLa und MEF. Die Luziferase-Aktivität wurde hinsichtlich der Proteinmenge normalisiert. Die Proben wurden als Triplikate ausgesät und die Standardabweichung der Expression durch Fehlerbalken dargestellt. Die Expression des Luziferase-induzierenden Reporter-Plasmids wird durch die Koftransfektion des Anti-GL2-Doppelstrangs signifikant gemindert.

Entsprechend dem Vorexperiment reagierten die allein mit dem Reporter-Plasmid behandelten Zellen mit einer Luziferase-Aktivitäts-Steigerung gegenüber der Kontrolle. Die Expression des Plasmids zeigte bei allen drei Zelllinien einen Maximalwert im Zeitraum von 24 Stunden.

In den zusätzlich mit den sequenz-homologen RNA-Oligonukleotiden behandelten Proben aller drei Zelllinien war dieser Aktivitätszuwachs um ein Vielfaches gehemmt. Die β -Galaktosidase-Aktivität der Proben blieb unbeeinflusst und zeigte konstante Transfektionsverhältnisse.

Die Expression des GL2-Reporter-Plasmids konnte, wie im Luziferase-Assay gezeigt, durch die Kotransfektion eines sequenz-homologen RNA-Oligonukleotids zu den gewählten Messzeitpunkten um ein Vielfaches vermindert werden. Die signifikante Expressionsminderung durch den Anti-GL2-Doppelstrang gegenüber sequenz-differenter RNA-Doppelstränge deutet auf einen spezifischen Gen-Knock-out durch RNA Interferenz hin. Ein hundertprozentiger Knock-out des Reporter-Plasmids konnte nicht erzielt werden.

Zusammengefasst konnte durch Kotransfektion der RNA-Doppelstränge und des GL2-Plasmids ein extremer Rückgang der Plasmid-induzierten Lumineszenz gegenüber allein mit dem Reporter-Plasmid transfizierter oder mit Nonsense-RNA kotransfizierter Zellen erreicht werden.

Schlussfolgernd lässt sich die Methode der RNA Interferenz zur transienten partiellen Gen-Stillegung in den Säugerzelllinien HeLa, HaCaT und MEF *in vitro* einsetzen.

Das Verfahren soll im weiteren zum Knock-out des Myc-interacting-zincfinger-protein 1 Miz-1 verwendet werden, und dadurch Rückschlüsse auf Proteinfunktion und -interaktionen des Gens zulassen.

3.2. Depletion von Miz-1 mittels RNA Interferenz

Die Entwicklung eines Tumors ist auf multiple Störungen im genetischen Programm einer Zelle zurückzuführen. Mutationen des Gens Myc und der Onkoproteine der Myc-Familie gehören zu den häufigsten Mutationen humaner Tumorzellen. Die Signaltransduktionswege über die Myc zur genomischen Instabilität führt sind bislang jedoch nicht vollständig entschlüsselt.

Aktuelle Veröffentlichungen unterstützen die Hypothese, das Myc in Miz-1 abhängiger Weise den bei UV-Schädigung zur Defekt-Reparatur benötigten Zellzyklusarrest durch Expression des CdK-Inhibitors *p21^{cip1}* inhibiert. Die durch Myc hervorgerufene negative Regulation der DNA-Schadensantwort mit Folge eines verfrühten Wiedereintritts der genomisch veränderten Zelle in den Zellzyklus führt durch Ansammlung genomischer Fehlinformationen zum Verlust weiterer Schadenskontrollmechanismen und so zur Tumorentstehung.

Die Frage, die hier beantwortet werden soll, ist, welche Rolle das Zinkfingerprotein Miz-1 beim durch Myc verursachten Übertritt des DNA-Schadens-Kontrollpunktes spielt. Zur Klärung dieses Sachverhaltes tragen die nachfolgenden Ergebnisse bei.

Zunächst wurde der Versuch unternommen, Miz-1 mittels der neu etablierten Methode der RNA Interferenz den zuvor getesteten Zelllinien zu entziehen.

Daraufhin sollen in DNA-Schadensexperimenten die Auswirkungen einer transienten Miz-1 Depletion auf die zellulären Regulationsmechanismen analysiert werden. Anhand der Abweichungen sollen so Rückschlüsse auf die Funktion von Miz-1 in der zellulären Reaktion auf DNA-Defekte ermöglicht werden.

Für die RNA Interferenz Tests wurden zunächst passende Doppelstrang-RNA-Oligonukleotide gegen Miz-1-Maus und humanes Miz-1 konstruiert. Dann wurde mit Hilfe verschiedener Nachweismethoden die Effizienz des RNAi Miz-1-Knock-out in HaCaT-, HeLa- und MEF- Zellen analysiert.

3.2.1. Der Miz-1 RNA-Doppelstrang

In Versuchen mit *Drosophila melanogaster* wurde die Effizienz des RNAi-Knock-out in Abhängigkeit von der Art der Doppelstrang-RNA analysiert. Dabei stellte sich diese als eine Funktion der Länge des RNA-Stranges, sowie der Länge und der Sequenz des Überhangs heraus (Elbashir et al., 2001a).

Als am effizientesten für Säugerzelllinien zeigte sich die Anwendung von 21-Basenpaar langen „Sense“ (der Ziel-mRNA gleichgerichtet) und „Antisense“ (der Ziel-mRNA entgegengerichteten) Sequenzen. Sense- und Antisense-Strang sollen sich so paaren, dass es an den 3'-Enden zu einem Überhang von zwei Basen kommt, wobei auch deren Sequenz zum Zielgen homolog sein muss. Die Überhangsequenz in Form zweier Thymin-Basen und besonders die Verwendung von Desoxynukleotiden, wegen besserer

Nukleasenresistenz, hat sich in den bisherigen Experimenten bewährt (Elbashir et al., 2001a).

Die Sequenz der Ziel-mRNA und des Doppelstrangs wurde mittels Datenbanksuche (NCBI Database) und BLAST (basic local alignment search tool) ermittelt. Entsprechend den Empfehlungen des „siRNA user guide“ (Tuschl, 2001), (<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>) sollte die gewählte Sequenz mindestens 50-100 Nukleotide vom Startcodon entfernt liegen. In dieser Region liegen in der Regel zahlreichen Bindestellen von Regulator-Proteinen, so dass die Bindung der RNA oder des RISC-Komplexes nicht sicher gewährleistet werden könnte. Außerhalb dieses Bereiches wurde daher unter Berücksichtigung der erwähnten Empfehlungen eine homologe Sequenz der Struktur (N19-21)TT aus der Zielsequenz ermittelt.

Für *Miz-1* (human) wurden aus der Gen-Sequenz (Zielregion dargestellt) das Oligonukleotid

151 catgtcttgg aacagctgaa ccagcagcgg cagctggggc ttctctgtga ctgcaccttt
210

sense **5'- CCAGCAGCGGCAGCUGGGGCdTdT -3'**

antisense **5'- GCCCCAGCUGCCGCUGCUGGdTdT -3'** ausgewählt.

Für *Miz-1* (murin) wurde das Oligonukleotid

sense **5'- CUGGGCCUCCUCUGUGACUGCdTdT -3'**

antisense **5'- GCAGUCACAGAGGAGGCCAGdTdT -3'** synthetisiert.

Für die Synthesetechnik wurde ebenfalls den Protokoll-Anweisungen der oben genannten Website entsprochen.

Die ausgewählten RNA-Fragmente sollen nachfolgend über ihre Sequenz-Homologie den in der Zelle entstehenden RISC-Komplex zur seiner Ziel-mRNA führen. Dort findet die Spaltung der mRNA mittig der entsprechenden 21-Basenpaar langen Region durch Endonukleasen statt. Damit kommt es zur Degradation der zelleigenen mRNA und zur posttranskriptionellen Stilllegung des Miz-1-Gens.

3.2.2. Miz-1 Depletion durch RNA Interferenz

Zur genauen Analyse der Funktion des Zinkfingerproteins Miz-1 in der UV-induzierten DNA-Schadensantwort sollte eine transiente Depletion des Miz-1-Gens mit Hilfe der RNA Interferenz Technik erfolgen. Die RNA-Oligonukleotide wurden analog dem zuvor demonstrierten Luziferase-Assay-Versuch transfiziert (siehe Kapitel 3.1.3).

In den folgenden Experimenten wurden sowohl HeLa-, HaCaT- als auch MEF-Zellen bezüglich ihrer Eignung zur Miz-1 RNA Interferenz getestet und eine nicht-homologe Nonsense-Doppelstrang-RNA zur Kontrolle unspezifischer Effekte transfiziert.

Die Ergebnisse werden jeweils anhand einer der Zelllinien repräsentativ dargestellt.

Zur Analyse des RNA-Interferenz-Effekts wurden die Nachweismethoden Immunfluoreszenz, Northern-Blot und RT-PCR eingesetzt um sowohl Änderungen der Proteinkonzentration darzustellen und zu quantifizieren als auch Konzentrationsänderungen auf RNA-Ebene messen zu können.

Die HeLa- HaCaT- und MEF-Zellen wurden mit anti-Miz-RNA oder unspezifischer Kontroll-RNA transfiziert und nach Inkubationszeiten von 0, 24 oder 48 Stunden den Nachweismethoden entsprechend geerntet.

3.2.2.1. Ermittlung der Miz-1 Proteinkonzentration mittels Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden Deckgläschen in die Zellkulturschalen gelegt auf denen sich ein Zellrasen bilden konnte. Die nach der Transfektion und Inkubation von 24 Stunden fixierten Zellen wurden mit einem polyklonalen Antiserum (anti-Kaninchen) für den Nachweis von Miz-1 inkubiert. Über Cy3 markierte sekundäre Antikörper konnte Miz-1 dann in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Die DNA wurde mittels DAPI gegengefärbt.

Dargestellt sind die mikroskopischen Bilder des Immunfluoreszenz-Experiments der Maus-Embryo-Fibroblasten (Abbildung 3.6). Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz können folgendermaßen zusammengefasst werden:

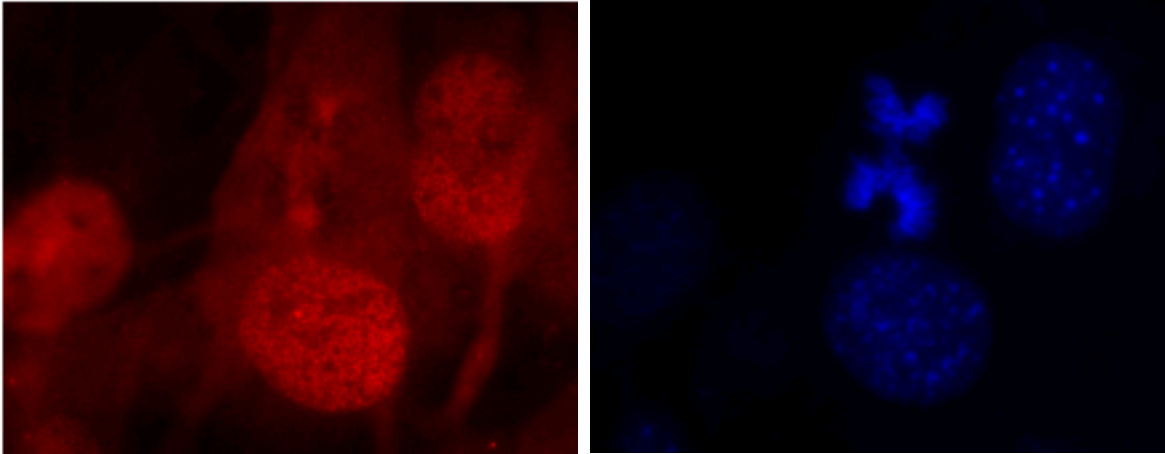


Abbildung 3.6: Miz-1 Immunfluoreszenz nach RNA Interferenz in Maus-Embryo-Fibroblasten.

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen des Immunfluoreszenz-Versuchs in Maus-Embryo-Fibroblasten. Die Zellen wurden 24 Stunden nach siRNA-Transfektion geerntet und mit Antikörpern gegen Miz-1 inkubiert. Die DNA wurde mittels DAPI gegengefärbt. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Zellen einer Probe auf quantitative Unterschiede ihres Proteingehalts untereinander und mit Kontroll-transfizierten Zellen verglichen. Es finden sich keine durch den Miz-1-Antikörper in der Fluoreszenz-Darstellung detektierbaren Konzentrations-Unterschiede des Miz-1-Proteingehalts einzelner Zellen.

Die Lokalisation von Miz-1 blieb von der Transfektion unbeeinflusst auf den Zellkern konzentriert, wobei sich besonders in MEF-Zellen kaum homogene Kernfärbung, sondern eher eine Konzentration des Proteins in sogenannten „*nuclear bodies*“ (Matera, 1999) zeigt.

