

Zellzyklus regulierende Funktion der Mammalian STE20 like Kinase 1 (MST1)

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität

2003

von Tobias Wengenmayer
geboren am 04.10.1977 in Frankfurt am Main

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

μM	mikromolar
AIF	Apoptose induzierender Faktor
Apaf	Apoptotic protease activating factor
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl2	B-cell/ lymphoma 2
BSA	Bovines Serum Albumin
CAK	CDK aktivierende Kinase
CDK	Cyclin Dependent Kinases
DISC	Death Initiating Signaling Complex
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	double stranded RNA
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
HLA-G	Human Leukocyte Antigene G
JNK	c-Jun Amino - terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
MAP Kinase	Mitogen Aktivierte Protein-Kinase
mM	millimolar
mRNA	Messenger RNA
MST1	Mammalian STE20 like Kinase
NES	Nukleäre Export Sequenz
nM	nanomolar
nt	Nukleotid
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
PKR	dsRNA Responsive Proteinkinase
PS	Phosphatidylserin
RISC	RNA Induced Silencing Complex

ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
JMY	Junction-Mediating and Regulatory Protein
MKK	MAPK Kinase Kinase
MKKK	MAPK Kinase Kinase Kinase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
RPMI	Rockwell Park Memorial Institute
SAPK	Stress Aktivierte Protein-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	Short Hairpin RNA
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
ssRNA	single stranded RNA
TNF	Tumor Nekrose Faktor
WT	Wild Type

Inhalt

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. ZIELSTELLUNG	3
2.2. APOPTOSE UND NEKROSE	4
2.2.1. ALLGEMEINES	4
2.2.2. NEKROSE	4
2.2.3. APOPTOSE	5
2.2.3.1. CASPASEN	6
2.2.3.1.1. INDUKTION VON AUBEN	6
2.2.3.1.2. INDUKTION VON INNEN	7
2.2.3.2. CASPASEN UNABHÄNGIGE APOPTOSE	7
2.2.3.3. VIREN UND APOPTOSE	8
2.3. ZELLYKLUSREGULATION	9
2.3.1. DER G1/S CHECKPOINT UND P53	12
2.3.2. DER G2/M CHECKPOINT	13
2.4. MITOGEN-ACTIVATED PROTEINKINASE (MAPK)	14
2.5. JNK	15
2.5.1. p38	15
2.6. MST1	17
2.7. RNA INTEREFERENCE	20
2.7.1. HINTERGRUND	20
2.7.2. MECHANISMUS	21
2.7.2.1. INITIIERUNGSSCHRITT	21
2.7.2.2. EFFEKTORSCHRITT	22
2.7.2.3. BIOLOGISCHE FUNKTION VON RNAI	23
2.7.2.4. AUSBLICK	24
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1. ZELLKULTUR	26
3.1.1. METHODE	26
3.1.2. MATERIAL	27
3.2. BESTIMMUNG DER LEBEND-ZELLZAHL MIT TRYPAN-BLAU	27
3.2.1. METHODE	27
3.2.2. MATERIAL	28
3.3. VORBEREITUNG DER PROBEN FÜR WESTERN BLOT	28
3.3.1. METHODE	28
3.3.2. MATERIAL	28
3.4. BRADFORD ASSAY	29
3.4.1. METHODE	29
3.4.2. MATERIAL	29
3.5. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	29
3.5.1. METHODE	30
3.5.2. PROBENVORBEREITUNG	31

3.5.3.	MATERIALIEN	31
3.6.	WESTERN BLOT UND ENTWICKLUNG MIT ECL	32
3.6.1.	PRINZIP	32
3.6.2.	METHODE	33
3.6.2.1.	TRANSFER	33
3.6.2.2.	BLOCKEN UND WASCHEN	33
3.6.3.	AUSWERTUNG DER BLOTS	34
3.6.4.	VERWENDETE MATERIALIEN	34
3.7.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	35
3.7.1.	PRINZIP	35
3.7.2.	METHODE	36
3.7.3.	MATERIAL	36
3.8.	ANNEXIN-V FÄRBUNG	36
3.8.1.	PRINZIP	36
3.8.2.	METHODE	36
3.8.3.	MATERIAL	37
3.9.	BEHANDLUNG MIT WASSERSTOFFPEROXID H₂O₂	38
3.9.1.	METHODE	38
3.9.2.	MATERIAL	38
3.10.	UV BESTRAHLUNG	38
3.10.1.	METHODE	38
3.10.2.	MATERIAL	39
3.11.	ETOPOSID BEHANDLUNG	39
3.11.1.	METHODE	39
3.11.2.	MATERIAL	39
3.12.	RNA INTERFERENCE	40
3.12.1.	RICHTLINIEN FÜR RNAi DESIGN	40
3.12.2.	METHODE	42
3.12.3.	MATERIALIEN	44
3.13.	PARP BLOT	44
3.13.1.	METHODE	44
3.13.2.	MATERIAL	44
3.14.	STATISTIK	45
4.	ERGEBNISSE	46
<hr/>		
4.1.	AUSWAHL DER ZELLINIE	46
4.2.	RNAi VORVERSUCHE	47
4.2.1.	ZEITVERLAUF UND KONZENTRATIONSERMITTLUNG	47
4.2.2.	VERGLEICH DER WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT UNTER RNAi EINFLUSS	50
4.3.	VORVERSUCHE OHNE RNAi	53
4.3.1.	UV INDUZIERTER APOPTOSE UND NACHWEIS DURCH ANTI-PARP BLOT	53
4.3.2.	H ₂ O ₂ INDUZIERTER APOPTOSE UND NACHWEIS DURCH ANTI-PARP-BLOT	56
4.3.3.	ETOPOSID INDUZIERTER APOPTOSE - NACHWEIS DURCH ANNEXIN-V	58
4.4.	MST1 SUPPRIMIERTE ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN STRESSSTIMULI	59
4.4.1.	UV INDUZIERTER APOPTOSE – NACHWEIS DER APOPTOSE MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	59
4.4.2.	UV INDUZIERTER APOPTOSE – NACHWEIS MITTELS ANTI-PARP BLOT	60
4.4.2.1.	24 SUNDEN NACH UV BESTRAHLUNG	60
4.4.2.2.	48 SUNDEN NACH UV BESTRAHLUNG	62
4.4.2.3.	72 SUNDEN NACH UV BESTRAHLUNG	64
4.4.3.	WACHSTUM NACH UV BESTRAHLUNG	66
4.4.4.	BILDER DER ZELLEN NACH RNAi UND UV	70

5. DISKUSSION	71
5.1. DISKUSSION DER RNAI VORVERSUCHE	71
5.1.1. VERSUCHE MIT VERSCHIEDENEN ZELLINIEN	71
5.1.2. ZEITVERLAUF UND KONZENTRATIONSERMITTLUNG	71
5.1.3. VERGLEICH DER WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT	73
5.2. DISKUSSION DER VORVERSUCHE OHNE RNAI:	73
5.2.1. UV INDUZIERTER APOPTOSE UND APOPTOSE	74
5.2.2. H ₂ O ₂ INDUZIERTER APOPTOSE UND APOPTOSE	75
5.2.3. ETOPOSID INDUZIERTER APOPTOSE	76
5.3. DISKUSSION DER RNAI VERSUCHE MIT STRESSSTIMULI	77
5.3.1. UV INDUZIERTER APOPTOSE – NACHWEIS DURCH ANNEXIN-V	77
5.3.2. UV INDUZIERTER APOPTOSE - NACHWEIS DURCH ANTI-PARP-BLOT	77
5.3.3. WACHSTUM NACH UV BESTRAHLUNG	79
5.4. ABSCHLIEßENDE DISKUSSION	80
5.5. AUSBLICK UND KRITIK DER EIGENEN ARBEIT	84
6. SCHLUSSFOLGERUNGEN	86
7. METHODENTRANSFER	88
7.1. RNAI FÜR HLA-G	88
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	89
9. LITERATUR	91
10. ANHANG	

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

1. Zusammenfassung

Wissenschaftlicher Hintergrund

Bei der Mammalian STE20 like Kinase (MST1) handelt es sich um eine 487 Aminosäuren große Proteinkinase, die in Säugetieren vorkommt. MST1 wird in der Literatur als proapoptotische Kinase beschrieben. So resultiert die Überexpression von MST1 in verschiedenen Säugetierzellen in apoptotischen Erscheinungen wie Chromatinkondensation, Zellschrumpfung und der Exposition von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Zellen. Während sich MST1 hauptsächlich im Cytosol aufhält, findet sich durch Caspase 3 gespaltenes, aktiviertes MST1 im Zellkern und induziert dort Chromatinkondensation und anschließende Fragmentation der DNS. MST1 wird außerdem durch extremen Zellstress wie z.B. chemischen Stress oder Hitzeschock aktiviert. Die Spaltung durch Caspase 3 illustriert die Beteiligung von MST1 an der apoptotischen Kaskade. MST1 scheint dabei eine modulierende Wirkung zuzukommen.

Fragestellung

Welche Funktion hat MST1 in der menschlichen Zelle? Inwieweit unterscheiden sich MST1 Knock-Out Zellen von normalen Zellen in ihrem Verhalten nach Einwirkung verschiedener Stressstimuli, insbesondere von UV Strahlung?

Material und Methoden

Die MST1 Produktion wurde in Hela-Zellen (Zervixkarzinom Zelllinie) mittels RNAi (interfering RNA) Technik unterdrückt. Die Suppression durch RNAi erfolgte auf der posttranskriptionalen Ebene durch den spezifischen Abbau der MST1 mRNA. Als Nachweismethoden für Apoptose dienten Anti-PARP-Blot (Anti-Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Blot) und Annexin-V Färbung. Supprimierte Zellen und Kontrollzellen wurden mit verschiedenen Noxen wie Etoposid, einem Topoisomerase Hemmstoff oder UV Licht behandelt und auf Apoptose und Wachstumsgeschwindigkeit hin untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

- Die Suppression von MST1 mittels RNAi Technik ist nach unseren Erkenntnissen erstmals erfolgreich durchgeführt worden. Der Suppressionseffekt konnte über mehrere Tage beobachtet werden.

- Die Suppression von MST1 verändert per se nichts an den Wachstumseigenschaften der Zellen.
- Nach Suppression von MST1 wird ohne zusätzlichen Zellstress kein erhöhtes oder erniedrigtes Apoptoselevel beobachtet.
- 24 Stunden nach Bestrahlung wird bei MST1 supprimierten Zellen und Kontrollzellen das gleiche Apoptoselevel gemessen. 48 Stunden nach Bestrahlung weisen die supprimierten Zellen eine signifikant erhöhte Apoptoseaktivität auf.
- Wichtigste Erkenntnis dieser Arbeit ist die Tatsache, dass MST1 supprimierte Zellen, im Gegensatz zu den Kontrollzellen, nach UV Bestrahlung in keinen Wachstumsstopp übergehen.

Ein Wachstumsstopp stellt jedoch die adäquate Antwort proliferierender Zellen auf DNS-Schädigung dar und ist essentiell. Eine Replikation würde Mutationen irreparabel machen, und die Mitose von unreparierter DNS könnte zu chromosomalen Aberrationen in den Tochterzellen führen.

Schlussfolgerung

Die hier erwähnten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass MST1 nicht nur einen Einfluss auf die apoptotische Kaskade hat, sondern auch in die Zellzyklusregulation eingreift. Das Fehlen von MST1 verhindert also ein Eintreten in den Zellarrest. Die Tatsache, dass MST1 in der Lage ist über ein Hilfsprotein das Tumorsuppressorgenprodukt p53 zu binden, unterstützt diese Interpretation der Ergebnisse.

Nach unseren Erkenntnissen liefert diese Arbeit den ersten Hinweis auf eine solche Funktion von MST1 und stellt somit einen wichtigen Baustein im Verständnis der komplexen Zusammenhänge von Apoptose und Zellzyklussteuerung dar.

Methodentransfer

Die im Rahmen dieser Arbeit erlernte RNAi Technik ließ sich im Labor von Dr. Markert, FSU Jena etablieren. Es gelang uns erstmals die HLA-G Produktion von Jeg-3-Zellen, Zellen einer Chorioncarcinom Zelllinie, zu unterdrücken.

2. Einleitung

Im den folgenden Abschnitten sollen Hintergrundinformationen zum Protein MST1 geliefert werden. Außerdem soll eine kurze Einführung zu Themen wie Apoptose, Zellzyklusregulation etc. gegeben werden um eine Einordnung der hier dargestellten Ergebnisse und Schlussfolgerungen zu erleichtern.

2.1. Zielstellung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt darin, die zelluläre Funktion von MST1 zu untersuchen. MST1 ist eine in Säugetieren vorkommende Proteinkinase. Sie wird in der Literatur als proapoptisches Element bezeichnet (Ura et al., 2001b). Mittels RNAi Technik wurde die Produktion von MST1 in den verwendeten Zellen unterdrückt und so der MST1 Gehalt deutlich verringert. Darauf folgten diverse funktionelle Tests, die durch den Vergleich von MST1 supprimierten Zellen mit Kontrollzellen die Funktion von MST1 aufzeigen sollten. Insbesondere wurden dabei Zellen mit UV Licht bestrahlt und die Zellen daraufhin auf die Parameter Apoptose und Wachstumsverhalten hin untersucht.

Die RNAi Technik bietet seit kurzer Zeit die Möglichkeit in der Zellkultur Experimente durchzuführen, die ansonsten „Knock-Out“ Mäuse Stämme erfordert hätten.

2.2. Apoptose und Nekrose

2.2.1. Allgemeines

Grundsätzlich kann man den Tod einer Zelle einem von zwei verschiedenen Mechanismen zuordnen (Schwartzman und Cidlowski, 1993; Vermes und Haanen, 1994):

1. Tod durch Nekrose
2. Tod durch „zellulären Selbstmord“, genannt Apoptose

Die Nekrose ist ein pathologischer Prozess, der einer schwerwiegenden Exposition einer physikalischen oder chemischen Noxe folgt.

Die Apoptose hingegen ist ein physiologischer Prozess bei dem ungewünschte oder für den Organismus nutzlose Zellen eliminiert werden.

2.2.2. Nekrose

Der Prozess der Nekrose beginnt mit der Unfähigkeit der Zelle, die Homöostase aufrecht zu erhalten und führt somit zum Einstrom von extrazellulären Ionen und Wasser.

Die Zellen und die Zellorganellen, insbesondere die Mitochondrien, schwellen an und zerreißen schließlich. Durch dieses Zerreißen der Membran gelangen cytoplasmatische Bestandteile, wie zum Beispiel Lysosomen, in den Extrazellularraum. Aus diesen Gründen bewirkt der nekrotische Zelltod eine Schädigung des umliegenden Gewebes und erzeugt eine intensive inflammatorische Reaktion (Van Furth und Van Zwet, 1988).

2.2.3. Apoptose

Beim sogenannten „Zell-Suizid“ – der Apoptose ist die Zelle selbst aktiv an ihrem Tod beteiligt und steuert diesen. 1972 beschrieben Kerr et al. als erste die Apoptose als verantwortlichen Prozess für den Zellschwund im lebenden Gewebe (Kerr et al., 1972). Mittlerweile weiß man, dass die Apoptose beim normalen Turnover der Zellen, bei der Embryogenese, bei der Induktion und Erhaltung der Immuntoleranz, bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems, sowie der endokrin-abhängigen Atrophie und vielen anderen Feldern eine wichtige Rolle spielt.

Bei der Apoptose treten charakteristische biochemische und morphologische Merkmale auf (Cohen, 1993):

- Chromatin Aggregation an der nukleären Membran
- Cytoplasmatische Schrumpfung und nukleäre Kondensation
- Zellfragmente werden in Membran umschlossene Vesikel verpackt (apoptotic bodies)
 - In vivo werden diese „apoptotic bodies“ von umliegenden Epithelzellen oder Makrophagen phagozytiert (Savill et al., 1989)
 - In vitro schwellen die „apoptotic bodies“ an und lysieren schließlich

Aber auch unphysiologische Stimuli können Apoptose triggern. Viren, Hypoxie oder toxische Substanzen gehören zu dieser Klasse. Auch eine Vielzahl von Chemotherapeutika wirken durch Induktion von Apoptose. In der Kanzerogenese spielt die Apoptose ebenfalls eine entscheidende Rolle – schließlich haben maligne Zellen ihre physiologische Fähigkeit verloren, nach einer kritischen DNS Änderung die Apoptose einzuleiten.

Es werden verschiedene Wege und Effektoren der Apoptose beschrieben. Vergleicht man die Apoptose bei verschiedenen Spezien, stellt man fest, dass der Prozess der Apoptose ein äußerst konservierter Prozess ist (Vaux et al., 1994).

2.2.3.1. Caspasen

Studien an den Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) haben ergeben, dass es eine ganze Familie von Proteinen zu geben scheint, die über die Weiterführung oder den Abbruch des Apoptose -Befehls entscheiden. Diese Familie besteht bei *C. elegans* aus den Produkten der *ced* Gene. *ced3* und *ced4* scheinen die Apoptose zu initiieren, während *ced9* die Apoptose abbricht. Diese *C. elegans* Proteine sind weitestgehend homolog zu ihren korrespondierenden Proteinen in anderen Spezies (Hengartner und Horvitz, 1994).

Das Pendant dieser Proteine beim Menschen stellen die Caspasen dar. Die Caspasen bilden eine Reaktionskaskade indem sie sich gegenseitig aktivieren. Es werden Caspasen unterschieden, die weiter „upstream“, also am Anfang der Reaktionskaskade liegen und deren Aktivierung noch nicht unweigerlich zur Apoptose führen muss. Im Gegensatz dazu scheint es Caspasen weiter „downstream“ zu geben, deren Aktivierung unweigerlich zur Apoptose führt. Die Caspasen bedienen sich verschiedener Substrate, wie zum Beispiel Cytoskelettbestandteile, chaperonartige regulatorische Proteine und Proteine der Kernmembran (Thornberry, 1997). Wird etwa das Protein ICAD gespalten, können bestimmte Nukleasen in den Zellkern gelangen, dort Chromatin spalten und so ihren Beitrag zur Apoptose leisten (Enari et al., 1998).

Offenbar liegen Caspasen in einer inaktiven „pro Form“ vor. Die Aktivierung kann von außen oder innen erfolgen. Nachfolgend sind Beispiele der Aktivierung aufgeführt.

2.2.3.1.1. Induktion von außen

Zytotoxische T-Zellen verfügen über eine Protease Granzym B. Durch Granula der T-Zellen gelangt diese Protease in die Zellen und dort werden dann die inaktiven „Pro-Formen“ der Caspasen durch die Wirkung von Granzym B in ihre aktive Form überführt (Thornberry et al., 1997).

Ein anderes bekanntes Caspasen-abhängiges System ist das TNF Rezeptor System mit dem Liganden Fas. Eine Aktivierung dieses Systems resultiert in der Bildung eines

Komplexes (DISC, death initiating signalling complex). Dieser aktiviert dann Caspase 8 und diese startet die autokatalytische Caspasenkaskade (Muzio et al., 1996).

2.2.3.1.2. Induktion von innen

Ein bekanntes endogenes Element der Apoptose Aktivierung ist ced4, ein *C. elegans* Protein. Dieses mitochondriale Protein induziert Apoptose in Zuständen zellulären Energiemangels bzw. unter Einfluss von Toxinen, welche die mitochondriale Atmung hemmen. Ced4 ist zu weiten Teilen homolog zum menschlichen Apaf1, welches aus der Zervixkarzinomzelllinie Hela isoliert wurde (Zou et al., 1997).

In gesunden menschlichen Zellen wird auf der äußeren Membran der Mitochondrien das Protein Bcl-2 exprimiert. An dieses ist das Protein Apaf-1 gebunden, welches nach Stress, beispielsweise durch Radikale, abgelöst wird. Außerdem wird aus dem Mitochondrium Cytochrom C freigesetzt. Cytochrom C und Apaf-1 bilden mit Caspase 9 und Adenosintriphosphat (ATP) einen Komplex. Dieser Komplex wird Aptosom genannt und aktiviert wiederum andere Caspasen (Tsujimoto, 1998; von Ahsen et al., 2000).

Einen anderen bekannten Apoptosemechanismus stellt das p53 System dar. Unter bestimmten Umständen wird nach Aktivierung des p53 Gens die Translation von BAX7 erhöht. BAX7 wiederum aktiviert ein System zur Schädigung der Zellmembran und leitet so die Apoptose ein (Jarvis et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995). In Abschnitt 2.2.1 wird genauer auf die Funktion von p53 eingegangen.

2.2.3.2. Caspasen unabhängige Apoptose

Beschrieben wurde dieser Weg bis jetzt nur bei Neuronen. Der Apoptose induzierende Faktor (AIF) befindet sich im physiologischen Zustand im intermembranären Raum der Mitochondrien. Erhält die Zelle nun ein Signal zur Apoptose, wird AIF freigesetzt und migriert zum Nukleus. Dort bindet AIF an die DNS und induziert so die Degradation der DNS, was im Zelltod resultiert (Cregan et al., 2002).

2.2.3.3. Viren und Apoptose

Viren haben beeindruckende Mechanismen entwickelt Apoptose zu unterdrücken und so das Sterben ihrer Wirtszelle zu verhindern. So produzieren das Papova Virus SV40, das Epstein Barr Virus und das humane Papilloma Virus Typ 16 Proteine, die p53 inaktivieren oder BAX binden (Young et al., 1997).

Oben wurden verschiedene Systeme angesprochen, die teils über die Regulation der Transkription oder transkriptionsunabhängig gesteuert werden, um dann in eine gemeinsame Endstrecke (BCL2, Caspasen) einzumünden. Diese relativ einfachen Schemen werden durch verschiedene Ergebnisse verkompliziert. So lässt sich beispielsweise die Apoptose nicht triggern, wenn der Fas Rezeptor inaktiviert wurde (Hueber et al., 1997).

Viele andere Onkogenprodukte wie die Proteine Ras und Abl haben einen Einfluss auf die Apoptose. Ihr Regulationsmechanismus ist sehr komplex, das heißt sie können Apoptose auf verschiedenen Ebenen hemmen oder triggern (Downward, 1998).

Abschließend sollte gesagt werden, dass trotz erheblicher Fortschritte auf dem Forschungssektor der Apoptose in den letzten Jahren nicht alle Modelle widerspruchsfrei in Einklang gebracht werden konnten.

2.3. Zellzyklusregulation

Ein Kernmerkmal maligne transformierter Zellen ist die zunehmende genetische Instabilität, die durch somatische Mutationen der DNS, Brüche oder gar Verlusten von ganzen Chromosomen verursacht wird. Man nimmt an, dass sich die genetische Instabilität und die maligne Transformation gegenseitig begünstigen (Hartwell und Weinert, 1989; Hartwell und Kastan, 1994).

Das Reaktionsmuster der Zellen deren DNS geschädigt worden ist, reicht von DNS-Reparatur oder Zellzyklusblock bis hin zur Apoptose (Hartwell und Kastan, 1994).

Zur vollständigen Replikation muss eine Zelle ihren gesamten Zellzyklus durchlaufen haben. Dabei unterscheidet man folgende Phasen:

- *G1-Phase:* Nach der Mitose erfolgt hier die Produktion von zellulären Bestandteilen, wie Proteinen, Membranlipiden usw.
- *G0-Phase:* Fehlen Substrat oder Wachstumsfaktoren, kann die Zelle in die G0 Phase übergehen und eventuell Jahre in dieser Phase verweilen.
- *S-Phase:* In dieser Synthese Phase erfolgt die Replikation der DNS.
- *G2-Phase:* Die G2 Phase stellt die Vorbereitung für die Mitose dar.

