

Aus dem
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT)
Leiter Prof. Dr. Rolf Müller
unter der Anleitung von Prof. Dr. Stefan Gaubatz
der Philipps-Universität Marburg

Die Rolle von Lin-9 und B-Myb in der Zellzyklusregulation humaner Zellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Medizin
dem Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lena Rein
aus Göttingen

Marburg
2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 26.03.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. S. Gaubatz

Korreferent: PD Dr. G. Zugmaier

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1 LIN-9 als neuer Tumorsuppressor mit Rolle im Rb-Signalweg	6
1.2 Der Rb-Signalweg	6
1.2.1 E2F und Rb regulieren den Zellzyklus	7
1.3 pRb in C.elegans und D. Melanogaster	10
1.3.1 Der SynMuv-Komplex in C. elegans	10
1.3.2 Der dREAM-Komplex in D. melanogaster	11
1.4 Gibt es einen humanen SynMuv-Komplex?	12
1.4.1 LIN-9	12
1.4.2 B-MYB	14
1.5 Gibt es eine Funktion des SynMuv-Komplexes in G2/M?	16
1.5.1 Mitose checkpoint und chromosomale Instabilität	16
1.6. RNAi	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Stämme und Zelllinien	20
2.1.1.1 Bakterienstämme	20
2.1.1.2 Zelllinien	20
2.1.1.3 Medien	20
2.1.2 Plasmide	21
2.1.3 Oligonukleotide	21
2.1.4 Oligonukleotide für shRNA	21
2.1.5 qRT-PCR-Primer	22
2.1.5 Puffer und Lösungen	23
2.1.4.1 Puffer	23
2.1.4.2 Lösungen	25
2.1.5 Chemikalien	27
2.1.6 Standards und Enzyme	27
2.1.6.1 Standards	27
2.1.6.2 Enzyme	28
2.1.7 Antikörper	28
2.1.8 Kitsysteme	29
2.1.9 Geräte	29
2.1.10 Firmen	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur	30
2.2.1.1 Kultivierung, Einfrieren, Auftauen von Zellen	30
2.2.1.2 Transiente Transfektion von HeLa Zellen mit Ca-Phosphat	32
2.2.1.3 Transiente Transfektion von Phoenix Zellen mit Ca-Phosphat	32
2.2.1.4 Stabile Integration von DNA durch retrovirale Infektion	33
2.2.1.5 Arretierung von Zellen in der Mitose durch Nocodazol	34
2.2.1.6 Synchronisierung von Zellen mit Thymidin	34
2.2.1.7 Synchronisierung der Zellen durch Kontaktinhibition	35

2.2.1.8 Inhibition von p53 mit Pifithrin- α	35
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	35
2.2.2.1 Design der shRNA-Oligonukleotide	35
2.2.2.2 Anlagern von Oligonukleotiden	36
2.2.2.3 Schneiden von DNA	36
2.2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	37
2.2.2.5 Aufreinigen von DNA-Fragmenten	38
2.2.2.6 Ligation	39
2.2.2.7 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	39
2.2.2.8 Präparative Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien	40
2.2.2.9 RNA-Isolierung mit TRIZOL	41
2.2.2.10 cDNA-Synthese	41
2.2.2.11 Real-time-PCR	42
2.2.3 Zellbiologische Methoden	43
2.2.3.1 FACS	43
2.2.3.1.1 Eindimensional (PI)	43
2.2.3.1.2 Zweidimensional (PI und BrdU)	44
2.2.3.1.3 Berechnung der Bewegung im Zellzyklus und DNA-Synthese-Zeit	45
2.2.3.2 Immunfluoreszenz	46
2.2.4 Biochemische Methoden	46
2.2.4.1 Herstellung von Zellextrakten	46
2.2.4.1.1 Lyse in TNN	46
2.2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford	47
2.2.4.2 Western Blot	47
2.2.4.2.1 SDS-Gelelektrophorese	48
2.2.4.2.2 Übertragen von Proteinen auf PVDF-Membranen: Nass-Blot	49
2.2.4.2.3 Antikörperreaktion und Filmentwicklung	50
2.2.4.3 Immunpräzipitation	51
3. ERGEBNISSE	52
3.1 Test neuer shRNA-Sequenzen gegen LIN-9 und B-MYB	52
3.1.1 Depletion von LIN-9 und B-MYB durch shRNAs in HeLa Zellen	52
3.1.2 Depletion von B-MYB durch shRNA in SHEP und BJ	53
3.1.3 Neue shRNA gegen LIN-9 führt in SHEP und BJ zu Apoptose	54
3.2 Charakterisierung von LIN-9 und B-MYB defizienten Zellen	55
3.2.1 Die Expression von Checkpoint-Genen ist in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP vermindert	55
3.2.2 LIN-9 und B-MYB depletierte SHEP-Zellen weisen mitotischen Spindel-Checkpoint-Defekt auf	57
3.2.3 Nach Thymidin-Block und Nocodazol-Behandlung in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP-Zellen tritt vermehrt Apoptose auf	61
3.2.4 Geringere Konzentration von phospho-Histon H3 nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion	63
3.2.5 Die durch Nocodazol und Thymidin induzierte Apoptose zeigt keine Abhängigkeit von p53 und p21	63
3.2.6 Hinweise auf Verzögerung in G2/M in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen	65
3.2.7 LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen treten verzögert in die G1-Phase ein	67
4. DISKUSSION	70
4.1 Synthese und Test neuer shRNA-Sequenzen gegen LIN-9 und B-MYB	70
4.2 Charakterisierung von LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen	70
4.2.1 LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen zeigen Mitose-Checkpoint-Defekt Phänotyp	70
4.2.2 LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen zeigen eine erhöhte Apoptoserate	71
4.2.3 Die Effekte in LIN-9- und B-MYB depletierten Zellen sind p53-unabhängig	71
4.2.4 Die DNA-Synthese ist unbeeinflusst von LIN-9- und B-MYB-Depletion	72
4.2.4 Führt der Verlust von Lin-9 bzw. B-Myb zu einem defekten Mitose-Checkpoint?	73

5. ZUSAMMENFASSUNG	75
6. ENGLISH SUMMARY	77
7. ANHANG	79
7.1 Abbildungsverzeichnis	79
7.2 Tabellenverzeichnis	80
7.3 Literaturverzeichnis	81
7.4 Abkürzungsverzeichnis	91
7.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer	95
7.6 Danksagung	96
7.7 Erklärung an Eides statt	97

1. EINLEITUNG

1.1 LIN-9 als neuer Tumorsuppressor mit Rolle im Rb-Signalweg

LIN-9 wurde kürzlich als neues pRb-assoziiertes Protein beschrieben (Gagrica et al., 2004) und kooperiert mit diesem bei der Transaktivierung differenzierungsspezifischer Gene. Zudem konnte gezeigt werden, dass es in Soft-Agar-Assays als Tumorsuppressor wirkt und dass die, normalerweise für die Transformation benötigte, Inaktivierung von Rb (Hahn et al., 1999) durch eine Herunterregulation von LIN-9 ersetzt werden kann. Die Rolle von LIN-9 im Rb-Signalweg wurde intensiv in *Caenorhabditis elegans* untersucht und zudem wurde ein Homolog (Mip130/TWIT) als Bestandteil des ersten nativen Rb-Komplex in *Drosophila melanogaster* aufgereinigt. Um die Zusammenhänge zu verstehen, soll im Folgenden kurz auf die Rolle von pRb im Zellzyklus und seine Rolle in den Modellorganismen *C. elegans* und *D. melanogaster* eingegangen werden sowie auf die gewählten Ansätze zur weiteren Untersuchung von LIN-9 im humanen System.

1.2 Der Rb-Signalweg

Friend et al. gelang es 1986 Rb als Tumorsuppressor zu identifizieren. Familiäre Mutationen im Rb-Allel führen im frühen Kindesalter zum meist beidseitig auftretenden Retinoblastom. Aber auch in vielen sporadisch auftretenden Tumoren sind Mutationen in Rb oder ein gestörter Rb-Signalweg häufig nachweisbar (z. B.: kleinzelliges Bronchial-Ca, Melanome, Pankreas- und Blasen-Ca,...zur Übersicht siehe: Bartek et al., 1997).

Der hochkonservierte Rb-Signalweg und seine Rolle im Zellzyklus sind mittlerweile relativ gut verstanden: pRb, das Produkt von Rb, liegt hyper- oder hypophosphoryliert vor, wobei letzteres an den Transkriptionsfaktor E2F bindet und somit eine aktive Repression von E2F-Zielgenen vermittelt. Die Phosphorylierung von pRb wird über Cyclin-abhängige-Kinasen (CDK) gesteuert: Cyclin D1 stimuliert die Kinaseaktivität von CDK4, was zu einer Phosphorylierung und somit Inhibierung von pRb führt, E2F wird freigegeben, die Zielgene transkribiert. Wird CDK4 durch die Cyclin-abhängige-

Kinasen-Inhibitor (CKI) p16/Ink4a gehemmt, fördert dies im Gegenzug den Zellzyklusarrest (Bernards 1997; Dyson 1998; Nevins 1998). Außerdem hat pRb eine bedeutende Rolle in Apoptose, Differenzierung und Seneszenz.

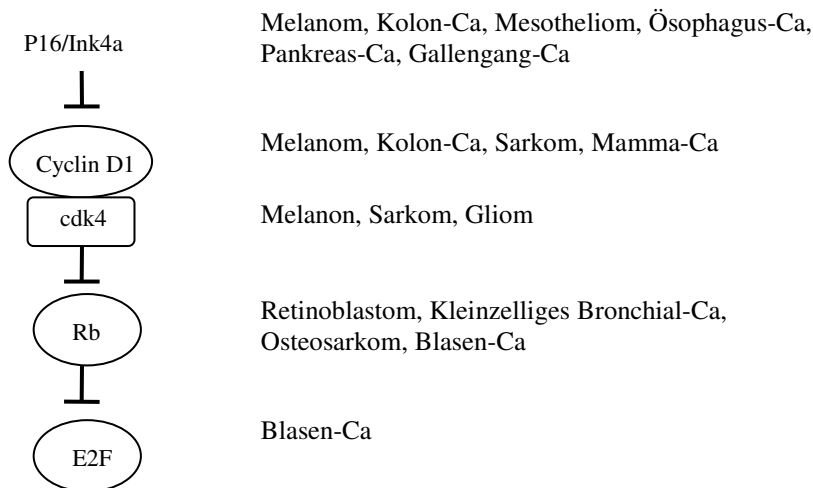


Abb. 1.1: Der Rb-Signalweg in humanen Karzinomen:

Humane Tumoren beinhalten oft Veränderungen wie Punktmutationen, Deletionen, Amplifikationen oder Methylierungen der Promotoren von Komponenten des Rb-Signalweges. Diese Veränderungen können aktivierender oder inaktivierender Natur sein, meist betreffen sie Rb-Regulatoren der oberen Kaskade. Beispiele humaner Karzinome, bei denen solche Veränderungen eine Rolle spielen, sind neben jeder Komponente angegeben.

1.2.1 E2F und Rb regulieren den Zellzyklus

Der E2F-Transkriptionsfaktor ist ein Downstream-Effektor des Rb-Signalweges mit Funktion in Replikation, Differenzierung, DNA-Reparatur, Apoptose, Onkogenese und als Tumorsuppressor. Durch zellzyklusabhängige Expression von Zielgenen ist E2F für die Proliferation von Zellen verantwortlich (Dimova and Dyson, 2005). Es sind bis jetzt acht Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie im humanen System bekannt, die alle eine gemeinsame DNA-Bindedomäne aufweisen (Zheng et al., 1999). Diese Proteine der E2F-Familie werden funktionell in Aktivatoren und Repressoren unterteilt. Zu den Aktivatoren gehören E2F1, E2F2 und E2F3a (ein Spleißprodukt von E2F3), die mit den Proteinen DP1 und DP2 dimerisieren und die Zelle durch Aktivierung der dafür notwendigen Gene auf den Zellzyklusdurchlauf vorbereiten (Helin et al., 1993). Wu et al. konnten 2001 zeigen, dass MEFs (primary mouse embryonic fibroblasts), denen diese drei E2Fs fehlen, nicht mehr proliferieren können. Zudem reicht eine Überexpression von E2F1 aus, um quieszente Fibroblasten in den Zellzyklus zu treiben

(Johnson et al., 1993). In hämatopoetischen Zelllinien der Maus führt der Verlust von E2F1 und E2F2 zu Störungen der Zelldifferenzierung und der Koordination des Zellzyklus. Diese Störungen der Zelldifferenzierung ist bei den Erythrozyten auf eine erschwerte Progression durch die S-Phase und bei B-Zellen auf einen fehlenden Austritt aus dem Zellzyklus und darauf folgende Apoptose zurückzuführen (Li et al., 2003). E2F3 wird sowohl eine Rolle in der Vermittlung der durch Mitogene induzierten Aktivierung von E2F Zielgenen, als auch in der p53-abhängigen Apoptose, die in Embryos mit pRb-Mangel auftritt, zugeschrieben. Zudem ist eine Funktion als Tumorsuppressor für bestimmte pRb-defiziente Tumoren beschrieben worden (Ziebold et al., 2000 und 2003).