Die Immunfluoreszenz-Technik erlaubt einen Eindruck der Veränderungen der Proteinexpression bei direkter Vergleichbarkeit einzelner Zellen. Die mit siRNA behandelten Zellen zeigten hier keine auffälligen Konzentrations-Unterschiede ihres verbleibenden Gehalts an Miz-1 Protein. Zwischen den siRNA-transfizierten Zellen, den Kontroll-RNA-Proben und den unbehandelten Zellen war zu den untersuchten Zeitpunkten auch kein sichtbarer Intensitätsunterschied in der Gesamt-Proteinfärbung für Miz-1 erkennbar.

Ein Knock-out des Miz-1-Proteins durch RNA Interferenz konnte mittels der Immunfluoreszenz-Technik nicht dargestellt werden.

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration von Miz-1 nach RNA Interferenz wurde ferner eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Dieses Nachweis-Verfahren zeigte im Zeitraum von 48 Stunden nach RNA Interferenz entsprechend den Ergebnissen der Immunfluoreszenz keine Veränderung des zellulären Miz-1 Gehaltes auf Proteinebene (hier nicht dargestellt).

Das Ergebnis kann zum einen eine mangelnde Reduktion der Miz-1-Proteinkonzentration zu den gewählten Messzeitpunkten, zum anderen eine unzureichende Sensitivität des Nachweis-Verfahrens zur Ursache haben.

Ein möglicher Grund für einen hohen Gehalt an verbleibendem Protein nach RNA Interferenz ist außerdem, dass das Zinkfingerprotein Miz-1 ein stabiles, endogen in hohen Konzentrationen exprimiertes Protein ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher sensitivere Verfahren wie Northern-Blot und RT-PCR zur Detektion des Knock-outs auf Basis der RNA-Konzentrationen gewählt.

3.2.2.2. Reduktion der Miz-1-RNA mittels RNA Interferenz – Nachweis durch Northern-Blot-Analyse

Für den Northern-Blot wurde die RNA der Zellen isoliert, mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Northern Blotting) übertragen. Durch die Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierten DNA-Proben gelang der Nachweis der Miz-1-RNA über ein Autoradiogramm. Als Ladekontrolle wurde vor dem Blot-Verfahren die ribosomale RNA der Proben im Gel detektiert.

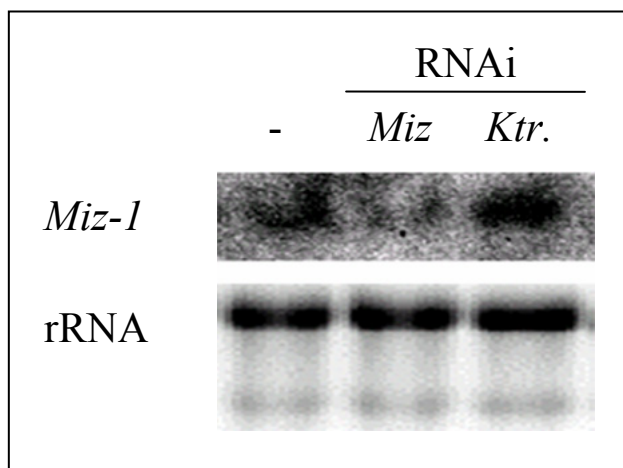


Abbildung 3.7: Northern-Blot-Analyse zur Quantifizierung der Miz-1-RNA nach RNA Interferenz in humanen Zervix-Karzinom-Zellen (HeLa)

Dargestellt ist der durch Northern-Blot-Analyse detektierte Miz-1-RNA-Gehalt der Zellen nach RNA Interferenz. 24 Stunden nach siRNA-Transfektion wurde RNA der Zellen isoliert und durch die Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten Marker im Autoradiogramm detektiert. Als Ladekontrolle wurden vor dem Blot-Verfahren die Banden der ribosomalen RNA im Gel aufgenommen. Die Northern-Blot-Analyse zeigt eine deutliche Reduktion der Miz-1-RNA in den mittels RNA Interferenz manipulierten Zellen.

Die Northern-Blot-Analyse quantifiziert die Miz-1 RNA der humanen Zervix-Karzinom-Zelllinie HeLa 24 Stunden nach RNA Interferenz. Als interne Kontrolle der Northern-Blot-Analyse sind die Banden der ribosomalen RNA dargestellt.

Die Northern-Blot-Analyse der Miz-1-RNA-Konzentrationen zur Darstellung der posttranskriptionellen Gen-Stillegung durch RNA Interferenz zeigt eine deutliche Reduktion der Miz-1-RNA in den mit dem sequenzspezifischen Doppelstrang manipulierten Proben gegenüber den Kontroll-Zellen. Die mit dem sequenzfremden Doppelstrang behandelten Zellen, weisen eine annähernd gleiche Miz-1 RNA-Konzentration auf, wie die nicht-transfizierten Kontrollen. Ein wesentlicher unspezifischer Knock-out-Effekt kann dadurch ausgeschlossen werden. Die Ladekontrolle zeigt einheitliche Ladeverhältnisse.

Durch die Anwendung des sensitiveren und auf RNA-Gehalt basierenden Verfahren des Northern-Blot konnte im Gegensatz zu Immunfloreszenz und Westernblot ein Effekt der RNA Interferenz dargestellt werden. Die Miz-1-Suppression lässt sich demnach auf RNA-Ebene quantifizieren, die Proteinkonzentration hängt des weiteren von der Stabilität und dem Zellumsatz des in der Zelle vorhandenen Proteins ab.

3.2.2.3. Partielle Miz-1 Depletion mittels RNA Interferenz – Nachweis durch Reverse-Transkriptase-PCR

Auch mittels Reverser-Transkriptase-PCR konnte die partielle Miz-Depletion durch die RNA Interferenz demonstriert werden.

24 Stunden nach Transfektion der anti-Miz-1-RNA beziehungsweise der Kontroll-Medien wurden die Zellen geerntet, die RNA der Zellen isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde per PCR-Reaktion amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt, mit Etidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht detektiert. Als Kontrolle diente die Expression von *GAPDH*.

Die Reverse-Transkriptase-PCR (Abbildung 3.8) zeigt die Miz-1 Expression der Maus-Embryo-Fibroblasten-Zelllinie MEF 24 Stunden nach RNA Interferenz.

Durch die semiquantitative Gen-Expressionsanalyse wird eine vergleichbare Miz-1 Expression der nicht-RNA-transfizierten sowie der Kontroll-RNA-transfizierten Zellen deutlich. Auch hier wurde eine sequenz-unspezifische Kontroll-Doppelstrang-RNA zum Ausschluss unspezifischer Allgemeineffekte verwandt.

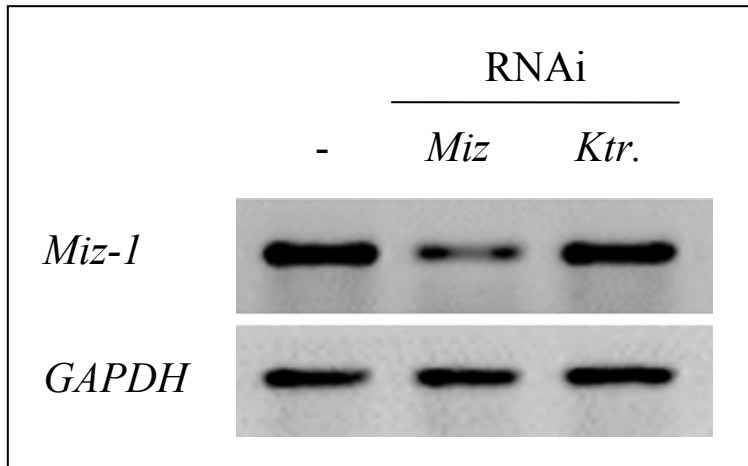


Abbildung 3.8: Reverse-Transkriptase-PCR zur semiquantitativen Analyse der Miz-1-Expression nach RNA Interferenz in Maus-Embryo-Fibroblasten

Zur Quantifizierung der Miz-1-RNA nach RNA Interferenz wurden MEF-Zellen 24 Stunden nach siRNA-Transfektion geerntet und zur semiquantitativen RT-PCR-Analyse verarbeitet. Als Kontrolle diente die Expression von *GAPDH*. Die mittels RNA Interferenz behandelten Zellen weisen im Vergleich zu den Kontrollen eine deutliche Reduktion ihres Miz-1-RNA-Gehalts auf.

Die mittels RNA Interferenz behandelten Zellen weisen im Vergleich zu den Kontrollen eine klar verringerte Miz-1-RNA Konzentrationen auf.

Es handelt sich um einen sequenzspezifischen partiellen Knock-out des Zinkfingerproteins Miz-1 durch RNA Interferenz.

Beim Immunfluoreszenzverfahren wird die Effektivität der RNA Interferenz anhand der Proteinkonzentration gemessen, die nach der Knock-out-Methode in der Zelle verbleibt. Daher müssen bei dieser Analyse Proteinstabilität und zellulärer Umsatz des Zielproteins berücksichtigt werden.

Northern-Blot und RT-PCR sind Nachweisverfahren, die auf RNA-Konzentrationen basierenden. Beide Methoden bestätigten einen reduzierten Gehalt an Miz-1 in den Knock-out-Zellen nach RNA Interferenz.

3.3. Die Rolle von Miz-1 in der p53-abhängigen Antwort auf UV-Bestrahlung

In den bisherigen Versuchen wurde die Möglichkeit einer Depletion des Transkriptionsfaktors Miz-1 mittels RNA Interferenz in verschiedenen Säugerzelllinien methodisch erarbeitet.

Im folgenden soll die biologische Konsequenz einer funktionellen Stilllegung des Miz-1 Gens analysiert werden. Untersucht wird die Bedeutung des Zinkfingerproteins für die p53-abhängige DNA-Schadensantwort auf UV-Licht.

Zur Induktion des DNA-Schadens wurde UVB-Strahlung angewandt. Getestet wurde ein Zellpool von Maus-Embryo-Fibroblasten. Da in UV bestrahlten Wildtyp-MEF-Zellen Myc eigenständig über ARF Apoptose induziert (Zindy et al., 1998), wurden zur detaillierten Analyse der p53-abhängigen UV-Antwort ARF^{-/-}-Maus-Embryo-Fibroblasten-Zellen eingesetzt.

Im Unterschied zur Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, lässt sich die UVB-induzierte p15^{INK4B}-Expression in bestrahlten MEF-Zellen nicht herleiten (Herold et al., 2002). Statt dessen wurde in den folgenden RT-PCR Expressionsanalysen die Expression des von p53 aktivierbaren CdK-Inhibitors p21^{cip1} analysiert.

Das in ARF^{-/-}-Maus-Embryo-Fibroblasten im Kontext der UV-Antwort die p21^{cip1}-Expression aktiviert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden (hier nicht dargestellt). Ein entsprechender Versuch wurde mit p53^{-/-}-Maus-Embryo-Fibroblasten durchgeführt. Vier Stunden nach UV-Behandlung wurde die Expression von p21^{cip1} in den bestrahlten und den Kontroll-Zellen analysiert. Die p53-defizienten MEF-Zellen zeigten kaum Induktion der p21^{cip1}-Expression nach UV-induziertem DNA-Schaden (persönliche Mitteilung, Michael Wanzel).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse zum einen, dass durch UV-Bestrahlung von MEF-Zellen die Expression von p21^{cip1} induziert wird. Zu anderen wird diese zelluläre Antwort auf DNA-Schäden durch UVB in p53-abhängiger Weise aktiviert.

Inwiefern die UV-induzierte p21^{cip1}-Expression in der p53-abhängigen DNA-Schadensantwort der MEF-Zellen vom Zinkfingerprotein Miz-1 abhängig ist, verdeutlicht der folgende Versuch durch transienten Knock-out von Miz-1 mittels RNA Interferenz.

3.3.1. Die Expression von p21^{cip1} durch UV-Bestrahlung ist abhängig von Miz-1

Reporteranalysen in HeLa-Zellen konnten zeigen, dass Miz-1 in der Lage ist den p21^{cip1}-Promotor zu aktivieren. Ein Reporterkonstrukt mit p21^{cip1}-Promotor und

Luziferase-cDNA als Reporter gen wurde mit einem Miz-1-Expressionsvektor kotransfiziert. Die Messung der Luziferaseaktivität zeigte eine signifikante Stimulation des Reportergens durch Miz-1 (Herold et al., 2002).

Eine Induktion der $p21^{cip1}$ -Expression in der UV-Antwort wurde für ARF^{-/-}-Maus-Embryo-Fibroblasten nachgewiesen (im Rahmen dieser Arbeit reproduziertes Ergebnis). Im Ganzen lassen diese Beobachtungen vermuten, dass die Expressionsinduktion von $p21^{cip1}$ in Folge der UV-Behandlung vom Zinkfingerprotein Miz-1 abhängig ist.