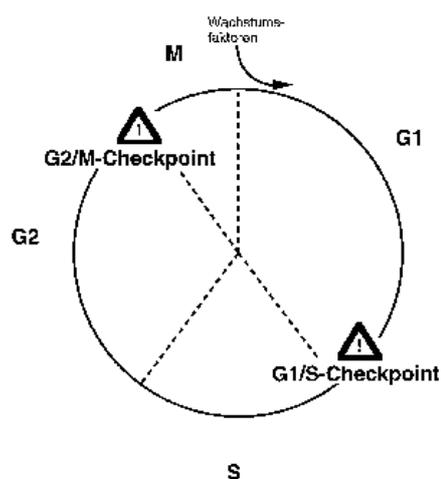


Abbildung 1 Schematischer Ablauf des Zellzyklus. Eingezeichnet sind die bekannten Kontrollpunkte des Zyklus nach Funk und Kind 1997.

Die Kontrollpunkte (Checkpoints) an denen die Zelle die Zellgröße, die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, die genetische Unversehrtheit und wahrscheinlich noch viele andere Parameter überprüft, liegen an mindestens zwei Positionen, nämlich am G1/S und am G2/M Übergang (Murray, 1992; Hartwell und Kastan, 1994).

Diese Checkpoints scheinen für die Teilung der Zelle nicht unbedingt notwendig zu sein, tragen aber bei DNS Schädigung zur korrekten Wachstumskontrolle bei. Der Checkpoint vor der S-Phase verhindert die Replikation und damit die dauerhafte Manifestation fehlerhafter DNS. Der Checkpoint vor der Mitose kann eine Teilung der Zelle mit chromosomaler Schädigung, beispielsweise den Verlust eines Chromosoms, verhindern. Insgesamt tragen so die Checkpoints zur genetischen Stabilität der Zelle bei (Hartwell und Weinert, 1989; Murray, 1992).

Der Zellzyklus wird durch Proteinkinasen gesteuert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiv sind. Aktiv sind diese nur dann, wenn sie im Komplex mit ihren regulatorischen Partnern, den Cyclinen, vorliegen. Diese Proteinkinasen, von denen mittlerweile acht verschiedene bekannt sind, werden deshalb „Cyclin dependent Kinases“ (CDKs) genannt (Murray, 1992; Serrano et al., 1996).

Die in vitro identifizierten Substrate der Kinase/Cyclin Komplexe sind Histone, Lamine, Produkte der Protoonkogene c-src und c-abl sowie die Produkte der Tumorsuppressorgene RB und p53 (Murray, 1992; Morgan, 1995). Dabei kennt man bis heute vier verschiedene Regulationsmechanismen:

- CDK Aktivierung durch Cyclin Bindung

Die Kinase interagiert mit einer bestimmten Gruppe von Cyclinen, deren Konzentration periodisch ab- und zunimmt (Murray, 1995).

- CDK Aktivierung durch Phosphorylierung

Nach der Bindung von Cyclin und Kinase muss die CDK zur vollständigen Aktivierung phosphoryliert werden. Dies wird durch die „CDK activating Kinase“ (CAK) gewährleistet (Makela et al., 1994). Die CAK Konzentration scheint während des normalen Zellzyklus konstant hoch und ist damit nicht limitierend (Hunter und Pines, 1994).

- CDK Hemmung durch Phosphorylierung
Diese Art der Regulation bestimmt insbesondere den G2/M Übergang. Dabei geschieht eine Phosphorylierung zweier Aminosäurereste, welche dann die Aktivität der CDK mindern (O'Connor et al., 1994; Herzinger et al., 1995).
- CDK Hemmung durch inhibitorische Untereinheiten
Niedermolekulare Inhibitoren binden an den CDK/Cyclin Komplex und hemmen so die Aktivität. Dabei werden zwei Familien von Inhibitoren unterschieden (Sherr und Roberts, 1995). p21 und p27 hemmen hauptsächlich CDK2 und CDK4 Komplexe (Massague und Polyak, 1995). Die andere Familie der Inhibitoren p15 und p16 hemmen bevorzugt CDK4 und CDK6 Komplexe (Serrano et al., 1993).

2.3.1. Der G1/S Checkpoint und p53

Bestrahlung von Zellen mit UV oder Gamma Strahlung führt zu einer Blockade im G1/S Übergang. Bei dieser Blockade spielt das Tumorsuppressorgen p53 eine zentrale Rolle (Kastan et al., 1991; Kuerbitz et al., 1992). P53 kann dabei einen Block induzieren oder Apoptose triggern (Haffner und Oren, 1995). Welcher dieser möglichen Wege eingeschlagen wird, hängt von vielen noch zu bestimmenden Faktoren ab.

Welche entscheidende Rolle p53 in der Tumorgenese spielt, wird deutlich, wenn man bedenkt, dass in 60% der humanen Tumoren eine Mutation von p53 vorliegt (Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). p53 „Knock-Out“ Mäuse entwickeln sich zunächst normal, versterben dann aber innerhalb von sechs bis neun Monaten an unterschiedlichen Tumoren (Donehower et al., 1992). Zellen mit einer p53 Mutation eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose induzierenden Chemotherapeutika auf (Ziegler et al., 1994; Enoch und Norbury, 1995).

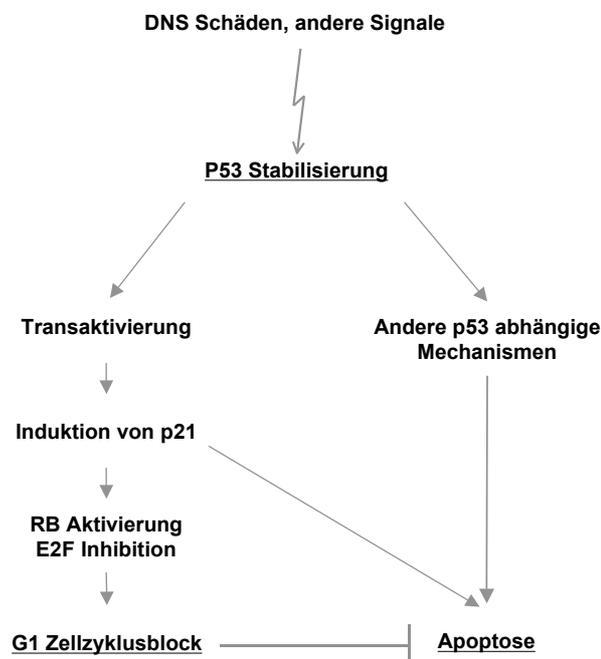


Abbildung2 Darstellung der wichtigsten p53 abhängigen Signalwege nach DNS Schädigung. Abk.: Retinoblastom- Tumorsuppressorgen (RB) Details im Text; nach Funk et al.

Nach einer DNS Schädigung erhöht sich der Gehalt von p53 Proteins in der Zelle (Ko und Prives, 1996; White, 1996). Man nimmt an, dass dann die Stabilität des sonst kurzlebigen p53 erhöht wird (Lu und Lane, 1993). p53 wirkt als Transkriptionsfaktor und induziert durch Aktivierung verschiedener Gene einen Zellzyklusblock (Haffner und Oren, 1995). Als wichtiges Element ist dabei die Induktion des CDK Inhibitors p21 zu nennen (Hermeking et al., 1995). p21 verhindert eine

Phosphorylierung des in gesunden Zellen vorkommenden Produktes des Retinoblastom Suppressorgens RB (Weinberg, 1995) und inhibiert so die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. Normalerweise vermittelt E2F die Progression im Zellzyklus und den Eintritt in die S Phase durch die Induktion von Genen.

Ein völliger Verlust oder eine funktionelle Beeinträchtigung von p53 führt zu einer unkontrollierten Verdopplung der DNS der Zelle, ohne dass die Zelle mögliche Schäden reparieren oder in den Zellarrest übergehen könnte.

2.3.2. Der G2/M Checkpoint

Während die Zellzykluskontrolle nach DNS Schaden am G1/S Checkpoint eng an die Funktion von p53 geknüpft ist, scheint die Aktivierung des G2/S Checkpoints nach Bestrahlung nicht an p53 gebunden zu sein (Herzinger et al., 1995).

Allerdings induzieren UV und γ Strahlen ebenfalls einen G2 Block. Hauptsächlich scheint die Aktivität des CDK/Cyclin B den Übergang der Zelle von der G2 Phase zur Mitose zu steuern (Datta et al., 1992; Herzinger et al., 1995). Vermutlich werden die assoziierten Phosphatasen (CDC25) gehemmt und CDK1 inhibitorisch phosphoryliert (O'Connor et al., 1994).

2.4. Mitogen-Activated Proteinkinase (MAPK)

Eukaryotische Zellen besitzen die Fähigkeit, extrazelluläre Signale an spezifische biologische Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung oder Stressreaktion zu koppeln. Bewerkstelligt wird dies durch bestimmte, evolutionär konservierte Signalkaskaden, die zusammengefasst als „Mitogen-activated Proteinkinase“ (MAPK) Kaskaden bezeichnet werden (Chen et al., 1992). Sie bilden ein ausgeklügeltes System, in welchem sich eine Serie von drei Proteinkinasen spezifisch phosphorylieren und aktivieren, und so eine Vielzahl von zellulären Prozessen kontrollieren (Johnson und Lapadat, 2002). Auch STE20, das zu MST1 strukturell verwandte Protein, stellt vermutlich eine MAP Kinase Kinase Kinase (MKKK) dar.



Abbildung3 Modell des MAPK Systems mit kaskadenartiger Aktivierung. Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK), MAP Kinase Kinase (MKK), MAP Kinase Kinase Kinase (MKKK) nach Ray und Sturgill (Ray und Sturgill, 1988).

Dabei lassen sich drei Hauptpfade unterscheiden:

- *ERKs*: (Extrazellulär regulierte Kinase) Extrazelluläre Signale aktivieren diesen Pfad. Hauptwirkung ist wahrscheinlich die Einflussnahme auf die Zellteilung.
- *JNKs*: (c-Jun Amino - terminale Kinase) Regulation der Transkription
- *p38*: Dieser Pfad wird durch proinflammatorische Cytokine aktiviert.

Im Folgenden soll etwas detaillierter auf den JNK und den p38 Pfad eingegangen werden.

2.5.JNK

Die JNKs wurden als Stress aktivierte Proteinkinasen in Antwort auf die Inhibition der Proteinsynthese entdeckt und isoliert (Kyriakis et al., 1994). In der oben erläuterten MAPK Kaskade sind sie auf der Stufe der MAP Kinasen einzuordnen. JNKs binden und phosphorylieren c-jun und erhöhen seine transkriptionale Aktivität. c-jun ist ein Bestandteil des AP-1 Komplexes, welcher ein Regulator der Genexpression ist. AP-1 beteiligt sich an der Regulation mehrerer Cytokin – Gene und wird nach Einwirken von Wachstumsfaktoren, Strahlung und Umweltstress aktiviert. All dies sind ebenfalls Faktoren, die JNKs aktivieren.

Die Regulation der JNKs ist äußerst komplex, und geschieht unter Einfluss von mindestens 13 verschiedenen MKKKs.. Diese Vielfältigkeit erklärt, warum JNKs von relativ vielen Stimuli aktiviert werden können.

Die JNKs sind essentielle Bestandteile in der Kontrolle des programmierten Zelltodes (Apoptose) (Tournier et al., 2000). So erhöht beispielsweise die Hemmung der JNKs die durch Zytostatika induzierte Tumor-Wachstumshemmung (Mamay et al., 2003).

2.5.1. p38

Die vier verschiedenen p38 Kinasen wurden ursprünglich als Inhibitoren der durch den Tumor Necrosis Faktor α (TNF α) induzierten Entzündungsreaktion beschrieben (Lee et al., 1994). Die p38 MAPKs regulieren die Expression einer Vielzahl von Cytokinen und p38 wird wiederum durch inflammatorische Cytokine aktiviert. Weitere Stimuli wie Hormone, Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Zellstress (osmotischer Schock und Hitzeschock) aktivieren p38.

p38 scheint außerdem eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort zu spielen und ist an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten und Asthma beteiligt (Johnson und Lapadat, 2002).

Einen weiteren wichtigen Hinweis zur Signaltransduktion der MAPKs liefern Ge et al. Sie zeigen, dass p38 durch TAB1 aktiviert werden kann (Ge et al., 2002). TAB1 ist aber keine MKK, sondern besitzt keine eigene katalytische Aktivität.

Dies zeigt, dass außer den bekannten Regulationsmechanismen der MAPKs durch die MKKK-MKK-MAPK Kaskade weitere Mechanismen bestehen, um die Aktivität der MAPKs zu beeinflussen.

Die Wichtigkeit der MAPKs in Bezug auf Zellwachstum, Genregulation und Apoptose wird durch die Bemühungen der Pharma Industrie illustriert, therapeutisch in die ERK, JNK, und p38 Signalwege einzugreifen (English und Cobb, 2002).

2.6.MST1

Bei MST1, auch bekannt unter Krs-2 (Taylor et al., 1996), handelt es sich um eine 487 Aminosäuren große, in Säugetieren vorkommende Proteinkinase. Sie ist strukturell verwandt mit STE20, eine Hefen MAP Kinase Kinase Kinase (Creasy und Chernoff, 1995). Daher rührt auch der Name MST (Mammalian STE20 like Kinase). Sie wurde von mehreren Autoren, wie auch ihre Schwesterkinase MST12, zur Gruppe der II GC Kinasen, einer Untergruppe der STE20 verwandten Kinasen, gezählt. Daher lässt sich MST1 in den oben erwähnten JNK Signalpfad einordnen (Kyriakis, 1999; Dan et al., 2001).

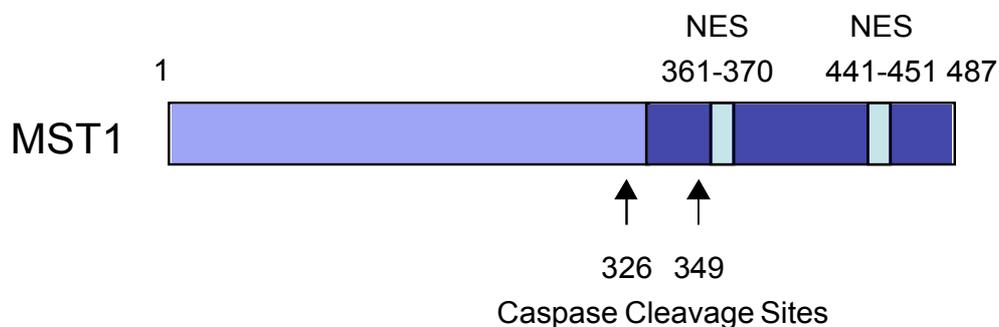


Abbildung 4 Modell des MST1 Proteins. (Ura et al., 2001a)
Die beiden nukleären Exportsignale liegen in der C Terminus Domäne und sind durch hellblaue Banden gekennzeichnet. Die Caspasen Schnittstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Aminosäurenposition ist angegeben.

MST1 enthält eine katalytische Kinase Domäne im N-terminalen Bereich (AS 30-270), eine autoinhibitorische Domäne von (AS 331–394), eine Dimerisierungsdomäne nach AS 431 und eine nukleäre Exportsequenz am COOH Ende (Creasy und Chernoff, 1995; Creasy et al., 1996; Taylor et al., 1996). Ura et al. beschreiben, wie in der obigen Skizze gezeigt, eine weitere nukleäre Exportsequenz (Ura et al., 2001a).

Durch extremen Zellstress bspwielseise chemischen Stress und Hitzeschock) (Taylor et al., 1996) oder den Fas Liganden (Lee et al., 2001) wird MST1 aktiviert.

Eine Art der MST1 Aktivierung stellt die Spaltung durch Caspase 3 während der Apoptose dar. Dabei entsteht ein 36 kDa großes Fragment, welches etwa 10-fach

aktiver ist als das ursprüngliche Protein (Graves et al., 1998; Lee et al., 1998; Reszka et al., 1999). Das Auftreten dieses aktiven Fragmentes während der Apoptose weist auf seine Beteiligung am programmierten Zelltod hin (De Souza et al., 2002).

Es scheint auch eine MST1 Aktivierung ohne Spaltung zu geben. Wahrscheinlich geschieht diese Aktivierung über Phosphorylierung. Dieser Mechanismus ist aber noch unklar (Taylor et al., 1996).

Die Überexpression von MST1 resultiert in einer Aktivierung des JNK Signalpfades (Graves et al., 1998; Watabe et al., 2000; Graves et al., 2001) und P38 Signalpfades und damit zu apoptotischen Erscheinungen wie Chromatinkondensation, Zellschrumpfung und der Exposition von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der Zelle bei BJAB Zellen(Graves et al., 1998).

Allerdings postulieren Ura et al, dass nur einer der beiden aktivierten Pfade, nämlich die JNK Kaskade, zur Apoptose führt (Ura et al., 2001b).

Umgekehrt hemmt eine Expression von inaktiven JNK Mutanten die durch MST1 initiierte Apoptose (Graves et al., 2001).

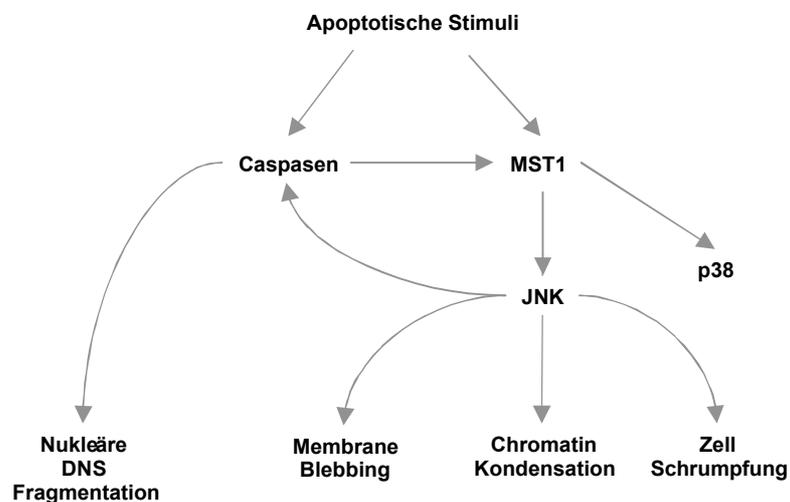


Abbildung 5 MST1 Modell nach Ura et al: MST1 spielt zweierlei Rollen innerhalb der Apoptose: 1. MST1 verstärkt das Caspase Signal durch JNK und wirkt 2. als Caspasen Effektor und induziert apoptotische Zellveränderungen ohne sich weiter downstream liegender Caspasen zu bedienen.

Bei der oben beschriebenen Chromatinkondensation unterscheidet man 2 Phasen. In der ersten Phase kondensiert nur das periphere Chromatin. Dies geschieht auch ohne die Beteiligung von Caspasen (Susin et al., 2000). In der zweiten Phase erscheint das

Chromatin insgesamt kompakter. Dieser Schritt ist caspasenabhängig (Susin et al., 2000). Es sind mehrere Substanzen beschrieben worden, die in diesem zweiten Schritt involviert und unverzichtbar sind (Liu et al., 1998; Sakahira et al., 1999).

Unklar ist hingegen, welche Substanzen den ersten Schritt der Kondensation induzieren. Ura et al. zeigten, dass die Expression von MST1, auch unter dem Einfluss von Caspasen Inhibitoren, genau diesen ersten Schritt der Kondensation induziert (Ura et al., 2001b).

Überexprimiert man Wildtype MST1 wird alleine durch MST1 Apoptose induziert. Im Gegensatz dazu verhindert die Expression von Kinase- inaktivem MST1 teilweise die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose (Watabe et al., 1999; Watabe et al., 2000). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Rekrutierung von MST1 eine signifikante Rolle in der durch die genannten Substanzen induzierten Apoptose spielt.

Während MST1 sich hauptsächlich im Cytosol aufhält, ist durch Caspasen gespaltenes aktiviertes MST1 im Zellkern zu finden und induziert dort Chromatinkondensation und anschließende Fragmentation der DNS (Lee et al., 2001; Ura et al., 2001a). Dies legt die Vermutung nahe, dass der nukleäre Eintritt von MST1 einen entscheidenden Schritt in der Apoptose - Signaltransduktion darstellt.

Bei der Suche nach Substanzen, die die γ -Interferon induzierte Apoptose hemmen, fand man das Death-associated Protein 4 (DAP4) (Kimchi, 1998; Levy-Strumpf und Kimchi, 1998). Eine Überexpression von DAP4 resultiert in Apoptose unter Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 (Raveh et al., 2001). Außerdem ist die Expression von DAP4 in vielen menschlichen Tumoren gleich Null (Kissil et al., 1997). DAP4 bindet MST1 und p53 und verstärkt die durch MST1 induzierte Apoptose (Lin et al., 2002). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von MST1 im p53 abhängigen Apoptose Signalweg.

2.7.RNA interference

2.7.1. Hintergrund

Das Phänomen der RNA Interference wurde in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt. Guo und Kemphues hatten 1995 gezeigt, dass von extern zugeführte, einzelsträngige RNA sequenzspezifisches Gene Silencing verursacht (Guo und Kemphues, 1995). Das heißt, zu einem bestimmten Zeitpunkt nach RNA Applikation ist das korrespondierende Genprodukt nur extrem vermindert nachweisbar. Fire et al. stellten daraufhin fest, dass sich die Potenz der Suppression um ein vielfaches (10-fach) steigern lässt, wenn doppelsträngige RNA (dsRNA) verwendet wird (Fire et al., 1998).

Nach diesen Beobachtungen wurde vermutet, dass ähnliche Suppressionsphänome, die auf der Zuführung von homologen RNA Sequenzen beruhen, dem gleichen Mechanismus unterliegen könnten. 1990 hatten die Biologen Stuitje und Napoli bei dem Versuch, den Farbgehalt von Petunien durch Gabe von externer mRNA zu erhöhen, einen erstaunlichen Effekt beobachtet. Statt die Farbintensität der violetten Pflanzen zu erhöhen, produzierten sie Petunien mit verändertem bis hin zu keinem Pigmentgehalt! (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990).

Dies bedeutete nicht nur, dass die zugeführten RNA inaktiv war, sondern auch, dass zelleigene Gene „abgeschaltet“ worden sind (Hannon, 2002). Diese sogenannte „Co-Suppression“, unter Degradation der fremden RNA, konnte bei unikalen (single-copy) Genen (Jorgensen, 1990; Elmayan et al., 1998), wie auch bei repetitiven (multi-copy) Genen gefunden werden. Gleichzeitig beobachtete man wie Pflanzen auf den Befall mit RNA Viren mit der Zerstörung von viraler RNA antworteten (Dougherty et al., 1994; Kumagai et al., 1995; Angell und Baulcombe, 1997; Ruiz et al., 1998). Das Phänomen der Co-Suppression lässt sich auch bei Protozoa und Metazoa (*Drosophila*, *C. elegans*), einschließlich Säugetieren finden (Fire et al., 1991; Romano und Macino, 1992; Pal-Bhadra et al., 1997; Dernburg et al., 2000).

Das RNAi Phänomen scheint durch mindestens drei verschiedene Mechanismen verursacht zu werden.

1. Die zur dsRNA Sequenz homologen mRNAs werden degradiert.
2. Im Fall von Pflanzen wurde ein suppressiver Effekt durch die Methylierung zu dsRNA homologer Promotorregionen beobachtet (Wassenegger et al., 1994; Mette et al., 2000).
3. Schließlich scheint es auch eine durch Änderung der Chromatinstruktur verursachte Suppression zu geben. Diese Beobachtungen wurden bei *C. elegans*, *Drosophila* und Pilzen gemacht (Tabara et al., 1999; Dudley et al., 2002; Pal-Bhadra et al., 2002).

2.7.2. Mechanismus

Es soll hier nur der Mechanismus der Degradation dargestellt werden, da dieser auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Es werden Initiierungsschritt und Effektorschritt unterschieden.