Zu den Repressoren gehören E2F3b, E2F4, E2F5, E2F6, E2F7, E2F8 (De Bruin et al., 2003; Gaubatz et al., 1998; Maiti et al., 2005). E2F4, E2F5, E2F6 dimerisieren ebenfalls mit den Proteinen DP1 und DP2 und rekrutieren Histondeacetylasen (HDACs) (Rayman et al., 2002).

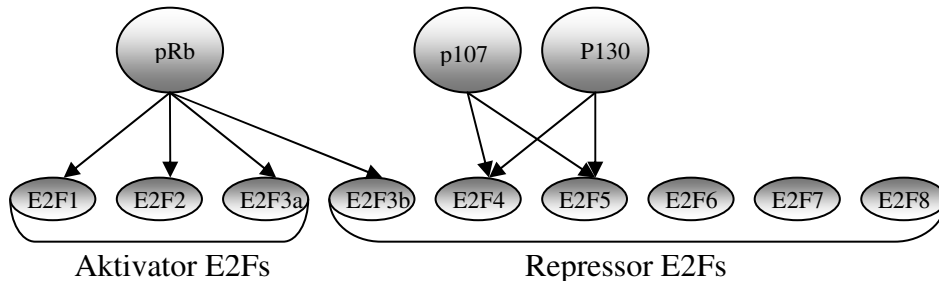


Abb. 1.2: Interaktion von Pocket Proteinen und E2F Transkriptionsfaktoren: Pocket Proteine werden unterteilt in die pRb und p107/p130 Gruppen. pRb bindet bevorzugt an die Aktivator E2Fs, E2F1, E2F2 und E2F3a sowie an E2F3b, das zumeist als Repressor fungiert. p107 und p130 binden bevorzugt die Repressor E2Fs, E2F4 und E2F5. E2F6-8 bilden ebenfalls Repressorkomplexe, binden aber nicht an Pocket Proteine.

Reguliert wird die Funktion der E2Fs durch die Interaktion mit so genannten Pocketproteinen (Blais and Dynlacht, 2004). Die dazugehörenden Proteine Rb, p107 und p130 haben eine gemeinsame „Pocket“-Region (A-Box, Spacer, B-Box), über die sie an virale Onkoproteine und zelluläre Proteine binden (Cobrinik, 2005). In der G0- und frühen G1-Phase bilden p107 und p130 Repressorkomplexe mit E2F4/5 an den Promotoren von E2F Zielgenen. (Genrepression in quieszenten Zellen; Apostolova et al., 2002; Gaubatz et al., 2001) Währenddessen bindet pRb an E2F1–3, entweder ebenfalls an oder unabhängig von den Promotoren (zur Übersicht siehe: Cobrinik 2005).

In später G1-Phase werden die Pocketproteine durch die Cyclin-abhängigen Kinasen cdk4 und cdk6 phosphoryliert und die Assoziation zu den E2Fs aufgehoben. Die Kernexportsignalsequenz von E2F4 und 5 führt zu deren Ausschleusung ins Zytoplasma und E2F1-3 können an den Promotoren binden. Die zusätzliche Rekrutierung von Histonacetyltransferasen (HATs) führt nun zur gesteigerten Acetylierung der Histone und zur Aktivierung der Transkription von z. B. DNA-Polymerase α und A-Typ Cyclinen (E2F1 Zielgene) und somit zur Vorbereitung der Zellen auf die S-Phase (Takahashi et al., 2000; Rayman et al., 2002; Taubert et al., 2004). In der G2/M-Transition binden, abhängig vom Zellzyklusstatus der Zelle, reprimierende oder aktivierende E2Fs an den Promotoren G2-regulierter Gene (Zhu et al., 2004). Als Möglichkeit zur Unterscheidung, ob Gene in G1/S oder G2/M exprimiert werden, werden weitere zellzyklusregulierte Transkriptionsfaktoren in kooperativer Bindung genannt. So ist z.B. die Expression von Cdc2, Cyclin B1 und Cyclin A2 zusätzlich von der Interaktion von B-MYB mit E2F3 abhängig (Zhu et al., 2004).

E2F6, E2F7 und E2F8 dagegen binden an keines der Pocketproteine, die Repression der Zielgene erfolgt hier über andere Mechanismen: E2F7 und E2F8 rekrutieren Histondeacetylasen und Ko-Repressoren wie Histonmethyltransferasen und Chromatinmodellierende Komplexe (Rayman et al., 2002; Zhang et al., 2000), E2F6 reprimiert über die Association zu Polycomb-group-Proteine (Trimarchi and Lees 2002). Auf den genaueren Mechanismus soll hier nicht weiter eingegangen werden.

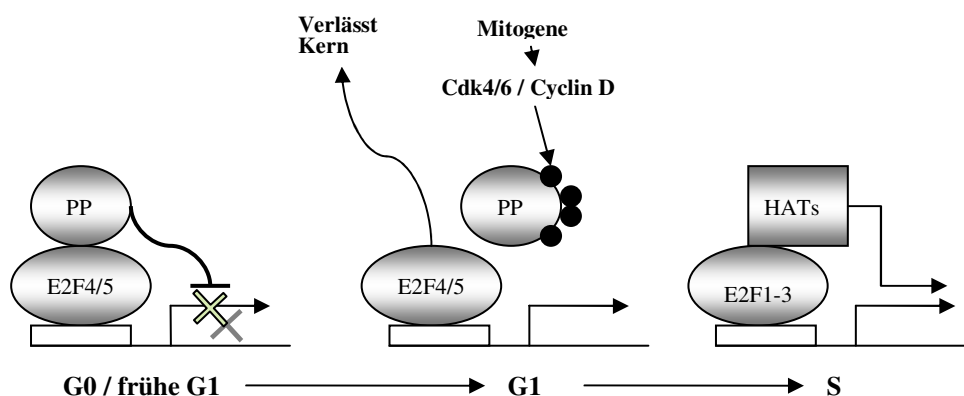


Abb. 1.3: Die Rolle von E2Fs und Pocketproteinen im G1/S-Übergang:

In G0 und der frühen G1-Phase sind die Promotoren der E2F-Targetgene durch reprimierende, zumeist E2F4/p130-Komplexe besetzt. Durch mitogene Signale kommt es zur Phosphorylierung der Pocket Proteine (PP). Nach Dissoziation von den PP wird E2F4/5 aus dem Kern transportiert und E2F1-3 kann an die frei werdenden Promotoren binden und über Histonacetyltransferasen (HATs) eine Aktivierung der Gene vermitteln.

1.3 pRb in *C.elegans* und *D. Melanogaster*

Aufgrund der entscheidenden Rolle für pRb in der Tumorentstehung und der Zellzyklusregulation wurde dieser hochkonservierte Signalweg in verschiedenen Organismen untersucht. In *C. elegans* und *D. melanogaster* wurden Proteinkomplexe gefunden, die pRb- und E2F-Homologe enthalten.

1.3.1 Der SynMuv-Komplex in *C. elegans*

Die in *C. elegans* gefundenen SynMuv Gene antagonisieren den RAS/MAPK-Pathway bei der Vulvaentwicklung (Ceol and Horvitz, 2001 und 2004). Dabei exprimiert eine Ankerzelle den EGF-ähnlichen Ligand LIN-3, der eine Rezeptortyrosinkinase von Vulvavorläuferzellen der Hypodermis, LET-23, bindet. Diese Bindung führt über den RAS/MAPK-Pathway zu einer Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (z.B. LIN-1, ein Mitglied der ETS-Familie, und LIN-31, „winged-helix“ Transkriptionsfaktor) (Tan et al., 1998). In *C. elegans* sind zunächst sechs multipotente ventrale ektodermale Vulvavorläuferzellen vorhanden, die alle zum Vulvaphänotyp führen können. Nur in drei von ihnen kommt es jedoch zu der oben beschriebenen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, bei den anderen wird durch SynMuv Gene die Expression des Liganden LIN-3, direkt oder über einen weiteren Regulator, gehemmt (Cui et al., 2006). Gain-of-function-Mutationen im RAS-Pathway oder loss-of-function-Mutationen in SynMuv-Genen führen zum multivulva (**Muv**) Phänotyp, wobei jedoch bei den SynMuv-Genen zwei voneinander unabhängige Mutationen notwendig sind (Horvitz and Sulston, 1980). Die SynMuv Gene werden in drei Klassen eingeteilt (A, B, C) und nur kombinierte synthetische (**Syn**) Mutationen von zwei, aus verschiedenen Klassen stammenden Genen, führen zum Phänotyp SynMuv. Für diese Arbeit interessant ist die Klasse B, deren Gene zumeist Komponenten des Rb-Pathways sind (Thomas et al.; 2003). Diese Gene werden weiter unterteilt in den DRM-Komplex (**DP**, **Rb**, and **MuvB** complex, Harrison et al., 2006) und möglicherweise einen NuRD-ähnlichen Komplex (**Nucleosome remodeling and Deacetylase**). Die genaue Funktion dieser Komplexe ist noch nicht klar, allerdings enthält der DRM-Komplex mehrere DNA-Bindestellen (z.B.: LIN-54 und der heterodimere Transkriptionsfaktor EFL-

1/DPL-1), über die eine Repression der Zielgene, möglicherweise zusammen mit dem NuRD-ähnlichen Komplex, vermittelt werden könnte.

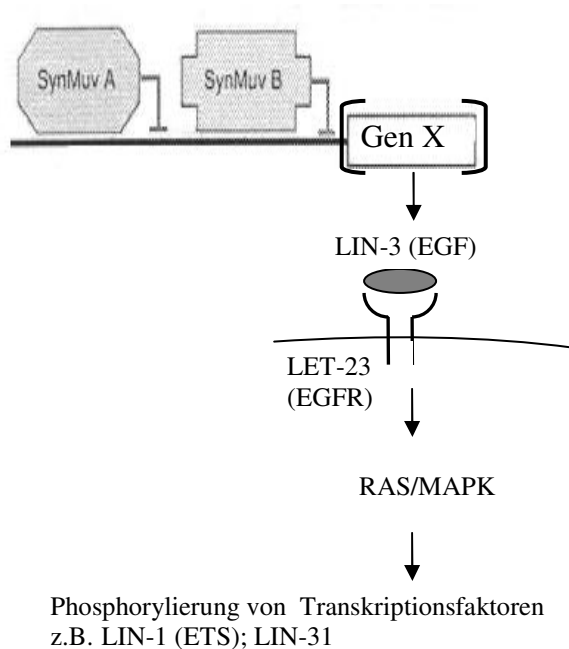


Abb. 1.4: Die Rolle des RAS-MAPK-Signalweges bei der Vulvainduktion in C.elegans

Die Induktion der Vulva in den Vorläuferzellen geschieht über einen hochkonservierten RAS/MAPK-Signalweg. Die Expression des Liganden LIN-3 wird durch Produkte der SynMuv-Gene der Gruppen A und B direkt oder über die Repression eines für die Transkription von Lin-3 notwendigen Gens gehemmt. In Klammern sind die humanen Homologe des Signalweges angegeben.