Um zu klären inwiefern Miz-1 für die UVB-induzierte $p21^{cip1}$ -Expression verantwortlich ist, wurden MEF-Zellen kultiviert und bei ca. 75% Konfluenz mit einer Dosis von 250J/m² über 60 Sekunden mit UVB bestrahlt. Einige Proben wurden zusätzlich mit einem anti-Miz-1 RNA-Doppelstrang transfiziert. Die Miz-1 defizienten Zellen sollten anschließend hinsichtlich ihrer UV-Schadensantwort, mit den Kontrollproben verglichen werden. Zum Ausschluss unspezifischer RNAi-Effekte, wurde jeweils eine Kontrollprobe mit Nonsense-Doppelstrang-RNA behandelt und parallel zu den anderen Zellen UV-bestrahlt. Der zeitliche Ablauf des Versuchs wird in Abbildung 3.9 a veranschaulicht.

Zur anschließenden Quantifizierung der Gen-Expression wurde nach Inkubationszeiten von 24h bzw. 48h nach RNA Interferenz und vier Stunden nach UV-Licht die RNA der Zellen geerntet und die Zellen zur RT-PCR präpariert. Die *GAPDH*-Expression wird durch UV-Bestrahlung nicht verändert und diente der RT-PCR als interne Kontrolle.

Die Abbildung 3.9 stellt die Ergebnisse des RNA Interferenz Versuchs dar.

Die UV-bestrahlten Maus-Embryo-Fibroblasten zeigten wie im Vorversuch eine Induktion der Expression des CdK-Inhibitors $p21^{cip1}$. Die *Miz-1*-Expression blieb wie erwartet durch die UVB-Behandlung unbeeinflusst (Abbildung 3.9 b).

Die RNAi transfizierten Proben wiesen dagegen eine geringere *Miz-1*-Expression auf als die untransfizierten oder mit Kontroll-RNA transfizierten Zellen, was für die spezifische Depletion des Myc-interagierenden Transkriptionsfaktors spricht.

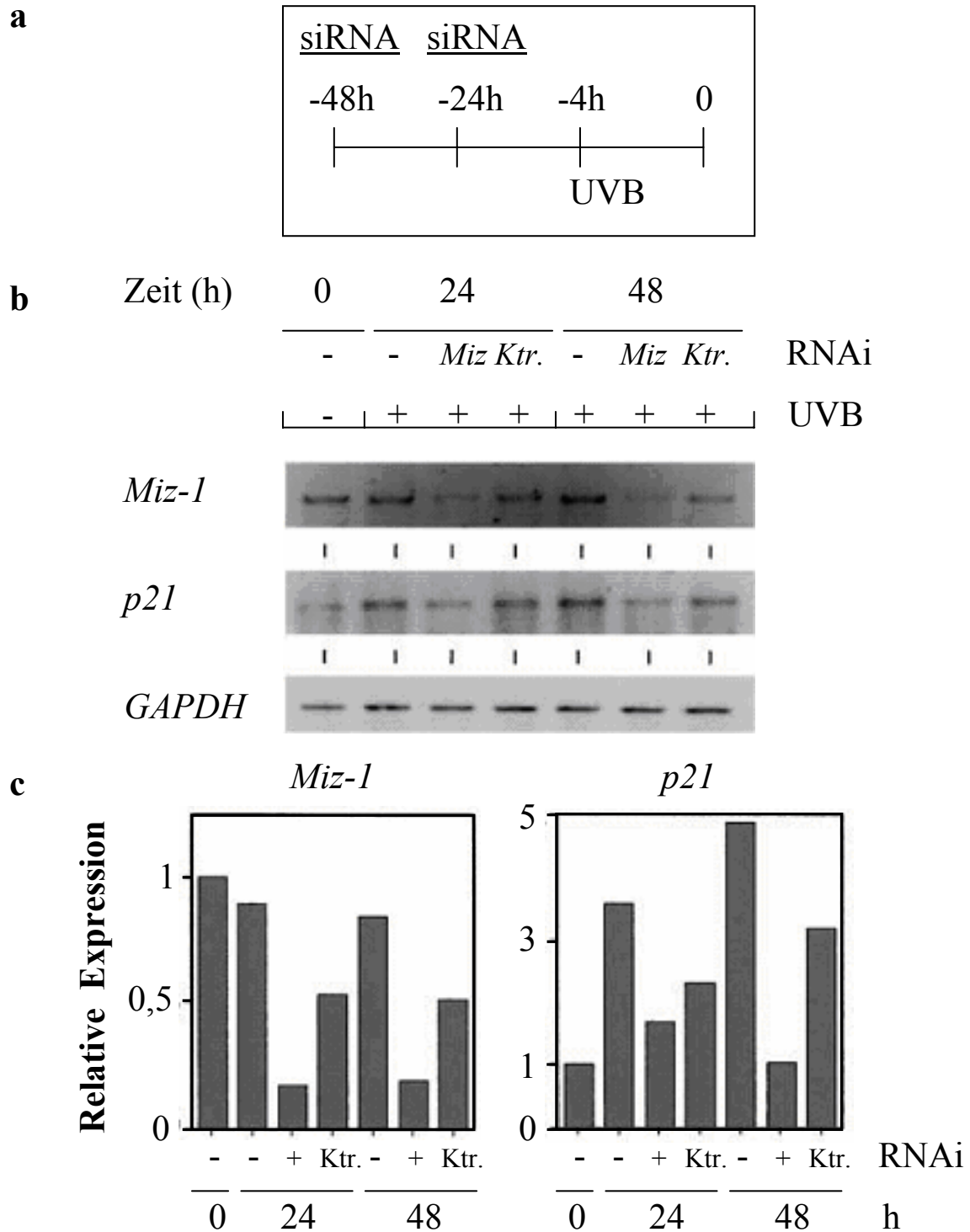


Abbildung 3.9: Reverse-Transkriptase-PCR UV-behandelter Maus-Embryo-Fibroblasten – Expressionsanalyse von Miz-1 sowie des CdK-Inhibitors p21^{cip1} nach Miz-1 RNA Interferenz

Die Abbildung zeigt eine RT-PCR-Analyse der Expression von Miz-1 und p21^{cip1} (b). Die Maus-Embryo-Fibroblasten wurden mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden UV-bestrahlt. Zusätzlich wurden die Zellen 24 und 48 Stunden zuvor mit Anti-Miz-1- (+) oder Kontroll-RNA (Ktr.) transfiziert beziehungsweise untransfiziert belassen (-). Der zeitliche Ablauf ist durch das Schaubild (a) wiedergegeben. Die relative Expression von Miz-1 und p21^{cip1} wird im Diagramm (c) graphisch dargestellt. Die Expression von *GAPDH* dient als interne Kontrolle.

Die *Miz-1* defizienten Zellen zeigten eine deutlich reduzierte *p21^{cip1}*-Expression in ihrer DNA-Schadensantwort auf die Strahlenbehandlung. Die mit einem sequenz-unspezifischen RNA-Doppelstrang behandelten Zellen weisen einen Rückgang der Miz-1 Konzentration gegenüber den Kontrollen auf, der jedoch deutlich geringer als die durch den sequenz-spezifischen Doppelstrang ausgelöste Miz-1 Depletion ist. Die *p21^{cip1}*-Expression fällt in diesen Zellen in Relation zur Miz-1 Depletion geringer aus, was wiederum für die Abhängigkeit der UV-induzierten *p21^{cip1}*-Induktion vom vorhandenen Transkriptionsfaktor Miz-1 spricht.

Eine Veranschaulichung der relativen Expression von Miz-1 und *p21^{cip1}* bietet die graphische Darstellung der RT-PCR Ergebnisse in Abbildung 3.9 c.

Summarisch konnte zum einen die UVB-induzierte Induktion der *p21^{cip1}*-Expression und die Suppression des Zinkfingerproteins *Miz-1* durch RNA Interferenz reproduziert werden. Zum anderen beantwortet der Zusammenhang der Miz-1 Depletion mit verminderter *p21^{cip1}*-Induktion die Frage nach der Abhängigkeit der UV-induzierten DNA-Schadensantwort von Miz-1. Die *p21^{cip1}*-Expression der durch RNA Interferenz behandelten Zellen wurde im Vergleich zu den unbehandelten Proben trotz UV-Bestrahlung nur schwach induziert.

Zusammenfassend zeigten die RNA Interferenz Versuche, dass ein partieller Knock-out von Miz-1 in Maus-Embryo-Fibroblasten-Zellen möglich ist.

Mittels RT-PCR wurde zunächst die UV-induzierte *p21^{cip1}*-Expression in der p53-abhängigen DNA-Schadensantwort demonstriert.

Schließlich konnte mittels RNA Interferenz nachgewiesen werden, dass die UV-induzierte p53-abhängige Expression des CdK-Inhibitors *p21^{cip1}* vom Miz-1 abhängig ist.

3.4. Die Rolle von Miz-1 in der p53-unabhängigen DNA-Schadensantwort

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert wurde, ist die *p21^{cip1}*-Induktion in der UV-Schadensantwort von Miz-1 und von p53 abhängig. Nachdem die DNA-Schadensantwort unter Bedingungen der Miz-1-Depletion getestet wurde, soll im folgenden die Rolle von Miz-1 in Zellen untersucht werden, denen kein funktionelles

p53 zur Verfügung steht. Außerdem soll geklärt werden, ob Miz-1 in allen oder nur in bestimmten Signaltransduktionskaskaden auf DNA-Schädigungen eine Rolle spielt.

HaCaT-Zellen sind spontan immortalisierte, humane Keratinozyten, die normale epidermale Differenzierungsfähigkeit besitzen, jedoch bezüglich stabilem funktionsfähigem p53-Protein defekt sind (Boukamp et al., 1988). Die p53-defiziente humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, eignet sich damit zur Untersuchung einer p53-unabhängigen DNA-Schadensantwort.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von Miz-1 im Kontext verschiedener DNA-Schadens-Kontrollpunkte in HaCaT-Keratinozyten untersucht. Dazu wurden durch verschiedene Agenzien (Hydroxy-Harnstoff, Zeozin und UVB) DNA-Schäden induziert und mittels RT-PCR die Expression von Miz-1 und einigen seiner Interaktionspartner während der Schadensantwort gemessen.

Zellen reagieren mit unterschiedlichen Mechanismen auf aufgetretene spezifische DNA-Defekte, indem sie einen Zellzyklusarrest induzieren, die Expression von „Reparaturgenen“ auslösen oder direkt einen programmierten Zelltod einleiten. Die Dosierung der Schadensinduktion wurde jeweils so gewählt, dass DNA-Schäden induziert, aber kein Zelltod verursacht wurde.

Die Regulation der zellulären DNA-Schadensantworten geschieht über Transkriptions-Induktion oder -Repression der am Kompensationsvorgang beteiligten Gene. Veranschaulichen lassen sich regulatorische Veränderungen der Gen-Expression mittels der Methode der RT-PCR.

Zu den angegebenen Zeitpunkten von 0, 2, 4 und 6 Stunden nach der Behandlung mit dem jeweiligen Schaden-induzierenden Agens, Hydroxy-Harnstoff, Zeozin und UVB-Bestrahlung, wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der cDNA, die RT-PCR-Reaktion, erlaubt eine Analyse der Expression spezifischer zellulärer Gene.

Auf diese Weise wurde die Expression von Genen ermittelt, die in direkter oder indirekter Interaktion mit Myc stehen und deren Expression in der p53-unabhängigen DNA-Schadensantwort untersucht werden sollte. Es handelte sich im einzelnen um Myc, Miz-1, *p15^{INK4B}* und TOPBP1 humaner Zellen. *GAPDH* diente jeweils als interne Kontrolle der cDNA-Konzentration.

3.4.1. UV-Bestrahlung – gegensätzliche Regulation der Expression von TopBP1 und p15^{INK4B}

Ultraviolette Strahlung (Wellenlänge 30-400 nm, UVB-Bereich 280-320 nm) hat die Sonne als natürliche Quelle. UV-Licht induziert Veränderungen zellulärer Moleküle (Proteine, Nukleinsäuren) infolge Absorption der Energie der UV-Quanten. Biologisch relevante Strahlungs-Dosen verursachen keine Strangbrüche. Die schädigende Wirkung von UV-Licht auf Zellen beruht vielmehr auf der Ausbildung von Pyrimidindimeren in der DNA zum Beispiel zwischen Thyminpaaren, Thymin und Cytosin und zwischen Cytosinpaaren. Ein Pyrimidindimer passt nicht in eine Doppelhelix, und deshalb sind Replikation und Genexpression bis zur Reparatur des Schadens gestört.