2.7.2.1. Initiierungsschritt

Der RNAi Prozess wird durch das Enzym Dicer initiiert. Es prozessiert fremde oder als nichtrelevant erkannte doppelsträngige RNA in ca. 22 nt lange „small interfering RNAs“ (siRNAs). Welche RNAs auf diese Weise „angegriffen“ werden ist noch nicht genau bekannt (Bernstein et al., 2001).

Dicer ist ein Enzym der Klasse der RNase III Familie. Normalerweise schneiden die aus Bakterien bekannten RNAsen der Klasse III nach 9-21 nt. Dicer arbeitet aber als dimerisches RNase III Enzym mit insgesamt vier theoretisch aktiven Sites. Dabei bleiben bei der dimerischen Anordnung zwei Sites inaktiv – so wird das Schneideraster auf ca. 21 Basenpaare vergrößert (Blaszczyk et al., 2001).

2.7.2.2. Effektorschritt

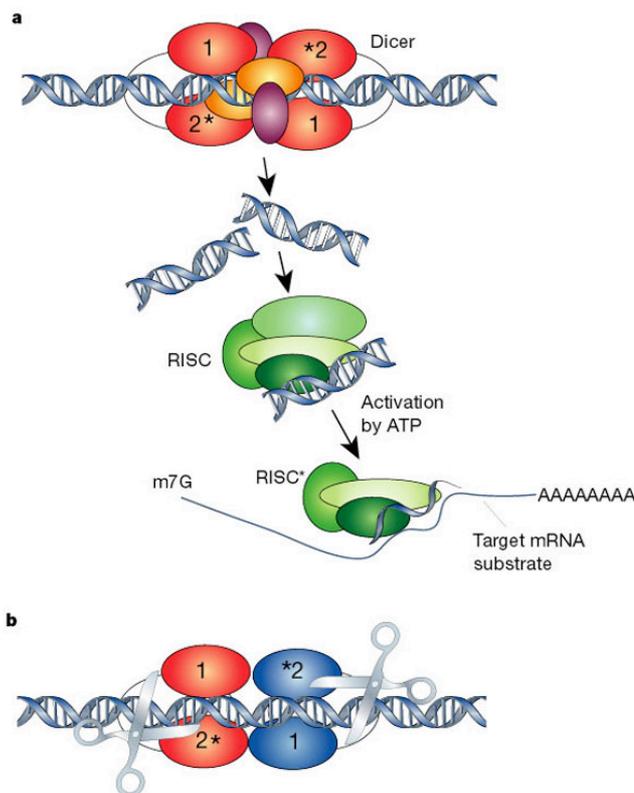


Abbildung 6 Modell des RNAi Mechanismus nach Hannon 2002.

- a: Dicer prozessiert RNA in 21 nt Fragmente. Risc verwendet diese als Leitstruktur zur Auffindung der homologen mRNA und führen zur Degradation der mRNA.
- b: Modell von Dicer. Die mit Sternen markierten enzymatischen Sites sind inaktiv.
Details im Text

Die von Dicer prozessierten RNA Fragmente werden in den nächsten Komplex integriert. RISC (RNA induced silencing complex) ist ein aus mehreren Untereinheiten bestehender Komplex und muss aus einer latenten Form, unter ATP Verbrauch, in eine aktive Form gebracht werden (Nykanen et al., 2001). Dabei wird durch eine Helikase die doppelsträngigen RNA in eine Einsträngige aufgewunden (Cogoni und Macino, 1999; Tijsterman et al., 2002).

RISC verwendet dann die einzelne siRNA als Leitsequenz zur Substratauswahl durch Anlagern der RNA durch „Watson-Crick basepairing“ (Hammond et al., 2000). Die Spaltung der Ziel-mRNA geschieht dann endonukleär und

nur innerhalb der homologen RNA Sequenz. Dabei ist zu beachten, dass ein 2 Nukleotid Überhang am 3' Ende und ein 5' Phosphatende essentiell für die Inkooperierung in den RISC Komplex sind (Elbashir et al., 2001; Nykanen et al., 2001).

2.7.2.3. Biologische Funktion von RNAi

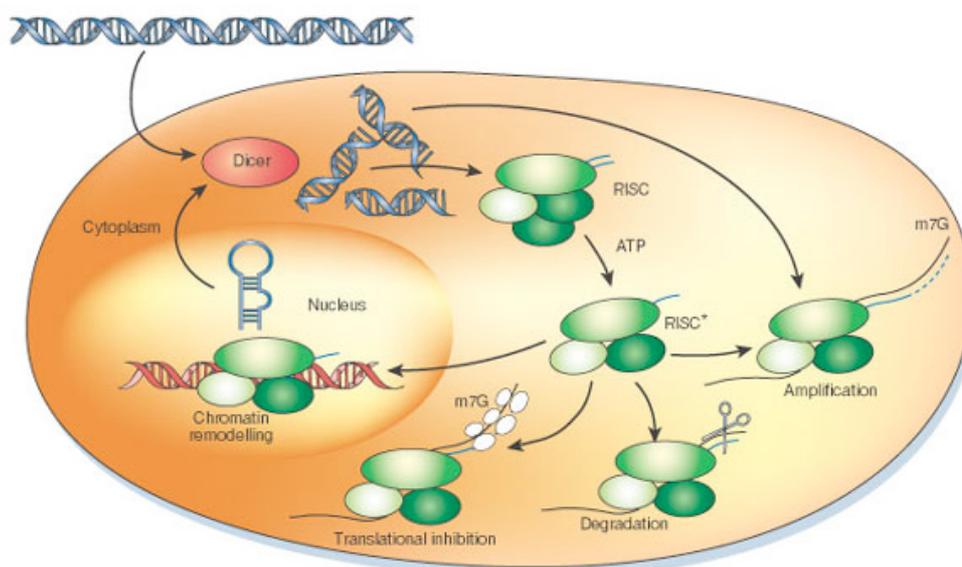
Schutz vor externen Nukleinsäuren:

Pflanzen benutzen das RNAi System, um sich vor viraler RNA zu schützen. Um diesen Verteidigungsmechanismus der Pflanzen zu überwinden, findet man bei bestimmten Pflanzenviren folgende Strategie:

Diese Viren besitzen RNAi Suppressor Gene, um die RNAi Antwort der Pflanze zu unterdrücken (Mourrain et al., 2000; Voinnet et al., 2000) und so ihr Genom in die Pflanzenzelle einzubringen.

Schutz vor endogenen Nukleinsäuren:

Es wurden *C. elegans* Stämme beschrieben, die eine RNAi Resistenz zeigen. Diese *C. elegans* Stämme weisen eine erhöhte Mobilität von Transposons, also beweglicher Chromosomabschnitte die das Genom verändern, auf (Ketting et al., 1999; Tabara et al., 1999). Es wird beschrieben, dass Transposons in Heterochromatin „gepackt“ werden, um eine genetische Mutation zu verhindern (Martienssen und Colot, 2001). Das heißt, RNAi stabilisiert das Genom entweder auf genomischer Ebene oder posttranskriptional durch Degradation der Transposons (Hannon, 2002). Des Weiteren besteht die oben beschriebene Möglichkeit, durch Methylierung an Promotoren die Ablesung bestimmter Genabschnitte zu supprimieren



· **Abbildung 7** Risc als variables Modul in der Zelle nach Hannon et al.2002. Details im Text.

Die dsRNA, die als „Silencing Trigger“ wirkt, wird im Fall der vorliegenden Arbeit von außen als synthetische Oligos zugegeben, ansonsten von sich replizierenden Viren produziert oder von endogenen Genen abgelesen. Dicer prozessiert die dsRNA wie oben beschrieben und die prozessierte RNA bildet dann einen Komplex mit RISC. RISC stellt nach neusten Erkenntnissen ein sehr variables Modul für die Steuerung der Genexpression dar. Je nach Stimulus wird die Genexpression durch RNA Degradation, Inhibition der Translation oder durch strukturelle Veränderungen am Chromatin gesteuert. Diese wird vermutlich durch die Anlagerung verschiedener Untereinheiten, wie z.B. Nukleasen an RISC bewerkstelligt (Hannon, 2002).

2.7.2.4. Ausblick

Während sich der Effekt von extern zugeführter siRNA in kultivierten Säugetierzellen nicht unbegrenzt lange aufrechterhalten lässt, beobachtet man bei *C. elegans* und Pflanzen einen anderen Effekt. Selbst geringste Mengen von siRNA breiten sich durch den gesamten Organismus aus (Fire et al., 1998). Diese Organismen verfügen über einen Mechanismus, das supprimierende Signal von Zelle zu Zelle weiterzugeben und zu verstärken. Dieses Phänomen bezeichnet man als „transitive RNAi“. Um das supprimierende RNAi Signal in alle Zellen weiterzugeben, benötigt der Organismus eine bestimmte RNA (Schiebel et al., 1998; Sijen et al., 2001).

Eine interessante Möglichkeit siRNA dauerhaft in Säugetierzellen zu etablieren, ist die Verwendung von „short hairpin RNAs“ (shRNA).

MicroRNA Moleküle sind kleine, nicht kodierende RNA Moleküle, die in den verschiedensten eukaryotischen Organismen gefunden wurden. Charakteristisch ist, dass sie in der Sekundärstruktur eine „Haarnadel-Struktur“ formen. Diese MicroRNAs werden ebenfalls von Dicer prozessiert, um dann ebenfalls in der RNAi Endstrecke die Genexpression zu steuern (Hannon, 2002; Pasquinelli und Ruvkun, 2002). Seit neuerer Zeit ist es möglich, diese MicroRNAs künstlich herzustellen und diese in das Genom zu integrieren (Paddison und Hannon, 2002). Diese synthetisierten MicroRNAs nennt man shRNAs. Hemann et al. transportierten eine solche shRNA Kasette mittels eines Retrovirus in hämatopoetische Stammzellen und konnten eine Langzeit-Suppression nachweisen (Hemann et al., 2003). Carmell et al.

konnten mit einer ähnlichen Methode eine Vererbung der suppressiven Wirkung an Mäusen feststellen (Carmell et al., 2003).

Demzufolge könnte in naher Zukunft die shRNA Technik, die auf Methoden der RNAi Technik beruht, die Palette der „Knock Out“ Methoden komplettieren und die Möglichkeit bieten, an lebenden Organismen beliebige Gene auszuschalten.

3. Material und Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Methode

Für die Versuche wurden folgende Zellen verwendet.

Mef	Zelllinie embryonaler Mausfibroblasten
293	Zelllinie embryonaler menschlicher Nierenzellen
HT	Zellen eines humanen B-Zelllymphoms
Hela	Zellen eines humanen Zervixkarzinoms

Die Zellen werden im Inkubator bei 37 °C in 5 % CO₂ bei 95 % Luftfeuchtigkeit in 100 mm Petrischalen kultiviert. Das verbrauchte Medium wird nach Bedarf durch frisches, auf 37°C angewärmtes Rockwell Park Memorial Institute (RPMI) Medium mit 10% fetalem Kälber-Serum (FCS) ersetzt. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig trypsinisiert und auf Mykoplasmen untersucht.

Passagieren der Zellen:

Um die Zellen auf weitere Petrischalen zu überführen, werden die Zellen für 5 min mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Durch das Trypsin werden Adhäsionsproteine der Zelloberfläche gespalten bzw. deaktiviert. Die Zellen lösen sich nun vom Untergrund ab, und die Trypsin Reaktion wird durch Zugabe von FCS haltigem Medium gestoppt. Die Zellen können dann nach Bedarf gesplittet werden. Zu Versuchszwecken werden die Zellen in 6 – Loch Platten gesät.

3.1.2. Material

<i>Hela-Zellen</i>	American Type Culture Collection, USA, (ATCC CCL-2.1)
<i>Mef Zellen</i>	American Type Culture Collection, USA (ATCC CRL-2214)
<i>293 Zellen</i>	American Type Culture Collection, USA, (ATCC CRL-1573)
<i>HT Zellen</i>	American Type Culture Collection, USA, (ATCC CRL-2260)
<i>100 mm Petrischalen</i>	Falcon, USA
<i>6 Loch Platten</i>	Falcon, USA
<i>RPMI Medium</i>	GibcoBRL, USA
<i>FCS</i>	Hyclone, USA
<i>Trypsin</i>	Sigma, USA

3.2. Bestimmung der Lebend-Zellzahl mit Trypan-Blau

3.2.1. Methode

Zur Bestimmung der Anzahl von Zellen pro Milliliter Medium wird ein Aliquot des Mediums mit Zellen im Verhältnis 1 : 3 mit Trypan-Blau versetzt. Tote Zellen werden blau gefärbt, während lebende Zellen den Farbstoff wieder exportieren.

In einer Neubauer-Zählkammer läßt sich dann die Anzahl der lebenden Zellen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors unter dem Mikroskop abzählen und auf das Gesamtvolumen hochrechnen.

3.2.2. Material

<i>Trypan-Blau</i>	Sigma, USA
<i>Neubauer Zählkammer</i>	Sigma-Aldrich, USA

3.3. Vorbereitung der Proben für Western Blot

3.3.1. Methode

Die Zellen werden wie im Ergebnisteil beschrieben, zu einem bestimmten Zeitpunkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70° C gelagert.

Zur Weiterverarbeitung werden sie bei 4° C in 1 ml Lysepuffer aufgelöst und dann für 10 min bei 13.500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Der Überstand wird dann mittels Ultraschall in einem Kühlraum bei 4° C weiter homogenisiert, um eine bessere Handhabbarkeit zu erreichen.

3.3.2. Material

<i>Lyse Puffer</i>	50 mM Tris Puffer, pH 7,9
	50 mM NaCl
	0,1 mM EDTA
	20 mM β -Glycerophosphat
	1 mM Dithiothreitol
	1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
	25 nM Calyulin
	0,5 % Triton x-100
	1 Tbl. / 50 ml Proteaseinhibitor (Roche, USA)
<i>Ultraschallgerät</i>	Sonics, USA

3.4. Bradford Assay

Mit dieser Methode kann eine quantitative Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe durchgeführt werden (Bradford, 1976). Prinzip dieser Methode ist die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einer alkalischen Lösung (Biuret Reaktion). Die Proteine binden das Farbreagenz und das Extinktionsmaximum steigt von 465 auf 595 nm.

3.4.1. Methode

Ein Aliquot der Proben wird mit Bradford Reagenz versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Extinktion gemessen. Anhand einer Standard BSA (Bovines Serum Albumin) Eichkurve kann die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.

3.4.2. Material

<i>Bradford Reagenz</i>	BioRad, USA
<i>BSA</i>	Sigma, USA

3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die von Laemmli 1970 etablierte Methode dient dazu, Protein- oder Nukleinsäuregemische aufzutrennen (Laemmli, 1970). Die zu untersuchenden Proben wandern im elektrischen Feld durch eine Gelmatrix.

Durch das beigesetzte SDS (Natriumdodecylsulfat), ein Detergens, werden die Proteine denaturiert. Das SDS lagert sich an die Proteine an und diese werden durch die im SDS enthaltenen Sulfatgruppen entsprechend ihrer Größe negativ geladen. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist nun ausschließlich von der relativen Molekülmasse abhängig.

Um eine möglichst scharfe Bandentrennung zu erreichen, muss gewährleistet werden, dass der Trennbeginn für die gesamte Probe gleichzeitig erfolgt. Dazu wird die

Gelmatrix in Sammelgel und Trenngel unterteilt. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Die Probe wird am Übergang der beiden Gele „gestaucht“.

Im Trenngel wandern die jetzt negativ geladenen Proteine in Richtung der positiven Elektrode. Da kleine Proteine schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels gelangen können, werden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

3.5.1. Methode

Gel gießen:

Die Reagenzien werden gut gemischt und direkt nach der Zugabe von Temed zwischen die gereinigten Glasplatten gegossen. Dabei bleibt ein Rand von etwa 2 cm für den Kamm bestehen. Dieser Rand wird mit Laufpuffer aufgefüllt um zu verhindern, dass sich eine harte Grenzschicht ausbildet. Die Apparatur wird dann bis zur fertigen Polymerisation stehen gelassen (ca. 30 min).

Anschließend wird das Sammelgel (4%), wie oben beschrieben, auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Gel wird ein Kamm mit der gewünschten Anzahl an Zähnen gesteckt.

Elektrophorese

Das fertige Gel wird mit den Glasplatten in die Apparatur eingespannt. Es entstehen so eine obere bzw. innere und eine untere bzw. äußere Kammer. Beide werden mit SDS - haltigem Laufpuffer gefüllt.

Der Kamm wird aus dem Sammelgel gezogen und die Taschen mit Laufpuffer gespült, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen in den Taschen verbleiben.

Die Taschen werden nun mit einer definierten Menge der vorbereiteten Proben beladen.

Als Größenstandard wird ein Protein Marker verwendet. Dieser enthält eine bekannte Mischung von Proteinen verschiedener Größen, die farblich markiert sind.

Das Gel wird entweder über Nacht bei 40 V oder für 3-4 h bei 100 V gefahren, bis die Front der Proben den unteren Gelrand erreicht hat.

3.5.2. Probenvorbereitung

Ein definiertes Volumen der Proben wird mit dem Laemli - Probenpuffer vermischt. Die Proben werden für 3 min bei 95° C erhitzt. Des Weiteren wird Bromphenolblau zugesetzt, welches an vorderster Front läuft. Damit wird gewährleistet, dass keine Probe unbemerkt aus dem Gel herausläuft.

3.5.3. Materialien

Verwendet wurde das Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System von BIO-RAD, USA.

<i>Abmessungen</i>	Gel Größe:	8 x 7,3 cm
	Innere Glassplatte	10,2 x 7,3 cm
	Äußere Glassplatte	10,1 x 8,3 cm
	Spacer Dicke	1,5 mm
<i>Reagenzien für ein 10% Gel</i>	0,95 ml H ₂ O	
	0,95 ml Glycerol	
	1,7 ml 30% Acrylamid Mix	
	1,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8	
	50 µl 10% SDS	
	5 µl Temed	
	20 µl Amoniumphosphat	
<i>Laemli - Probenpuffer</i>	0,2 M Tris-HCL, pH 6,8	
	8% SDS	
	40% Glycerol	
	0,004 % Bromphenolblau	
<i>Protein Marker</i>	„Broad Range“, New Englang Biolabs, USA	

3.6. Western Blot und Entwicklung mit ECL

3.6.1. Prinzip

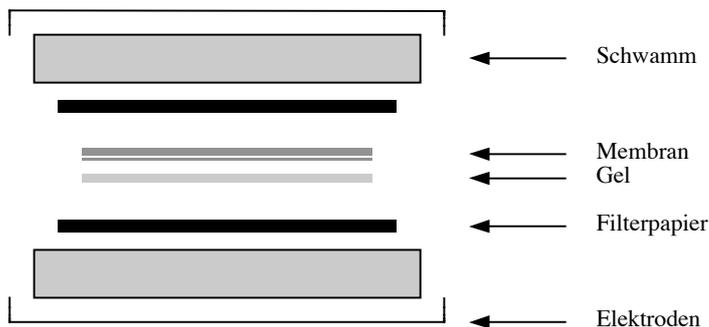
An die Gelelektrophorese schließt sich der Western Blot an. Er dient dazu, die größenabhängig getrennten Proteine sichtbar zu machen.

Dazu werden die Proteine in einem elektrischen Feld, welches senkrecht zur Laufrichtung im Gel steht, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und so immobilisiert. Anschließend wird das zu suchende Protein entweder mit einem spezifischen Antikörper markiert oder eine unspezifische Färbung mit Coomassie durchgeführt. Der darauf folgende ECL-Western-Blot (Enhanced Chemiluminescence) ist eine nicht-radioaktive Detektionsmethode für durch die Blotting-Membran immobilisierte Proteine, die von spezifischen Peroxidase-markierten Detektions-Antikörpern erkannt werden. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol in der Gegenwart von Wasserstoff-Peroxyd (H_2O_2). Durch die Oxidation wird das Luminol in einen angeregten Zustand versetzt und emittiert Licht, welches durch einen Film sichtbar gemacht werden kann.

3.6.2. Methode

3.6.2.1. Transfer

Beim verwendeten Semidry Verfahren werden die Gele und die Nitrozellulosemembran sandwichartig von Filterpapier umgeben und dann in eine eng umschließende Kassette eingelegt.



Der die Kassette umgebende Transfer Puffer enthält Methanol, um das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

3.6.2.2. Blocken und Waschen

Die Membran wird nach vollendetem Transfer entnommen, um dann für 15 min in einer Blocker-Lösung inkubiert zu werden. Stattdessen kann auch eine 5%ige Milchpulverlösung zum Einsatz kommen. Dieser Schritt ist notwendig, um alle eventuell unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen.

Der erste Antikörper wird in Blockpuffer 1:3000 verdünnt. Nach dem Blocken wird die Membran mit dem ersten Antikörper für ca. 1 h unter vorsichtigem Rütteln inkubiert. Darauf folgen 3 Waschungen mit TBS Puffer 0,05 % Tween.

Anschließend kann die Membran mit dem zweiten Antikörper für 1,5 h inkubiert werden. Dieser zweite ist ein Anti-Maus, Anti-Hase- oder Anti-Ziege-Antikörper, der

mit dem ersten kreuzreagiert und an ein Enzym (Peroxidase) gekoppelt ist. Es folgen 2 weitere wie oben beschriebene Waschstschritte, anschließend wird der Blot mit ausschließlich TBS Puffer gewaschen.

Als letzter Schritt wird die Membran mit der Chemiluminescence-Lösung inkubiert. Die gebundenen sekundären Antikörper reagieren mit der Chemiluminescence-Lösung wodurch Licht emittiert wird. Ein Film wird an der entsprechenden Stelle geschwärzt und bildet so qualitativ und vergleichend quantitativ den Proteingehalt der Probe ab.

3.6.3. Auswertung der Blots

Die entwickelten Filme wurden eingescannt und mittels einer Software quantifiziert. Dabei wurde die Software „Scion Image“ verwendet.

3.6.4. Verwendete Materialien

Verwendet wurde das Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System von BIO-RAD.

<i>Nitrozellulosemembran</i>	Imobilon, USA
<i>Blocker Lösung</i>	Superblock, Pierce USA enthält: Blocker™ BLOTTO in TBS, 1 Liter 5% Milchpulver in 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.01% Antifoam A und Kathon® anti-microbial agent.
<i>TBS</i>	1 M Tris pH 7,5 5 M NaCl
<i>Tween</i>	ICI Americas, USA
<i>Primärer Anti MST1 Antikörper</i>	Zymed, USA
<i>Sekundäre Antikörper</i>	Upstate Biotechnology, USA
<i>Chemiluminescence Lösung</i>	PIERCE Supersignal5

3.7. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht eine quantitative und qualitative Analyse von Partikeln wie zum Beispiel Zellen in einer Flüssigkeit. Dabei können sowohl physikalische als auch molekulare Eigenschaften von Zellen untersucht werden. Ein Hauptanwendungsgebiet ist die markierte Untersuchung von Zellpopulationen auf Einzelzellebene, welche durch Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

3.7.1. Prinzip

Die Zellen werden in einer Einzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem geeigneten Laserstrahl vorbeigeleitet. Durch eine Antigen—Antikörper Reaktion sind entsprechende fluoreszenzmarkierte Antikörper an die Zellen gebunden. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach Beendigung des Impulses fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Beim Zurückfallen wird ein charakteristisches Licht bestimmter Wellenlänge emittiert.

Dabei verhält sich die emittierte Menge an Licht direkt proportional zur Menge der an die Zelle gebunden Antikörper.

Es können auch mehrere Markierungen an einer Zelle vorgenommen werden. Die verschiedenen emittierten charakteristischen Spektren können durch verschiedene Kanäle verarbeitet werden.

Abgesehen von diesen hoch spezifischen Detektionsmethoden besteht noch die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Morphologie zu unterscheiden. Dabei können durch die Lichtbeugung Informationen über Zellgröße, Zellform und die Innenstruktur (Granularität des Zellplasmas) gewonnen werden.