1.3.2 Der dREAM-Komplex in D. melanogaster

Vergleichbar dazu ist der von Brehm und Botchan in D. melanogaster untersuchte dREAM-Komplex (**d**rosophila **R**BF, **E**2F and **M**yb-interacting proteins). Dieser enthält acht Untereinheiten: Sieben sind homolog in C. elegans SynMuv Klasse B und dMyb, das ohne Homolog in C. elegans ist (Korenjak et al., 2004). Botchan ordnete diesem Komplex noch drei weitere Proteine zu (Myb-MuvB-Komplex; Lewis et al.; 2004). In RNAi-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der gesamte Proteinkomplex zur Reprimierung differenzierungsspezifischer Gene notwendig ist. Bereits das Herunterregulieren einer Komponente (Ausnahme dMyb) führte zur Expression der entsprechenden Gene. Über den genauen Repressionsmechanismus herrscht jedoch noch Uneinigkeit: Botchan verfiht einen aktiven Mechanismus über die Histonacetyltransferase HDA-1, Brehm, der diese nicht zum dREAM-Komplex zählt, postuliert eher eine indirekte Repression. Möglich ist außerdem auch eine aktivierende Rolle des Komplexes, abhängig davon, ob dE2F1 (Aktivator) oder dE2F2 (Repressor) gebunden sind. Auf jeden Fall besitzt der Komplex mit MIP-120, dMyb und E2F mögliche DNA-Bindedomänen (Beall et al., 2002). Neuere Ergebnisse lassen vermuten,

dass der Komplex um dMyb sowohl aktivierend, als auch repressiv wirkt. Hierbei scheint dMyb einen normalerweise reprimierenden Komplex um Mip-130 (Myb-interacting protein) zu aktivieren, so dass dieser nun die Replikation spezifischer Gene unterstützt (Beall et al., 2004).

synMuv class B C. Elegans Rtk/Map-pathway		dREAM-complex Drosophila (Koreniak et al., Brehm)	Myb/MuvB- complex Drosophila (Lewis et al., Botchan)	Human
DRM	NuRD- ähnlich			
LIN-9		Mipl30 (Twit)	Mipl30	LIN-9
Lin-35		RBF1/2	RBF1/2	pRB,p107,p130
		dMyb	dMyb	
Dpl-1		dDP	dDP	DP
Efl-1		dE2F2	dE2F2	E2F
Lin-53	Lin-53	p55	p55	RbAp46, 48
Lin-37		Mip40	Mip40	ESTs
Lin-54		Mip120	Mip120	ESTs
Lin-52			dLin-52	ESTs
	Hda-1		Rpd3	HDAC
	Mi2			LET-418

Tab. 1.1: Homologe der SynMuv Gene Klasse B in Drosophila und Mensch

1.4 Gibt es einen humanen SynMuv-Komplex?

In dieser Arbeit von Bedeutung sind das humane LIN-9 und das humane B-MYB, deren Funktion in verschiedenen Organismen und unter der Fragestellung eines möglichen humanen SynMuv-Komplexes genauer untersucht wurde.

1.4.1 LIN-9

Das humane LIN-9 wurde in unserem Labor erstmals kloniert (Gagrica et al., 2004). Es besteht aus 542 AS, hat ein Molekulargewicht von 62 kDa und 34% Sequenzhomologie zu Lin-9 aus C. elegans. Es wurden zwei hochkonservative Regionen (Box1 und Box2)

beschrieben, wobei der N-terminale Teil (Box 1) die Assoziation zu der Pocket-Domäne von pRb ermöglicht.

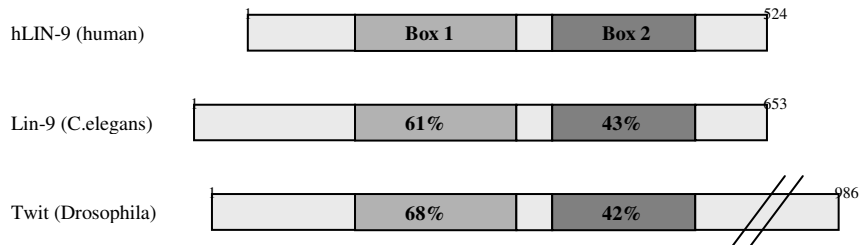


Abb. 1.5: Schematischer Vergleich von Lin-9 Proteinen

Box 1 und Box 2 sind hochkonservierte Regionen, die zu der jeweils angegebenen Prozentzahl homolog zu den entsprechenden Regionen des humanen LIN-9 sind. Box1 wird als DIRP-Region bezeichnet (Domain in Rb-related Pathway).

Das kern- und chromatinassoziierte Protein Lin-9 (Gagrica et al., 2004) fungiert als möglicher Tumorsuppressor, da in Soft Agar Assays die normalerweise zur Transformation benötigte Inaktivierung von Rb (Hahn et al., 1999) durch eine Herunterregulation von LIN-9 ersetzt werden kann (Gagrica et al., 2004). Außerdem wird LIN-9 für die Zelldifferenzierung (hier am Beispiel der „flat-cell-formation“ in Saos-2 Zellen) durch Rb benötigt. Das humane LIN-9 ist als Ko-Aktivator mit RB an der Regulation differenzierungsspezifischer Gene beteiligt, jedoch nicht in den oben beschriebenen E2F-abhängigen G1-Arrest involviert (Gagrica et al., 2004). Ähnlich reguliert das Testis-spezifische LIN-9 homologe Protein Aly in Drosophila die Expression differenzierungsspezifischer Gene in Spermatozyten (White-Cooper et al, 2000; Ayyar et al., 2003; Jiang and White-Cooper, 2003).

Lisa Osterloh identifizierte LIN-9 Zielgene mit Hilfe von cDNA-Microarrays, wobei Genexpressionsmuster Lin-9 depletierte Zellen (RNAi-Virus gegen LIN-9) mit Kontrollzellen verglichen wurden. Es konnten 103 differenziell exprimierte Gene identifiziert werden, deren Expression sich mehr als 1,41-fach von den Kontrollzellen unterschied. Davon waren 36 Gene in den LIN-9 depletierten Zellen herunterreguliert und die restlichen 67 Gene hochreguliert. Unter den herunterregulierten Genen fand sich eine Gruppe von Genen mit beschriebener Rolle in G2/M-Übergang. Diese Gene wurden zum großen Teil schon als direkte E2F- und zum Teil auch als B-MYB-Zielgene beschrieben. Es handelt sich sowohl um Gene, deren Produkte für den

Übergang von der G2- in die M-Phase essentiell sind, als auch um Genprodukte mit Funktionen in der Mitose.

Symbol	Name	E2F-Zielgen	B-MYB-Zielgen
UBCH10	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	X ^{a)}	
BIRC5	Survivin	X ^{b)}	
CDC2	Cell division cell cycle 2	X ^{c)}	X ^{c)}
CCNA2	Cyclin A2	X ^{c)}	X ^{c)}
CCNB1	Cyclin B1	X ^{c)}	X ^{c)}
PLK1	Polo-like kinase 1	X ^{d)}	
BUB1	BUB1	X ^{e)}	
CENPE	Centromere protein E	X ^{f)}	
STK6	Aurora A	X ^{g)}	

Tab. 1.2: LIN-9 regulierte Gene: Auszug der im cDNA-Microarray gefundenen von LIN-9 regulierten Gene mit Funktion in der G2/M-Transition, die teilweise schon als E2F- und B-MYB-Zielgene bekannt sind. Referenzen: a) (Weinmann et al., 2002); b) (Jiang et al., 2004); c) (Zhu et al., 2004); d) (Gunawardena et al., 2004); e) (Ishida et al., 2001); f) (Ren et al., 2002); g) (Tanaka et al., 2002)

1.4.2 B-MYB

Als Komponente des SynMuv Komplexes in *Drosophila* wurde dMyb genauer untersucht. Es spielt bei verschiedenen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. So kontrolliert es die Endoreplikation (Verdopplung des DNA-Gehalts ohne Zellteilung) während der Entwicklung, wird aber auch in der adulten Fliege in allen Geweben essentiell exprimiert, homozygote dMyb-Mutationen sind für die Fliege letal (Katzen and Bishop, 1996). Außerdem wurde eine Funktion des Transkriptionsfaktors in der Genregulation differenzierungsspezifischer und zellzyklusregulierender Gene gefunden. So konnten Katzen et al. 1998 zeigen, dass dMyb-depletierte Zellen vor dem G2/M-Übergang geblockt sind. Dieser Effekt konnte durch *cdc2* Überexpression gerettet werden und dMyb stellte sich erstmals als Regulator G2/M-spezifischer Gene wie *cdc2* und Cyclin B heraus. Des Weiteren zeigte sich, dass die Zellen trotz des G2/M-Blocks eine Endoreplikation durchliefen, was zur Aneuploidie führte. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass dMyb eine Rolle im Zellzyklus spielt, für den Erhalt der Euploidie und Vermeidung von genomischer Instabilität von Bedeutung ist und dieser

Effekt sich nicht nur auf Flügelzellen beschränkt (Manak et al., 2002; Fitzpatrick et al., 2002; Fung et al., 2002). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht klar.

In Maus und Mensch gibt es drei MYB-Paraloge. A-MYB kommt in Spermienvorläuferzellen, Nervenvorläuferzellen während der Entwicklung und Duktuszellen der Mamma vor (Trauth et al., 1994), c-myb hingegen ist vor allem in hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert (Golay et al., 1991). B-MYB, das Homolog zu *Drosophila* dMyb, wird hingegen als direktes E2F-Zielgen (Lam and Watson, 1993) in allen proliferierenden Zellen in der späten G1- und S-Phase exprimiert (Joaquin and Watson, 2003; Lam et al., 1992; Nomura et al., 1988). Zudem ist es absolut essentiell in der Entwicklung: B-MYB Knockoutmäuse (Feten) bilden keine innere Zellmasse und sterben ca. am 5. Tag nach der Einnistung (Tanaka et al., 1999). B-MYB ist Aktivator und Repressor. Phosphoryliert durch Cyclin A/cdk2 an 15 Serinen oder Threoninen im C-Terminus und somit co-exprimiert mit Cyclin A, fördert es die Transaktivierung (Johnson et al., 2002; Ziebold et al., 1997). Außerdem interagiert es mit Ko-Aktivatoren wie p300/CBP (Johnson et al., 2002). Die Genrepression wird über die Ko-Repressoren SMRT/N-CoR vermittelt (Li and McDonnell, 2002), die wiederum HDACs rekrutieren (Alland et al., 1997; Nagy et al., 1997). Wie zuvor erwähnt sind bereits einige Zielgene von B-MYB bekannt: In RNAi-Experimenten konnte eine verminderte Expression der G2/M-Gene *Cdc2*, Cyclin A2 und Cyclin B1 gezeigt werden (Zhu et al., 2004). Dies bestätigt die Beobachtung, dass der durch dMyb-Mutationen hervorgerufene G2/M-Arrest in *Drosophila* Flügelzellen durch *cdc2* aufgehoben werden konnte (siehe oben). Da diese Gene zudem von LIN-9 und E2F reguliert werden, ist eine Interaktion von Lin-9 und B-MYB in Menschen wahrscheinlich, was in Co-Immünpräzipitations-Experimenten durch Björn von Eyss bestätigt wurde.

Shepard et al. (2005) postulieren zudem eine entscheidende Funktion von B-Myb als haploinsuffizienten Tumorsuppressor in Vertebraten. Untersuchungen im Zebrafisch zeigen, dass der crash&burn-Phänotyp (*crb*), der durch verzögertes Eintreten in die Mitose und Unfähigkeit diese zu beenden gekennzeichnet ist, durch den Verlust von *bmyb* (B-MYB-Homolog im Fisch) entsteht. Wie schon beschrieben kommt es auch hier zu einer Reduktion von Cyclin B-mRNA, schon bevor der Phänotyp erkennbar ist, und dieser kann durch Injektion von Cyclin B gerettet werden, so dass die durch *bmyb*-

Verlust bedingte Herunterregulation von Cyclin B zumindest teilweise für die Disregulation der G2/M-Transition verantwortlich ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *bmyb* einen deutlichen Effekt auf die Bildung des Spindelapparates hat, der möglicherweise zur mitotischen Katastrophe führt. Nach Färbungen mit α - und γ -Tubulin wurden vermehrt Abnormalitäten (monopolare Spindel, zwei ungetrennte Zentromere) und außerdem multipolare und disorganisierte Spindeln beobachtet. In der Folge konnten im FACS und mittels FISH vermehrt polyploide und aneuploide Zellen nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass Defekte am Spindelapparat und der Anzahl der Chromosomen mit genomischer Instabilität und Aneuploidie assoziiert sind und oft in Krebszellen beobachtet werden (Kramer et al., 2002). Demzufolge ist auch eine Rolle von *bmyb*-loss-of-function-Mutationen in der Entstehung von Tumoren wahrscheinlich, zumal Shepard et al. zeigen konnten, dass *crb*-Heterozygoten im Vergleich zum Wildtyp nach MNNG-Exposition (Karzinogen beim Fisch) eine doppelt so hohe Anfälligkeit für Krebserkrankungen haben. Da die durch diese Mutationen betroffene Gensequenz auch in anderen Vertebraten (einschließlich Mensch) konserviert ist, wird eine vergleichbare Rolle von B-MYB in der humanen Tumorgenese diskutiert.

1.5 Gibt es eine Funktion des SynMuv-Komplexes in G2/M?

Die von Lisa Osterloh identifizierten Zielgene von LIN-9, die zum Teil bereits bekannte Zielgene von B-MYB bzw. E2F sind, weisen auf eine regulierende Rolle des SynMuv-Komplexes im Zellzyklus speziell in der G2/M-Phase hin. Bei der in dieser Arbeit behandelten Fragestellung stehen besonders die Mitose und der M-A-Kontrollpunkt im Vordergrund.