Potter konnte durch UV-Bestrahlung von Keratinozyten die Suppression der Gen-Expression dreier möglicherweise an der Zellzykluskontrolle beteiligter Gene darunter TopBP1 nachweisen, (Potter et al., 2000). Außerdem konnte in HaCaT-Keratinozyten ein UV-induzierter transients Zellzyklusarrest dokumentiert werden (persönliche Mitteilung, Michael Wanzel), was auf einen spezifischen p53-unabhängigen DNA-Schadens-Kontrollpunktes hinweist.

Da TopBP1 DNA-Strangbrüche und -Enden bindet (Wang et al., 2000), ist dessen Funktion als Sensor eines DNA-Defekts sowie als Kontrolleur von Reparaturprozessen nach der Replikation denkbar.

Diese Beobachtungen implizieren, dass TopBP1 eine regulatorische Rolle in der Keratinozyten-UV-Antwort spielt und der Arrest der Zellprogression im Zusammenhang mit der UV-induzierten TopBP1-Suppression steht.

Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs wurden ca. 75% konfluente HaCaT-Zellen mit einer Dosis von 250 J/m² 60 Sekunden mit UVB-Licht bestrahlt. Die Zellen wurden in einem Zeitfenster von 0 bis 10 Stunden abgeerntet und zur semiquantitativen RT-PCR-Analyse vorbereitet. Bei unbestrahlten Zellen wurde analog vorgegangen. Untersucht wurde der Einfluss der UV-Behandlung auf die Gen-Expression von Myc, Miz-1, TopBP1 und p15^{INK4B}.

Wie die Abbildung 3.10 zeigt, reagierten die Keratinozyten-Zellen besonders nach 4 bis 6 Stunden mit einer deutlichen Reduktion der *TopBP1*-Expression auf die UVB-Bestrahlung. Diese Daten entsprechen bis dahin der bereits bekannten UV-Antwort von Keratinozyten (Potter et al., 2000). Der hier außerdem untersuchte Cdk-Inhibitor

$p15^{INK4B}$ wird bei UVB-Licht umgekehrt-analog zur TopBP1-Reduktion in seiner Expression intensiviert. Die Expression von Myc und Miz-1 zeigt sich in der semiquantitativen RT-PCR durch die UVB-Bestrahlung unbeeinflusst.

Die *GAPDH*-Expression wird durch UV-Bestrahlung nicht verändert und dient der RT-PCR als interne Kontrolle.

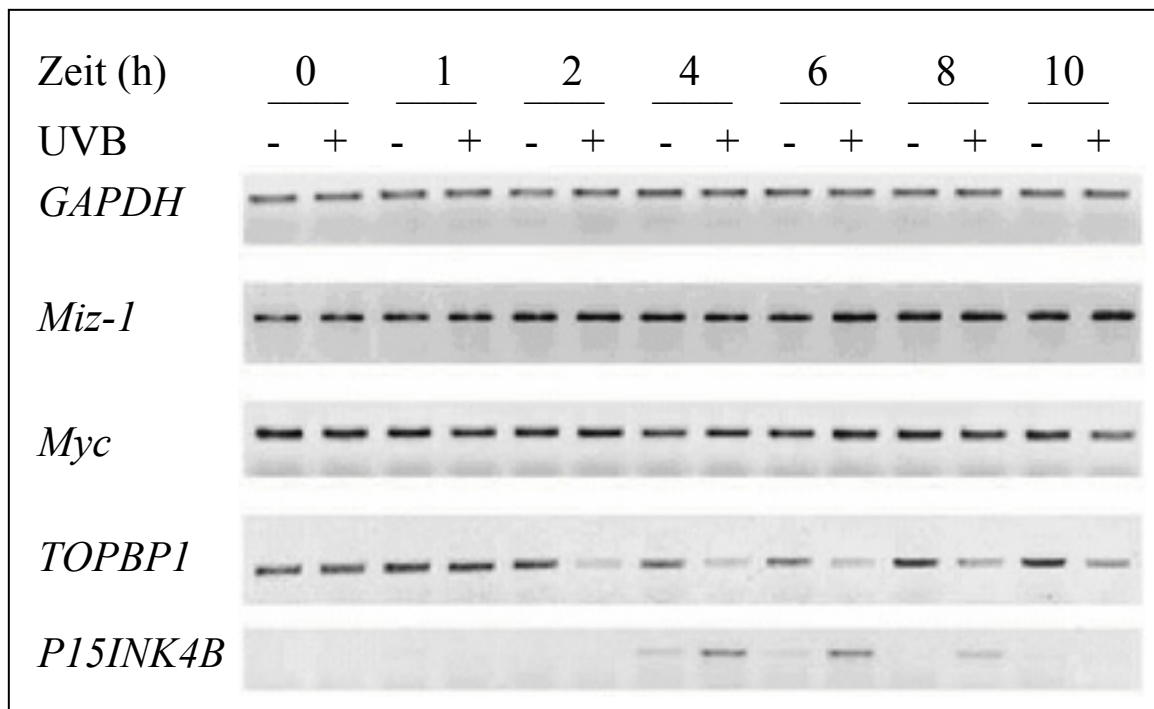


Abbildung 3.10: Reverse-Transkriptase-PCR UV-behandelter HaCaT-Zellen

Die Abbildung zeigt eine RT-PCR-Dokumentation der Expression von Myc, Miz-1, TopBP1 und $p15^{INK4B}$ in der Antwort auf UV-induzierte DNA-Schäden (+) beziehungsweise unbestrahlt (-) in einem Zeitfenster von 0 bis 10 Stunden.

Die Gen-Expression von Myc und Miz-1 bleibt durch Bestrahlung mit UVB über den gesamten Messzeitraum unverändert. Die Expression des Topoisomerase II-bindenden Proteins 1 und des CdK-Inhibitor-Proteins $p15^{INK4B}$ wird in HaCaT-Zellen mit einem Maximum nach 4 bis 6 Stunden gegensätzlich reguliert. *GAPDH* dient als interne Kontrolle und bleibt durch UV-Licht unbeeinflusst.

(Abbildung freundlicherweise von Michael Wanzel zur Verfügung gestellt)

Ein Zusammenhang zwischen der UV-abhängigen *TopBP1*- und $p15^{INK4B}$ -Expression konnte durch Reporteranalysen hergestellt werden und wird durch das Zinkfingerprotein Miz-1 vermittelt. Miz-1 transaktiviert den $p15^{INK4B}$ -Promotor (Staller et al., 2001). Durch Überexpression von TopBP1 wird eben diese Transaktivierung durch Miz-1 inhibiert. In Zellpopulationen einer TopBP1-Deletionsmutante mit fehlender 7. und 8. BRCT-Domäne, also der notwendigen Interaktionsfläche zu Miz-1, wird die Transaktivierung des $p15^{INK4B}$ -Promotors nicht mehr signifikant inhibiert (Herold et al., 2002).

Summarisch ist TopBP1 Inhibitor der Aktivierung der $p15^{INK4B}$ -Transkription durch Miz-1.

3.4.2. Zeozin – kein Einfluss auf die Expression von Myc, Miz, TopBP1 und $p15^{INK4B}$

Das Zytostatikum Zeozin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum der Bleomycinfamilie und induziert insbesondere Doppelstrangbrüche. Der Wirkmechanismus beruht auf Interkalierung in die DNA, deren Fragmentierung und Hemmung der DNA-abhängigen Polymerase. In molekulargenetischen Experimenten wird Zeozin als Selektionsagens benutzt und wirkt toxisch auf alle Bakterien-, Pflanzen- und Säuger-Zellen, die nicht einen Vektor mit dem Zeozin-Resistenz-Gen (*Sh ble*) beinhalten.

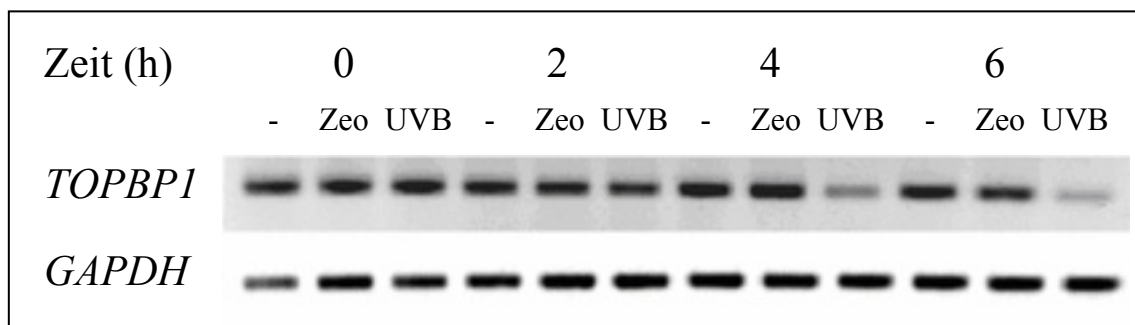


Abbildung 3.11: Reverse-Transkriptase-PCR: Vergleichende Analyse der Gen-Expression von TopBP1 Zeozin- beziehungsweise UVB-behandelter HaCaT-Zellen

Die Reverse-Transkriptase-PCR dokumentiert die Expression des TopBP1-Gens in einem Zeitfenster von 0 bis 6 Stunden. Die TopBP1-Gen-Expression der Zeozin-behandelten Zellen (Zeo) bleibt über den gesamten Messzeitraum unverändert. Die Expression des Topoisomerase II-bindenden Proteins 1 der UV-bestrahlten HaCaT-Zellen (UVB) wird, wie bereits zuvor dokumentiert, mit einem Maximum nach 4 bis 6 Stunden supprimiert. Die Expression von *GAPDH* dient als interne Kontrolle.

Zunächst wurde hier die DNA-Schadensantwort auf das Zytostatikum Zeozin parallel zur bereits gezeigten UV-Schadens-Regulation untersucht, um zu testen, ob die gemessene TopBP1- und $p15^{INK4B}$ -Expressions-Regulation UV spezifisch erfolgt.

Die beschriebene Expressions-Reduktion des Topoisomerase-bindenden Proteins 1 nach UV-Bestrahlung der Zellen wurde in diesem Versuch reproduziert (siehe Abbildung 3.11). Die Behandlung der HaCaT-Zellen mit dem Zytostatikum Zeozin, hier im direkten Vergleich dargestellt, löste dagegen keinen entsprechenden Regulationsprozess aus. Nach Induktion des DNA-Schadens durch das Zytostatikum konnte keine Repression der TopBP1-Expression beobachtet werden.

In Analogie zu Vorversuch wurde mittels RT-PCR ebenfalls die Expression von Myc und Miz-1 analysiert, um die Beteiligung der Gene an der mutmaßlichen alternativen Signaltransduktionskaskade der zellulären DNA-Schadensantwort auf Zeozin zu untersuchen.

Wie durch die RT-PCR (Abbildung 3.12) verdeutlicht, wurde durch die DNA-Schädigung mittels Zeozin im gewählten Zeitraum ebenfalls keine Expressionsregulation der Gene Myc und Miz-1 induziert.

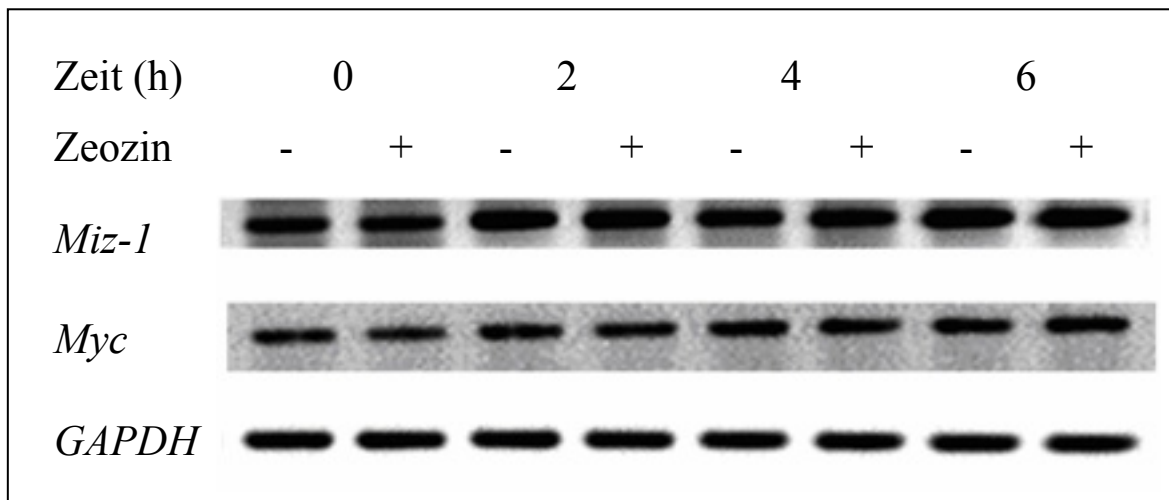


Abbildung 3.12: Reverse-Transkriptase-PCR: Expressions-Analyse der Gene Myc und Miz-1 Zeozin-behandelter HaCaT-Zellen

Die Abbildung zeigt eine RT-PCR-Dokumentation der Expression von Myc und Miz-1 in der zellulären Antwort auf Zeozin-induzierte DNA-Schäden (+), beziehungsweise Kontroll-Medium-behandelt (-), in einem Zeitfenster von 0 bis 6 Stunden. Die Expression von *GAPDH* dient als interne Kontrolle. Die Gen-Expression von Myc und Miz-1 bleibt durch Behandlung mit dem Zytostatikum Zeozin über den gesamten Messzeitraum unverändert.