Insgesamt ist es so durch die FACS Analyse möglich, in kürzester Zeit sehr genaue und vor allem quantitative Aussagen zu treffen.

3.7.2. Methode

Siehe Annexin-V Färbung

3.7.3. Material

Durchflusszytometer

Beckmann Coulter

3.8. Annexin-V Färbung

3.8.1. Prinzip

Als eines der frühesten Zeichen der Apoptose ist eine Veränderung der Zellmembran zu beobachten. Phosphatidylserin (PS) ist unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich auf der cytoplasmatischen Seite der Zelle anzutreffen. Während der Apoptose findet es sich vermehrt auf der Zellaußenseite.

Das Protein Annexin-V bindet spezifisch und Ca^{2+} abhängig an PS. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis von Apoptose.

Koppelt man an Annexin-V einen Fluoreszenzfarbstoff, können apoptotische Zellen durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. Da aufgrund der permeabilisierten Membran Annexin-V auch von nekrotischen Zellen gebunden werden kann, muss diese Tatsache bei der Interpretation in Betracht gezogen werden.

3.8.2. Methode

Das Zellmedium wird vorsichtig aspiriert und die Zellen werden zwei Mal mit PBS gewaschen.

Die Zellen werden dann mit HBS, 2,5 mM CaCl_2 und 1:20 Annexin-V Biotin für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden anschließend drei mal mit HBS + 2,5 mM CaCl_2 gewaschen um überschüssiges Annexin zu entfernen.

Die Zellen werden dann für 10 min mit Biotin-flourescent-conjugate in HBS + 2,5 mM CaCl₂ bei RT inkubiert. Als letzter Schritt erfolgt eine zweimalige Waschung mit HBS + CaCl₂.

Die Zellen können nun mit dem Durchflusszytometer ausgewertet werden.

3.8.3. Material

<i>Annexin-V Biotin</i>	Clonotech, USA
<i>Biotin-flourescent-conjugate</i>	Molprobes, USA
<i>HBS</i>	1,4 M NaCl
	50 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O
	200 mM Dextrose
	200 mM Hepes

Zellen hinzugegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass dieser Prozess schnell vonstatten geht, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern.

3.10.2. Material

UV Bestrahler

Stratalinker von Stratagene, USA

3.11. Etoposid Behandlung

Etoposid ist ein lange bekanntes Chemotherapeutikum mit dem Wirkstoff 4'-Desmethylepipodophyllotoxin- (4,6 O- Ethyliden- Glucosid).

Der Wirkungsmechanismus von Etoposid besteht in der Hemmung der Topoisomerase II. Ein DNA-Enzym-Komplex führt zu bestehenden Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA. Es folgt eine Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) (Barry et al., 1993).

3.11.1. Methode

Etoposid liegt flüssig vor und wird in verschiedenen Konzentrationen mit Zellmedium vermischt. Um eine gleichmäßige Verteilung des Chemotherapeutikums zu gewährleisten, wird das gesamte alte Medium aspiriert und durch neues Etoposid-haltiges ersetzt.

3.11.2. Material

Etoposid

Sigma, USA

3.12. RNA interference

Ziel dieser Methode ist es spezifisch einzelne Gene abzuschalten. Dies geschieht auf posttranskriptionaler Ebene. 21 nt lange RNA Oligos werden mithilfe von Lipidtröpfchen (Oligofectamine), ähnlich wie bei einer Transfektion, in die zu behandelnden Zellen eingebracht. Die RNA Oligos entsprechen in ihrer Basenabfolge genau einem Abschnitt der Sequenz des Zielgens. Dies führt zum Abbau der entsprechenden endogenen mRNA.

Zu diesem Zweck müssen die Oligos selbst designed werden und können anschließend synthetisiert werden.

3.12.1. Richtlinien für RNAi Design

- Regionen nahe zum Start Codon sollten vermieden werden, da sie vermehrt Bindungsstellen für regulatorische Proteine aufweisen. Diese können mit dem Bindungsprozess der siRNA interagieren
- Aus den gleichen Gründen sollte ebenfalls "untranslated Regions" am 5' und 3' Ende vermieden werden.
- Empfohlene Target-sites befinden sich 50 bis 100 nt downstream vom Start Codons
- Idealerweise sollten die Oligos (=siRNA) einen G/C Gehalt von 50 % haben. Ein Mindestgehalt zwischen 30 und 70 % ist anzustreben.
- Um die Spezifität der Oligos zu gewährleisten, müssen die entworfenen Oligos mit allen bekannten Proteinsequenzen verglichen werden. Dazu dient beispielsweise ein Suche in der NCBI Datenbank (BLAST). Nur wenn die Oligos ausschließlich mit dem Target Protein interagieren, kann gewährleistet sein, dass nur ein Gen inaktiviert wird.
- Als Negativkontrolle dienen sogenannte „Scrambled RNA“, die genau die gleichen Nukleotide enthalten, wie die wirksamen RNAs. Allerdings ist durch einen BLAST gesichert, dass sie mit keinerlei bekannter mRNA interferieren.

- Beim Umgang mit siRNA ist strengsten darauf zu achten, möglichst kontaminationsarm zu arbeiten. Die ubiquitär vorkommenden RNAsen würden die siRNAs sofort zerstören. RNase freie Labormaterialien sind eine Grundbedingung.

	881	891	901	911	921	931	941	951
mst oligo	-----							
mst1 sequenz	TTGTCAGGAGTGCCAAAGGAGTGTCAATACTGCGAGACTTAATTAATGAAGCCATGGATGTGAAACTGAAACGCCAGGAA							
Consensus								
	961	971	981	991	1001	1011	1021	1031
mst oligo	-----							
mst1 sequenz	TCCCAGCAGCGGGAAGTGGACCAGGACGATGAAGAAAACCTAGAAGAGGATGAAATGGATTCTGGCACGATGGTTCGAGC							
Consensus	atggattctggcaccgatggtt							
	1041	1051	1061	1071	1081	1091	1101	1111
mst oligo	-----							
mst1 sequenz	AGTGGGTGATGAGATGGGCACTGTCCGAGTAGCCAGCACCATGACTGATGGAGCCAATACTATGATTGAGCACGATGACA							
Consensus								

Abbildung 8 Anlagerung (Alignment) der MST1 Sequenz und der MST1 siRNA Oligo Sequenz

Die Darstellung der von uns konstruierten Oligos im Vergleich zur Sequenz des MST1 Proteins zeigt eine 100%ige Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen (Abb. 9). Eine genaue Übereinstimmung ist wichtig für die Funktion der Oligos als Leitsequenzen. Versuche mit extern zugeführter siRNA zeigen, dass bereits eine Abweichung von einer Base den Supprimierungseffekt zunichte macht (Tuschl, 2001).

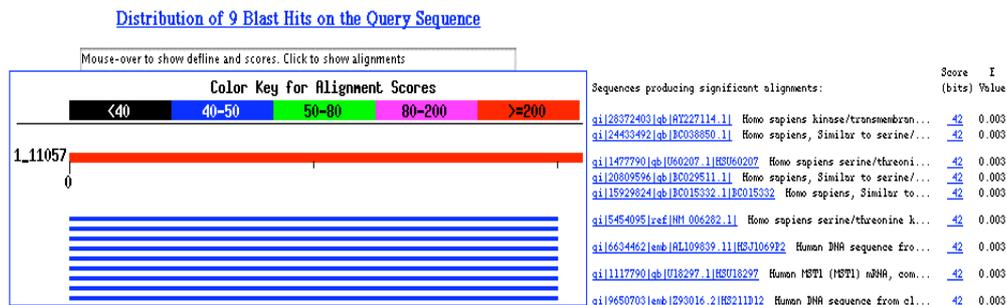


Abbildung 9 Ausschnitt des MST1 siRNA BLAST bei PubMed

Der BLAST bei Pubmed zeigt, dass die Oligos zu keinem anderem menschlichen Protein homolog sind als zu MST1 (vergl. Abb. 9). Die dargestellten blauen Linien zeigen eine 100%ige Übereinstimmung der Oligo Sequenz mit der MST1 Sequenz. Andere Übereinstimmungen, mit ggf. niedrigerem Prozentsatz einer Übereinstimmung, würden andersfarbig dargestellt werden.

Das Ergebnis dieses BLASTs lässt auf die 100%ige Spezifität der Oligos schließen.

3.12.2.Methode

- Die Oligos, die getrennt geliefert werden, müssen erst „annealed“, das heißt aneinander gelagert werden. Dazu werden die Oligos mit 5x „Annealing Buffer“ und Nuklease-freiem Wasser versetzt und für 1 min bei 95°C erhitzt.
- Die Oligos werden dann mit Nuklease freiem H₂O auf eine Konzentration von 200 µM verdünnt.
- Die zu verwendenden Zellen werden in RPMI Medium ohne Antibiotika-Zusätze kultiviert. Die Zellen werden gesplittet und auf 6-Loch-Plattes verteilt und weiterhin bei 37 C und 5% CO₂ inkubiert. Am Tag der RNAi Transfektion sollten die Zellen etwa eine Konfluenz von 40 % aufweisen.
- Das Zellmedium wird aspiriert und die Zellen vorsichtig mit Opti-Mem Medium gewaschen.
- Es werden 2 Mixturen vorbereitet:
 - 1. Die RNAi Oligos werden mit Opti-Mem Medium vermischt:

10 μ l siRNA (10 μ M Stammlösung) + 175 μ l Opti-Mem

- 2. Das Oligofectamine wird mit Opti-Mem vermischt:

4 μ l Oligofectamine + 11 μ l Opti-Mem

- Beide Mixturen werden vermischt und dann bei Zimmertemperatur für 20 min inkubiert (endgültiges Volumen 200 μ l).
- Das Opti-Mem wird von den gewaschenen Zellen aspiriert und durch 800 μ l frisches Opti-Mem ersetzt.
- Die 200 μ l der Oligo/Opti-Mem/Oligofectamine Lösung werden tropfenweise zu den Zellen zugegeben.
- Die Zellen werden für 4 h bei 37° C inkubiert.
- Es werden dann 500 μ l RPMI mit 30 % FCS und Glutamin zugegeben. Die Konzentration der Oligos beträgt nun 66 nM.
- Soweit nicht anders angegeben wurde in den Experimenten eine Konzentration von 100 nM verwendet.

Da in den Versuchen immer wieder gleich behandelte Zellpopulationen verwendet wurden, sollen die häufigsten Abkürzungen an dieser Stelle kurz erklärt werden und gelten für die gesamte Arbeit:

- MST1 siRNA Diese Zellen wurden mit MST1 homologen RNAi Oligos behandelt. Ziel war es, die Produktion von MST1 in diesen Zellen zu unterdrücken.
- SCR siRNA Diese Zellen wurden mit RNAi Oligos behandelt, die die gleiche Anzahl und Art von Nukleotiden enthält, wie die mit MST1 RNAi Zellen. Die Reihenfolge der Nukleotide ist aber so vertauscht, dass die Sequenz der Oligos zu keinem bekannten menschlichen Protein homolog ist.
- No RNAi Diese Zellen wurden exakt wie die beiden oberen Gruppen behandelt, ohne dass siRNA hinzugegeben wurde.

3.12.3. Materialien

<i>RNA Oligos</i>	Ambion, USA
<i>Oligofectamine</i>	Invitrogene, USA
<i>RPMI Medium</i>	GibcoBRL, USA
<i>Opti-Mem</i>	GibcoBRL
<i>FCS</i>	Hyclone, USA

3.13. *PARP Blot*

Anti-PARP ist ein monoklonaler Maus Antikörper, der ein Fragment von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) bindet.

PARP ist ein 116 kDa Protein, welches sich spezifisch an DNS Brüchen anlagert. Außerdem ist PARP ein Substrat für bestimmte Caspasen (Bsp. Caspase 3 und 7) und somit ein früher Marker der Apoptose. Diese Proteasen schneiden PARP in Fragmente von ca. 85 kDa und ca. 24 kDa.

Der Antikörper ist in der Lage, sowohl ungespaltenes 116 kDa großes PARP, als auch das ca. 85 kDa große Fragment zu erkennen und zu binden. Die Bindung erfolgt an das Carboxyende des PARP Proteins.

3.13.1. Methode

Der Anti PARP Antikörper wird, wie im Kapitel Western Blot beschrieben, eingesetzt.

3.13.2. Material

<i>Anti PARP Antikörper</i>	Zymed, USA
-----------------------------	------------

3.14. Statistik

Alle in der Arbeit angegebenen Daten beziehen sich jeweils auf den Mittelwert mindestens zweier getrennter Ansätze mit jeweils drei parallel geführten Proben. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken angegeben.

Als signifikant wurden Daten mit einem p-Wert $< 0,05$ angesehen. Auf Signifikanz wurde mit dem Students-T-Test getestet. Nicht alle Daten wurden auf Signifikanz überprüft. Signifikante Werte haben als Markierung einen Stern in der Grafik.

4. Ergebnisse

4.1. Auswahl der Zelllinie

Zunächst wurden verschiedene Zelllinien auf den Gehalt von MST1 hin untersucht. Günstig ist es, wenn die Zellen einen möglichst hohen MST1 Gehalt haben, um das endogene MST1 zuverlässig darstellen zu können. Die erfolgreiche Suppression durch RNAi kann in diesem Fall ebenfalls deutlich dargestellt werden. Es wurden folgende Zellen untersucht:

Mef	Zelllinie embryonaler Mausfibroblasten
293	Zelllinie humaner embryonaler Nierenzellen
HT	Zellen eines B-Zelllymphoms
Hela	Zellen eines Zervixkarzinoms

Western Blots mit Anti MST1 Antikörpern zeigten, dass 293 und Hela-Zellen die größten Mengen an MST1 aufwiesen.

Der darauf folgende Versuch, die MST1 Produktion mittels RNAi zu unterdrücken, gelang ausschließlich mit Hela-Zellen. Folglich wurden alle folgenden Versuche mit Hela-Zellen durchgeführt.

4.2. RNAi Vorversuche

4.2.1. Zeitverlauf und Konzentrationsermittlung

Verschiedene Konzentrationen von siRNA wurden getestet, um die Effektivität der RNAi Oligos zu testen. Die Zellen wurden jeweils nach 36, 60 und 80 Stunden lysiert und auf den Gehalt an MST1 per Western Blot überprüft.

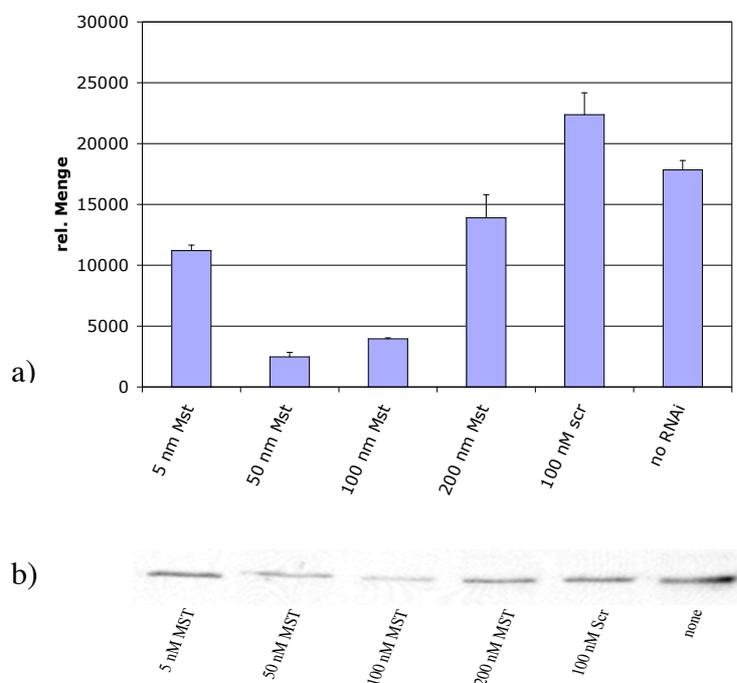


Abbildung 10 a) Quantifizierung des Anti-MST1-Blots 36 h nach Applikation der RNAi Oligos in verschiedenen Konzentrationen; n=4; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt b) Originalblot des gleichen Versuches

Bei einer Konzentration von 50 nM und 100 nM RNAi Oligos kann eine erhebliche Abnahme der nachzuweisenden MST1 Menge beobachtet werden (Abb. 10). Warum bei einer Konzentration von 200 nM keine größere Suppression der MST1 Produktion erzielt wurde, konnte nicht geklärt werden.

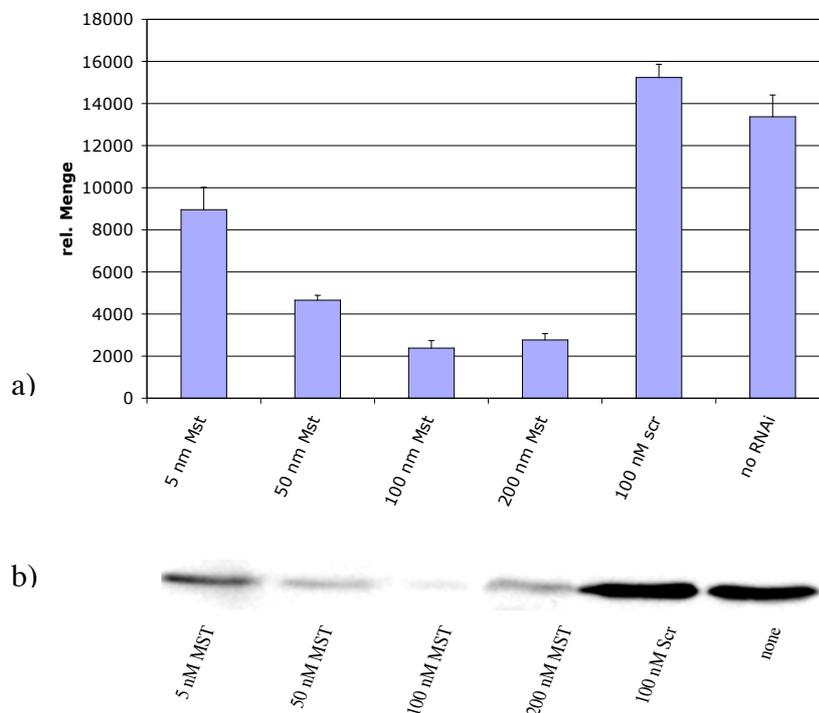


Abbildung 11 a) Quantifizierung des Anti-MST1-Blots 60 h nach Applikation der RNAi Oligos in verschiedenen Konzentrationen; n=4; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt b) Originalblot des gleichen Versuches

Die Abbildung 11 stellt den MST Gehalt der Zellen 60 h nach Applikation der Oligos dar. Das höchste Maß an Suppression kann bei Konzentrationen von 100 und 200 nM Oligos beobachtet werden. Insgesamt ist bei allen Konzentrationen der verwendeten Oligos eine Abnahme der MST1 Menge nachzuweisen.

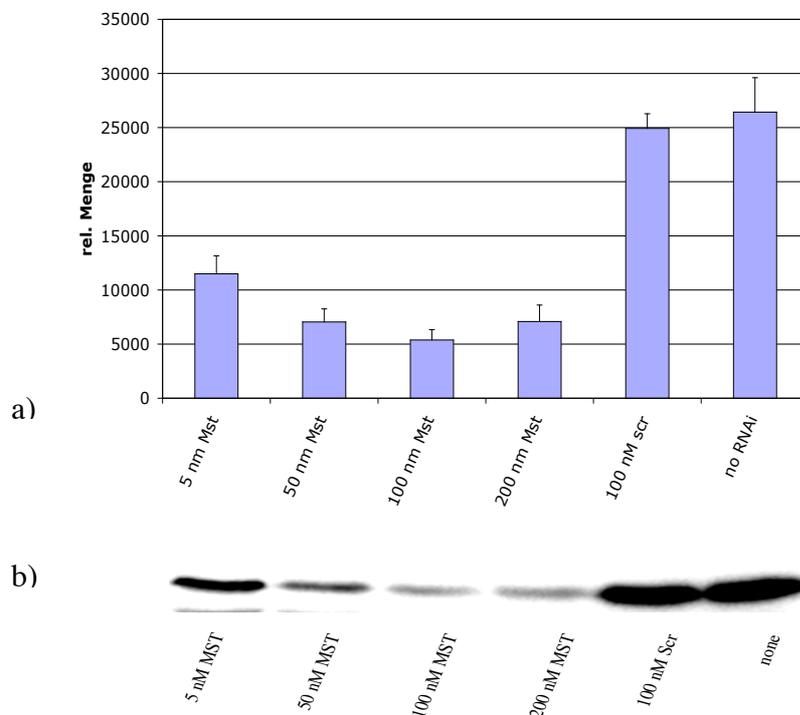


Abbildung 12 a) Quantifizierung des Anti-MST1-Blots 80 h nach Applikation der RNAi Oligos in verschiedenen Konzentrationen; n=4; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt b) Originalblot des gleichen Versuches

80 h nach Beginn des Einwirkens der RNAi Oligos zeigten alle verwendeten Konzentrationen der Oligos eine Suppression des MST1 Proteins. Besonders stark fällt diese bei den Konzentrationen von 50, 100, und 200 nM aus (siehe Abb. 12).

Die dargestellten Anti-MST1-Blots (Abbildungen 10-12) zeigen deutlich, dass der Ansatz, die MST1 Produktion mittels RNAi zu unterdrücken, erfolgreich ist. Im Vergleich zu den Kontrollzellen weisen die mit MST1 siRNA behandelten Zellen oftmals bis zu 80 % supprimierten MST1 Gehalt auf.

Am zuverlässigsten lässt sich die Proteinproduktion mit einer Oligo Konzentration von 100 nM unterdrücken. Zwar liegt der Suppressionseffekt 36 Stunden nach Applikation knapp unter dem von 50 nM, 60 und 80 Stunden nach Applikation kann

bei 100 nM jedoch das höchste Maß an Suppression beobachtet werden. Als Konsequenz aus diesen Beobachtungen wird bei allen folgenden Versuchen eine Konzentration von 100 nM verwendet.

4.2.2. Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit unter RNAi Einfluss

Vor Beginn der eigentlichen Versuche sollte untersucht werden, ob der Einsatz von MST1-siRNA oder SCR-siRNA die Zellen hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit beeinflusst. Dazu wurden Hela-Zellen in 6-Loch Platten gesät und 24 h später mit RNAi Oligos behandelt. Alle 24 Stunden wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

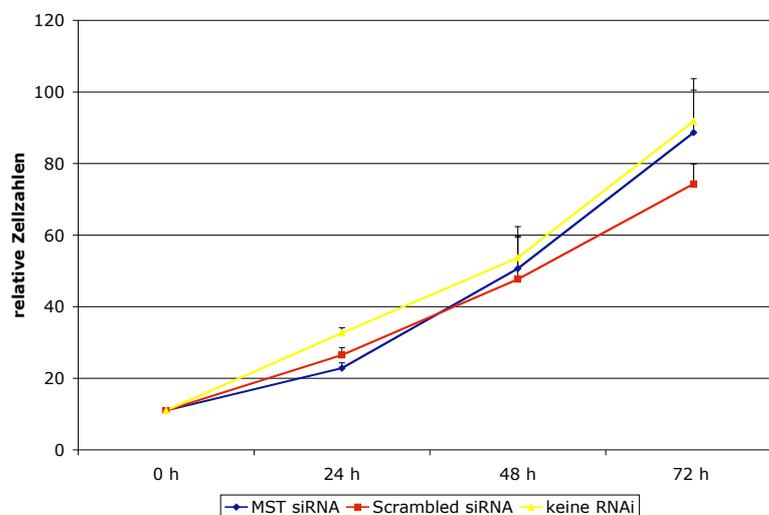


Abbildung 13 Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit unter dem Einfluss von RNAi Oligos. Der 0 h Zeitpunkt kennzeichnet den Zeitpunkt der RNAi Oligo Applikation; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Getestet wurde, ob die Zellen mit unverändertem oder vermindertem MST1 Gehalt eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen. Die Kurven für die „MST1 siRNA“ und „kein RNAi“ Zellen zeigen einen annähernd parallelen

Verlauf(Abb. 13). Die Zellzahl der mit MST1 siRNA behandelten Zellen liegt lediglich 24 Stunden nach Transfektion unter der Zahl der Kontrollzellen. 48 und 72 Stunden nach der Transfektion liegt die Zellzahl aller Gruppen eng beieinander. Die Wachstumskurve, welche für SCR siRNA behandelte Zellen ermittelt wurde, zeigt nach 72 Stunden eine geringere Zellzahl als die der beiden anderen Gruppen.