1.5.1 Mitose checkpoint und chromosomale Instabilität

In der Mitose wird die bereits verdoppelte DNA auf die zwei entstehenden Tochterzellen aufgeteilt, wobei jeweils genau eines der Schwesterchromatiden in jeder neuen Zelle benötigt wird. Dazu stehen der Zelle an drei bisher bekannten Punkten Kontrollmechanismen zur Verfügung: Findet die Trennung der Zentromere nicht statt,

so dass die Bedingung für die Ausbildung eines bipolaren Spindelapparates nicht gegeben ist, so ist die Prometaphase verzögert (Scolnick et al., 2000). Der Metaphase-zu-Anaphase (M-A) Kontrollpunkt verhindert die Trennung von Schwesterchromatiden, bis alle Kinetochore an Mikrotubuli gebunden sind (Burke 2000, Amon 1999). Bis zur vollständigen Trennung der Chromosomen wird der Ausgang aus der Mitose zudem von einem Bub2-abhängigen Kontrollpunkt verhindert (Hoyt 2000, Taylor 1999). Der Ablauf der Mitose ist durch inhibierende Proteine kontrolliert, die mittels APC/C (Anaphase-promoting complex/Cyclosome) ubiquitiniert und anschließend degradiert werden (Zachariae 1999, Morgan 1999).

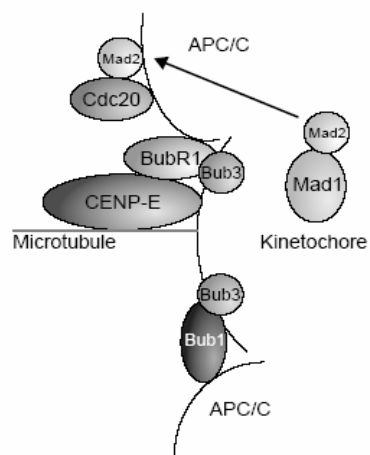


Abb.: 1.6: Der aktivierte M-A Kontrollpunkt im Säugetier

Mad1 rekrutiert Mad2 zu ungebundenen Kinetochoren, dort inhibiert Mad2 die E3-Ubiquitin-Ligase APC/C^{Cdc20} und verhindert somit die Trennung der Schwesterchromatiden. BubR1 interagiert mit CENP-E und Bub3. Die genaue Lokalisation des Komplexes ist noch nicht gesichert, da Cdc20 jedoch von der späten Prophase bis zur Telophase am Kinetochor lokalisiert ist (Kallio et al., 1998), wird, wie in der Abbildung gezeigt, angenommen, dass der Mad2/APC/C^{Cdc20}-Komplex am Kinetochor liegt.

Bei Ausfall des M-A-Checkpoints wurde chromosomale Instabilität (Legauer et al., 1998, Cahill et al., 1998), d.h. das Auftreten von Aneu- bzw. Polyploidie, beschrieben, was durch den Verlust ganzer Chromosomen aufgrund einer fehlerhaften Teilung bedingt sein kann (Duesberg et al., 2000, Sieber et al., 2003). Die Mehrheit der Tumoren weist chromosomale Instabilität auf (Lengauer, 1998), jedoch liegt zumeist keine Alterationen der Checkpoint-Gene zugrunde (Hernando et al., 2001). Stattdessen scheint die Herunterregulation der Expression der Gene zu einer Deaktivierung des Checkpoints in Tumorzellen beizutragen. Tatsächlich konnte eine Haploinsuffizienz von den MCC-Proteinen Mad2, Bub3 und BubR1 gezeigt werden (Michel et al., 2001, Babu et al., 2003, Baker et al., 2004). Heterozygote Deletion von Mad2 in humanen Kolon-Ca-Zelllinien und heterozygoter Bruch von Mad2, Bub3 oder BubR1 in der Maus führen zu herunterregulierten MCC-Proteine, einer beeinträchtigten Funktion des Checkpoints und Aneuploidie, was ebenfalls durch eine partielle Herunterregulation von Mad1 hervorgerufen wird (Wang et al., 2002, Kienitz et al., 2005). Dies ist

besonders interessant, wenn man bedenkt, dass Checkpoint-Gene von LIN-9 reguliert werden und dass Depletion von B-Myb im Zebrafisch ebenfalls zu chromosomaler Instabilität geführt hat (s.o.). Zudem regulieren E2F-Transkriptionsfaktoren Gene mit Funktion in der Mitose und des mitotischen Checkpoints (Ren et al., 2002) (s.o.) und Mad2 ist ein direkt durch E2F zellzyklusabhängig reguliertes Gen, das bei Rb-Inaktivierung durch hyperaktivem E2F überexprimiert wird, was ebenfalls zu genomischer Instabilität führt (Hernando et al., 2004). Eine regulierende und kontrollierende Funktion eines möglichen humanen SynMuv-Komplexes in der Mitose ist also nicht auszuschließen.

1.6. RNAi

RNAi (interference) ist ein hochkonservierter Mechanismus, der in Insekten, Würmern, Pflanzen und Säugerzellen beschrieben ist (Caplen et al., 2001, Clemens et al., 2000) und diese vor Fremd-RNA (z.B. von Viren und Transposons) schützt sowie über posttranskriptionelles Gene-silencing eine wichtige physiologische Rolle in der Entwicklung hat (miRNAs (micro) fungieren u.a. ähnlich einem Schalter bei der zeitlichen Steuerung der Entwicklung und vermitteln die Gewebsidentität bei der Differenzierung; zur Übersicht siehe: Chen and Rajewsky, 2007). Dieses sequenzspezifische, posttranskriptionale Gene-silencing kann gezielt durch die Einführung von aneinandergelagerten Sinn/Gegensinn Doppelstrang (ds) – RNAs in die Zelle induziert werden (Bass 2000). Die dsRNA wird so synthetisiert, dass sie zur Sequenz des Zielgens homolog ist. Durch eine RNase der III. Klasse werden die dsRNAs in small interfering (si) RNAs gespalten (21-25 Nukleotide lang) (Zamore et al., 2000). Diese siRNAs binden spezifisch an die entsprechende zelluläre messenger (m) RNA und bilden einen Komplex mit Helikasen und nukleären Enzymen (“RNA-induced silencing complex”; RISC), was zu einer Spaltung der Ziel-mRNA nahe dem Zentrum der siRNA führt („garbage RNA“). In den meisten Säugetierzellen löst dies jedoch zusätzlich eine unspezifische zytotoxische Reaktion aus (Hunter et al., 1975). Dieser unspezifische Effekt („off-target“ Effekt) kann durch die Benutzung von kleinen synthetischen siRNAs umgangen werden, die eine starke und weitgehend spezifische Unterdrückung der Gen-Expression vermitteln (Elbashir et al., 2001). Um eine dauerhafte Herunterregulation zu erzielen, nutzt man einen Vektor, durch dessen

Vermittlung siRNA-Abschriften in der Zelle synthetisiert werden können. Die über den Polymerase- III abhängigen H1- Promoter produzierten RNA-Stücke haben keinen Polyadenosinschwanz und werden so gespalten, dass sie synthetischen siRNAs ähneln. Das Insert beinhaltet eine 19 Nukleotide lange spezifische Sequenz, die der Ziel-RNA entspricht, einen Spacer und die zu dieser Sequenz gegenläufigen 19 Nukleotide. Dadurch faltet es sich zu einer 19bp langen Haarnadelstruktur (Brummelkamp et al., 2002).

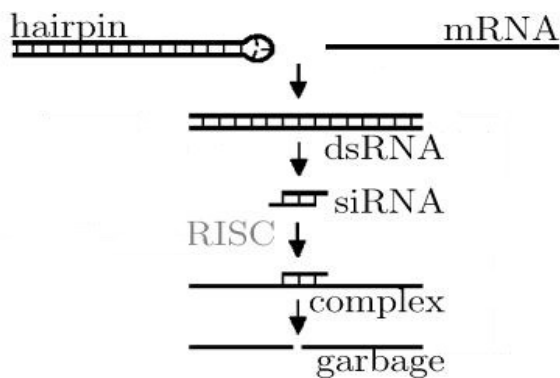


Abb. 1.7: Gene silencing durch RNAi:

Durch eine RNase der III. Klasse werden die dsRNAs in small interfering (si) RNAs gespalten (21-25 Nukleotide lang). Diese siRNAs binden spezifisch an die entsprechende zelluläre messenger (m) RNA und bilden einen Komplex mit Helikasen und nukleären Enzymen ("RNA-induced silencing complex"; RISC), was zu einer Spaltung der Ziel-mRNA nahe dem Zentrum der siRNA führt („garbage RNA“).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die biologische Funktion eines möglichen SynMuv-Komplexes in menschlichen Zellen zu untersuchen. Besonderes Augenmerk lag, mit dem Hintergrund der von LIN-9 und B-MYB regulierten Gene mit Funktion in G2/M und Hinweise auf durch B-MYB Depletion hervorgerufene chromosomale Instabilität im Zebrafisch (Shepard et al., 2005), auf der Mitose und der Funktion des Spindel-Checkpoints. Dazu wurden die Effekte auf den Zellzyklus bei LIN-9 bzw. B-MYB depletierte Zellen untersucht.

Außerdem sollten weitere shRNA-Sequenzen gegen LIN-9 und B-MYB synthetisiert und ausgetestet werden. Dies ist notwendig, um die durch Depletion von LIN-9 oder B-MYB erzeugten Effekte spezifisch diesen Proteinen zuordnen zu können und um „off-target“-Effekte auszuschließen. Dabei wird nicht nur die mRNA des Zielgenes durch den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) zerstört, sondern es werden auch andere Proteine herunterreguliert, was zu weiteren unspezifischen Effekten führen kann.

2.1.2 Plasmide

Plasmidnummer		Funktion
174	pEGFP	
574	pSuperior.puro.tet	Leerer RNAi-Vektor; Puromycin-Resistenzgen; Tet-Repressor
623	pRetro-Super.puro	Leerer Retroviraler RNAi-Vektor; Puromycin-Resistenzgen
652	pMSCV.Blast	Leerer viraler RNAi-Vektor; Blastocidin-Resistenzgen (van de Wetering et al., 2003)
654	pMSCV.Blast-LIN-9 #1	Viraler Lin-9 RNAi-Vektor
721	pSuperior.puro-B-MYB #2	B-MYB RNAi-Vektor
750	pRetro-Super.puro-p53	Retroviraler p53-RNAi-Vektor (Brummelkamp et al., 2002)
756	pMSCV.Blast-B-Myb #5	Viraler B-Myb RNAi-Vektor
758	pMSCV.Blast-B-Myb #3	Viraler B-Myb RNAi-Vektor
807	pSuperior.puro-B-MYB #4	B-MYB RNAi-Vektor
808	pSuperior.puro-LIN-9 #5	LIN-9 RNAi-Vektor
809	pSuperior.puro-LIN-9 #6	LIN-9 RNAi-Vektor
817	pMSCV.Blast-B-MYB #2	Viraler B-Myb RNAi-Vektor
818	pMSCV.Blast-LIN-9 #5	Viraler Lin-9 RNAi-Vektor

Tab. 2.2: Plasmide

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Roth und Metabion synthetisiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in TE auf 100 pmol/μl eingestellt. Die verwendete Konzentration betrug 10 pmol/μl in ddH₂O.