Die fehlende Reaktion der Zeozin behandelten HaCaT-Zellen im direkten Vergleich mit der UV-Antwort deutet darauf hin, dass dieser DNA-Schaden einer anderen Zell-Antwort unterliegen muss, die von der Regulation der untersuchten Gene unabhängig ist. Die Art der Reaktion auf DNA-Schädigung ist nicht allein vom Zelltyp abhängig, sondern zeigt auch Spezifität bezüglich der Art des DNA-Schadens und des dadurch verursachten Defekts.

3.4.3. Hydroxy-Harnstoff – unveränderte Expression von Myc, Miz, TopBP1 und p15^{INK4B}

Hydroxy-Harnstoff ist ebenfalls ein Zytostatikum. Es hemmt durch Chelat-Bildung S-Phase-spezifisch die DNA-Synthese.

Die Behandlung der HaCaT-Zellen mit dem Zytostatikum Hydroxy-Harnstoff (1mM) wurde in Analogie zu den vorausgegangenen Experimenten durchgeführt.

In den durchgeführten RT-PCR Analysen zeigte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum, keine Beeinflussung der Expression von Myc, Miz-1, TopBP1 oder *p15^{INK4B}*. Als Kontrolle diente wiederum die Expression von *GAPDH*.

Die Induktion des DNA-Schadens durch die Anwendung des Zytostatikums Hydroxy-Harnstoff zeigte keinen quantitativen Unterschied in der Gen-Expressions-Analyse gegenüber den Zeozin behandelten Proben (daher RT-PCR nicht dargestellt).

Dagegen weisen ebenfalls parallel durchgeführte Versuche mit UVC-Bestrahlung (15J/m²) von HaCaT-Keratinocyten wiederum die transiente Expressionsabnahme von TopBP1 und die Expressionszunahme des CdK-Inhibitors *p15^{INK4B}* auf (persönliche Mitteilung, Michael Wanzel). Das lässt vermuten, dass diese Signaltransduktionskaskade in der Reaktion der Zelle auf einen DNA-Schaden für UV-Strahlung als schädigendes Agens spezifisch ist.

Offensichtlich besitzt die Keratinozytenzelle für die in den letzten beiden Versuchen durch die Zytostatika verursachten DNA-Schäden, andere, hier nicht untersuchte, Signaltransduktionskaskaden im Kontext einer differentiellen DNA-Schadensantwort.

4. Diskussion

4.1. RNA Interferenz in den Säugerzelllinien HaCaT, HeLa und MEF

Während der transiente Gen-Knock-out für viele Organismen schnell als Routine-Methode zur Analyse von Gen-Funktionen eingesetzt wurde, bereitete die Nutzung der RNA Interferenz in Säugerzellen wegen unspezifischer, genereller Knock-out-Effekte lange Zeit Probleme.

Bisher wurde die sequenz-spezifische RNA Interferenz der Säugerzelle durch allgemeine unspezifischen Effekte maskiert. Das Verhältnis von unspezifischer zu sequenz-abhängiger Reaktion erwies sich dann als von der Länge des Doppelstrangs abhängig. Des Weiteren müssen Kriterien existieren, die mit dem jeweiligen Zelltyp variieren. Tuschel beobachtete in seinen Luziferase-Assay-Experimenten signifikante Unterschiede in der Effizienz des spezifischen Knock-outs von Luziferase-Genen in Abhängigkeit von der Zelllinie. Unterschiede zwischen den Zelltypen sind durch unterschiedliche Ausstattung der jeweiligen Zellen mit den zur RNA Interferenz notwendigen Enzymkomplexen denkbar, können aber auch durch unterschiedlichen Proteinumsatz der Zellen zustande kommen. Das Ergebnis eines spezifischen Gen-Knock-out durch RNA Interferenz ist von zahlreichen Komponenten abhängig und differiert mit jedem Zielgen und jeder Zelllinie.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Protokoll zur Nutzung der RNA Interferenz in Anpassung an die Zelllinien HaCaT und HeLa und an murine Embryo-Fibroblasten angepasst werden. Die durchgeführten Fluoreszenz-Experimente zeigen, dass die transfizierten fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide intrazellulär lokalisiert sind, was den Rückschluss auf eine vergleichbar effiziente Transfektion der RNA-Doppelstrang-Moleküle zur RNA Interferenz zulässt.

Die durch Auszählung fluoreszierender Zellen quantifizierte Transfektions-Effizienz von durchschnittlich 80% macht eine phänotypische Auswirkung der RNA Interferenz eines Zielgens auf die Zellpopulation möglich.

4.1.1. GL2-Knock-down in den Zelllinien HaCaT-, HeLa- und MEF

Zur Analyse der Effizienz der RNA Interferenz in verschiedenen Zelllinien ist der Gen-Knock-out von Luziferase-Genen besonders geeignet. Die verbleibende Gen-Expression lässt sich durch Messung der Lumineszenz im Luziferase-Assay leicht quantifizieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 21-Basenpaar-lange doppelsträngige RNA-Oligonukleotide eingesetzt, deren Sequenz homolog zum Zielgen GL2 einem Glühwürmchen-Luziferase kodierenden Reporter-Plasmid ist.

Durch Kotransfektion der RNA-Doppelstränge und des GL2-Plasmids konnte ein Rückgang der Plasmid-induzierten Lumineszenz gegenüber allein mit dem Reporter-Plasmid transfizierter oder mit Nonsense-RNA kotransfizierter Zellen erreicht werden.

Der Versuch wurde in Analogie zu den RNA-Interferenz-Versuchen mit Säugerzelllinien durch Thomas Tuschl gestaltet. Tuschl beweist in seiner Veröffentlichung das Gelingen der spezifischen RNA Interferenz in Säugerzelllinien mittels Knock-out von Luziferase-Genen sowie natürlich vorkommenden, endogenen Zellgenen (Elbashir et al., 2001a).

Im Kontext dieser Dissertation konnte der Knock-out des Glühwürmchen-Luziferase-Reporter-Plasmids für die bereits von Tuschl verwandte Zelllinie humaner Zervix-Karzinom-Zellen HeLa reproduziert werden. Die Methode der RNA Interferenz wurde parallel für die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und die murinen primären embryonalen Fibroblasten MEF etabliert.

Ein hundertprozentiger Knock-out, wie bisher bei Nicht-Säugetieren zum Beispiel in *Drosophila*-Zellen beobachtet, konnte hier nicht erzielt werden. Die Vollständigkeit der Gen-Stilllegung ist vermutlich aufgrund nicht hundertprozentiger Transfektion aller Zellen, unterschiedlicher Enzymausstattung der Säugerzellen gegenüber Nicht-Säugetieren und in Abhängigkeit von Stabilität und Halbwertszeit des Zielproteins sowie der Entwicklungsphase der Zelle unter Transfektion nicht erreichbar.

Trotzdem qualifiziert der Nachweis des signifikanten RNA Interferenz Effekts die genannten drei Zelllinien für die Nutzung der sequenzspezifischen post-transkriptionellen Gen-Stilllegung der RNA Interferenz als molekulargenetisches Werkzeug zur Analyse endogener Gen-Funktionen.

4.1.2. Depletion des Transkriptionsfaktors Miz-1 durch RNA Interferenz

Nach der methodischen Etablierung der RNA Interferenz für die genannten Zellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Nutzung der Methode ein biologischer Sachverhalt aus dem Bereich der zellulären DNA-Schadensantwort untersucht. Von besonderem Interesse war der Transkriptionsfaktor Miz-1, der Interaktionspartner des Proto-Onkogens Myc, in der p53-abhängigen Signaltransduktionskaskade nach DNA-Schädigung durch UV-Licht.

Durch UV-Bestrahlung kultivierter Maus-Embryo-Fibroblasten wird eine Induktion der Expression des CdK-Inhibitors *p21^{cip1}* induziert. Überexpression von Myc hemmt diesen UV-induzierten Effekt. Eine Mutante von Myc mit defekter Miz-1-Bindung ist nicht in der Lage, die *p21^{cip1}*-Expression zu hemmen (Herold et al., 2002).

Geht man aufgrund dieser Erkenntnisse davon aus, dass die *p21^{cip1}*-Expression sowie deren Repression durch Myc in der UV-induzierten p53-Schadensantwort von Miz-1 abhängig ist, lässt sich ein Verlust dieser zellulären Mechanismen nach der Depletion von Miz-1 erwarten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Depletion des Transkriptionsfaktors Miz-1 durchgeführt und die biologische Konsequenz im Kontext der UV-Schadensantwort untersucht.

Sowohl Immunfluoreszenz als auch Westernblot zeigten keine Konzentrationsänderung des Miz-1-Proteins nach RNA Interferenz.

Dieses Resultat kann zum einen bedeuten, dass der Knock-out ineffizient war und keine Auswirkung auf die Miz-1-Proteinkonzentration zu den gewählten Messzeitpunkten hatte. Zum anderen kann es eine unzureichende Sensitivität der Nachweis-Verfahren zur Ursache haben.

Eine partielle Depletion der Miz-1 Gen-Expression stellt sich auf Proteinebene aufgrund der Antikörper-Konzentrationen und starker Fluoreszenz des Zweit-Antikörpers in der Immunfluoreszenz nicht notwendigerweise dar. Für Immunfluoreszenz- und Westernblot wird daher zur Quantifizierung der RNA Interferenz anhand des Proteins die Titration des primären sowie des sekundären Antikörpers in Verdünnungsreihen empfohlen (Sammlung von Protokollen zur RNA Interferenz in Säugerzellen, (Elbashir et al., 2002)).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden stattdessen sensitivere, auf RNA-Konzentration basierende Nachweis-Verfahren wie Northern-Blot und RT-PCR zur Detektion des RNA Interferenz Effekts verwandt.

Beide Methoden bestätigten einen reduzierten Gehalt von Miz-1 in den Knock-out-Zellen im Vergleich zu den verwandten Kontrollen. Es kann von einer spezifischen post-transkriptionellen Gen-Stillegung gesprochen werden.

Ähnlich wie in zahlreichen bisherigen RNA Interferenz-Versuchen in Säugerzellen konnte nur ein partieller Knock-out des Miz-1 Gens erreicht werden.

Kann ein Fehler in der Sequenzauswahl des RNA-Doppelstranges ausgeschlossen werden, verbleiben weitere mögliche Gründe für eine Unvollständigkeit der post-transkriptionellen Gen-Stillegung.

Zum Beispiel wird in Säugerzellen meist keine hundertprozentige Transfektionseffizienz erreicht. Das heißt, nicht alle Zellen sind erfolgreich mit siRNA transfiziert und nehmen an der RNA Interferenz teil.

Wie seit langem bekannt besitzen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp), durch die die Doppelstrang-RNA vervielfacht wird und der Knock-out-Prozess unterhalten werden kann (Lipardi et al., 2001; Napoli et al., 1990; Sijen et al., 2001). Säugerzellen besitzen diese Polymerase nicht (Stein et al., 2003), was ihren Interferenz-Effekt der siRNA automatisch auf wenige Stunden limitiert.

Zusätzlich hängt die verbleibende Proteinkonzentration von der Stabilität und dem zellulären Umsatz des in der Zelle vorhandenen Proteins ab. Eine hohe Proteinstabilität maskiert unter Umständen den Effekt der RNA Interferenz auf Proteinebene. Dementsprechend bereiten besonders Depletionsversuche extrem stabiler und intensiv exprimierter Gene wie zum Beispiel Vimentin Schwierigkeiten beim Versuch der post-transkriptionellen Gen-Stillegung (Elbashir et al., 2001a).

So lässt sich die nur partielle Depletion der Miz-1 Gen-Expression möglicherweise darauf zurückführen, dass Miz-1 ein stabiles, endogen in hohen Konzentrationen exprimiertes Protein ist.