Resultat dieser Untersuchungen ist, dass die verschiedenen Gruppen keine eklatanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen. Eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen wird auch dadurch gewährleistet, dass bei jedem Versuch, mit „SCR siRNA Zellen“ und „kein RNAi Zellen“, zwei verschiedene Negativ Kontrollen mitgeführt werden.

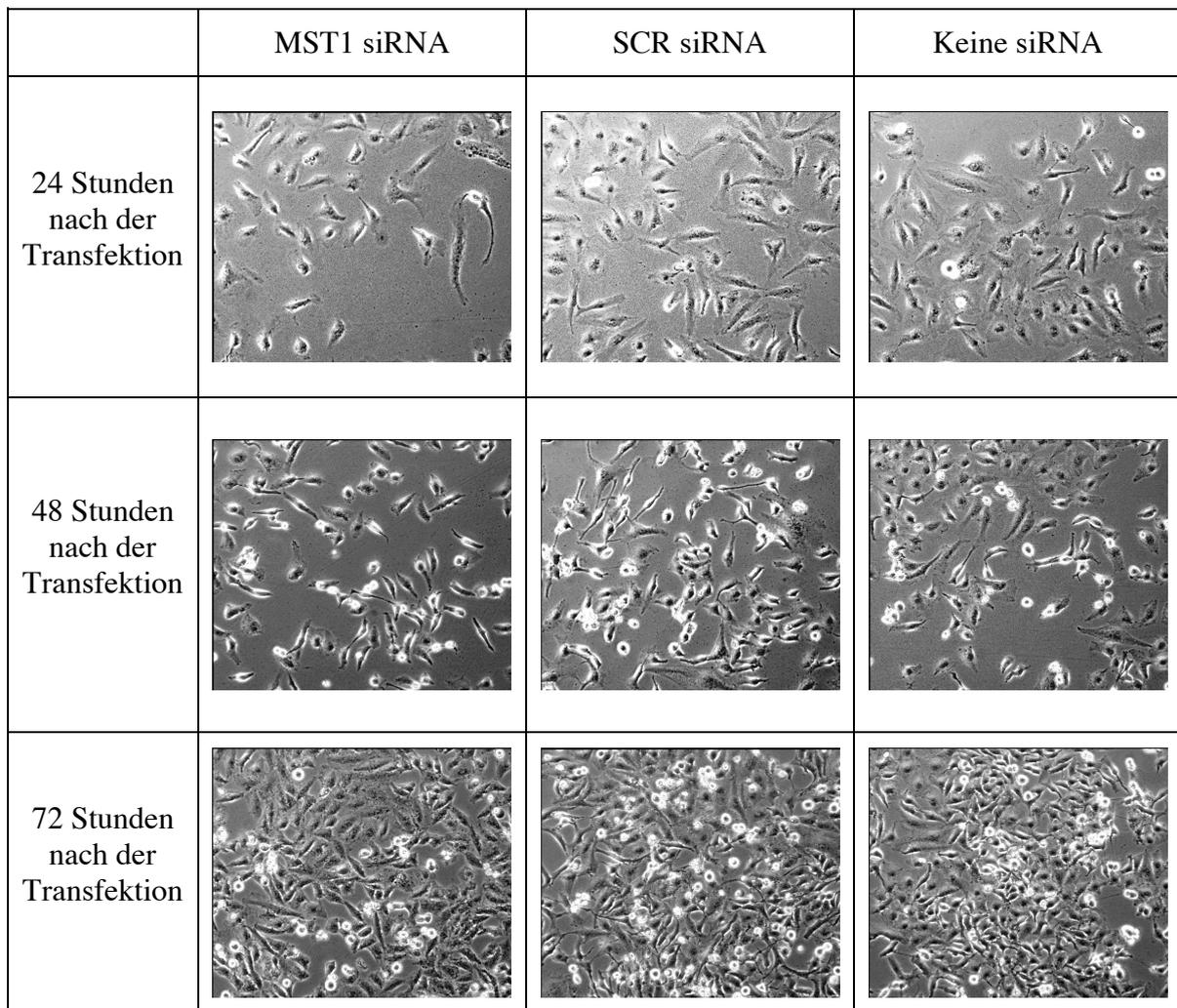


Abbildung 14 Dargestellt sind HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach siRNA Applikation

Die Aufnahmen zeigen HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der siRNA Applikation (Abb.14). In der linken Reihe sind die MST1 supprimierten, in der Mitte die mit scrambled siRNA behandelten Zellen und in der rechten Reihe die Kontrollzellen abgebildet.

Der subjektive Eindruck der Zellzahlen unterstützt das Ergebnis der mittels Neubauer Kammer erfolgten Zählung. Eine Veränderung in der Wachstumsgeschwindigkeit nach siRNA Applikation liegt nicht vor.

4.3. Vorversuche ohne RNAi

Um folgenden Experimenten die Stressreaktion von MST1 supprimierten Zellen mit Wildtype-Zellen vergleichen zu können, wurden zunächst diverse Stressstimuli getestet. Dabei wurden auch verschiedene Detektionsmethoden zum Nachweis der Apoptose verwendet, um die am besten geeignete Methode ausfindig zu machen.

4.3.1. UV induzierte Apoptose und Nachweis durch Anti-PARP Blot

Um zu können, inwieweit das Verhalten der mit MST1 - siRNA behandelten Zellen vom Verhalten der WT Zellen nach UV Bestrahlung hinsichtlich Apoptose abweicht, wurden Hela-Zellen mit verschiedenen Dosen UV Strahlung bestrahlt.

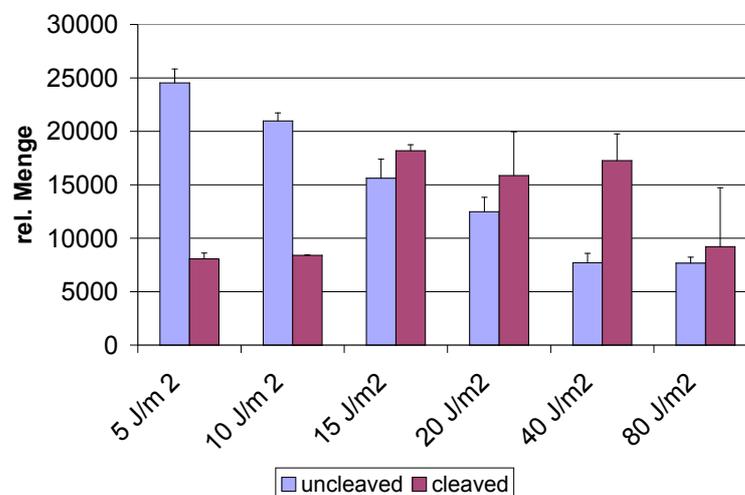


Abbildung 15 Quantifizierung eines Anti-PARP-Blots; verwendet wurden Hela-Zellen 24 h nach UV Bestrahlung; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Mit steigender UV Dosis verringert sich die Menge des nachgewiesenen „uncleaved PARP“. Um die Geschehnisse klarer abbilden zu können, zeigt die folgende Abbildung das Verhältnis von „cleaved PARP“ zu „uncleaved PARP“. Und spiegelt damit den Grad der Apoptose Aktivierung wieder.

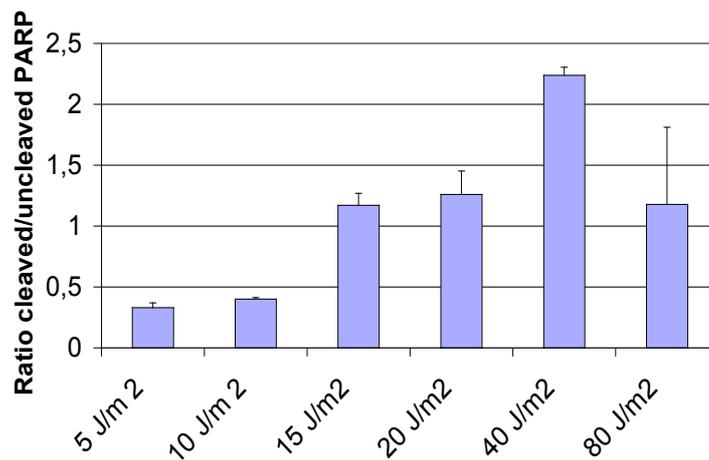


Abbildung 16 Verhältnis von „cleaved PARP“ zu „uncleaved PARP“ 24 h nach UV Bestrahlung; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Mit steigender UV Bestrahlung nimmt das Maß der PARP Prozessierung, und damit der Anteil an apoptotischen Zellen, dosisabhängig zu. Mit dieser Art der Darstellungsform wird der Zusammenhang von UV Dosis und Grad der Apoptoseaktivierung klarer (Abb. 16).

Ein geringfügig erhöhtes Maß an apoptotischer Aktivität wurde schon bei einer Dosis von 10 J/m² festgestellt. Dabei konnte mithilfe des Mikroskops beobachtet werden, dass sich nahezu alle Zellen wieder erholten. Bei weiterer Dosissteigerung auf 15 bzw. 20 J/m² erhöhte sich das Apoptoselevel sprunghaft. Eine weitere Erhöhung der Dosis auf 40 J/m² ließ das apoptotische Level erneut deutlich ansteigen.

Bei 15, 20 und 30 J/m² waren zahlreiche Zellablösungen von der Bodenfläche zu beobachten. Siehe dazu beispielhaft die Abbildung Nr. 17, die Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 30 J/m² zeigt

Nicht gezeigte Aufnahmen der Hela-Zellen zeigen einen Großteil (>70%) von ihnen 24 h nach Applikation von 40 J/m^2 tot und als nicht mehr adhärent. Bei 80 J/m^2 zeigen 100% der Zellen Zeichen des Zelltods und sind vom Untergrund abgelöst. Dies erklärt die niedrige Aktivierung des PARP Systems bei der Dosis von 80 J/m^2 .

Bei 5 und 10 J/m^2 ist unter dem Mikroskop kein Zeichen einer Beeinträchtigung der Zellvitalität zu beobachten.

Als Beispiel sind hier Zellen vor und nach Bestrahlung mit 30 J/m^2 dargestellt.

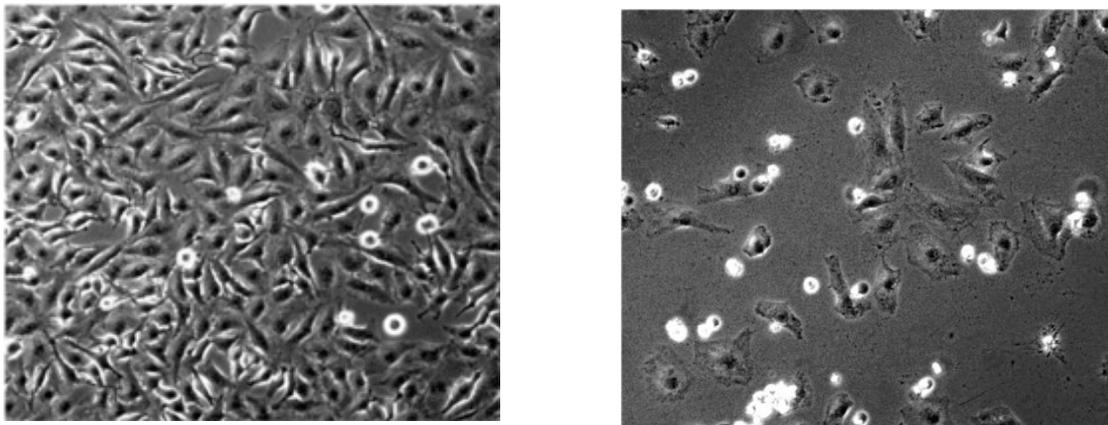


Abbildung 17 Beispiel für Hela-Zellen 24 Stunden nach 30 J/m^2 UV Bestrahlung. Auf der linken Seite sind die Zellen vor der Bestrahlung, recht 24 Stunden nach der Bestrahlung, dargestellt.

4.3.2. H₂O₂ induzierte Apoptose und Nachweis durch Anti-PARP-Blot

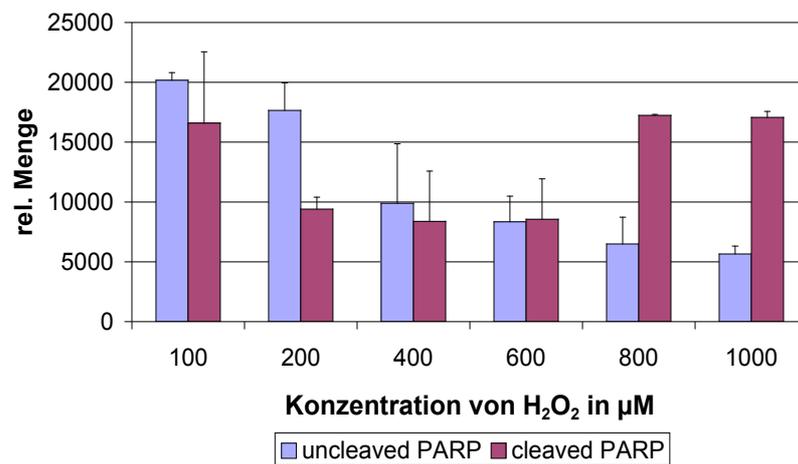


Abbildung 18 Quantifizierung eines Anti-PARP-Blots; getestet wurden HeLa-Zellen 48 h nach H₂O₂ Einfluss; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ behandelt. Dargestellt sind, wie im oberen Abschnitt beschrieben, Anti-PARP-Blots als Maß für Apoptose.

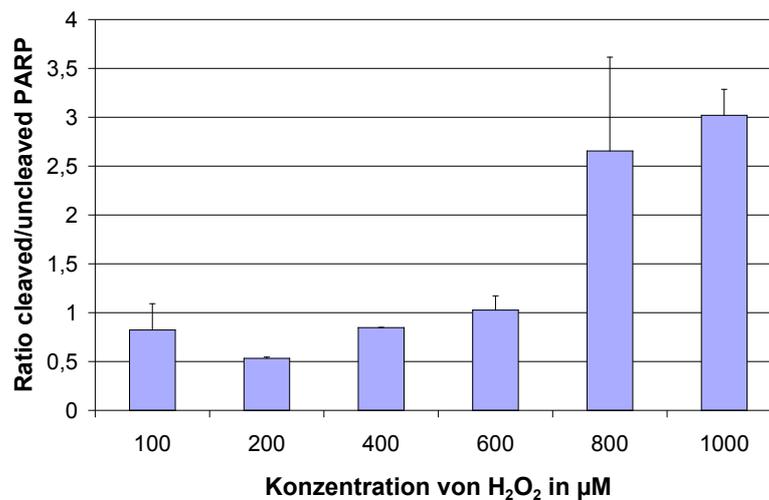


Abbildung 19 Darstellung des Verhältnisses von cleaved PARP zu uncleaved PARP 48 h nach H₂O₂ Einfluss; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Die Darstellung des Blots als Verhältnis von „cleaved PARP zu uncleaved PARP“ (Abb. 19) zeigt eine klare Abhängigkeit des Grades der Apoptose von der verwendeten H₂O₂ Konzentration.

Eine Steigerung des Apoptoselevels kann bei Konzentrationen von 400 bis 600 μM H₂O₂ festgestellt werden. Danach konnte mit dem Mikroskop eine nachfolgende Erholung der Zellen beobachtet werden.

Geringere Konzentrationen liefern keine zuverlässige Aktivierung der Apoptose. Höhere Dosen von Wasserstoffperoxid machen eine Erholung der Zellen unmöglich.

4.3.3. Etoposid induzierte Apoptose - Nachweis durch Annexin-V

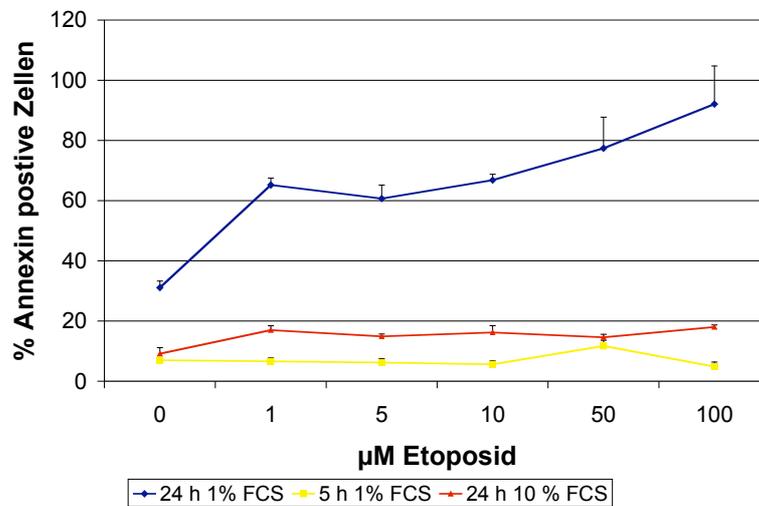


Abbildung 20 Annexin positive HeLa-Zellen nach Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Etoposid in verschiedenen Medien; n=5; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

In Abbildung 20 ist die apoptotische Aktivität von HeLa-Zellen nach Etoposid Applikation in verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Die Erfassung der apoptotischen Aktivität erfolgte durch Annexin-V Färbung und anschließenden Auswertung mit dem Durchflusszytometer.

24 Stunden nach Applikation können in 10 % FCS haltigem Medium keine unterscheidbaren Grade der Apoptose Aktivierung nachgewiesen werden

In 1%igen FCS Medium kann 24 Stunden nach Applikation eine konzentrationsabhängige Zunahme der Apoptose beobachtet werden.

Die Messungen in 1%igem FCS Medium 5 Stunden nach Applikation ergeben keine unterscheidbaren Ergebnisse.

4.4. *MST1* supprimierte Zellen mit verschiedenen Stressstimuli

4.4.1. UV induzierte Apoptose – Nachweis der Apoptose mittels Durchflusszytometrie

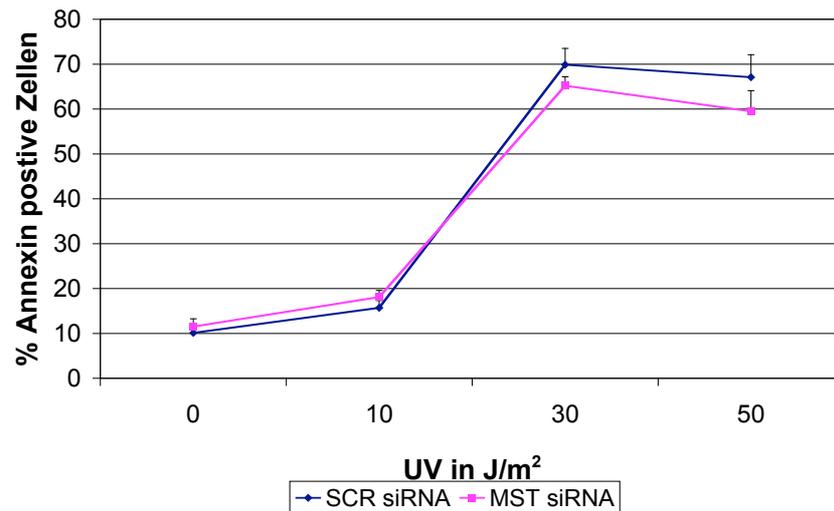


Abbildung 21 Annexin positive HeLa-Zellen 24 h nach UV Bestrahlung; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Untersuchung nach Annexin-V Färbung.

Untersucht wurde der Grad der Apoptose Aktivierung von HeLa-Zellen 24 Stunden nach UV Bestrahlung in verschiedenen Dosen in 10%igem FCS Medium.

Die Zellen wurden am Tag 0 mit RNAi behandelt und 24 Stunden später bestrahlt. Der Grad der Apoptoseaktivierung, gemessen anhand der Annexin-V Färbung, zeigt bei den zwei verschiedenen Zelllinien keinen nennenswerten Unterschied.

4.4.2. UV induzierte Apoptose – Nachweis mittels Anti-PARP Blot

4.4.2.1. 24 Stunden nach UV Bestrahlung und 48 Stunden nach RNAi Applikation

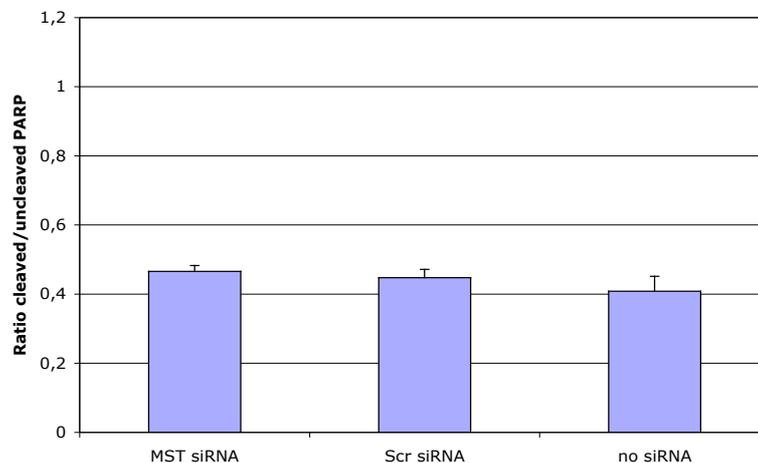
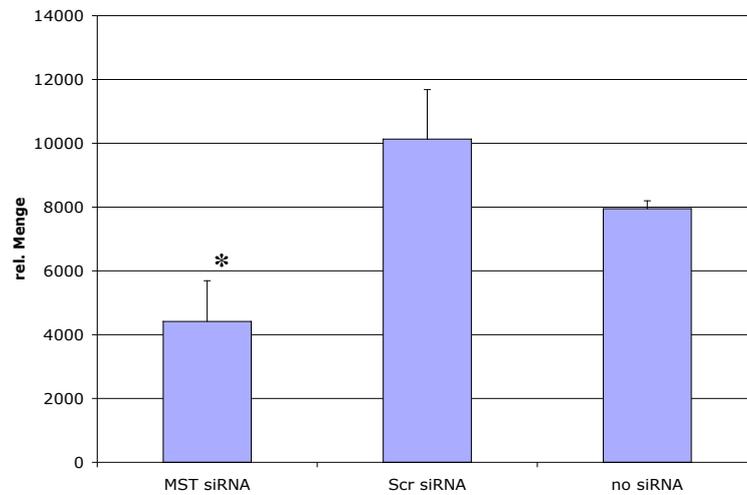


Abbildung 22

Dargestellt ist das Verhältnis von cleaved PARP zu uncleaved PARP 24 h nach UV Bestrahlung und 48 h nach RNAi Applikation; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Hela-Zellen wurden 24 h nach UV-Bestrahlung lysiert und mittels Anti-PARP Blot auf Apoptose untersucht. Die verwendete UV-Dosis betrug 10 J/m^2 . Abbildung 22 zeigt das Verhältnis der Menge von cleaved PARP zu ungespaltenen PARP.

24 Stunden nach Bestrahlung lassen sich keine Unterschiede hinsichtlich des Grades der Apoptose Aktivierung beobachten.

**Abbildung23**

Quantifizierung des Kontroll-Anti-MST1-Blot 24 h nach UV Bestrahlung und 48 h nach RNAi Applikation; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant kleiner als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$).