2.1.4 Oligonukleotide für shRNA

Nr.	Sequenz	Funktion
SG526	5'> GAT CCC GAA ACG AGC CTG CCT TAC ATT CAA GAG ATG TAA GGC AGG CTC GTT TCT TTT TA <3'	siRNA gegen B-MYB #2
SG527	5'> AGC TTA AAA AGA AAC GAG CCT GCC TTA CAT	(Zhu et al.,

	CTC TTG AAT GTA AGG CAG GCT CGT TTC GG <3'	2004)
SG554	5'> GAT CCC GAA ACA TGC TGC GTT TGT ATT CAA GAG ATA CAA ACG CAG CAT GTT TCT TTT TA <3'	siRNA gegen B-MYB #3
SG555	5'> AGC TTA AAA AGA AAC ATG CTG CGT TTG TAT CTC TTG AAT ACA AAC GCA GCA TGT TTC GG <3'	
SG556	5'> GAT CCC GGA AGT CTT CTG ACC AAC TTT CAA GAG AAG TTG GTC AGA AGA CTT CCT TTT TA <3'	siRNA gegen B-MYB #4
SG557	5'> AGC TTA AAA AGG AAG TCT TCT GAC CAA CTT CTC TTG AAA GTT GGT CAG AAG ACT TCC GG <3'	
SG663	5'> GAT CCC GGA AGC TTATCT AAC ACG TTT CAA GAG AAC GTG TTA GAT AAG CTT CCT TTT TA <3'	siRNA gegen LIN-9 #5
SG664	5'> AGC TTA AAA AGG AAG CTT ATC TAA CAC GTT CTC TTG AAA CGT GTT AGA TAA GCT TCC GG <3'	
SG665	5'> GAT CCC GAC TTA ATT TCC AGG CTT ATT CAA GAG ATA AGC CTG GAA ATT AAG TCT TTT TA <3'	siRNA gegen LIN-9 #6
SG666	5'> AGC TTA AAA AGA CTT AAT TTC CAG GCT TAT CTC TTG AAT AAG CCT GGA AAT TAA GTC GG <3'	

Tab. 2.3: Oligonukleotide für shRNA

2.1.5

qRT-PCR-Primer

Nr.	Sequenz	Funktion
SG 566	5'> TGG CAT CAA AAC AGA AAA ATG A <3'	5'-Primer für Aurora A
SG 567	5'> GGC GAC CAA TTT CAA AGT CT <3'	3'-Primer für Aurora A
SG 568	5'> GCC CAG TGT TTC TTC TGC TT <3'	5'-Primer für Birc5
SG 569	5'> CCG GAC GAA TGC TTT TTA TG <3'	3'-Primer für Birc5
SG 570	5'> GGA GAA CGC TCT GTC AGC A <3'	5'-Primer für Bub1
SG 571	5'> TCC AAA AAC TCT TCA GCA TGA <3'	3'-Primer für Bub1
SG 576	5'> TGG ATC TGA AGA AAT ACT TGG ATT CTA <3'	5'-Primer für cdc2
SG 577	5'> CAA TCC CCT GTA GGA TTT GG <3'	3'-Primer für cdc2
SG 580	5'> CCC CAC CAC GGT GAC ATT AT <3'	5'-Primer für LIN-9
SG 581	5'> CGGCGA CTG TCC TAA TAA AGG <3'	3'-Primer für LIN-9
SG 630	5'> TCC ACA CTG CCC AAG TCT CT <3'	5'-Primer für B-MYB
SG 631	5'> AGC AAG CTG TTG TCT TCT TTG A <3'	3'-Primer für B-MYB
SG 645	5'> AGC CAC ATC GCT CAG ACA C <3'	5'-Primer für GAPDH
SG 646	5'> GCC CAA TAC GAC CAA ATC C <3'	3'-Primer für GAPDH
SG 680	5'> AAG ATC TGG AGG TGA AAA TAG GG <3'	5'-Primer für plk1
SG 681	5'> AGG AGT CCC ACA CAG GGT CT <3'	3'-Primer für plk1
SG 690	5'> TTG CTT GTA ACT ACT GAT CTT GAG C <3'	5'-Primer für MAD2
SG 691	5'> TTC TGA ACT GAA CAC TTG TAT AAC CA <3'	3'-Primer für MAD2

Tab. 2.4: qRT-PCR-Primer

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.4.1 Puffer

5x DNA Ladepuffer	15 % Ficoll 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylene Cyanol 0,05 M EDTA In 1 x TAE
5x DNA Ladepuffer (nur Xylene Cyanol)	15 % Ficoll 0,05 % Xylene Cyanol 0,05 M EDTA In 1 x TAE
Blot Puffer 5x (Stock)	75g Tris 282,25g Glycin Mit ddH ₂ O auf 5l auffüllen
Blot Puffer	200ml 5x Blot Puffer 150ml Methanol Mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen
3x ESB	300mM Tris-Cl, pH 6,8 15mM Na ₂ EDTA 150mM DTT 12 % (w/v) SDS 15 % (w/v) Glycerol 0,03 % (w/v) Bromphenol Blau
2x HBS	280 mM NaCl 50 mM Hepes 1,5 mM Na ₂ PO ₄ pH: 6,95-7,05

PBS	<p>137 mM NaCl 3 mM KCl 6,4 mM Na₂HPO₄ 1,5 mM KH₂PO₄ pH 7,4 mit HCl einstellen Autoklavieren</p>
10x SDS-Laufpuffer	<p>0,25 M Tris, pH 8,3 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS</p>
50x TAE	<p>2 M Tris Base (AppliChem) 250 mM Eisessig 50 mM EDTA, pH 8,0</p>
20x TBS	<p>1 M Tris/HCl, pH 7,4 3 M NaCl</p>
TBST	<p>1x TBS 0,05 % (v/v) Tween 20</p>
TE	<p>10 mM TrisCl, pH 8,0 1 mM EDTA Mit ddH₂O auf 500 ml auffüllen</p>
TNN Puffer	<p>50 mM Tris-Cl, pH 7.5 120 mM NaCl 5 mM EDTA 0.5% NP-40 10 mM Na₄P₂O₇ 2 mM Na₃VO₄ 100 mM NaF auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen vor Gebrauch zugeben:</p>

Proteinaseinhibitoren 1:1000
PMSF1:200

2.1.4.2 Lösungen

Allgemein

Acrylamidstammlösung 30 % (w/v) Acrylamid (Protogel, national diagnostics)
0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in H₂O
Lagerung: RT, lichtgeschützt

Ampicillin 100X 10 g Ampicillin in 100 ml ddH₂O
Stock Konzentration: 100 mg/ml.
Arbeitskonzentration: 100 µg/ml
Steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

Bisbenzamid 5mg/ml Sigma

Blasticidin 10 mg/ml InvivoGen

Blocklösung 3%
(Western Blot) Magermilchpulver (Merck) in TBST

Bradford Reagenz 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma)
0,01% (w/v) 23.75 ml Ethanol
50 ml 85% (v/v) Ortho-Phosphorsäure
auf 500 ml ddH₂O auffüllen, 2x filtrieren,
Lichtgeschützt bei 4°C Lagern

Chemolumineszenz-Substratlösung mit Luminol

10 ml 100 mM Tris-HCl; pH 8.5
50 µl 250 mM Luminol (in DMSO)
22 µl 90 mM p-Coumarinsäure (in DMSO)
3µl H₂O₂ (30 %)

Chlorophorm	JC Baker
DEPC-H ₂ O 0,1% (v/v)	Diethylpyrocarbonat in H ₂ O 12h 37°C, dann autoklavieren
Desoxynukleosid-Triphosphat (dNTP)	Invitrogen (je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Ethydiumbromid	Roth (Stammlösung 10 mg/ml in H ₂ O)
LB-Agar	Luria Bertani Agar 40g auf 1l H ₂ O
LB-Medium	Luria Bertani Medium 25g auf 1l H ₂ O
Miniprep I	50mM Glukose 25mM Tris 10mM EDTA
Miniprep II	0,2 N NaOH 1% SDS
Miniprep III	3 M Kalciumacetat, pH 5,2
Phenol	Roth
PMSF	10µg in 1 ml Isopropanol
Propidiumjodid	Sigma (Stammlösung 1 mg/ml)
Protein A-Sepharose	Amersham Biosciences
Proteaseinhibitoren	Mix (Sigma); Bestellnr.: P8340

RNase A	10mg/ml RNase A (Sigma) in: 10 mM Tris, pH 7,4 150 mM NaCl DNasen inaktivieren (15 min 100°C)
SDS 20%	20g in 100ml ddH ₂ O

Zellkultur

Trypsin/EDTA 0,25 %		Cambrex
Penicillin/Streptomycin 10mg/ml		Cambrex
DMSO Dimethylsulfoxid (100%)		Merck
Hygromycin B 50mg/ml		PAA
Nocodazol 1mg/ml	in ddH ₂ O	Sigma
Pifithrin-a 100µg/ml	in DMSO	Merck
Polybrene (Hexadimethrinebromide) 4mg/ml	in ddH ₂ O	Sigma
Puromycin		Sigma
Thymidin	in 1N NaOH	Sigma

2.1.5 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden mindestens in der Qualitätsstufe „zur Analyse“ von den Firmen Roth, Merck, Riedel-de Haën, AppliChem oder Sigma-Aldrich bezogen.

2.1.6 Standards und Enzyme

2.1.6.1 Standards

Molekulargewichtsmarker	SM0671	Fermentas
DNA Marker	1kb Leiter (1µg/µl)	Invitrogen

2.1.6.2 Enzyme

Restriktionsendonuklease, 10x Puffer, 100x BSA	NEB
T4-DNA Polymerase	NEB
Taq DNA-Polymerase, 10x Puffer S und Y	Peqlab

2.1.7 Antikörper

Primärantikörper

AK	Eigenschaft/Bestellnr.	Für IP/Western	Firma
LIN-9	polyklonal	1:100 / 1:1000	Nicht kommerziell
B-MYB N19	Sc724 polyklonal	1:150*/ 1:500	SantaCruz
B-MYB H115	Sc13028 polyklonal	1:150*/ 1:500	SantaCruz
IgG	15006 1mg/ml	1:1000	Sigma
β-Tubulin	3408 monoklonal	1:5000	Chemicom
Cdk2 (M-2)	Sc 163 polyklonal	1:1000	SantaCruz
p-Histone H3	#06-579 polyklonal	1:1000	Upstate
p53	monoklonal	1:1000	Oncogene
p21 C-19	Sc 397 polyklonal	1:1000	SantaCruz

Tab. 2.5: Primärantikörper: * N19 und H115 für IP nur in Kombination

Sekundärantikörper

AK	für Western	Firma
Protein-A-HRP	1:5000	Amersham
α-Maus-HRP	1:5000	Amersham

Tab. 2.6: Sekundärantikörper

2.1.8 Kitsysteme

Name	Firma
Plasmid Maxiprep System Jetstar	Genomed
Qiaquick Gel Extraction Kit	Quiagen
Real-Time PCR Core Kit for Sybr Green I	Eurogentec

Tab. 2.7: Kitsysteme

2.1.9 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
CO ₂ -Inkubatoren		Heraeus
Bakterien-Inkubatoren		Heraeus
Bakterien-Schüttel-Inkubatoren	New Brunswick	Scientific Co.
FACScalibur		Becton Dickinson
Filmentwicklungs-Automat		Kodak
Fluoreszenzmikroskop		Zeiss
Gelelektrophoresekammern		BioRad
Hamilton-Spritze (50µl)		Hamilton
Heizblöcke	HBT130	HLC
Heizofen		Memmert
Mikroskop	CK2	Olympus
Minigelelektrophoresekammer		Biorad
Spektralphotometer	ND1000	Kisker Biotech
Neubauer-Zählkammer	Improved	Assistent Germany
PCR Gerät	Thermocycler T1	Biometra
Photometer		Pharmacia Biotec
Pipetten	Pipetman	Gilson
Präzisionswaage		Kern
Real-time-PCR Gerät	Abi Prism7000SDS	Applied Biosystems
Zentrifugen	Labofuge GL	Heraeus
	Mikrozentrifuge 5415D	Eppendorf
	Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf

Tab. 2.8: Geräte

2.1.10 Firmen

Firma	Sitz
Amersham	Braunschweig
Applichem	Darmstadt
BD Biosciences Clontech	Heidelberg
Becton Dickinson	Heidelberg
Cambrex	Verviers, Belgien
Eurogentec	Seraing, Belgien
Invitrogen/Gibco	Karlsruhe
Jackson ImmunoResearch	Sohan, UK
New England Biolabs	Frankfurt
Nalge Nunc International	Wiesbaden
Merck	Darmstadt
Metabion	Martinsried
Promega	Mannheim
Quiagen	Hilden
Riedel-de-Haen	Hannover
Roche Diagnostics	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Sigma-Aldrich	München
SeqLab	Göttingen
Zeiss	Oberkochen

Tab. 2.9: Firmen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung, Einfrieren, Auftauen von Zellen

- Reagenzien: Zellkulturmedium
PBS

Trypsin/EDTA

Die in dieser Arbeit beschriebenen Zellen wurden in Adhäsionskultur in Zellkulturschalen (Durchmesser 6, 10, 15cm) und 6 bzw. 24 well-Platten der Firma Nunc Brand Products in den jeweiligen Medien (siehe Tabelle) kultiviert. Die Inkubatoren waren auf 37°C temperiert und hatten eine relative Luftfeuchtigkeit von 100% bei ca. 5% CO₂-Gehalt. Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilarbeitsbank durchgeführt.

Kultivierung

Die Zellen wurden in ihrem Medium kultiviert und wenn sie konfluent waren, weiterpassagiert, damit eine ausreichende Nährstoffversorgung gewährleistet war. Dazu wurde eine konfluente Schale SHEP-Zellen in der Regel 1:10; Phoenix-Zellen 1:4 und HeLa-Zellen 1:6 gesplittet. Um die Zellen von der Kulturschale zu lösen, wurden sie mit ca. 10 ml sterilem, autoklaviertem PBS gewaschen. Dieses wurde wieder abgesaugt und anschließend wurde je nach Größe der Schale 0,5-1 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Dadurch wurden bei Inkubation bei 37°C extrazelluläre Proteine (Peptidase) verdaut. EDTA bindet dazu an das für die Zelladhäsion nötige Ca²⁺ und die Zellen wurden vereinzelt. Nach ca. 15 min wurde die Ablösung der Zellen unter dem Mikroskop überprüft. Falls dies vollständig geschehen ist und die Zellen vereinzelt waren, wurde die Reaktion durch Zugabe der gewünschten Menge an Medium gestoppt und die Zellen wurden in frischem Medium auf neuen Zellkulturschalen weiterkultiviert.