Wie Veröffentlichungen zahlreicher RNA Interferenz Experimente zeigten liegt die durchschnittliche Reduktion der Ziel-Gen-Expression mittels siRNA in Säugerzellen bei 70-80% (Review, Tuschl and Borkhardt, 2002). Auch die Technik der stabilen Gen-

Repression mittels shRNA und retroviralen Vektoren erzielte in groß angelegten Studien eine Expressions-Hemmung der Ziel-Gene von durchschnittlich 70% (Berns et al., 2004).

Aber auch eine partielle Depletion eines Gens hat Auswirkungen auf den resultierenden Phänotyp. Wie zahlreichen bisherigen Veröffentlichungen zu entnehmen, wurde die RNA Interferenz-Technik mittels siRNA in Säugerzellen erfolgreich genutzt, um Genfunktionen somatischer Zellen zu analysieren. Die resultierenden zellulären Phänotypen der RNA Interferenz essentieller und nicht essentieller Ziel-Gene sind in Vergleichen mit den zuvor bei transgenen Mäusen beobachteten Phänotypen identisch (Elbashir et al., 2002; Harborth et al., 2001).

Die Möglichkeit einer partiellen Depletion von Miz-1, eines sogenannten Knock-down, bietet Gelegenheit zur Analyse der Funktion des Gens selbst und der indirekten Untersuchung seiner Interaktionspartner sowie der Überprüfung eventuell Miz-1-abhängiger Signaltransduktionswege.

Bei gegebenenfalls Miz-1 abhängiger Vermittlung der kanzerogenen Eigenschaften des Proto-Onkogen Myc wäre auch ein therapeutischer Nutzen einer Depletion der Miz-1 Expression im Tumorgewebe denkbar.

Für die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3 konnte eine gesteigerte Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung nach Miz-1-Depletion beobachtet werden. Die Zellen zeigen eine deutliche vermehrte Apoptose-Induktion (persönliche Mitteilung, Michael Wanzel). Vorstellbar wäre demnach eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Strahlentherapie durch gentherapeutische RNA Interferenz des Transkriptionsfaktors Miz-1.

4.1.3. Perspektiven: RNA Interferenz als molekularbiologisches Werkzeug in Forschung und Therapie

Experimente, die einen Gen-Knock-out erfordern, waren vor Entdeckung der RNA Interferenz von Modell-Systemen in Nagetieren, Fliegen, Würmern oder Zebrafischen abhängig. RNA Interferenz ist mittlerweile in nahezu jedem Zelltyp durchführbar. Der Knock-out mittels RNA Interferenz ersetzt zunehmend die konventionellen Gen-Knock-out-Technologien (Elbashir et al., 2002). Die entstehenden siRNA-Datenbanken werden eingesetzt um Genom-umfassende Funktions-Screenings durchzuführen.

RNAi ist dabei außer in der Untersuchung von Gen-Funktionen durch Knock-out von mindestens ebenso großen Nutzen für den therapeutischen Bereich:

In Entwicklung befinden sich neue Möglichkeiten der therapeutischen Intervention in der Tumorgenese oder bei Viruserkrankungen zum Beispiel durch HIV-1, Hepatitis- oder Influenza-Virus (Hu et al., 2002; Kawasaki and Taira, 2003; Surabhi and Gaynor, 2002).

Als Beispiel aus der Onkogenese sei das Philadelphia-Chromosom mit seinem Fusions-Gen BCR-ABL genannt. Das Translationsprodukt von BCR-ABL ist eine Tyrosinkinase, die die leukämischen Transformationen der chronischen myeloischen Leukämie (CML) hervorruft. Für die spezifische siRNA des BCR-ABL-Gens konnte gezeigt werden, dass sie das onkogene Transkript stilllegt ohne die Transkripte der normalen nicht fusionierten Teil-Gene c-ABL und c-BCR zu tangieren (Scherr et al., 2003; Wohlbold et al., 2003).

Die genannten Beispiele deuten nur einen kleinen Teil des enormen therapeutischen Potentials der RNA Interferenz an. Zahlreiche Erkrankungen, deren genetische Ätiologie und Pathogenese geklärt ist, könnten vermutlich bald durch diese neue Interventions-Möglichkeit bekämpft werden.

RNA Interferenz bedarf noch einiger Forschung im Hinblick auf seine Applikation und Stabilität. Die Aussicht auf Arzneimittel, die sequenz-spezifisch, kausal therapieren und dabei mit der hohen Mutationsrate von Viren oder auch Onkogenen Schritt halten können, ist Grund genug in naher Zukunft mit RNA Interferenz als bedeutendes Therapeutikum rechnen zu können.

4.2. Miz-1 reguliert die Zellproliferation in der Antwort auf UV-induzierte DNA-Schäden

4.2.1. UV-Schadensantwort – die Bedeutung von Miz-1

Auf einen UV-induzierten DNA-Schaden können Zellen in unterschiedlicher Weise reagieren. Sie leiten einen Zellzyklusarrest ein um zum Beispiel Zeit zur Reparatur des entstandenen DNA-Defekts zu haben oder im Falle eines irreparablen Schadens den programmierten Zelltod, die Apoptose, durchzuführen.

Im Rahmen von Zellzyklusanalysen UV-bestrahlter Maus-Embryo-Fibroblasten wurde ein signifikanter Rückgang der DNA-Synthese in der Schadensantwort auf UV-Licht festgestellt, wobei auffiel, dass Zellen denen der CdK-Inhibitor $p21^{cip1}$ fehlt, nicht arretieren (Herold et al., 2002). Die Expression von $p21^{cip1}$ ist demnach für den UV-induzierten Zellzyklusarrest notwendig. Zudem ist die UV bedingte Induktion von $p21^{cip1}$ in MEF-Zellen von p53 abhängig (Deng et al., 1995).

Gelretardationsexperimente belegten ferner, dass $p21^{cip1}$ ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Miz-1 ist (Herold et al., 2002).

Welche Rolle Miz-1 in der p53-abhängigen DNA-Schadensantwort auf UV-Licht spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Nutzung der RNA Interferenz untersucht.

Durch RNA Interferenz von Miz-1 konnte eine partielle Depletion des der Zelle zur Verfügung stehenden Transkriptionsfaktors erreicht werden. Eine Reduktion von Miz-1 zeigte auch mit dem Kontroll-Doppelstrang transfizierte Zellen, wobei die spezifische RNA Interferenz durch anti-Miz-1-siRNA deutlich stärkere Depletion von Miz-1 bewirkte.

Im Vergleich der UV-Schadensantworten der Zellen konnten die Miz-1 defizienten Zellen eine deutlich geringere Expression von $p21^{cip1}$ induzieren. Die durch unspezifischen Effekt der RNA Interferenz in ihrem Miz-1 Gehalt reduzierten Zellen zeigten ebenfalls einen Rückgang der $p21^{cip1}$ -Expression in Korrelation zur Miz-1-Protein-Konzentration.

UV-Bestrahlung von unbehandelten MEF-Zellen induzierte, wie aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, die verstärkte Expression des CdK-Inhibitors $p21^{cip1}$.

Es kann also bestätigt werden, dass Miz-1 für die UV-induzierte $p21^{cip1}$ -Expression notwendig ist. Anzunehmen ist daher, dass eine Miz-1 defiziente Zelle, ebenso wie für $p21^{Cip1^{-/-}}$ -Zellen gezeigt wurde (Herold et al., 2002), ihren Zellzyklusarrest nach UV-Bestrahlung nicht arretiert, weiter DNA synthetisiert und in einen neuen Zyklus eintritt.

In das Modell der hypothetischen Signaltransduktionskaskade der Miz-1 abhängigen $p21^{cip1}$ -Expression auf UV-Licht kann außerdem TopBP1 als Inhibitor des Myc-interagierenden Zinkfingerproteins involviert werden (siehe Abbildung 4.1).

UV-Bestrahlung von Maus-Embryo-Fibroblasten bewirkt in der Zelle die negative Regulation der Expression des Topoisomerase-bindenden Proteins TopBP1. Dieses liegt

in der Zelle assoziiert an Miz-1 vor und bewirkt so dessen funktionelle Hemmung (Herold et al., 2002). Durch UV-Bestrahlung liegt vermehrt aus dem Komplex mit TopBP1 gelöstes Miz-1 vor, dass den „core-Promotor“ des CdK-Inhibitors $p21^{cip1}$ bindet und dessen Genexpression veranlasst (Herold et al., 2002; Staller et al., 2001).

Die Transaktivierung des CdK-Inhibitors $p21^{cip1}$ in der DNA-Schadensantwort der Maus-Embryo-Fibroblasten ist außer von Miz-1 auch von p53-abhängig.

Für primäre Maus-Embryo-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass p53 zur UV-induzierten Expression von $p21^{cip1}$ erforderlich ist (Deng et al., 1995).

Die Notwendigkeit einer Kooperation von Miz-1 und p53 zur Transaktivierung des $p21^{cip1}$ -Promotors ist daher wahrscheinlich. Der molekulare Mechanismus der funktionellen Interaktion von p53 und Miz-1 ist bislang ungeklärt, eine Kooperation auf Promotorebene wäre hier zum Beispiel denkbar.

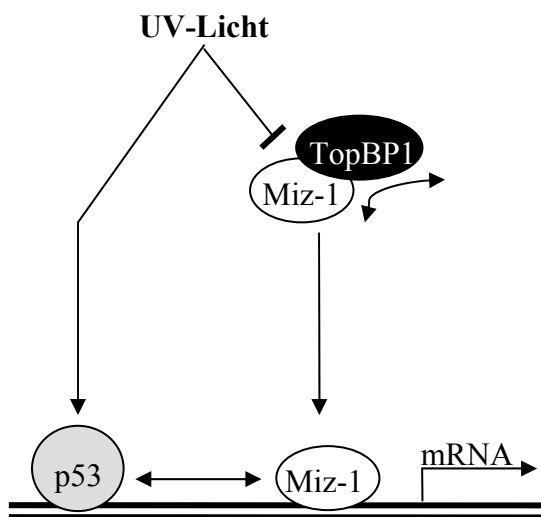


Abbildung 4.1: Modell der UV-induzierten Expression von $p21^{cip1}$

Miz-1 wird durch UV-Licht aus einem inhibitorischen Komplex mit TopBP1 entlassen, und bindet den $p21^{cip1}$ -Promotor. Miz-1 benötigt zur Expressionsinduktion des CdK-Inhibitors außerdem die Aktivierung von p53, welches in der Transaktivierung des $p21^{cip1}$ -Promotors mit Miz-1 kooperiert.

Die Expression von $p21^{cip1}$ bewirkt über eine Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk, entsprechend dem Mechanismus, der in der Einleitung erläutert wurde, den Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Niculescu et al., 1998).

4.2.2. DNA-Schadensantwort – abhängig von der Schadensart

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die *p21^{cip1}*-Induktion auf UV-Licht von p53 und von Miz-1 abhängig. Miz-1 defiziente Zellen konnten hier mittels RNA Interferenz untersucht werden. Zur Testung p53-defizienter Zellen wurde eine Keratinozyten-Zelllinie eingesetzt, der kein funktionelles p53 zur Verfügung steht. Mittels dieser Zellen wurde die Rolle von Miz-1 in von p53-unabhängigen DNA-Schadensantworten untersucht.

Die Signaltransduktionskaskade UV-bestrahlter Maus-Embryo-Fibroblasten resultiert in der Induktion der Expression des CdK-Inhibitors *p21^{cip1}*. Eine vergleichbare Schadensantwort konnte in p53-defizienten HaCaT Zellen im Rahmen vorheriger Arbeiten nicht beobachtet werden. Die Expression von *p21^{cip1}*, welches am Zellzyklusarrest infolge von DNA-Defekten der meisten Zellen beteiligt ist, wird in HaCaT-Zellen nicht aktiviert (Xie et al., 1998).

Das genaue Muster der Schadens-induzierten Gene ist stets abhängig vom jeweiligen Zelltyp.

Zellen sichern die Stabilität ihrer genetischen Information über ein strukturiertes Kontroll- und Reparatursystem. Es existieren zum Beispiel Kontrollpunkte, die bei einem DNA-Schaden einen Zellzyklusarrest veranlassen, um Zeit für die Reparatur des Fehlers bereitzustellen.

Verschiedene DNA-schädigende Agenzien verursachen strukturell unterschiedliche DNA-Defekte. Zu deren Reparatur erfordert es demnach unterschiedliche Effektormoleküle, die von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen initiiert und von verschiedenen DNA-Schadens-Sensoren detektiert werden. So variiert die Antwort der Zelle auf die DNA-Schädigung in Abhängigkeit des jeweiligen Schadenstyps.