Abbildung 23 zeigt die Quantifizierung des Anti-MST1-Blots zur gleichen Zeit und bestätigt eine signifikante Suppression der MST1 Produktion in den mit RNAi behandelten Zellen zu ca. 50 %.

4.4.2.2. 48 Stunden nach UV Bestrahlung und 72 Stunden nach RNAi Applikation

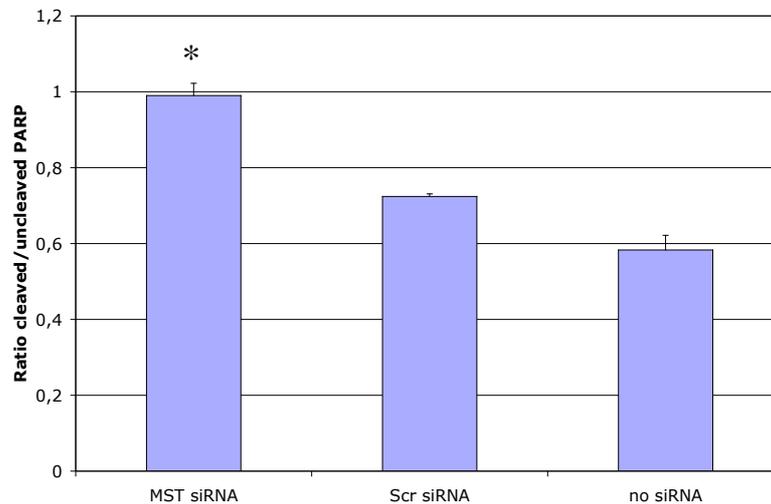
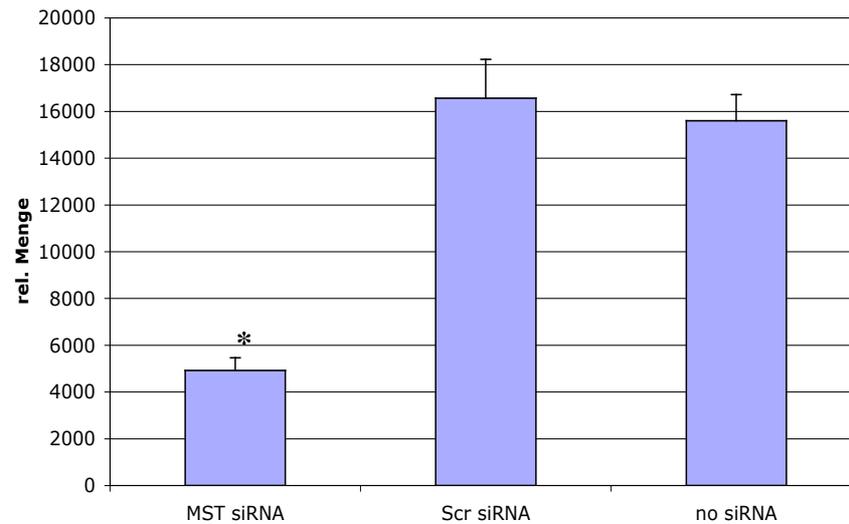


Abbildung 24 Dargestellt ist das Verhältnis von cleaved PARP zu uncleaved PARP 48 h nach UV Bestrahlung und 71 h nach RNAi Applikation; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant größer als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$).

48 Stunden nach UV Bestrahlung mit 10 J/m^2 lässt sich bei den MST1 supprimierten Zellen eine signifikant größere Aktivierung der Apoptose feststellen, als bei den Kontrollzellen (siehe Abb. 24).

**Abbildung25**

Quantifizierung des Kontroll-Anti-MST1-Blots 48 h nach UV Bestrahlung und 72 h nach RNAi Applikation; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant kleiner als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$).

Der zum gleichen Zeitpunkt durchgeführte Kontroll-Anti-MST1-Blot zeigt eine Suppression von MST1 in den mit MST siRNA behandelten Zellen auf ca. 30% in Vergleich zu den Kontrollzellen. In Abbildung 25 ist die elektronische Quantifizierung dieses Blots dargestellt.

4.4.2.3. 72 Stunden nach UV Bestrahlung und 96 Stunden nach RNAi Applikation

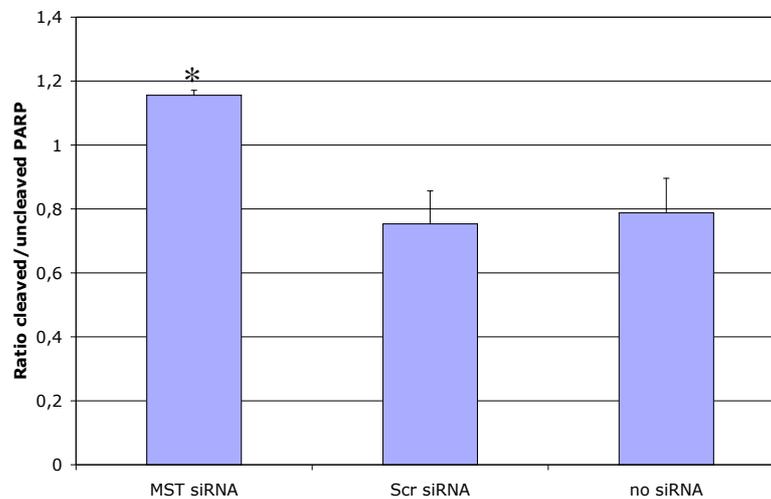
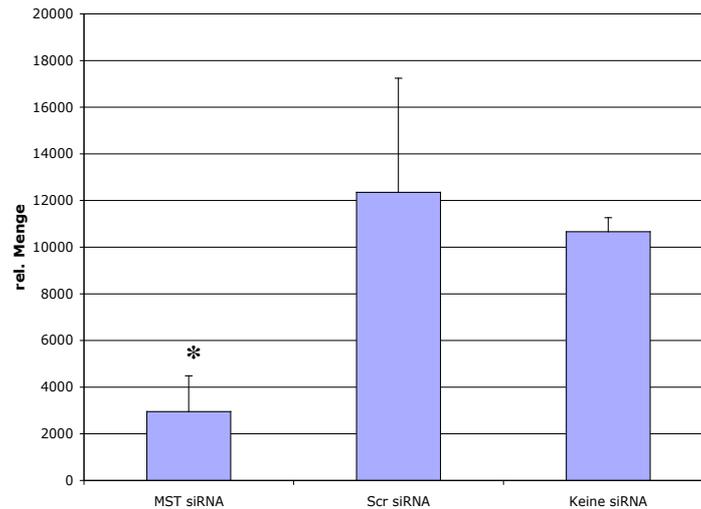


Abbildung 26

Verhältnis von cleaved PARP zu uncleaved PARP 72 h nach UV Bestrahlung und 96 h nach RNAi Applikation; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant größer als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$).

Die 72 Stunden nach UV Bestrahlung durchgeführten Untersuchungen bestätigen die vorigen Ergebnisse. Wieder zeigen die MST1 supprimierten Zellen eine relativ zu den Kontrollen signifikant höhere Apoptoseaktivität. In Abbildung ist eine Quantifizierung des Anti-PARP Blots dargestellt.

**Abbildung 27**

Quantifizierung des Anti-MST1-Blots 72 h nach UV Bestrahlung und 96 h nach RNAi Applikation; n=6; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant kleiner als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$).

Der zur gleichen Zeit durchgeführte Anti-MST1-Blot bestätigt eine Suppression des MST1 Proteins. Der MST1 Gehalt der supprimierten Zellen ist um ca. 70 % geringer als der der Kontrollzellen.

Die Abbildungen 22 bis 27 zeigen, dass MST1 supprimierte Zellen 48 und 72 Stunden nach UV-Bestrahlung mit 10 J/m^2 ein im Vergleich zu nicht supprimierten Zellen signifikant erhöhten Anteil an apoptotischer Zellen aufweisen.

Im Gegensatz dazu, kann 24 Stunden nach Strahlenapplikation kein Unterschied im Apoptose Verhalten der verschiedenen Zellen festgestellt werden.

4.4.3. Wachstum nach UV Bestrahlung

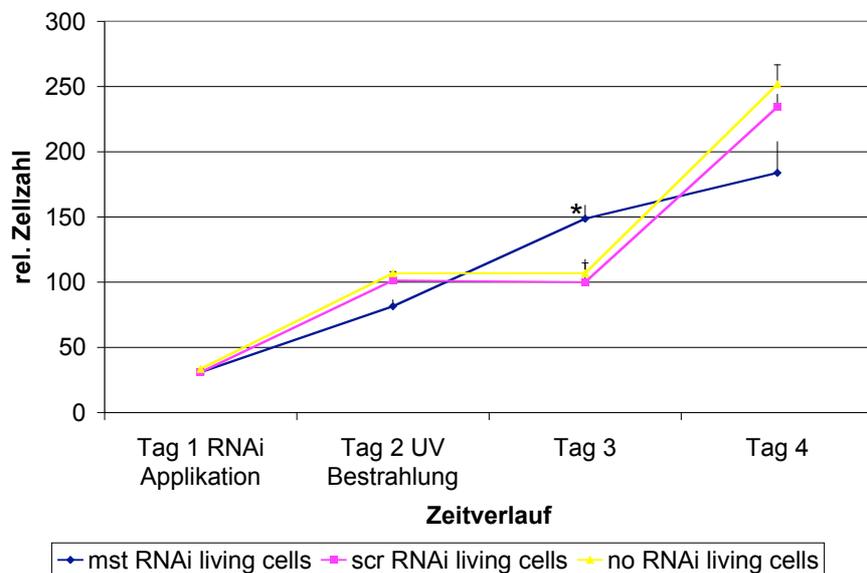


Abbildung 28

Relative Zellzahlen nach UV Bestrahlung mit 10 J/m^2 ; $n=6$; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant größer als die beiden Kontrollwerte am Tag 3 ($p < 0,05$).

Die Abbildung 28 zeigt die drei verschieden behandelten Zellpopulationen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens nach UV Bestrahlung mit 10 J/m^2 .

Bei diesem Versuch wurden die drei Zellpopulationen am Tag 0 in 6 Loch Platten gesät. An Tag 1 erfolgte die Behandlung mit MST siRNA, bzw. SCR siRNA, eine dritte Population wurde ohne siRNA mitgeführt. An Tag 2 wurden die Zellen mit UV Licht (254 nm , 10 J/m^2) bestrahlt. An jedem Tag wurde die absolute Zellzahl ermittelt.

Nach erfolgter Bestrahlung reagierten beide Kontrollzellpopulationen (SCR siRNA und keine RNAi) mit einem Wachstumsstopp, das heißt am zweiten und am dritten Tag wurden etwa gleiche Zellzahlen festgestellt.

Im Gegensatz dazu konnten bei den MST1 supprimierten Zellen keine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit durch die applizierte Strahlung festgestellt werden. Diese Zellen wuchsen mit einer annähernd gleich bleibenden Geschwindigkeit weiter.

An Tag 3 konnten so signifikant mehr MST1-supprimierte Zellen als Kontrollzellen festgestellt werden.

An Tag 4 hatten die Kontrollzellen die MST1-supprimierten Zellen bezüglich des Wachstums wieder eingeholt. Die Zählung der Zellen ergab für beide Kontrollgruppen sogar höhere Zahlen als für die MST1 supprimierte Gruppe.

Um sicher zu gehen, dass während des Versuches die MST1 Produktion in ausreichender Menge unterdrückt wurde, wurden an jedem Versuchstag Zellen auf den MST1 Gehalt hin untersucht (Abbildungen 29 – 31).

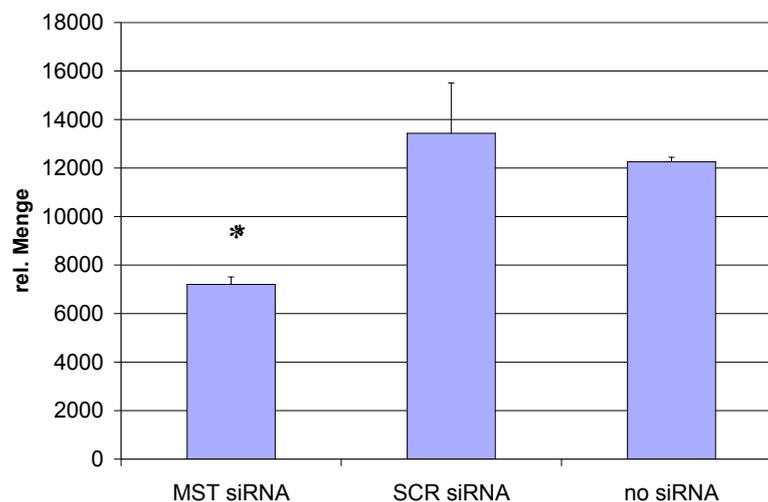
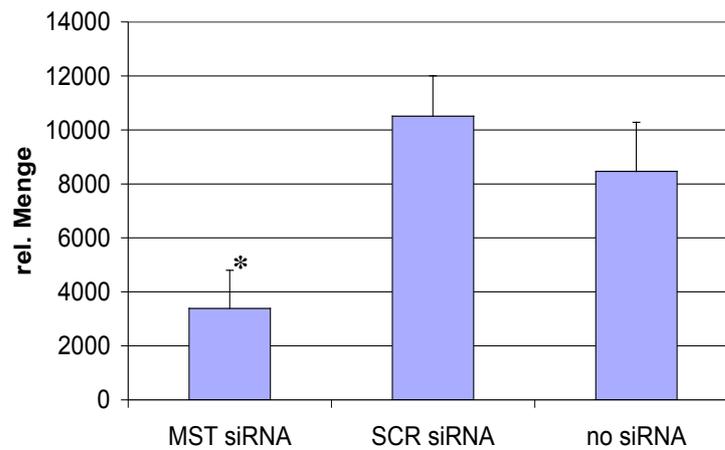


Abbildung 29

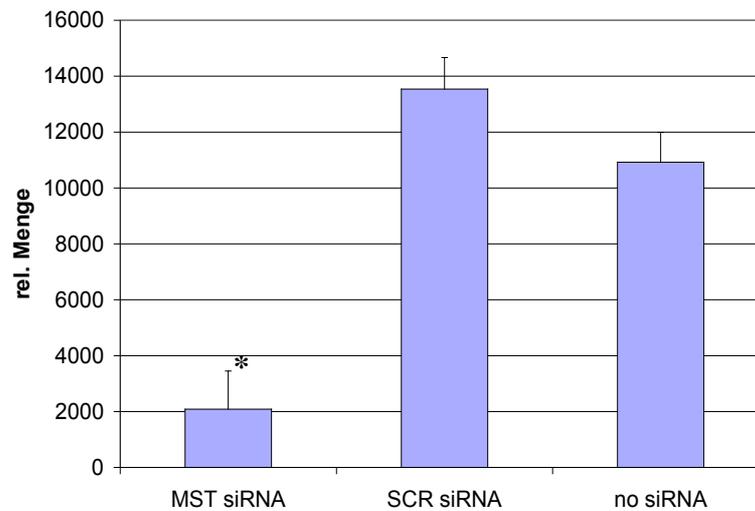
Quantifizierung des Kontroll-Anti-MST1-Blots 24 h nach RNAi und 0 h nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 UV; n=4; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant kleiner als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$).

Der Kontroll-Anti-MST1-Blot zeigt eine signifikante Suppression des MST1 Proteins 24 Stunden nach RNAi Applikation.

**Abbildung 30**

Quantifizierung des Kontroll-Anti-MST1-Blots 48 h nach RNAi und 24 h nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 ; $n=4$; Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte Wert ist signifikant kleiner als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$)

48 Stunden nach RNAi Applikation zeigt der MST1 Blot erwartungsgemäß eine signifikante Suppression des MST1 Gehaltes.

**Abbildung 31**

Quantifizierung des Anti-MST1-Blots 72 h nach RNAi und 48 h nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 UV; $n=4$. Die Standardabweichung ist in Form von Fehlerbalken dargestellt. Der mit * markierte ist signifikant kleiner als die beiden Kontrollwerte ($p < 0,05$).

72 Stunden nach RNAi Applikation ist der MST1 Gehalt der Zellen auf rund 1/5 des Gehaltes der Kontrollzellen gesunken.

4.4.4. Bilder der Zellen nach RNAi und UV

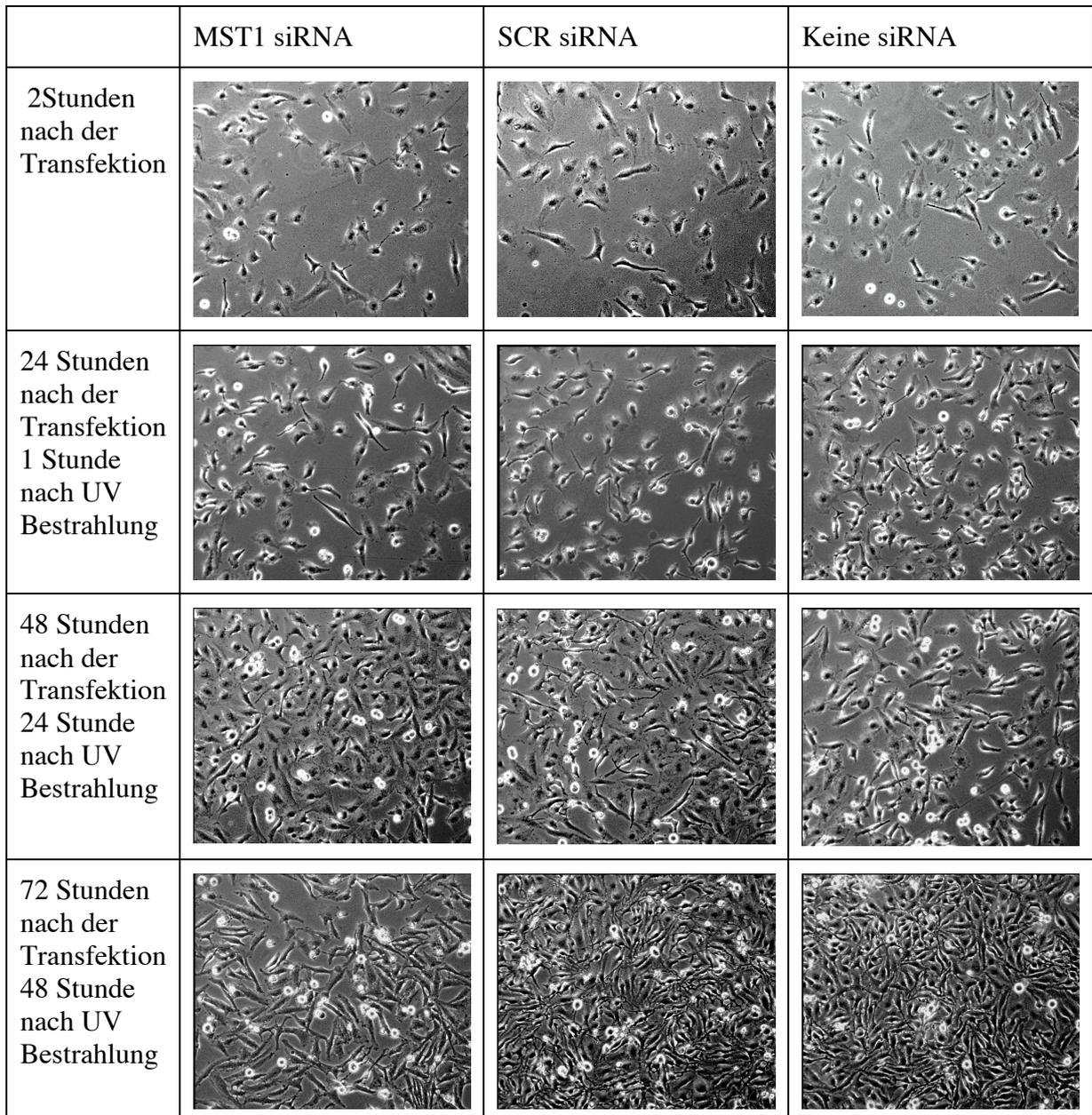


Abbildung 32 Aufnahmen der mit siRNA und UV Strahlung behandelten Zellen

Diese Aufnahmen zeigen die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuches. In der linken Reihe sieht man MST1 supprimierte Zellen, in der mittleren Reihe mit SCR siRNA behandelte Zellen und in der rechten Reihe die unbehandelten Kontrollzellen.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der RNAi Vorversuche

5.1.1. Versuche mit verschiedenen Zelllinien

Wie im Ergebnisteil beschrieben, wurde zunächst versucht MST1 in 293 Zellen (menschliche embryonale Nierenzellen) und in Hela-Zellen (Zervixkarzinom) mittels RNAi Technik zu supprimieren. Dies gelang nur bei den Hela-Zellen. Es gibt Arbeiten, die einen erfolgreichen „Knock-Out“ anderer Proteine an diversen Zelllinien beschreiben (Tuschl und Borkhardt, 2002). Dabei sind die beiden oben genannten Zelllinien mit eingeschlossen. Warum der „Knock-Out“ nur in einer der beiden Zelllinien funktionierte, bleibt zu klären.

Man muss bei der kritischen Betrachtung der RNAi Arbeit bedenken, dass diese Technik erst 2001 eingeführt wurde und längst nicht alle Aspekte dieser Methode verstanden sind (Elbashir et al., 2001b; Caplen et al., 2002)

Ohne Zweifel wird diese Methode aber die genomweite Analyse von Genfunktionen wesentlich erleichtern und wird auch zu der Entwicklung von Gen-spezifischen Medikamenten führen.

5.1.2. Zeitverlauf und Konzentrationsermittlung

Nach unseren Erkenntnissen stellt diese Arbeit die erste erfolgreiche Suppression des MST1 Proteins dar.

Die verwendeten Konzentrationen von siRNA unterschieden sich hinsichtlich ihrer Suppressionspotenz, jedoch ließ sich bei allen eine Suppression erkennen. Gesucht war eine Konzentration, die eine schnell einsetzende und lang wirksame Suppression erzielen würde. Dabei wurden Konzentrationsbereiche gewählt, wie sie auch von anderen Gruppen angegeben wurden (Elbahsir et al. 2001a)

Die Tatsache, dass auch 80 Stunden nach RNAi Applikation noch eine ähnliche Suppression wie nach 60 Stunden nachzuweisen war, wies darauf hin, dass mit 80 Stunden nicht das Ende der Wirkungszeit erreicht ist, sondern auch zu späteren

Zeitpunkten eine Hemmung der Proteinproduktion zu erwarten war. In der Literatur werden Suppressionsphänomene in kultivierten Säugetierzellen von über einer Woche berichtet (Tuschl, 2002).

Es gelang also wiederholt und zuverlässig den MST1 Gehalt von HeLa-Zellen um bis zu 80 % zu supprimieren und so die Grundvoraussetzung für funktionelle Tests zu schaffen.

5.1.3. Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit

Es wurde getestet, ob die Suppression von MST1 zu Änderungen im Wachstumsverhalten der Hela-Zellen führt. Abbildung 13 zeigt den Wachstumsverlauf der MST supprimierten Zellen und zweier Kontrollgruppen. Ergebnis dieser Untersuchung war, dass sich das Wachstumsverhalten unter normalen Umständen (10 % FCS, 37 °C) nach MST1 Suppression nicht ändert.

Die eingefügten Photographien der Zellen (Abb. 14) bestätigen, soweit eine Abschätzung auf Grundlage von Photographien zulässig ist, die durch Zählung in der Neubauer Kammer erzielten Daten.

Eine Suppression von MST1 per se führt also nicht zu einer Änderung des Wachstumsverhaltens.

Diese Ergebnisse lieferten den ersten Hinweis, dass MST1 unter physiologischen Bedingungen nicht in die Zellzykluskontrolle eingreift.