Einfrieren

Zum Einfrieren wurden die konfluenten Zellen wie oben beschrieben durch Trypsinbehandlung von der Schale abgelöst, mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und die Zellsuspension in ein 15 ml Falkonröhrchen überführt. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 1200rpm in einer Hareus Zentrifuge wurden die Zellen pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden für ca. 5 min auf Eis

gelagert und dann bei -80°C weggefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in Flüssigstickstoff.

Auftauen

Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und direkt in ein mit Falconröhrchen mit 10 ml vorgewärmtes Medium gegeben, um das DMSO zu verdünnen. Durch 5-minütige Zentrifugation bei 1200rpm wurden die Zellen pelletiert, das Pellet in 10 ml Medium suspendiert und auf eine 10cm Schale gegeben.

2.2.1.2 Transiente Transfektion von HeLa Zellen mit Ca-Phosphat

- Reagenzien: Plasmid-DNA
 2,5M CaCl_2
 2xHBS
 ddH₂O

Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 80% konfluent (am Tag zuvor 1:8 gesplittet). 30 μg der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurden mit 50 μg 2,5M CaCl_2 versetzt und mit sterilem ddH₂O auf 500 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde gut gemischt. Nun legte man in einem Falconröhrchen 500 μl 2xHBS vor, erzeugte mit einer Glaspipette Blasen, wobei man gleichzeitig den DNA-Mix tropfenweise hinzupipettierte. Es sollte ein weißliches Präzipitat sichtbar werden. Diese Lösung wurde auf das Zellmedium getropft und durch leichtes Schwenken der Kulturschale verteilt. Bei Ko-Transfektion von GFP konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop nach 24-30h die Effizienz überprüft werden.

2.2.1.3 Transiente Transfektion von Phoenix Zellen mit Ca-Phosphat

- Reagenzien: s.o.

Die Zellen wurden am Tag zuvor 1:4 gesplittet. 40 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA wurden wie oben beschrieben transfiziert, ca. 18h später wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und 6,5 ml neues Medium hinzugegeben.

2.2.1.4 Stabile Integration von DNA durch retrovirale Infektion

- Reagenzien: DMEM, 10% Supreme, 1% P/S
 Polybrene
 Blasticidin

Bei der retroviralen Infektion wurden die von Phoenix-Zellen produzierten Viren als Werkzeug zur stabilen Integration von DNA verwendet. Diese Zelllinie exprimiert stabil Gene, die für virale Hüllproteine codieren und ist somit in der Lage, die mRNA der transfizierten DNA verpackt in Retroviren in das Kulturmedium abzugeben. Diese Retroviren können nun Zellen infizieren, die einen ekotrophen Rezeptor exprimieren. Die mRNA wird in den Zielzellen in DNA umgeschrieben und in das Zielgenom integriert.

Herstellung rekombinanter Retroviren

Die Phoenix-Zellen wurden nach der oben beschriebenen Calcium-Phosphat Methode transfiziert. Es wurde ca. 18h nach der Transfektion 6,5 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. In den folgenden 24h wurden die Retroviren produziert und in das Medium abgegeben. Nach dieser Zeit konnte dieses direkt zur Infektion verwendet werden oder einige Minuten in Stickstoff gelagert und dann bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt werden.

Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren

Zur Infektion wurde eine konfluente Schale SHEP-Zellen am Tag zuvor 1:5 gesplittet. Der Virusüberstand wurde, falls zuvor eingefroren, bei 37°C aufgetaut, mit Polybrene 1:500 versetzt. Unter sterilen Bedingungen wurde der Virusüberstand mit einem 0,45 µM Filter steril filtriert. Dieser wurde, nach Entfernen des Mediums von den zu

infizierenden Zellen, für 24h in die Kulturschale gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Selektion infizierter Zellen

Zwei Tage nach Infektion wurde mit der Selektion begonnen. Die verwendeten Plasmide codieren u.a. für ein Resistenzgen für Blastocidin, so dass bei Blastocidinkonzentrationen von 10 µg/ml Medium die nicht infizierten Zellen nach ca. 5 Tagen ausselektiert waren. Als Kontrolle diente eine Selektionsplatte (nicht infizierte Zellen). Die SHEP-Zellen müssen in der Regel am Tag des Selektionsbeginns 1:2 gesplittet werden.

2.2.1.5 Arretierung von Zellen in der Mitose durch Nocodazol

- Reagenzien: Nocodazol

Um Zellen in der Mitose zu arretieren, wurden sie bis zu 24h mit Nocodazol, das ins Zellmedium gegeben wurde, behandelt. Die Dauer der Behandlung richtete sich nach Wachstum der Zelllinien und Art der Fragestellung. Die verwendete Konzentration lag bei 250 ng/ml Medium. Das Nocodazol hemmt die Polymerisation der Aktinfilamente beim Aufbau des Spindelapparates während der Mitose, so dass der nicht funktionelle Spindelapparat den mitotischen Checkpoint aktiviert und die Zellen die Anaphase auf Grund einer Arretierung nicht beenden können. So wurden SHEP-Zellen für bis zu 36h mit Nocodazol behandelt und dann für Immunfluoreszenz (Behandlung schon auf Deckgläschen) oder FACS fixiert.

2.2.1.6 Synchronisierung von Zellen mit Thymidin

- Reagenzien: Thymidin

Die Behandlung der Zellen mit Thymidin, das in einer Konzentration von 2,5 mM für 24h ins Kulturmedium gegeben wurde, führt zu einem späten G1/frühen S-Phase Arrest.

Die Zellen wurden nach 24h aus dieser Phase entlassen, indem ein Mediumwechsel vorgenommen wurde, und laufen nun synchron im Zellzyklus weiter.

2.2.1.7 Synchronisierung der Zellen durch Kontaktinhibition

Die Zellschalen wurden 24h konfluent gelassen und anschließend 1:5 gesplittet. Zum Zeitpunkt des Splittens befanden sich ca. 70% der Zellen in G1, nach 18h sind >40% in der S-Phase, was mit FACS überprüft werden konnte.

2.2.1.8 Inhibition von p53 mit Pifithrin- α

- Reagenzien: Pifithrin- α

Pifithrin- α (**p-fifty three inhibitor**) ist ein p53-Inhibitor und blockiert die p53-abhängige Transkription und Apoptose, ohne die Bildung von Tumoren zu fördern (Komarov et al., 1999). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt, es wird eine spezifische Inhibition von p53 nach Translokation in den Kern vermutet (Murphy et al., 2004). Wie von Komarov et al. Beschrieben, wurden die Zellen zugleich mit dem Spindelgift Nocodazol (s.o.) mit Pifithrin- α (10 μ M) behandelt und dann zu den gegebenen Zeitpunkten fürs FACS fixiert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Design der shRNA-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden nach Brummeklamp et al. (2002) designed. Sie enthalten eine Sequenz von 19 Nukleotiden, die einem Abschnitt der mRNA des Zielgens entspricht, einen Spacer und die zur mRNA gegenläufige Sequenz. Kriterien für die Auswahl der zur mRNA homologen Sequenz sind (Reynolds et al., 2004):

- G/C-Gehalt (30%-52%)
- Mindestens drei A/U-Basen an Position 15-19
- Keine internen Wiederholungen
- A an Position 19
- A an Position 3
- U an Position 10
- Eine andere Base als G oder C an Position 19
- Eine andere Base als G an Position 13

Tab. 2.10: 8 Kriterien zum erfolgreichen Design von siRNAs

Zudem sind die Oligonukleotide so synthetisiert, dass sie ohne weiteres Schneiden mit dem mit BglIII und HindIII geschnittenen Vektor ligiert werden können.

2.2.2.2 Anlagern von Oligonukleotiden

- Reagenzien: Oligo-Anlagerungspuffer
Oligonukleotide (Konzentration: 2µg/µl)

Je 2µl der Oligonukleotide wurden mit 46µl Oligo-Anlagerungspuffer versetzt. In einer PCR-Maschine wurden die Oligonukleotide für 4 min bei 90°C denaturiert, für 10min auf 70°C gehalten und dann langsam (0,01°C/sek) auf 10°C heruntergekühlt. Für eine Ligation in einen Vektor wurden 4µl in einem 20µl-Ligationsansatz verwendet.

2.2.2.3 Schneiden von DNA

- Reagenzien: Restriktionsendonuklease
Zugehöriger 10xPuffer
RNase A
ddH₂O

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Die eingesetzten Mengen und Puffer richteten sich nach Herstellerempfehlung. Ein

Restriktionsverdau wurde z.B. zur Linearisierung eines Vektors oder nach einer Plasmid-Präparation aus Bakterien zur Überprüfung durchgeführt.

Ansatz zur Linearisierung: 5 µg Plasmid-DNA
 5 µl 10x Restriktionspuffer
 je 1µl Restriktionsendonuklease
 X µl ddH₂O
 = 50 µl Gesamtvolumen

Der Restriktionsverdau des pSUPERIOR Vektors wurde nach Herstellerempfehlung in zwei Schritten mit HindIII und BglIII vorgenommen. Dazu wurde zunächst 60 min mit HindIII geschnitten, anschließend BglIII zugegeben und weitere 2h inkubiert. Anschließend folgte eine Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65-80°C.

Ansatz zum Kontrollverdau: 4 µg Plasmid-DNA
 2 µl 10x Restriktionspuffer
 je 0,25µl Restriktionsendonuklease
 0,25µl RNase A
 X µl ddH₂O
 = 20 µl Gesamtvolumen

Pro µg DNA wurden 5-10U Restriktionsenzym eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in der Regel zwischen 5 und 12h bei 37°C.

2.2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

- Reagenzien: agarose
 1xTAE-Puffer
 Ethidiumbromid
 5x DNA Ladepuffer
 1kb DNA Marker

DNA-Fragmente aus Restriktionsverdau oder PCR-Produkte wurden zu analytischen Zwecken über 1,0-2,0% (w/v) Agerosegele in 1xTAE-Puffer aufgetrennt. Nach Lösen der Agarose in 1xTae-Puffer in der Mikrowelle wurde Ethidiumbromid (interkaliert in doppelsträngige DNA) in einer Endkonzentration von 0,5 µg/µl zugegeben und das Gemisch in die entsprechenden horizontalen Gelkammern mit Gelkämmen gegossen. Die Proben wurden in 1xDNA-Ladepuffer zusammen mit ca. 5 µl des 1kb Markers als molekularer Massenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße zwischen 80 und 129 V in 1xTAE Laufpuffer. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht (320 nm) und somit erzeugter Fluoreszenz des interkalierten Etidiumbromids analysiert und mit Hilfe einer Kamera und dem entsprechenden Computerprogramm Gel doc von Biorad in Grafikdateien gespeichert.

2.2.2.5 Aufreinigen von DNA-Fragmenten

- Reagenzien: Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von Restriktionsfragmenten wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Qiagen Gelextraktionskit. Dafür wurde die Agarose mit dem 3-fachen Gelvolumen QG Puffer für 10 min bei 50°C inkubiert und dadurch geschmolzen. Die Lösung wurde mit 1-fachem Gelvolumen Isopropanol versetzt, auf eine Säule gegeben und 10 sek bei 13.200rpm zentrifugiert. Zum Entfernen der überschüssigen Agarose wurde die Säule mit 500µl QG gewaschen und wie im vorigen Schritt zentrifugiert. Zum Waschen wurden 0,75ml PE auf die Säule gegeben und zweimal bei 13.200rpm für jeweils 1 min zentrifugiert, um die Ethanol-Reste des PE-Puffers von der DNA zu entfernen. Die Elution erfolgte über eine Zentrifugation bei 13.400rpm für 1 min mit 30-50µl EB in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß.

2.2.2.6 Ligation

- Reagenzien: T4 DNA Ligase (NEB)
10x T4 DNA Ligationspuffer

Zur Ligation wurden Vektor und zu klonierende DNA so restriktionsverdaut, dass kompatible Enden entstehen, und die DNA-Konzentration von Vektor und Insert photometrisch bestimmt. Die Ligation wurde in einem Volumen von 20µl angesetzt, wobei 50ng Vektor und das sechsfache molare Verhältnis an Insert verwendet wurden.