Kommt es zum Beispiel zu einem DNA-Doppelstrangbruch, wird dieser durch einen Sensor erkannt, die Information über eine Kaskade von Signaltransduktionsmolekülen weitergegeben und ein Effektorprotein zur nachfolgenden Reparatur oder bei irreversiblen Schäden zur Einleitung der Apoptose veranlasst.

Diese Spezifität des Schaden-Kontrollpunktes für die jeweilige Schadensart wurde hier anhand verschiedener DNA-schädigender Agenzien in HaCaT-Zellen getestet.

UV-Behandlung der p53-defizienten HaCaT-Zellen induzierte eine Expressions-Änderung von TopBP1 und *p15^{INK4B}*. Die Expression des Topoisomerase II-bindenden

Proteins wurde mit einem Maximum nach 4 bis 6 Stunden reprimiert, während das CdK-Inhibitor-Proteins $p15^{INK4B}$ gegensätzlich reguliert wurde. Es resultierte eine Induktion von $p15^{INK4B}$.

Eine entsprechende Schadensantwort konnte durch Zeozin- beziehungsweise Hydroxy-Harnstoff-Behandlung von HaCaT-Zellen nicht ausgelöst werden. Die zytostatischen Substanzen Zeozin und Hydroxy-Harnstoff zeigten in den durchgeführten RT-PCR Analysen keinen Einfluss auf die Expression der Signal-Transduktoren Myc, Miz, TopBP1 und $p15^{INK4B}$.

Diese DNA-schädigenden Agenzien verursachen demnach verschiedene schadensspezifische Zellantworten.

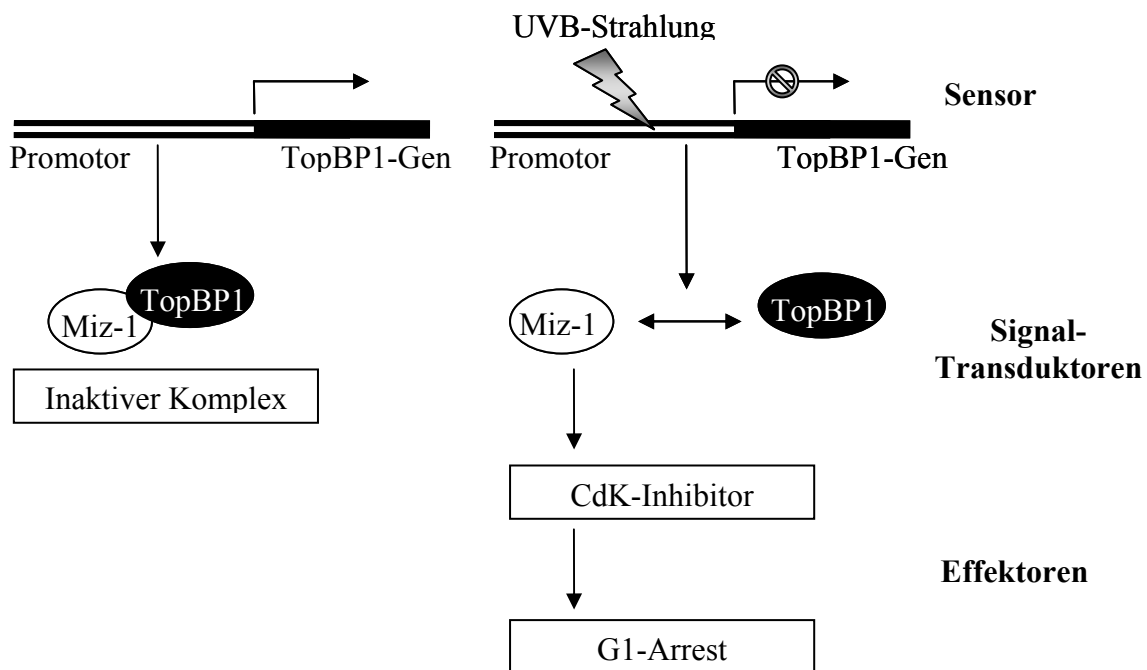


Abbildung 4.2: Modell eines DNA-Schadens-Kontrollpunktes, exemplarisch unter Beteiligung von Miz-1 und TopBP1

Da eine Regulation der TopBP1-Expression durch Zeozin und Hydroxy-Harnstoff mittels Reverser-Transkriptase-PCR ausgeschlossen werden konnte, das Topoisomerase II-bindende Proteins aber notwendiger Bestandteil der zuvor beschriebenen Signaltransduktionskaskade ist (siehe 4.2.1.), ist davon auszugehen, dass die regulatorische DNA-Schadensantwort auf die beiden Zytostatika anderen, hier nicht detektierten, Kontroll- und Reparatursystemen unterliegen, denen im Rahmen dieser Arbeit nicht näher nachgegangen werden konnte.

Zusammengefasst beschreiben die Ergebnisse eine schadensspezifische Reaktion der Keratinozyten-Zelle auf UV-Behandlung. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Komplexbildung von TopBP1 und Miz-1 nur für die UV-Licht vermittelte Schadensantwort eine Bedeutung hat.

4.2.3. Potentielle Bedeutung der Miz-1 abhängigen DNA-Schadensantwort in der Tumorgenese

Im Anschluss an die Betrachtung der Bedeutung von Miz-1, dem Myc-interagierenden Protein, im Kontext verschiedener DNA-Schadensantworten stellt sich die Frage, welche Rolle Myc in der Miz-1 vermittelten Schadensantwort spielt.

- Dass Myc Miz-1 durch Komplexbildung in seiner Funktion hemmen kann, ist durch zahlreiche Arbeiten bekannt. Die Repression der $p15^{INK4B}$ -Expression durch Myc erfolgt zum Beispiel durch die Interaktion mit Miz-1. Myc hemmt durch Komplexbildung mit Miz-1 über eine Blockierung der Bindestelle des Koaktivators $p300$ die Transkriptions-Aktivierung des $p15^{INK4B}$ -Initiator-Element (INR) (Staller et al., 2001).

- Dass die Expression von Myc die Aktivierung von $p21^{cip1}$ hemmen kann, ist ebenfalls bekannt (Herold et al., 2002)

- Dass die $p21^{cip1}$ -Expression in der UV-induzierten p53-abhängigen Schadensantwort von Miz-1 abhängig ist, konnte unter anderem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden.

Berücksichtigt man bei der Überlegung, auf welche Weise Myc in die Miz-1-abhängige Schadensantwort UV-behandelter Zellen eingreift, die vorliegenden Ergebnisse, ergibt sich, dass Myc ein negativer Regulator der UV-induzierten DNA-Schadensantwort durch seine Interaktion mit Miz-1 ist.

Diese Rolle des Myc/Miz-1-Komplexes in dieser DNA-Schadensantwort wurde durch den Einsatz einer Punktmutante von Myc (MycV394D) verifiziert. Die getestete Mutante ist zur Transaktivierung von Myc-Zielgenen fähig, aber in der Bindung zu Miz-1 defekt. Im Vergleich zum Wildtyp-Myc wurde durch die Myc-Mutante die UV-induzierte Expression von $p21^{cip1}$ nicht reprimiert (Herold et al., 2002).

Dass Myc im Falle seiner Überexpression in zahlreichen Tumoren zur genomischen Instabilität führt, ist durch zahlreiche Berichte belegt (siehe Literaturhinweise in 1.3.2.).

Auf welche Weise Myc und Miz-1 im Rahmen der Schadensantwort interagieren, wurde vorab anhand der gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

Abschließend stellt sich daher die Frage, welche Rolle Miz-1 in der Tumorgenese spielen könnte.

Wie mit Hilfe von Zellzyklusanalysen gezeigt werden konnte, bewirkt die Überexpression von Myc ein frühzeitiges Fortschreiten des Zellzyklus nach UV-Bestrahlung und damit unter Umständen den Verlust genomischer Stabilität (Herold et al., 2002). Eine vergleichbare Konsequenz ist demnach durch einen Verlust an funktionellem Miz-1 denkbar.

Die vielseitigen Mechanismen, durch die Myc zur genomischen Instabilität führt, werden zur Zeit aufgeklärt. Es ist möglich, dass die Hemmung von Miz-1 den generellen Mechanismus darstellt, durch den überexprimiertes Myc den Zellzyklusarrest des p53-abhängigen Schadens-Kontroll-Punktes überwindet.

Durch den verkürzten Zellzyklusarrest können DNA-Schäden nicht vollständig repariert und Veränderungen im Genom weitergetragen werden. Eine deregulierte Expression von Myc begünstigt so die Kumulation von Mutationen in nachfolgenden Zellgenerationen. Es kommt zum Verlust weiterer Schadens-Kontrollpunkte bis zum Erreichen einer kritischen Gesamtzahl von Mutationen, die zur Karzinomentstehung führt.

Durch Aufklärung der Zusammenhänge defekter Schadens-Kontrollpunkte wird es wahrscheinlich in Zukunft möglich sein, pharmakologisch selektiv in Prozesse der Gen-Regulation und Checkpointmechanismen einzugreifen. Besonders die Aussicht, mittels RNA Interferenz in die Genexpression einer Zelle *in vivo* eingreifen zu können, eröffnet neue therapeutische Perspektiven.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertationsarbeit beschäftigte sich zum einen methodisch mit dem Gen-Knock-out des mit Myc interagierenden Proteins Miz-1 mittels der kürzlich erschlossenen Technik der RNA Interferenz in Säugerzellen.

Zum anderen wurde unter Nutzung der RNA Interferenz ein Zusammenhang aus dem Bereich zellulärer Schadenskontrollmechanismen, speziell der Regulation der UV-induzierten DNA-Schadensantwort durch das Myc interagierende Protein Miz-1 geklärt.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Nutzung eines evolutionär konservierten Abwehrmechanismus der Zelle gegen Fremdgene, der RNA Interferenz. Der Knock-out mittels RNA Interferenz ersetzt zunehmend die konventionellen Gen-Knock-out-Technologien.

Durch RNA Interferenz Versuche mit Kotransfektion eines Glühwürmchen-Luziferase-kodierenden Plasmids und eines sequenz-homologen RNA-Doppelstrangs konnte ein deutlicher Rückgang der Plasmid-induzierten Lumineszenz gegenüber den allein mit Reporter-Plasmid transfizierten oder mit Nonsense-RNA kotransfizierten Zellen erreicht werden. Mittels dieses spezifischen Knock-out eines Gens wurde die Eignung der Säugerzelllinien HaCaT, einer humanen Keratinozyten-Zelllinie, HeLa, ebenfalls humaner Zervix-Karzinom-Zellen und MEF, primärer muriner Embryo-Fibroblasten zur RNA Interferenz dargelegt.

Anschließend wurde die Depletion des Transkriptionsfaktors Miz-1 durchgeführt. Ähnlich wie in zahlreichen bisherigen RNA Interferenz-Versuchen in Säugerzellen konnte nur ein partieller Knock-out des Gens erreicht werden. Aber auch eine partielle Depletion eines Gens hat Auswirkungen auf den resultierenden Phänotyp. Die Möglichkeit eines partiellen Miz-1 Knock-out, auch als Knock-down bezeichnet, eröffnet umfangreiche Möglichkeiten der Funktionsanalyse des Gens und seiner Interaktionspartner sowie der Analyse Miz-1-abhängiger Signaltransduktionswege.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der zellulären Antwort auf UV-induzierte DNA-Schäden. Dabei wurde ein vom Tumorsuppressor p53 abhängiger sowie ein p53-unabhängiger Schadens-Kontrollpunkt untersucht und die jeweilige Bedeutung des Transkriptionsfaktors Miz-1 geprüft.

Zur Analyse der p53-abhängigen zellulären Antwort auf UV-induzierte DNA-Schäden wurden ARF^{-/-}-Maus-Embryo-Fibroblasten verwendet, da Myc in UV bestrahlten Wildtyp-MEF-Zellen eigenständig über ARF Apoptose induziert. Durch p53 werden eine Reihe von Genen, unter anderem der CdK-Inhibitor *p21^{cip1}*, aktiviert, die Zellzyklusarrest oder Apoptose einleiten. Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, ist für die *p21^{cip1}*-Expression in der UV-Antwort neben dem Tumorsuppressor p53 die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Miz-1 notwendig. Nach Depletion des Myc interagierenden Proteins mittels RNA Interferenz liegt eine gehemmte Expression des CdK-Inhibitors *p21^{cip1}* vor.

Mit der Depletion von Miz-1 durch RNA Interferenz vergleichbar ist der funktionelle Ausfall der Aktivität von Miz-1 in Zellen mit deregulierter Expression von Myc. In MEF-Zellen verhindert eine Überexpression des Onkogens die UV-induzierte Aktivierung der Expression von *p21^{cip1}*. Folge ist die verkürzte Dauer des Zellzyklusarrestes und ein rascher Wiedereintritt der geschädigten Zelle in den Zellzyklus. Anzunehmen ist also, dass die negative Regulation der DNA-Schadensantwort auf UV-Licht durch Myc in Miz-1 abhängiger Weise erfolgt.