5.2.Diskussion der Vorversuche ohne RNAi:

Für die Vorversuche wurden verschiedene Stressestimuli getestet:

UV C Strahlung

Wasserstoffperoxid als oxidativer Stress

Hitzeschock

Etoposid als Topoisomerase II hemmende Substanz

Durch die Verwendung von verschiedenen Stressestimuli sollte versucht werden, möglichst selektiv diejenige Signalkaskade zu aktivieren, in die das Protein MST1 eingebunden ist.

Die Bestrahlung mit UV-Licht führte zu signifikanten Unterschieden im Verhalten der MST supprimierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Daher wurde hauptsächlich mit dem Stimulus UV-Strahlung weitergearbeitet.

Die Untersuchungen unter Verwendung der anderen Stressformen werden zurzeit von Dr. Aoyama in Boston durchgeführt.

5.2.1. UV induzierte Apoptose und Apoptose Nachweis mittels Anti-PARP-Blot

Die Bestrahlung wurde mit UV-C Strahlung, welche den Wellenlängenbereich von 290 bis 100 nm umfasst, vorgenommen. Die verwendete Apparatur emittierte UV Strahlung mit der Wellenlänge von 254 nm. Diese Wellenlänge liegt sehr nahe am Absorptionsmaximum der DNS (260 nm).

Dass UV (254 nm) Bestrahlung ein Mittel zur Apoptose-Induktion ist, ist lange bekannt. Vermutlich bewirken Strangbrüche der DNS an RNA Polymerase II transkribierten Genen eine Apoptose Induktion (Yamaizumi und Sugano, 1994; Ford und Hanawalt, 1995). Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass UV Bestrahlung auch in der von mir verwendeten HELA Zelllinie zu Apoptose führt (Al-Mohanna et al., 2001).

Wenn die DNS mit UV-C bestrahlt wird, ergeben sich hauptsächlich folgende spezifische Schäden: Es entstehen zum einen Cyclobutyl-Thymin-Dimere und zum anderen die (6-4)Photoprodukte (Balajee et al. 1999).

Die entstandenen DNS Schäden ziehen eine ganze Reihe von Folgeschäden nach sich. So werden nach dem Einwirken von UV-C Strahlung Mutationen, Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidaustausche beobachtet (de Gruijl et al., 2001, Ravanat et al. 2001). Außerdem ist eine Schädigung der Zellwand zu beobachten (Nishigaki et al., 1998).

Abhängig vom Schweregrad der Schädigung sind die Zellen entweder in Lage den Schaden zu reparieren oder sie leiten Apoptose ein (Nishigaki et al., 1998; Shaulian et al., 2000; Zeng et al., 2000).

Gesucht war eine UV Dosierung, die auf der einen Seite einen transienten Zellarrest bewirkt und gegebenenfalls Apoptose induziert, auf der anderen Seite aber den

Grossteil der Zellen nur soweit schädigt, dass diese ihren DNS Schaden reparieren können.

Der Nachweis durch Anti PARP ist ein etabliertes Verfahren zum Apoptosenachweis und zeigt apoptotische Aktivität früher an als andere Apoptosetests an, die beispielsweise auf der Fragmentation der DNS beruhen (Duriez und Shah, 1997).

Die mit UV bestrahlten Hela-Zellen zeigten eine klar UV-dosisabhängige Steigerung des Apoptoselevels (siehe Abb. 16). Wichtig für die späteren Versuche war die Bedingung, dass sich die Zellen sich nach Bestrahlung wieder erholen sollten. Nur so war eine eventuelle genomstabilisierende Funktion von MST1 nachzuweisen.

Da eine massive Bestrahlung der Zellen den programmierten Zelltod auf mehreren Ebenen aktiviert und außerdem auch in der Lage ist eine Nekrose zu verursachen (Lennon et al. 1991), wurde in dieser Arbeit die zukünftige Bestrahlungsdosis auf 10 J/m² festgelegt. So sollte möglichst selektiv nur die UV abhängige Signaltransduktion der apoptotischen Kaskade aktiviert werden. Falls MST1 dabei eine Rolle spielen sollte, könnte dies mit diesen Rahmenbedingungen am ehesten nachgewiesen werden.

5.2.2. H₂O₂ induzierte Apoptose und Apoptose Nachweis mittels Anti-PARP-Blot

Die Behandlung der Hela-Zellen mit Wasserstoffperoxid zeigt eine dosisabhängige Steigerung des Anteils der apoptotischen Zellen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen (Wang et al., 1998). Die differenzierte Wirkung der verschiedenen verwendeten, nachzuvollziehen mittels der Anti-PARP-Blots unterstreicht die Zuverlässigkeit dieser Methode.

Nach der Applikation von Wasserstoffperoxid im Konzentrationsbereich von 400 bis 600 µM wurde eine Steigerung der apoptotischen Aktivität und eine nachfolgende Erholung beobachtet.

Wasserstoffperoxid ist also unter den verwendeten Bedingungen als Stressestimulus verwendbar.

5.2.3. Etoposid induzierte Apoptose - Nachweis mittels Annexin-V

Etoposid hemmt die Aktivität der Topoisomerase II und induziert so DNS Strangbrüche. Eine Apoptose Induzierung bei verschiedenen Zelllinien ist beschrieben worden und Etoposid findet als Chemotherapeutikum breite Anwendung (Martin, 2001).

Die Hela-Zellen wurden dem Wirkstoff mit dem Ziel ausgesetzt, eine Konzentration von Etoposid zu finden, die eine moderate Apoptose Aktivierung induziert. Es wurden Konzentrationen von 0 bis 100 μ M Etoposid verwandt.

In 10%igen FCS haltigem Zellkulturmedium ließen sich 24 h nach erfolgter Applikation keine klar unterscheidbaren Effekte von Etoposid erkennen. Erst bei einer Reduzierung des FCS Gehaltes auf 1% lässt sich eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose erkennen. Allerdings bewirkt eine Reduzierung des FCS Gehaltes auf 1% bei ca. 30% der Zellen die Triggerung der Apoptose. Um bei späteren Versuchen den Effekt von MST1 erkennen zu können, darf ein solcher apoptotischer Hintergrund nicht auftreten. Von weiteren Versuchen mit Etoposid wurde daraufhin abgesehen.

Die Prüfung der Apoptose Detektionsmethode mittels Annexin Färbung verlief dennoch positiv. Bei einer FCS Konzentration von 1% konnten nachvollziehbare Unterschiede hinsichtlich der Apoptose Aktivierung, abhängig von der Etoposid Konzentration, sichtbar gemacht werden. Die Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen die ebenfalls Etoposid induzierte Apoptose durch Annexin-V Färbung nachgewiesen haben (Kimura et al. 2003).

5.3. Diskussion der RNAi Versuche mit Stressstimuli

5.3.1. UV induzierte Apoptose – Nachweis durch Annexin-V

Es wurde beobachtet, ob sich MST1 supprimierte Zellen von WT Zellen hinsichtlich ihrer Antwort auf UV-C Bestrahlung (254 nm) unterscheiden. Es wurden UV Dosen von 0, 10, 30 und 50 J/m² verwendet. Als Nachweismethode diente bei diesem Versuch eine Annexin-V-Färbung und anschließende Quantifizierung der apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Diese wurde 24 Stunden nach Bestrahlung durchgeführt. Der Anteil an Annexin-V positiven Zellen war bei beiden Zellpopulationen bei den jeweils verwendeten UV Dosen fast identisch (siehe Abb. 21). Eine erhöhte oder erniedrigte Strahlenresistenz, 24 Stunden nach Bestrahlung, konnte also bei keiner der Gruppen beobachtet werden. Nicht gezeigte Aufnahmen der Zellen zeigten eine fast vollständige Regeneration der Hela-Zellen nach einer Bestrahlung mit 10 J/m².

5.3.2. UV induzierte Apoptose - Nachweis durch Anti-PARP-Blot

Bei diesem Versuch wurde nur eine UV Dosierung verwendet. Die Vorversuche hatten gezeigt, dass die Zellen sich nach Einwirkung von 10 J/m² relativ gut erholen konnten. 24, 48 und 72 Stunden nach Bestrahlung wurde durch einen Anti-PARP-Blot die Apoptose Antwort gemessen. Verwendet wurden wieder drei Zellpopulationen:

- MST1 supprimierte Zellen
- Kontrollzellen mit Scr siRNA
- Kontrollzellen ohne RNAi

24 Stunden nach UV Einwirkung unterschieden sich die drei verwendeten Zellpopulationen nicht in ihrem Anteil an apoptotischen Zellen (siehe Abb. 22).

Sowohl 48 als auch 72 Stunden nach UV Applikation konnte man bei den MST1 supprimierten Zellen ein signifikant höheres Maß an Apoptose feststellen (siehe

Abbildungen 24 und 26). Die Darstellung der Ratio von „Anti cleaved PARP“ zu „uncleaved PARP“ ergab ca. 40 % höhere Werte für die MST1 supprimierten Zellen.

Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu den Literaturangaben zu stehen. Ura et al. hatten gezeigt, dass eine Überexpression von MST1 in verstärkter Apoptose resultiert (Ura et al., 2001b).

Der Umkehrschluss sollte heißen: Wenn MST1 supprimiert ist, sollte man ein erniedrigtes Maß an Apoptose erwarten. Allerdings muss ein Umkehrschluss in dem komplexen Feld der Apoptose nicht unbedingt Gültigkeit haben, da bei dieser Betrachtungsweise die zahlreichen anderen Apoptose modulierenden Systeme außen vor gelassen werden.

Tatsächlich aber zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Suppression per se keinen direkten Einfluss auf die Zellen hat. Unter physiologischen Bedingungen verändert die Suppression weder Wachstumsgeschwindigkeit, noch den Anteil an apoptotischen Zellen.

Unter unphysiologischen Bedingungen, wie nach UV Bestrahlung kann man nach 24 Stunden ebenfalls keinen Unterschied hinsichtlich des Grades der Apoptose Aktivierung erkennen.

48 Stunden nach Bestrahlung erhöht sich allerdings das Apoptoselevel. Wie sich diese Beobachtungen in Einklang mit der bisher veröffentlichten Literatur bringen lassen, ergibt die Interpretation der Wachstumsversuche im folgenden Abschnitt.

5.3.3. Wachstum nach UV Bestrahlung

MST1 supprimierte und zwei nicht supprimierte Kontrollzellpopulationen wurden mit UV Licht ($10\text{J}/\text{m}^2$) bestrahlt und anschließend auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit hin untersucht.

Nach erfolgter Bestrahlung reagierten beide Kontrollzellpopulationen (SCR siRNA und keine RNAi) mit einem Wachstumsstopp, das heißt am zweiten und am dritten Tag wurden etwa gleiche Zellzahlen festgestellt.

Im Gegensatz dazu konnte bei den MST1 supprimierten Zellen keine Veränderung der Wachstumsgeschwindigkeit durch die applizierte Strahlung festgestellt werden. Diese Zellen wuchsen mit einer annähernd gleich bleibenden Geschwindigkeit weiter. An Tag 3 konnten so signifikant mehr MST1-supprimierte Zellen als Kontrollzellen festgestellt werden.

An Tag 4 hatten die Kontrollzellen die MST1-supprimierten Zellen bezüglich des Wachstums wieder eingeholt. Die Zählung der Zellen ergab für beide Kontrollgruppen sogar höhere Zahlen als für die MST1 supprimierte Gruppe. Die Suppression des MST Gehaltes

MST1 supprimierte Zellen gehen also nicht, oder nicht in gleichem Ausmaß, nach einer Zellschädigung durch UV Licht in einen Zellarrest über.

Die in der Einleitung beschriebenen Kontrollmechanismen, die in einem Zellarrest nach UV Bestrahlung führen sollten (Geyer et al., 2000; Wang et al., 1999), funktionieren bei MST supprimierten Zellen nicht mehr. Die fehlende Möglichkeit dieser Zellen ihr Genom zu reparieren, führt wahrscheinlich zu einer Vervielfältigung genetischer Schäden.

Defekte am Genom sind bereits ein Trigger für Apoptose. So kann schon ein einzelner DNS Strangbruch zu Induktion von Apoptose führen (Rich et al., 2000).

Es ist vorstellbar, dass erst mehr als 24 Stunden nach Bestrahlung vergehen müssen, um einen Unterschied zwischen MST1 supprimierten Zellen und Kontrollzellen bezüglich der Apoptoseaktivierung feststellen zu können. Die Unfähigkeit das Genom

während eines Wachstumsstopps zu reparieren führt also zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität 48 Stunden nach Bestrahlung.

Die MST1 supprimierten Zellen replizieren also ihr defektes Genom, da sie nicht in einen Wachstumsstopp übergehen können, und vervielfältigen so ihre Schäden. MST agiert nach diesen Beobachtungen ähnlich wie das Tumorsuppressorgen p53. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass MST1 in der Lage ist p53 über ein Hilfsprotein zu binden (Lin et al., 2002). Ein regulierender Komplex von MST und p53 ist also vorstellbar.

5.4.Abschließende Diskussion

Die Versuchsergebnisse lassen zwei verschiedene Modellvorstellungen für die Wirkung von MST1 zu.

1. MST1 modelliert die Wirkung von p53
2. MST1 stellt eines der Schlüsselproteine in einem unabhängigen Pfad zur Zellzyklusregulation und Apoptose-Steuerung dar

Zu 1:

Es ist bekannt, dass MST1 ein Protein namens DAP4 bindet. DAP4 steht für „Death-associated Protein“. Überexprimiert man DAP4, kann zunächst kein erhöhtes Maß an Apoptose festgestellt werden. Wird jedoch MST1 mit DAP4 coexprimiert, kann eine erhebliche Steigerung der proapoptotischen Funktion von MST1 beobachtet werden (Lin et al., 2002).

DAP4 verfügt außerdem über die Fähigkeit p53 zu binden. Ein Komplex aus p53, MST1, und DAP4 als Apoptose- und Zellzyklus-regulierender Komplex ist also denkbar. Lin et al. postulierten, dass Dap4 durch die Bindung an MST1 die Kolokalisation von p53 und MST1 ermöglicht und so durch MST1 Apoptose induziert werden kann (Lin et al., 2002).

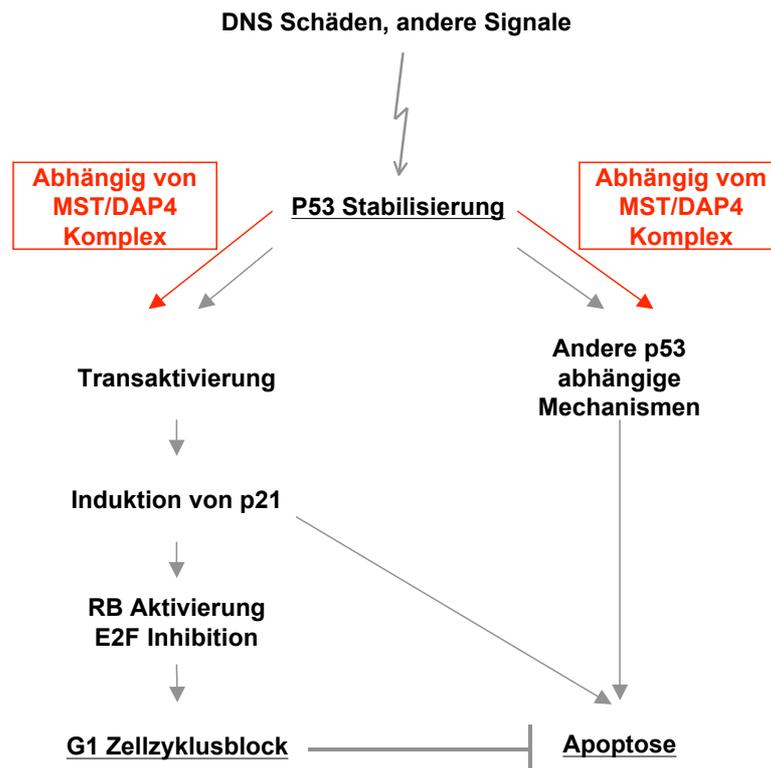


Abbildung 33 Darstellung der Funktion von p53 mit Berücksichtigung der potentiellen Wirkung von MST1; modifiziert nach Funk et al. Abk.: Retinoblastom-Tumorsuppressorgen (RB)

MST1 könnte, ähnlich wie JMY (Junction-mediating and regulatory protein) die proapoptischen Eigenschaft von p53 erhöhen (Shikama et al., 1999; Samuels-Lev et al., 2001), die Funktion von p53 modulieren und so einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der genetischen Unversehrtheit des Gewebes liefern.

Abbildung 33 zeigt ein schon in der Einleitung vorgestelltes Modell der Wirkungsweise von p53. Rot eingezeichnet sind nun die vermuteten Wirkungsstellen von MST1. MST1 könnte die Wirkung des Tumorsuppressorgens p53 modulieren oder die Stabilität von p53 beeinflussen. Damit würde MST1 eine bedeutende Funktion in der Zellzykluskontrolle zukommen.

Zu 2:

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit HeLa-Zellen verwendet wurden, impliziert folgende Überlegungen zu dem p53 Protein: HeLa-Zellen sind Zellen einer Zervixkarzinomzelllinie die durch das humane Papillomavirus transformiert wurden. Es ist bekannt, dass ein Protein des Papillomavirus den Abbau von p53 beschleunigen kann. (Huibregtse et al., 1991). Man könnte also argumentieren, dass mit den hier vorliegenden Ergebnissen ein p53 unabhängiger Signalpfad von MST1 demonstriert wurde. Abbildung 34 zeigt ein mit diesen Gedanken vervollständigtes Modell der zellulären Funktionen von MST1.

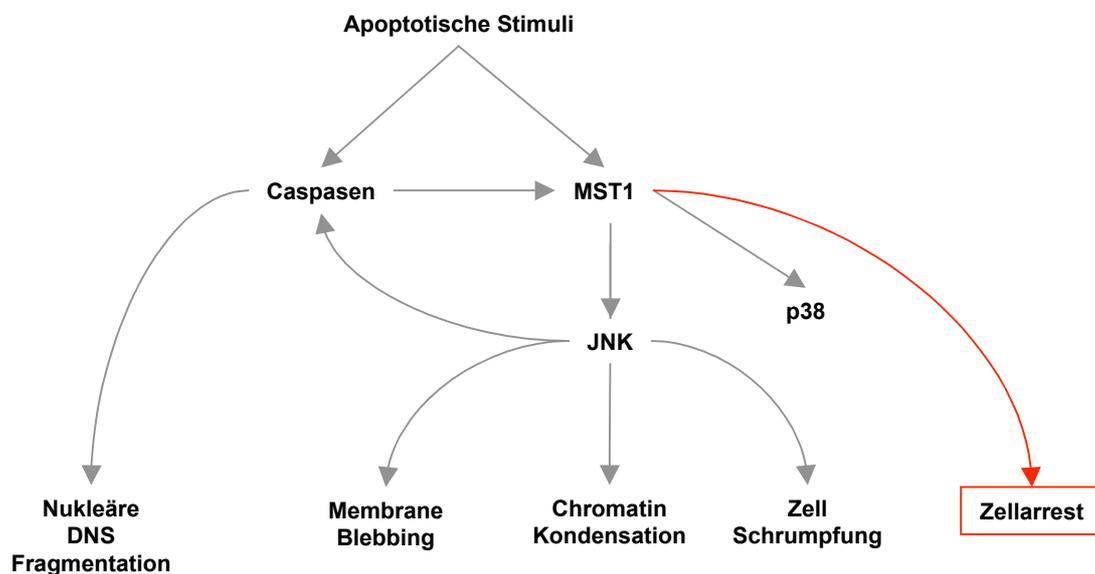


Abbildung 34 Modifiziertes Modell der zellulären Funktion von MST1 nach Ura et al.; Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene Zellzyklus-regulierende Funktion ist rot eingezeichnet.

Auf der anderen Seite gibt es Arbeiten, die eine Akkumulation von p53 nach Einwirken von UVB Strahlung (Kulms et al., 1999) und nach DNS Schädigung in den hier verwendeten HeLa-Zellen beschreiben (Salazar et al., 1997).

Die Antwort auf die Frage welches der beiden Modelle den wirklichen Zustand in der Zelle beschreibt, muss in der Zukunft geklärt werden. Die Tatsache, dass Zellen auch ohne ein intaktes Tumorsuppressorgen p53 in einen UV Strahlen induzierten

Zellarrest treten können (Al-Mohanna et al., 2001), dies aber durch Suppression von MST1 unmöglich gemacht wird, unterstreicht die zentrale Rolle von MST1 im Zellzyklus.

Die Ergebnisse zeigen also deutlich, dass MST1 auf entscheidende Art und Weise an der Steuerung der Zellzyklusregulation beteiligt ist und die genetische Stabilität so von MST1 direkt abhängt.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt arbeitet Dr. Aoyama am Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School in Boston an der Weiterführung dieses Projekts.

5.5. Ausblick und Kritik der eigenen Arbeit

Suppression

Die erreichte Suppression des Proteingehaltes lag in keinem der Versuche bei 100 %. Insofern unterscheidet sich die RNAi Technik klar von anderen „Knock-Out“ Methoden. Die hier aufgeführten Versuche beruhen auf der Hypothese, dass auch eine drastische Suppression eines bestimmten Proteins, und nicht nur sein vollständiges Fehlen, Rückschlüsse auf seine Funktion zulässt.

Kontrolle der Effektivität der RNAi Methode

Nach jedem funktionellen Test erfolgte ein Anti-MST1-Blot, um den Gehalt von MST1 zu vergleichen und die Zellen auf eine hinreichende Suppression hin zu überprüfen.

Es wäre möglich gewesen, parallel zur „RNAi Transfektion“ eine Transfektion mit einem Vektor durchzuführen, der für das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) kodiert. Ausgehend von der Annahme, dass alle diejenigen Zellen, die das GFP aufnehmen und daraufhin unter dem Mikroskop zu erkennen sind, auch siRNA aufnehmen, hätte man dadurch einen Hinweis auf die Effektivität der „RNAi Transfektion“ erhalten. Eine zusätzliche Transfektion hätte jedoch einen höheren Zellstress zur Folge gehabt. Da ein hoher Zellstress auch mit einem höheren Apoptoselevel korrespondiert, wurde von diesen zusätzlichen Untersuchungen Abstand genommen.

Wachstumsvergleich mit anderen Stressesstimuli

Eine interessante Fragestellung ist, ob MST1 nur bei dem durch UV Strahlung induzierten Zellarrest eine entscheidende Rolle spielt, oder auch für den Zellarrest durch andere Stimuli verantwortlich ist.

Analyse des Zellzustandes

Eine genaue Analyse der im Zellarrest befindlichen Zellen wäre von großem Interesse. Dabei wäre festzustellen, in genau welchem Zellarrest sich die nicht supprimierten Zellen befinden, und könnte so weitere Rückschlüsse über die Funktion von MST1 ziehen.

Ein Teil der hier aufgeführten Vorschläge werden zurzeit von Dr. Aoyama, Boston umgesetzt.

6. Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit verwendete RNAi Technik bietet als neues Werkzeug eine hervorragende Möglichkeit zur funktionellen Genanalyse. Nach Suppression einer spezifischen mRNA und damit des Proteins kann auf die Funktion des codierenden Gens geschlossen werden (Hannon 2002). Eine vergleichbare Möglichkeit bietet nur der konventionelle „Knock-Out“ an Mäusen. Dieser erfordert jedoch eine langwierige PCR Konstruktion und eine darauf folgende erfolgreiche Kreuzung der Mäuse.

Im Gegensatz dazu liefert die RNAi Technik eine effektive Methode, die auch in der Zellkultur angewendet werden kann.

Es wurde die biologische Funktion von MST1 untersucht. Neben der proapoptischen Funktion, die von zahlreichen Arbeitsgruppen beschrieben wird (Graves et al., 1998; Watabe et al., 2000; Graves et al., 2001), zeigt diese Arbeit die Zellzyklus-regulierenden Eigenschaften dieser Proteinkinase auf.