X µl Vektor
X µl Insert
1µl 10x Ligationspuffer
1µl T4 DNA Ligase
X µl ddH₂O
= 20µl Gesamtvolumen

2.2.2.7 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

- Reagenzien: LB-Medium
(LB-Platten)

Transformationskompetente DH5α wurden auf Eis aufgetaut. 5 µg des zu transformierenden Plasmids wurden mit 100 µl Bakteriensuspension 2 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte 45 sek bei 42°C in Heizblock. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 min und anschließender Zugabe von 400 µl vorgewärmten Mediums (ohne Ampicillin) wurden die Bakterien für 30-45 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Zur Maxiprep wurden 150 µl der transformierten Bakterien in 250 ml LB^{Amp}-Medium angeimpft und über Nacht bei 250 rpm und 37°C geschüttelt. Zum Ausplattieren wurde die Bakteriensuspension 1 min bei 1300rpm (RT) zentrifugiert und anschließend 400 µl des Überstandes abpipettiert. Die Bakterien wurden in dem Rest-Medium resuspendiert und auf LB-Platten aufgetragen.

2.2.2.8 Präparative Isolation von Plasmid DNA aus Bakterien

MiniPräp:

- Reagenzien: LB^{AMP}
 Miniprep I
 Miniprep II
 Miniprep III
 100% Ethanol
 TE

Transformierte Bakterienkolonien auf LB^{AMP}-Platten wurden mit Hilfe autoklavierter Pipettenspitzen gepickt und in 5ml LB^{AMP} in einem 15ml Falcon Röhrchen angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einem Schüttler bei 37°C. Um die Kolonien auf Vorhandensein des transformierten Plasmids zu testen, wurde die DNA durch alkalische Lyse isoliert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT und 13.000rpm. 1,5ml der Übernachtskultur der transformierten Bakterien wurden 1 min in einem 1,5ml Eppendorfgefäß abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 150µl Miniprep I resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 150µl Miniprep II, fünfmaliges Invertieren der Gefäße und fünfminütige Inkubation bei RT. Durch Zugabe von 150µl Miniprep III mit anschließendem fünfmaligen Invertieren wurde neutralisiert. Das ausfallende Kalium-SDS wurde durch Zentrifugation für 5 min pelletiert und 400µl des Überstandes mit 1ml Ethanol versetzt. Nach 15 min Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, die DNA bei RT getrocknet und in 30µl TE aufgenommen.

Maxipräp/Midipräp:

- Reagenzien: Maxi-Präp Kit (Genomed)
 TE

Um größere Mengen eines Plasmids zu erhalten, wurden 100ml/50ml einer transformierten DH5α Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers (Genomed) für den DNA Maxikit verarbeitet. Das DNA Pellet wurde je nach Größe in 100-200µl

TE Puffer resuspendiert. Die Konzentration wurde nach photometrischer Bestimmung auf $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.2.2.9 RNA-Isolierung mit TRIZOL

- Reagenzien: TRIZOL
Chloroform
Isopropanol
75% Ethanol
RNase freies DEPC Wasser

Nach Abnahme des Mediums wurde 1 ml TRIZOL ohne vorheriges Waschen mit PBS auf die Zellen gegeben, mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt und in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 200 μl Chloroform hinzugegeben, 15 sec geschüttelt und 2-3 min ruhen gelassen. Dann wurde für 10 min bei 16200 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf Gefäß mit 500 μl eiskaltem Isopropanol überführt und 10 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 11400 rpm für 10 min bei 4°C , die nach Waschen mit 1 ml 75% Ethanol noch einmal mit 9000rpm wiederholt wurde. Die RNA wurde nach Abnahme des Überstandes in 30 μl RNase freiem DEPC Wasser resuspendiert.

2.2.2.10 cDNA-Synthese

- Reagenzien: M-MLV-RT (Invitrogen)
Random Primer ($0,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Roche)
RNasin (Promega)
5x "first strand buffer" (Invitrogen)
0,1 M DTT (Sigma)
dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP;
jeweils 2mM in DEPC- H_2O
RNase freies DEPC- H_2O

Die Synthese der cDNA wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

2,5µg RNA
0,5µl Random Primer
5µl 2mM dNTPs
ad 12µl DEPC-H₂O

Dieser Ansatz wurde 5 min bei 65°C in einem T1 Thermo cycler und dann 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden zugegeben:

4µl 5x first strand buffer
2µl 0,1 M DTT
1µl RNasin

Nach 10 min Inkubation bei 25°C wurde 1µl M-MLV-RT zugegeben, 50 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Auf diese Weise erhält man 20µl cDNA, die 1:1 mit ddH₂O verdünnt in eine rtPCR eingesetzt wurde.

2.2.2.11 Real-time-PCR

- Reagenzien: qPCR Core Kit for Cybr Green (Eurogentec)

Durch die Real-time-PCR kann die Menge an DNA in einer Probe quantitativ gemessen werden. Während der Amplifikation wird die Fluoreszenzintensität eines an die DNA bindenden Farbstoffes (SybrGreen) gemessen. Hiedurch kann direkt auf die Menge an vorhandener DNA in der Probe während eines bestimmten Zyklus rückgeschlossen werden. Die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal über den Hintergrund steigt, wird als CT-Wert (Cycle treshold) gesetzt und so können die verschiedenen CT-Werte verschiedener, mit den gleichen Primern amplifizierten Proben untereinander verglichen werden. Die Messung erfolgt immer in Triplikaten.

Für die Real-time-PCRs wurde folgender Ansatz mit folgendem PCR-Ablauf verwendet:

2µl cDNA
 2,5µl 10x Puffer
 1,75µl MgCl₂ 50mM
 25 pmol 5'-Primer
 25 pmol 3'-Primer
 1µl dNTPs 5mM
 0,75µl SybrGreen I
 0,125µl Hot GoldStar Polymerase

95°C 10min
 95°C 15sek | 40 Zyklen
 60°C 1min

Für quantitative rt-PCRs (qrt-PCR) wurde folgende Formel zur Berechnung der x-fachen Induktion (fold induction) in Vergleich zur Kontrolle (kontrollinfizierte Zellen) berechnet. Zur Normalisierung wurde die GAPDH-Expression als Referenz verwendet:

$$\begin{aligned}
 CT^{\text{GEN}} - CT^{\text{GAPDH}} &= \Delta CT \\
 CT^{\text{RNAi}} - CT^{\text{Kontrolle}} &= \Delta\Delta CT \\
 \text{Fold induction} &= 2^{-\Delta\Delta CT}
 \end{aligned}$$

Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Für die Werte wurde der Mittelwert berechnet und die Standardabweichung bestimmt.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 FACS

2.2.3.1.1 Eindimensional (PI)

- Reagenzien:
 - PBS
 - 80% Ethanol
 - 38mM Na-Citrat

RNase A

Propidiumjodid

Zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation werden mittels Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt sowie die Größe der einzelnen Zellen bestimmt und somit auf den Zellzyklusstatus Rückschlüsse gezogen. Dazu werden die Zellen zunächst von der Kulturschale durch Trypsinbehandlung gelöst, in ca. 10 ml Medium aufgenommen und mit 1200 rpm 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf ca. 100 µl abgenommen und die Zellen im Rest resuspendiert. Zur Fixierung gibt man unter vortexen tropfenweise 1 ml eiskaltes 80% Ethanol hinzu. Die Zellen werden 24h bei 4°C gelagert, anschließend können sie bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden. Zur Messung wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, einmal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 500 µl 38mM Na-Citrat resuspendiert. Es werden 25 µl RNase A zugegeben und 1,5 h bei 37°C inkubiert. Direkt vor der Messung werden die Zellen mit 15 µl Propidiumjodid versetzt, was in die DNA interkaliert und somit detektiert werden kann. Mit einem FACScalibur wurden 25000 Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programms Cellquest Pro.

2.2.3.1.2 Zweidimensional (PI und BrdU)

- Reagenzien: BrdU
PBS
80% Ethanol
2 M HCl/0,5% Triton X-100
0,1 M Na₂B₄O₇, pH 8,5
PBS/0, 5% Tween 20/1% BSA
α-BrdU-FITC
38mM Na-Citrat
RNase A
Propidiumjodid

Die Zellen wurden in der S-Phase mit BrdU, einem Thymidin-Analoga, markiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt gemessen (s.o.). Dazu wurden 10µM BrdU zu dem Kulturmedium gegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Alle zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befindlichen Zellen lagerten das BrdU in die DNA ein. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und konnten mit neuem Medium nun bis zum jeweiligen Fixierungszeitpunkt weiter wachsen. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben abtrypsinisiert und in 80% Ethanol fixiert (über Nacht bei 4°C). Zur Messung wurden die Zellen 10 min bei 1000rpm pelletiert und in 1ml 2 M HCl/0,5% Triton X-100 resuspendiert. Um die DNA zu denaturieren, lässt man die Zellen 30 min bei RT inkubieren, wobei sie alle 10 min leicht geschüttelt wurden. Nach erneuter Zentrifugation (1000rpm; 10min), wurde das Pellet zur Neutralisation in 1ml 0,1 M Na₂B₄O₇ resuspendiert. 1x 10⁶ Zellen wurden nun in ein Eppendorfgefäß überführt, 10 sek zentrifugiert und in 50µl PBS/0,5% Tween 20/1% BSA resuspendiert. Hierzu wurden nun 20µl α-BrdU-FITC (pro 1x 10⁶ Zellen) gegeben und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und mit 50µl PBS/0,5% Tween 20/1% BSA gewaschen und wie oben beschrieben in Na-Citrat + RNase A resuspendiert und nach Inkubation mit Propidiumjodid versetzt. (Messung und Auswertung siehe oben.)

2.2.3.1.3 Berechnung der Bewegung im Zellzyklus und DNA-Synthese-Zeit

Die Bewegung der Zellen durch die S-Phase (RM= relative Movement) wurde wie folgt berechnet (Begg et al., 1985):

$$RM = \frac{F_L - F_{G1}}{F_{GM} - F_{G1}}$$

Dabei beinhaltet F_L die Fluoreszenzintensität (x-Achsen-Wert) der BrdU-positiven Zellen der S-Phase und G2/M, F_{G1} alle (auch BrdU-negativ) Zellen in G1 und F_{GM} alle Zellen in G2/M. Diese Formel hat jedoch nur Gültigkeit, wenn noch keine BrdU-positiven Zellen die Mitose vollendet haben und wieder in G1 auftauchen.

Daraus wurde dann die DNA-Synthese-Zeit (T_s) wie folgt berechnet:

$$T_s = \frac{0.5}{RM - 0.5} \times t,$$

t steht hierbei für die Zeit des chases.

2.2.3.2 Immunfluoreszenz

- Reagenzien: Ethanol
3% Paraformaldehyd/ 2% Glukose in PBS
Bisbenzamid
Mounting Medium
Nagellack

1×10^5 Zellen wurden auf zuvor mit Ethanol abgeflammt Deckgläschen in einer six-well Platte ausplattiert. Zur Fixierung wurden sie mit PBS gewaschen und durch 10 min Inkubation in 3% Paraformaldehyd/ 2% Glukose in PBS fixiert. Danach wurden sie zweimal mit PBS ab gespült und zusätzlich 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Kerne mit Bisbenzamid (1:250 in PBS) angefärbt und nach ca. 5 min kurz mit PBS ab gespült. Nun wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf Objektträger mit je einem Tropfen Mounting Medium gelegt und mit Nagellack versiegelt. Für den Mitose Index wurden pro Zellart und Zeitpunkt jeweils > 500 Zellen unter einem UV-Mikroskop ausgezählt.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Zellextrakten

2.2.4.1.1 Lyse in TNN

- Reagenzien: PBS
TNN-Proteaseinhibitoren

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS (bei einer 10 cm Platte) abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Diese wurden 5 min mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das 9-10fache des Zellpellets TNN-Puffer + Proteaseinhibitoren hinzugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und die Lyse durch mehrfaches Auf- und Ab-pipetieren unterstützt. Nach einer 20 min Inkubation auf Eis wurde gevortext und mit 1400 rpm bei 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteine und wurde in ein neues Gefäß überführt und konnte zur Lagerung zuerst in Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt werden. Zur direkten Auftragung auf ein SDS-Page-Gel wurde das Lysat nach der Bestimmung der Proteinkonzentration in 3xEBS aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht.

2.2.4.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

- Reagenzien: Bradford-Reagenz
 BSA-Lösung

3-2 µl des Zelllysats wurden mit 100µl 150mM NaCl und 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption der Ansätze in Duplikation bei 595nm im Photometer bestimmt. Wenn der Coomassie-Farbstoff an Aminosäuren gebunden hat, wurde das Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm verschoben und somit ließ die Absorption bei 595nm Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration zu. Parallel wurde die Absorption einer BSA-Verdünnungsreihe gemessen und so eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration bestimmt werden konnte.