Anhand eines Zellsystems p53-defizienter humaner Keratinozyten konnte die p53-unabhängige Schadensantwort auf verschiedene DNA-schädigende Agenzien untersucht werden. Ein für HaCaT-Zellen ermittelter Signaltransduktionsweg nach DNA-Schädigung wurde zunächst reproduziert. Die UV-Bestrahlung der Keratinozyten löst eine transiente Repression des Topoisomerase-bindenden Proteins TopBP1 aus. Das aus dem inhibitorischen Komplex mit TopBP1 frei werdende Miz-1 veranlasst die transkriptionelle Aktivierung des CdK-Inhibitors *p15^{INK4B}*. Ähnlich der Induktion der *p21^{cip1}*-Expression ist das Resultat des UV-Schadens die Aktivierung eines CdK-Inhibitors mit folgendem Zellzyklusarrest.

Die Zytostatika Zeozin und Hydroxy-Harnstoff zeigten keinen Einfluss auf die Expression von Myc, Miz, TopBP1 oder *p15^{INK4B}*, den beteiligten Interaktionspartnern des Schadens-Kontrollpunktes der UV-Antwort der Keratinozyten-Zelle.

Die Ergebnisse sprechen für die Schadens-Spezifität der p53-unabhängigen UV-Antwort. Der untersuchte Signaltransduktionsweg ist an der zellulären Antwort auf die Zytostatika-induzierten DNA-Defekte nicht beteiligt. Es ist möglich, dass der Miz-1/TopBP1-Komplex Bestandteil eines ausschließlich durch UV-Licht ausgelösten Schadens-Kontrollpunktes ist.

6. Literaturverzeichnis

Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* *318*, 533-538.

Adhikary, S., Peukert, K., Karsunky, H., Beuger, V., Lutz, W., Elsasser, H. P., Moroy, T., and Eilers, M. (2003). Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Mol Cell Biol* *23*, 7648-7657.

Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J* *12*, 5083-5087.

Asker, C., Steinitz, M., Andersson, K., Sumegi, J., Klein, G., and Ingvarsson, S. (1989). Nucleotide sequence of the rat Bmyc gene. *Oncogene* *4*, 1523-1527.

Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944). Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types; Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med*, 137-158.

Bardwell, V. J., and Treisman, R. (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* *8*, 1664-1677.

Bass, B. L. (2001). RNA interference. The short answer. *Nature* *411*, 428-429.

Berns, K., Hijmans, E. M., Mullenders, J., Brummelkamp, T. R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R. M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., *et al.* (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* *428*, 431-437.

Bister, K., and Duesberg, P. H. (1979). Structure and specific sequences of avian erythroblastosis virus RNA: evidence for multiple classes of transforming genes among avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 5023-5027.

Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* *13*, 5216-5224.

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* *106*, 761-771.

Brodeur, G. M., Sekhon, G., and Goldstein, M. N. (1977). Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* *40*, 2256-2263.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* *296*, 550-553.

Dang, C. V., and Lee, W. M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 8, 4048-4054.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21Cip/Waf1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-684.

Deweindt, C., Albagli, O., Bernardin, F., Dhordain, P., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., and Leprince, D. (1995). The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth Differ* 6, 1495-1503.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.

Erisman, M. D., Rothberg, P. G., Diehl, R. E., Morse, C. C., Spandorfer, J. M., and Astrin, S. M. (1985). Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Mol Cell Biol* 5, 1969-1976.

Ferre-D'Amare, A. R., Prendergast, G. C., Ziff, E. B., and Burley, S. K. (1993). Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 363, 38-45.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Fong, C. T., Dracopoli, N. C., White, P. S., Merrill, P. T., Griffith, R. C., Housman, D. E., and Brodeur, G. M. (1989). Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3753-3757.

Grover, R., Ross, D. A., Wilson, G. D., and Sanders, R. (1997). Measurement of c-myc oncoprotein provides an independent prognostic marker for regional metastatic melanoma. *Br J Plast Surg* 50, 478-482.

Guo, S., and Kemphues, K. J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-620.

- Hannon, G. J. (2002). RNA interference. *Nature* *418*, 244-251.
- Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T., and Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* *114*, 4557-4565.
- Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., Bradley, A., and Donehower, L. A. (1993). Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* *5*, 225-229.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaaja, J., Saluz, H. P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* *10*, 509-521.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* *253*, 49-53.
- Hu, W. Y., Myers, C. P., Kilzer, J. M., Pfaff, S. L., and Bushman, F. D. (2002). Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr Biol* *12*, 1301-1311.
- Jenkins, R. B., Qian, J., Lieber, M. M., and Bostwick, D. G. (1997). Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* *57*, 524-531.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* *51*, 6304-6311.
- Kawasaki, H., and Taira, K. (2003). Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Res* *31*, 700-707.
- Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* *95*, 1017-1026.
- Koonin, E. V., Altschul, S. F., and Bork, P. (1996). BRCA1 protein products ... Functional motifs. *Nat Genet* *13*, 266-268.
- Kuznicki, K. A., Smith, P. A., Leung-Chiu, W. M., Estevez, A. O., Scott, H. C., and Bennett, K. L. (2000). Combinatorial RNA interference indicates GLH-4 can compensate for GLH-1; these two P granule components are critical for fertility in *C. elegans*. *Development* *127*, 2907-2916.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* *240*, 1759-1764.

Lipardi, C., Wei, Q., and Paterson, B. M. (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107, 297-307.

Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T., and Housman, D. E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74, 957-967.

Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9, 935-944.

Matera, A. G. (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9, 302-309.

Minks, M. A., West, D. K., Benveniste, S., and Baglioni, C. (1979). Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem* 254, 10180-10183.

Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., and et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.

Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O. W., Bertness, V., Hollis, G. F., and Minna, J. D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318, 69-73.

Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14687-14692.

Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18, 629-643.

Paddison, P. J., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1443-1448.

Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* 16, 5672-5686.

Potter, T., Gohde, W., Wedemeyer, N., and Kohnlein, W. (2000). Keratinocytes exposed to ultraviolet radiation reveal three down-regulated genes with potential function in differentiation and cell cycle control. *Radiat Res* 154, 151-158.

- Resar, L. M., Dolde, C., Barrett, J. F., and Dang, C. V. (1993). B-myc inhibits neoplastic transformation and transcriptional activation by c-myc. *Mol Cell Biol* *13*, 1130-1136.
- Sanchez Alvarado, A., and Newmark, P. A. (1999). Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 5049-5054.
- Scherr, M., Battmer, K., Winkler, T., Heidenreich, O., Ganser, A., and Eder, M. (2003). Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood* *101*, 1566-1569.
- Schwab, M., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Grzeschik, K. H., Naylor, S. L., Sakaguchi, A. Y., Brodeur, G., and Trent, J. (1984). Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* *308*, 288-291.
- Sears, R., Ohtani, K., and Nevins, J. R. (1997). Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* *17*, 5227-5235.
- Seeger, R. C., Brodeur, G. M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S. E., Wong, K. Y., and Hammond, D. (1985). Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* *313*, 1111-1116.
- Seoane, J., Le, H. V., and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* *419*, 729-734.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* *3*, 400-408.
- Sharp, P. A. (2001). RNA interference--2001. *Genes Dev* *15*, 485-490.
- Sheiness, D., and Bishop, J. M. (1979). DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. *J Virol* *31*, 514-521.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* *107*, 465-476.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* *3*, 392-399.
- Stein, P., Svoboda, P., Anger, M., and Schultz, R. M. (2003). RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. *Rna* *9*, 187-192.
- Stone, J., de Lange, T., Ramsay, G., Jakobovits, E., Bishop, J. M., Varmus, H., and Lee, W. (1987). Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol* *7*, 1697-1709.

Sugiyama, A., Kume, A., Nemoto, K., Lee, S. Y., Asami, Y., Nemoto, F., Nishimura, S., and Kuchino, Y. (1989). Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9144-9148.

Surabhi, R. M., and Gaynor, R. B. (2002). RNA interference directed against viral and cellular targets inhibits human immunodeficiency Virus Type 1 replication. *J Virol* 76, 12963-12973.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Tijsterman, M., and Plasterk, R. H. (2004). Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 117, 1-3.

Tommerup, N., and Vissing, H. (1995). Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics* 27, 259-264.

Tuschl, T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2, 239-245.

Tuschl, T., and Borkhardt, A. (2002). Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2, 158-167.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.

Vousden, K. H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14, 927-939.

Wargelius, A., Ellingsen, S., and Fjose, A. (1999). Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 156-161.

Watson, J. D., and Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Wianny, F., and Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2, 70-75.

Wohlbold, L., van der Kuip, H., Miething, C., Vornlocher, H. P., Knabbe, C., Duyster, J., and Aulitzky, W. E. (2003). Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood* 102, 2236-2239.

Xie, G., Habbersett, R. C., Jia, Y., Peterson, S. R., Lehnert, B. E., Bradbury, E. M., and D'Anna, J. A. (1998). Requirements for p53 and the ATM gene product in the regulation of G1/S and S phase checkpoints. *Oncogene* 16, 721-736.

Yamane, K., Kawabata, M., and Tsuruo, T. (1997). A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur J Biochem* 250, 794-799.

Yamane, K., and Tsuruo, T. (1999). Conserved BRCT regions of TopBP1 and of the tumor suppressor BRCA1 bind strand breaks and termini of DNA. *Oncogene* 18, 5194-5203.

Yamane, K., Wu, X., and Chen, J. (2002). A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol* 22, 555-566.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, die hier nicht aufgeführt sind, wurden entsprechend den Maßgaben der IUPAC (International union of pure and applied chemistry) und denen des SI-Systems (System Internationale de l'Unité) verwendet. Spezielle Abkürzungen der Fachtermini, die in dieser Liste nicht enthalten sind, werden jeweils im Text erläutert.

A	Adenosin
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	alternative reading frame
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BR	Basische Region
BRCA	breast cancer associated
BRCT	BRCA1 carboxyl-terminal
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CdK	Cyklin dependent Kinase
cDNA	copy DNA
cip	Kinase Inhibitorprotein
CMV	Cyotomegalievirus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid

ds RNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FCS	fetal calf serum
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
Ink4	Inhibitor of kinase 4
INR	Initiatorregion
Ktr.	Kontrolle
Leu	Leuzin
Lsg	Lösung
LZ	Leuzinzipper
m	milli
M	molar
MEF	Mausembryofibroblasten
min	Minute
Miz-1	Myc-interacting-zink-finger-protein-1
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Myc	Myelocytomatose Protein
N	Nukleotid
NLS	nuclear localisation signal
NP40	Nonidet P-40
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

POZ	Poxvirus und Zinkfinger-Domäne
Rb	Retinoblastom
RdRP	RNA dependnet RNA Polymerase
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
si RNA	short interfering RNA
β -Gal	β -Galaktosidase
SV40	Simian Virus
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor β
TopBP1	Topoisomerase II-Binding-Protein 1
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
Zn	Zinkfinger
α -	anti-
β -	beta-
μ	mikro

7.2. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanffy, Beyer, Bien, Cetin, Christiansen, Daut, Eilers, Feuser, Gemsa, Geus, Görg, Gotthard, Gotzen, Greger, Griss, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Heeg, Hellinger, Hesse, Hofmann, Höltermann, Hörle, Jungclas, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lammel, Lang, Lennartz, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Radsak, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seitz, Seyberth, Steiniger, Suske, Vogelmeier, Vohland, Wagner, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wolf, Wulf,

sowie in Zürich Herr Baer.

7.3. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Eilers für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die stets gewährte Beratung und wertvolle Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit ausschlaggebend waren.

Michael Wanzel und Steffi Herold danke ich für die gute Betreuung, die richtungsweisenden Anregungen und Ratschläge, ihre Geduld und die über die Entstehungszeit der Arbeit hinausgehende Freundschaft.

Mary-Lou Zouzarte danke ich für die Hilfe bei den konfokalmikroskopischen Aufnahmen.

Für das gute Arbeitsklima bedanke ich mich bei den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Eilers, mit denen ich zusammenarbeiten durfte.

Danken möchte ich darüber hinaus allen, die mir zur Fertigstellung dieser Arbeit verhalfen.

Tobias Rogosch danke ich für die kritische Prüfung des Manuskripts, die Lösung diverser informationstechnischer Probleme und die verständnisvolle Begleitung.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, auf deren Beistand und Unterstützung ich mich während der Entstehung dieser Arbeit und darüber hinaus immer verlassen konnte.