Die mittels RNAi durchgeführte Suppression von MST1 verhindert nach erfolgter UV-Bestrahlung den Eintritt in den Zellarrest. Dabei lässt sich bei nicht MST1 supprimierten Zellen zuverlässig ein Arrest im Zellzyklus nach UV Strahlungseinwirkung erzeugen (Al-Mohanna et al. 2001).

So kann geschlussfolgert werden, dass MST1 eine entscheidende Rolle in der UV vermittelten Zellarreststeuerung zukommt.

Diese Vermutung wird durch die Tatsache gestützt, dass MST1 mithilfe des Proteins DAP4 in der Lage ist, das Tumorsuppressorgenprodukt p53, welches einen Zellzyklusblock bewirken kann, zu binden (Lin et al., 2002).

Weiterhin ist interessant zu erwähnen, dass p53 nicht grundsätzlich für den Eintritt in den Zellarrest benötigt wird. Al-Mohanna et al. zeigten, dass Hela-Zellen auch nach Elimination von p53 noch in der Lage sind, nach UV-Strahlung mit einem Zellarrest zu reagieren (Al-Mohanna 2001).

Anders als bei p53 verhindert eine Eliminierung von MST1 den Eintritt in den Zellarrest, wodurch den Zellen keine Zeit bleibt, die durch die UV Strahlung verursachten Schäden zu reparieren.

Nach unseren Erkenntnissen ist dies die erste Arbeit, die auf eine solche Funktion von MST1 hinweist.

Um den genauen Mechanismus zu ermitteln, mit dem MST1 in die Zellsteuerung eingreift, bedarf es noch vieler weiterer Experimente. Um zu erkennen, für welchen Zellarrest MST1 verantwortlich ist, wäre beispielsweise eine genaue Analyse des Zellstadiums der im Zellarrest befindlichen Zellen notwendig. Eine Ableitung aus den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist leider nicht möglich, da ihre Angaben über den UV-Strahlen induzierten Zellarrest stark differieren. So wird sowohl von G1 Phasen-Arrest (Geyer et al. 2000), als auch von G2- und S-Phasen-Arrest (Vincent et al., 1999; Meyer et al., 1999) berichtet.

Auch wenn mit dieser Arbeit noch keine konkreten Hinweise auf praktische oder therapeutische Anwendung geliefert werden können, so lassen sich aus den Ergebnissen jedoch wichtige Informationen für das Verständnis der komplexen Schutzmechanismen der Zelle nach Einwirken von Noxen, insbesondere von UV-Strahlung ableiten.

7. Methodentransfer

7.1. RNAi für HLA-G

Die oben beschriebene RNAi Technik sollte nach meiner Rückkehr aus Boston auch im Plazenta Labor von Dr. Markert an der FSU Jena eingeführt werden.

Analog zu dem in Kapitel 3.12. beschriebenen Vorgehen, konstruierten wir RNAi Oligos für HLA-G. Die darauf folgenden Suppressionsversuche wurden entsprechend der im Methodenteil erwähnten Anleitung ausgeführt.

Jeg-3 Zellen, Zellen einer Chorionkarzinomzelllinie, wurden mit verschiedenen Konzentrationen von HLA-G siRNA behandelt und 36 Stunden später lysiert. Ein Anti HLA-G Western Blot sollte die HLA-G vergleichend quantifizieren.



Abbildung 35 zeigt einen Anti HLA-G Blot. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von RNAi behandelt.

Als Kontrolle dient wieder scrambled siRNA, die genau die gleichen, aber in verschiedener Reihenfolge angeordneten Nukleotide enthält, um mit keinem bekannten menschlichen Protein zu interferieren.

Der Western Blot zeigt eine eindeutige Suppression des HLA-G Gehaltes in den mit HLA-G siRNA behandelten Zellen und demonstriert damit die erfolgreiche Suppression der HLA-G Produktion der Zellen.

Diese Methode bietet ein hervorragendes Werkzeug, um mit funktionellen Tests den Aufgaben von HLA-G näher zu kommen.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematischer Ablauf des Zellzyklus	9
Abbildung 2	Darstellung der wichtigsten p53 abhängigen Signalwege nach DNS Schädigung	12
Abbildung 3	Modell des MAPK Systems	14
Abbildung 4	Modell des MST1 Proteins	17
Abbildung 5	MST1 Modell nach Ura et al	18
Abbildung 6	Modell des RNAi Mechanismus	22
Abbildung 7	Risc als variables Modul in der Zelle	23
Abbildung 8	Alignment der MST1 Sequenz	41
Abbildung 9	Ausschnitt des MST1 siRNA BLAST bei PubMed	42
Abbildung 10	Anti-MST1-Blot 36 h nach Applikation der RNAi Oligos	47
Abbildung 11	Anti-MST1-Blot 60 h nach Applikation der RNAi Oligos	48
Abbildung 12	Anti-MST1-Blot 80 h nach Applikation der RNAi Oligos	49
Abbildung 13	Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeit	50
Abbildung 14	Aufnahmen der Hela-Zellen nach siRNA Applikation	52
Abbildung 15	Anti-PARP-Blot 24 h nach UV Bestrahlung	53
Abbildung 16	Verhältnis von „cleaved PARP“ zu „uncleaved PARP“ 24 h nach UV Bestrahlung	54
Abbildung 17	Hela-Zellen 24 Stunden nach 30 J/m ² UV Strahlung	57
Abbildung 18	Anti-PARP-Blot 48 h nach H ₂ O ₂ Einfluss	56
Abbildung 19	Verhältnis von cleaved PARP zu uncleaved PARP 48 h nach H ₂ O ₂ Einfluss	57
Abbildung 20	Annexin positive Hela-Zellen nach Einfluss von Etoposid	58
Abbildung 21	Annexin positive Hela-Zellen 24 h nach UV Bestrahlung	59

Abbildung 22	Verhältnis von cleaved PARP zu uncleaved PARP 24 h nach UV Bestrahlung und 48 h nach RNAi Applikation	60
Abbildung 23	Anti-MST1-Blot 24 h nach UV Bestrahlung und 48 h nach RNAi Applikation	61
Abbildung 24	Verhältnis von cleaved PARP zu uncleaved PARP 48 h nach UV Bestrahlung und 72 h nach RNAi Applikation	62
Abbildung 25	Anti-MST1-Blot 48 h nach UV Bestrahlung und 72 h nach RNAi Applikation	63
Abbildung 26	Verhältnis von cleaved PARP zu uncleaved PARP 72 h nach UV Bestrahlung und 96 h nach RNAi Applikation	64
Abbildung 27	Anti-MST1-Blot 72 h nach UV Bestrahlung und 96 h nach RNAi Applikation	65
Abbildung 28	Relative Zellzahlen nach UV Bestrahlung mit 10 J/m ²	66
Abbildung 29	Anti-MST1-Blot 24 h nach RNAi und 0 h nach Bestrahlung mit 10 J/m ² UV	67
Abbildung 30	Anti-MST1-Blots 48 h nach RNAi und 24 h nach Bestrahlung mit 10 J/m ² UV	68
Abbildung 31	Anti-MST1-Blots 72 h nach RNAi und 48 h nach Bestrahlung mit 10 J/m ² UV	69
Abbildung 32	Aufnahmen der mit siRNA und UV Strahlung behandelten Zellen	70
Abbildung 33	Funktion von p53 unter Berücksichtigung von MST1	81
Abbildung 34	modifiziertes Modell der Funktion von MST1	82
Abbildung 35	HLA-G Blot nach RNAi	87

9. Literatur

- Al-Mohanna MA, Al-Khodairy FM, Krezolek Z, Bertilsson PA, Al-Houssein KA and Aboussekhra A. (2001). p53 is dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G(1) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 22:573-578.
- Angell SM and Baulcombe DC. (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *Embo J* 16:3675-3684.
- Balajee A.S., May A. and Bohr V.A. (1999). DNA repair of pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in the ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 27:2511-2520
- Barry MA, Reynolds JE and Eastman A. (1993). Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* 53:2349-2357.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
- Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL and Ji X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure (Camb)* 9:1225-1236.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Caplen N.J., Taylor J.P., Statham V.S., Tanaka F., Fire A., and Morgan R.A. (2002). Rescue of polyglutamine-mediated cytotoxicity by double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Hum. Mol. Genet.* 11:175-184
- Carmell MA, Zhang L, Conklin DS, Hannon GJ and Rosenquist TA. ((2003)). Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* 10:91-92.
- Chen RH, Sarnecki C and Blenis J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12:915-927.
- Cogoni C and Macino G. (1999). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 286:2342-2344.
- Cohen JJ. (1993). Apoptosis. *Immunol Today* 14:126-130.
- Creasy CL, Ambrose DM and Chernoff J. (1996). The Ste20-like protein kinase, Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain. *J Biol Chem* 271:21049-21053.
- Creasy CL and Chernoff J. (1995). Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. *J Biol Chem* 270:21695-21700.
- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G and Slack RS. (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158:507-517.
- Dan I, Watanabe NM and Kusumi A. (2001). The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11:220-230.
- Datta R, Hass R, Gunji H, Weichselbaum R and Kufe D. (1992). Down-regulation of cell cycle control genes by ionizing radiation. *Cell Growth Differ* 3:637-644.
- De Gruijl F.R., van Kranen H.J., and Mullenders L.H. (2001). UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63:19-27

- De Souza PM, Kankaanranta H, Michael A, Barnes PJ, Giembycz MA and Lindsay MA. (2002). Caspase-catalyzed cleavage and activation of Mst1 correlates with eosinophil but not neutrophil apoptosis. *Blood* 99:3432-3438.
- Dernburg AF, Zalevsky J, Colaiacovo MP and Villeneuve AM. (2000). Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes Dev* 14:1578-1583.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS and Bradley A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356:215-221.
- Dougherty WG, Lindbo JA, Smith HA, Parks TD, Swaney S and Proebsting WM. (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 7:544-552.
- Downward J. (1998). Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 8:49-54.
- Dudley NR, Labbe JC and Goldstein B. (2002). Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4191-4196.
- Duriez PJ and Shah GM. (1997). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 75:337-349.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. (2001)a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W and Tuschl T. (2001)b. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20:6877-6888.
- Elmayan T, Balzergue S, Beon F, Bourdon V, Daubremet J, Guenet Y, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S, Vialle T, Wostrikoff K and Vaucheret H. (1998). *Arabidopsis* mutants impaired in cosuppression. *Plant Cell* 10:1747-1758.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- English JM and Cobb MH. (2002). Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends Pharmacol Sci* 23:40-45.
- Enoch T and Norbury C. (1995). Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. *Trends Biochem Sci* 20:426-430.
- Fire A, Albertson D, Harrison SW and Moerman DG. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113:503-514.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Ford JM and Hanawalt PC. (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8876-8880.
- Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y and Han J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295:1291-1294.

- Geyer R.K., Nagasawa H., Little J.B. and Maki C.G. (2000). Role and Regulation of p53 during an Ultraviolet Radiation-induced G₁ Cell Cycle Arrest. *Cell Growth & Differentiation* 11:149-156
- Graves JD, Draves KE, Gotoh Y, Krebs EG and Clark EA. (2001). Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276:14909-14915.
- Graves JD, Gotoh Y, Draves KE, Ambrose D, Han DK, Wright M, Chernoff J, Clark EA and Krebs EG. (1998). Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *Embo J* 17:2224-2234.
- Guo S and Kemphues KJ. (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.
- Haffner R and Oren M. (1995). Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev* 5:84-90.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D and Hannon GJ. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296.
- Hannon GJ. (2002). RNA interference. *Nature* 418:244-251.
- Hartwell LH and Kastan MB. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266:1821-1828.
- Hartwell LH and Weinert TA. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-634.
- Hemann MT, Fridman JS, Zilfou JT, Hernando E, Paddison PJ, Cordon-Cardo C, Hannon GJ and Lowe SW. ((2003)). An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet*.
- Hengartner MO and Horvitz HR. (1994). The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:243-246.
- Hermeking H, Funk JO, Reichert M, Ellwart JW and Eick D. (1995). Abrogation of p53-induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an inhibitor of p21WAF1/CIP1/SDI1. *Oncogene* 11:1409-1415.
- Herzinger T, Funk JO, Hillmer K, Eick D, Wolf DA and Kind P. (1995). Ultraviolet B irradiation-induced G₂ cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene* 11:2151-2156.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.
- Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S and Evan GI. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* 278:1305-1309.
- Huibregtse JM, Scheffner M and Howley PM. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* 10:4129-4135.
- Hunter T and Pines J. (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79:573-582.
- Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA and Grant S. (1994). Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:73-77.

- Johnson GL and Lapadat R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912.
- Jorgensen R. (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol* 8:340-344.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51:6304-6311.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG and Plasterk RH. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99:133-141.
- Kimchi A. (1998). DAP genes: novel apoptotic genes isolated by a functional approach to gene cloning. *Biochim Biophys Acta* 1377:F13-33.
- Kimura E., Aoki S., Kikuta E. and Koike T. ((2003)) A macrocyclic zinc(II) fluorophore as a detector of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7:3731-6.
- Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones PA, Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME and Kimchi A. (1997). DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 15:403-407.
- Ko LJ and Prives C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054-1072.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV and Kastan MB. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7491-7495.
- Kulms D, Poppelmann B, Yarosh D, Luger TA, Krutmann J and Schwarz T. (1999). Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7974-7979.
- Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K and Grill LK. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1679-1683.
- Kyriakis JM. (1999). Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J Biol Chem* 274:5259-5262.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J and Woodgett JR. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW and et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.
- Lee KK, Murakawa M, Nishida E, Tsubuki S, Kawashima S, Sakamaki K and Yonehara S. (1998). Proteolytic activation of MST/Krs, STE20-related protein kinase, by caspase during apoptosis. *Oncogene* 16:3029-3037.
- Lee KK, Ohyama T, Yajima N, Tsubuki S and Yonehara S. (2001). MST, a physiological caspase substrate, highly sensitizes apoptosis both upstream and downstream of caspase activation. *J Biol Chem* 276:19276-19285.

- Lennon S.V., Martin S.J and Cotter T.G. (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 2:203-14.
- Levine AJ, Momand J and Finlay CA. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351:453-456.
- Levy-Strumpf N and Kimchi A. (1998). Death associated proteins (DAPs): from gene identification to the analysis of their apoptotic and tumor suppressive functions. *Oncogene* 17:3331-3340.
- Lin Y, Khokhlatchev A, Figeys D and Avruch J. (2002). Death-associated Protein 4 Binds MST1 and Augments MST1-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 277:47991-48001.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT and Wang X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8461-8466.
- Lu X and Lane DP. (1993). Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* 75:765-778.
- Makela TP, Tassan JP, Nigg EA, Frutiger S, Hughes GJ and Weinberg RA. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* 371:254-257.
- Mamay CL, Mingo-Sion AM, Wolf DM, Molina MD and Van Den Berg CL. ((2003)). An inhibitory function for JNK in the regulation of IGF-I signaling in breast cancer. *Oncogene* 22:602-614.
- Martienssen RA and Colot V. (2001). DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293:1070-1074.
- Martin M. (2001). Platinum compounds in the treatment of advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2:190-208; discussion 209.
- Massague J and Polyak K. (1995). Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr Opin Genet Dev* 5:91-96.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA and Matzke AJ. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* 19:5194-5201.
- Meyer K.M., Hess S.M., Tlsty T.D., and Leadon S.A. (1999). Human mammary epithelial cells exhibit a differential p53-mediated response following exposure to ionizing radiation or UV light. *Oncogene* 18:5795:805
- Miyashita T and Reed JC. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299.
- Morgan DO. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
- Mourrain P, Beclin C, Elmayer T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA and Vaucheret H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101:533-542.
- Murray A. (1995). Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* 81:149-152.
- Murray AW. (1992). Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* 359:599-604.
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME and Dixit VM. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is

- recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* 85:817-827.
- 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.
- Nishigaki R., Mitani H., and Shima A. (1998). Evasion of UVC-induced apoptosis by photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Exp Cell Res* 244:43-53
- Nykanen A, Haley B and Zamore PD. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107:309-321.
- O'Connor PM, Ferris DK, Hoffmann I, Jackman J, Draetta G and Kohn KW. (1994). Role of the *cdc25C* phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9480-9484.
- Paddison PJ and Hannon GJ. (2002). RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell* 2:17-23.
- Pal-Bhadra M, Bhadra U and Birchler JA. (1997). Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-*Adh* transgenes is Polycomb dependent. *Cell* 90:479-490.
- Pal-Bhadra M, Bhadra U and Birchler JA. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol Cell* 9:315-327.
- Pasquinelli AE and Ruvkun G. (2002). Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:495-513.
- PubMed BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- Ravanat J.L., Douki T., and Cadet J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its compounds. *J Photochem Photobiol B* 63:88-102
- Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA and Kimchi A. (2001). DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 3:1-7.
- Ray LB and Sturgill TW. (1988). Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3753-3757.
- Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ and Rodan GA. (1999). Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of *mst1* kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase. *J Biol Chem* 274:34967-34973.
- Rich T, Allen RL and Wyllie AH. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407:777-783.
- Romano N and Macino G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6:3343-3353.
- Ruiz MT, Voinnet O and Baulcombe DC. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10:937-946.
- Sakahira H, Enari M, Ohsawa Y, Uchiyama Y and Nagata S. (1999). Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr Biol* 9:543-546.
- Salazar AM, Ostrosky-Wegman P, Menendez D, Miranda E, Garcia-Carranca A and Rojas E. (1997). Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutat Res* 381:259-265.

- Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T and Lu X. (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8:781-794.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM and Haslett C. (1989). Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83:865-875.
- Schiebel W, Pelissier T, Riedel L, Thalmeir S, Schiebel R, Kempe D, Lottspeich F, Sanger HL and Wassenegger M. (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* 10:2087-2101.
- Schwartzman RA and Cidlowski JA. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14:133-151.
- Serrano M, Hannon GJ and Beach D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707.
- Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D and DePinho RA. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85:27-37.
- Shaulian E., Schreiber M., Piu F., Beeche M., Wagner E.F., and Karin M. (2000). The mammalian UV response: c-jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103:897-907
- Sherr CJ and Roberts JM. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.
- Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M and La Thangue NB. (1999). A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell* 4:365-376.
- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH and Fire A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-476.
- Susin SA, Dugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC and Kroemer G. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192:571-580.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A and Mello CC. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99:123-132.
- Taylor LK, Wang HC and Erikson RL. (1996). Newly identified stress-responsive protein kinases, Krs-1 and Krs-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10099-10104.
- Thornberry NA. (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 53:478-490.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT and Nicholson DW. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272:17907-17911.
- Tijsterman M, Ketting RF, Okihara KL, Sijen T and Plasterk RH. (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science* 295:694-697.
- Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA and Davis RJ. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288:870-874.

- Tsujimoto Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3:697-707.
- Tuschl T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2:239-245.
- Tuschl T. (2002). Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20:446-448.
- Tuschl T. and Borkhardt A. (2002). Small interfering RNAs. *Molecular Interventions* 3:158-167
- Ura S, Masuyama N, Graves JD and Gotoh Y. (2001)a. Caspase cleavage of MST1 promotes nuclear translocation and chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10148-10153.
- Ura S, Masuyama N, Graves JD and Gotoh Y. (2001)b. MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways. *Genes Cells* 6:519-530.
- van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN and Stuitje AR. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2:291-299.
- Van Furth R and Van Zwet TL. (1988). Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells. *J Immunol Methods* 108:45-51.
- Vaux DL, Haecker G and Strasser A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76:777-779.
- Vermes I and Haanen C. (1994). Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem* 31:177-246.
- Vincent F., Deplanque G., Ceraline J., Duclos B. and Bergerat J.P., (1999). p53-independent regulation of cyclin B1 in normal human fibroblasts during UV-induced G2-arrest. *Biol Cell* 91:665-74
- Voinnet O, Lederer C and Baulcombe DC. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103:157-167.
- von Ahlsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E and Newmeyer DD. (2000). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release. *J Cell Biol* 150:1027-1036.
- Wang J.A., Fan S., Yuan R.Q., Ma Y.X., Meng Q., Goldberg I.D., Rosen E.M. (1999). Ultraviolet radiation down-regulates expression of the cell-cycle inhibitor p21WAF1/CIP1 in human cancer cells independently of p53. *Int J Radiat Biol.* 3:301-16.
- Wang X, Martindale JL, Liu Y and Holbrook NJ. (1998). The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* 333 (Pt 2):291-300.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L and Sanger HL. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76:567-576.
- Watabe M, Kakeya H, Onose R and Osada H. (2000). Activation of MST/Krs and c-Jun N-terminal kinases by different signaling pathways during cytotrienin A-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275:8766-8771.
- Watabe M, Kakeya H and Osada H. (1999). Requirement of protein kinase (Krs/MST) activation for MT-21-induced apoptosis. *Oncogene* 18:5211-5220.
- Weinberg RA. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
- White E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10:1-15.

-
- Yamaizumi M and Sugano T. (1994). U.v.-induced nuclear accumulation of p53 is evoked through DNA damage of actively transcribed genes independent of the cell cycle. *Oncogene* 9:2775-2784.
- Young LS, Dawson CW and Eliopoulos AG. (1997). Viruses and apoptosis. *Br Med Bull* 53:509-521.
- Zeng X., Keller D., Wu L., and Lu H. (2000). UV but not gamma irradiation accelerates p53-induced apoptosis of teratocarcinoma cells by repressing MDM2 transcription. *Cancer Res* 60:6184-8
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, Remington L, Jacks T and Brash DE. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372:773-776.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.

10. Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Markert für die fachliche Betreuung, die Vermittlung des Forschungsaufenthaltes an der Harvard Medical School, Boston und die freundschaftlichen Ratschläge.

Ich bedanke mich bei Dr. Avruch, Dr. Khokhlatchev und Dr. Volk, die mich während meines Aufenthaltes in Boston hervorragend betreuten und unterstützten.

Allen Mitarbeitern der Labore in Jena und Boston danke ich für ihre gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.

Für die freundliche Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums bedanke ich mich beim Boehringer Ingelheim Fond.

Ich bedanke mich bei meiner Freundin Sabine für die kritische Durchsicht der Arbeit und ihre hilfreichen Hinweise.

Meiner Familie danke ich für so vieles.

Lebenslauf Tobias Wengenmayer

PERSÖNLICHE INFORMATION

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsort: Frankfurt am Main

SCHULISCHE AUSBILDUNG

- 1983 – 1987 ■ Grundschule Wilhelm Busch Schule in Hofheim am Taunus
- 1987 – 1996 ■ Main Taunus Schule in Hofheim am Taunus
- Juni 1996 ■ Abitur an der Main Taunus Schule

ZIVILDIENST

- August 1996 bis August 1997 ■ Kliniken des Main Taunus Kreises, Einsatz im Pflegebereich

STUDIUM

- Oktober 1997 ■ Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich – Schiller – Universität
- September 1999 ■ Physikum
- September 2000 ■ 1. Staatsexamen
- August 2002 ■ 2. Staatsexamen
- Februar 2001 bis Oktober 2001 ■ Forschungstätigkeit im Massachusetts General Hospital und Beth Israel Hospital, Harvard Medical School in Boston, Massachusetts

AUSZEICHNUNGEN

- 1994 ■ 1.Landessieger Jugend Forscht, 3. Bundessieger Jugend Forscht, 1994
- seit März 1996 ■ Stipendiat der Deutschen Studienstiftung, seit März `96
- Februar bis Oktober 2001 ■ Promotionsstipendium der Studienstiftung für den Aufenthalt an der Harvard Medical School, Februar `01 bis Oktober `01
- Februar bis Oktober 2001 ■ Forschungsstipendium des Boehringer Ingelheim Fonds

Jena, den 10. April 2003

(Tobias Wengenmayer)

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst geschrieben habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Udo Markert,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder eine andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 10. April 2003

(Tobias Wengenmayer)