2.2.4.2 Western Blot

Zum Nachweis von bestimmten Proteinen in einem Proteingemisch wurden diese auf ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen. Nach Anlegen eines Gleichstroms wurden diese denaturiert und nach dem Molekulargewichts nach aufgetrennt. Anschließend wurden sie von Gel auf eine PVDF-Membran übertragen, auf der sie durch Antikörper spezifisch gebunden wurden. Ein an eine Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper

entwickelte bei Zugabe eines Substrates (Luminol) Licht, das an dieser Stelle einen auf die Membran gelegten Film schwärzte.

2.2.4.2.1 SDS-Gelelektrophorese

- Reagenzien:
 - H₂O
 - 1,5 M Tris pH 8,8
 - 0,5 M Tris pH 6,8
 - Acrylamid/Bisacrylamid
 - 20% SDS
 - 10% APS
 - TEMED
 - Isopropanol
 - 3xESB
 - 1xSDS-Laufpuffer

Je nach Fragestellung wurde ein Gel, das aus einem Sammelgel mit niedriger Acrylamidkonzentration und einem Trenngel besteht, gegossen. Die Konzentration des Trenngels bestimmt die Dichte der Matrix des Gels und somit den Auftrennungsgrad und ist somit je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins zu wählen. Durch Anlagerung von SDS an die einzelnen Aminosäuren wurden die Proteine negativ geladen und liefen somit bei Anlegen einer konstanten Stromstärke abhängig von ihrem Molekulargewicht unterschiedlich schnell in Richtung Anode.

Hier wurden 10%ige Trenngele mit 1,5mm Stärke verwendet, die zusammengesetzt waren aus:

6,1 ml	H ₂ O
3,7 ml	1,5 M Tris pH 8,8
5,0 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
75 µl	20% SDS
100 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Durch Zugabe von APS und TEMED an Schluss wurde die Polymerisationsreaktion gestartet, der Ansatz wurde durch kurzes Vortexen gemischt.

Nach Säubern der Glasplatte mit Ethanol und Aufbau einer Gelapparatur für Minigele von Biorad wurde zunächst das noch nicht auspolimerisierte Trenngel gegossen. Um eine glatte Front zum Sammelgel zu bilden, wurde das Trenngel bis zur Auspolimerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärtung wurde das Isopropanol abgegossen, das Sammelgel darüber gegossen und ein Kamm mit der gewünschten Anzahl der Taschen eingesetzt. Das 5%ige Sammelgel bestand aus:

6,9 ml	H ₂ O
1,4 ml	0,5 M Tris pH 6,8
1,6 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
50 µl	20% SDS
50 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Nach Auspolimerisation wurde das Gel aus der Gießvorrichtung entnommen und in einer Laufapparatur fixiert. Diese wurde mit 1xSDS-Laufpuffer gefüllt. Nach Ziehen des Kamms wurden die Taschen mit Hilfe einer Hamilton-Spritze mit den Proben, die zuvor mit 3xEBS versetzt und aufgekocht wurden, beladen. In einer Spur wurden 5µl Proteinstandard aufgetragen, um später die Größe der Proteine in den jeweiligen Proben abschätzen zu können. Ein Minigel dieser Dicke wurde bei konstanten 35 mA für ca. 1h angeschlossen.

2.2.4.2.2 Übertragen von Proteinen auf PVDF-Membranen: Nass-Blot

- Reagenzien: Methanol

Nachdem die Proteine infolge ihrer negativen Ladung ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt wurden, wurden sie nun von dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dies erfolgte in einer Kammer, befüllt mit 1xBlot-Puffer. Die Apparatur wurde folgendermaßen zusammengebaut:

2x Whatman-Papier
PVDF-Membranen
Gel
2x Whatman-Papier

Die Whatman-Papiere wurden in Blot Puffer eingeweicht, die Membran zur Equilibrierung für 1 min in Methanol gebadet und dann für einige Minuten in Blotpuffer aufbewahrt. Nach dem Zusammenbau wurden die Luftblasen entfernt und das Ganze zwischen zwei in Blotpuffer getränkten Schwämmchen in die Apparatur eingelegt. Die Apparatur wurde so an den Stromkreis angeschlossen, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf die Membran gebracht wurden. Um eine Überhitzung zu vermeiden, wurde zusätzlich ein Kühlakku in die Blotkammer gestellt. Es wurde ca. 1,5 h bei 200 mV geblottet. Anhand des Markers ließ sich der Transfer kontrollieren.

2.2.4.2.3 Antikörperreaktion und Filmentwicklung

- Reagenzien: TBST
TBST/3% Milchpulver
 1. Antikörper
 2. AntikörperChemolumineszenz-Substratlösung mit Luminol

Die PVDF-Membran wurde ca. 15 min in TBST/3% Milchpulver geblockt und dann in der Blocklösung mit dem ersten Antikörper über Nacht langsam schwenkend inkubiert (Verdünnung der jeweiligen Antikörper siehe 2.1.7). Am nächsten Morgen wurde die Membran in TBST 1x10 min und 2x5 min gewaschen. Nun wurde der Blot mit dem zugehörigen Zweitantikörper, an den Horseradish-Peroxidase gekoppelt ist, in 1:1000 Verdünnung in TBST für 1h behandelt. Es folgten Waschschrte wie oben beschrieben. Danach wurde der Blot 1 min in der frisch zubereiteten Substratlösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Blot zwischen zwei Filterpapieren trockengepresst, um den Hintergrund durch überschüssige Flüssigkeit möglichst gering zu halten. Die Membran wurde in der Filmkassette fixiert und mit Frischhaltefolie bedeckt, bevor die Belichtung des Films in der Dunkelkammer erfolgte: Ein Film

wurde in die Filmkassette eingelegt und anschließend in einer Entwicklermaschine entwickelt. Da das Luminol von der an den Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase umgesetzt wird, wird Licht emittiert, so dass der Film nur an den Stellen belichtet wird, wo sich Proteine befinden. Falls die Signale nach der Entwicklung zu stark oder zu schwach waren, wurde die Dauer der Filmexposition angepasst. Anhand des Markers ließen sich die zu erkennenden Banden den korrelierenden Proteinen zuordnen.

2.2.4.3 Immunpräzipitation

- Reagenzien: TNN-Puffer + Proteaseinhibitoren
Protein-A-Sepharose
PBS
3xESB

Durch die Immunpräzipitation können Proteine durch Antikörper spezifisch angereichert werden, was bei der Untersuchung von endogenen, schwach exprimierten Genen genutzt wurde. Auf diese Weise konnte die Herunterregulation von LIN-9 und B-Myb in HeLa- und SHEP-Zellen detektiert werden. Hierzu wurden 500 µg Zelllysat in die Immunpräzipitation eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 300 µl, wobei das Lysat mit TNN-Puffer + Proteaseinhibitoren aufgefüllt wurde (Verdünnung der jeweiligen Antikörper siehe 2.1.7) Die Inkubation erfolgte über Nacht im Rad bei 4°C. Anschließend wurden die Ansätze mit 30 µl Protein-A-Sepharose versetzt und für eine weitere Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Die an die Protein-A-Sepharose gebundenen Immunkomplexe wurden durch Zentrifugation mit 2300 rpm für 1 min vom Überstand getrennt. Die Sepharose-Beads wurden fünfmal mit TNN-Puffer + Proteaseinhibitoren gewaschen, um unspezifisch an die Beads gebundene Proteine zu entfernen. Dann erfolgte ein einmaliger Waschschrift mit PBS, wonach mit einer Hamilton-Spritze die restliche Flüssigkeit abgenommen wurde. Nach Zugabe von 20 µl PBS und 10µl 3xEBS wurden die Proben bei 95°C 5 min aufgekocht, damit sich die Proteine von den Beads lösen, und das Lysat mit einer Hamilton-Spritze auf ein denaturierendes SDS-Page aufgetragen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Test neuer shRNA-Sequenzen gegen LIN-9 und B-MYB

3.1.1 Depletion von LIN-9 und B-MYB durch shRNAs in HeLa Zellen

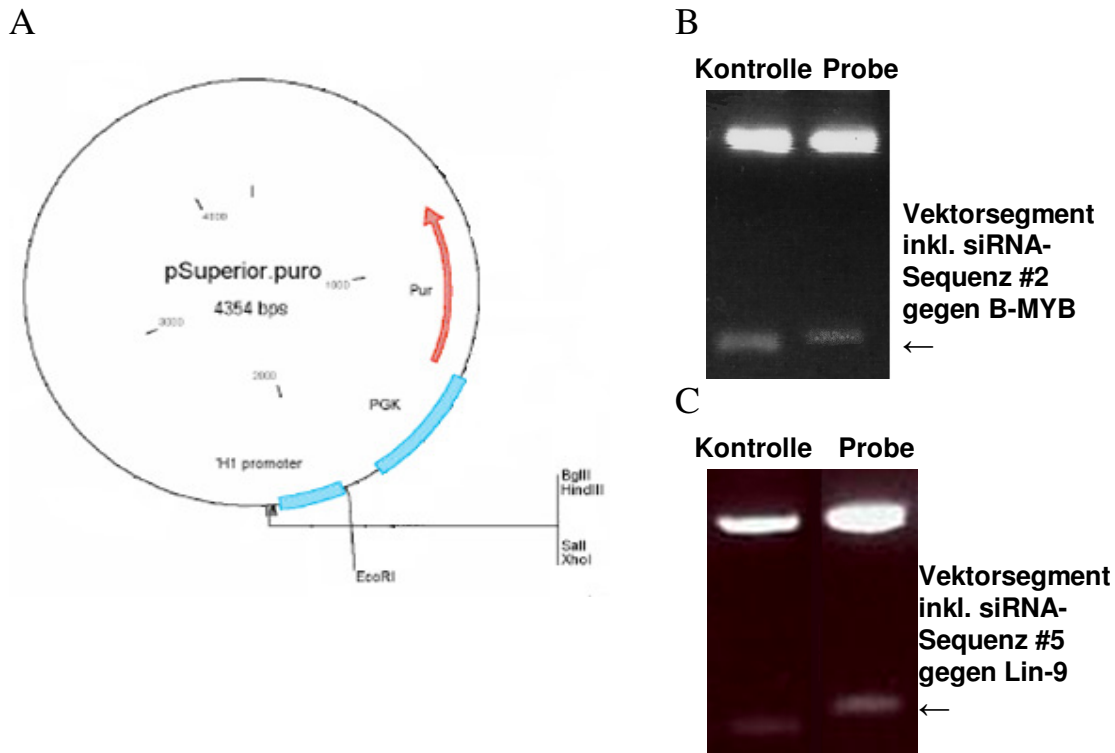


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des pSuperior.puro-Vektors und Kontrolle der Klonierung:

A) In den mit BglII und HindIII geschnittenen Vektor wurde die shRNA-Sequenz hinter den H1-Promotor kloniert. Außerdem markiert sind der PGK-Promotor und die Puromycinresistenz sowie die wichtigsten Schnittstellen. **B und C)** Kontrollverdau des Leervektors und der jeweiligen Probe mit Xho und EcoRI, das größere Segment in der zweiten Spalte enthält in B) die shRNA-Sequenz #2 gegen B-MYB, in C) die shRNA-Sequenz #5 gegen LIN-9.

Um eine dauerhafte Herunterregulation durch RNA Interferenz zu erzielen, habe ich einen pSuperior.puro-Vektor genutzt, durch dessen Vermittlung shRNA-Abschriften in der Zelle synthetisiert werden können (Abb. 3.1A). Die shRNA-Oligonukleotide werden hinter einen Polymerase- III H1-RNA Promoter kloniert, der durch einen Tet-Repressor regulierbar ist. Der pSuperior.puro-Vektor enthält zusätzlich Resistenzgene gegen Puromycin und Ampicillin. Zwei neue shRNA-Sequenzen gegen LIN-9 (#5 und 6) und drei Sequenzen gegen B-MYB (# 2, 3 und 4; Sequenz #2 wurde bereits publiziert: Zhu et al., 2004) wurden in den pSuperior.puro-Vektor kloniert. (Für Kriterien zu Design und Auswahl der Oligonukleotide siehe Material und Methoden 2.2.2.1.) Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktionsverdau und nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht bestätigt (Abb. 3.1), anschließend

erfolgte eine Sequenzierung bei der Firma SeqLab zum Ausschluss von Punktmutationen. Alle Vektoren wurden dann in HeLa-Zellen transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mit einem ko-transfizierten Vektor überprüft, der für GFP kodiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte nach 24-30h eine Effizienz von 60-70% nachgewiesen werden. Die Zellen wurden nach drei Tagen lysiert und Proteine mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) im Lysat nachgewiesen. In IP- Western Blots konnte bei je einer weiteren shRNA Sequenz gegen LIN-9 (# 5) und B-MYB (# 2) eine deutliche Herunterregulation beobachtet werden, die mit den alten, bereits bekannten shRNAs vergleichbar ist (Abb. 3.2).

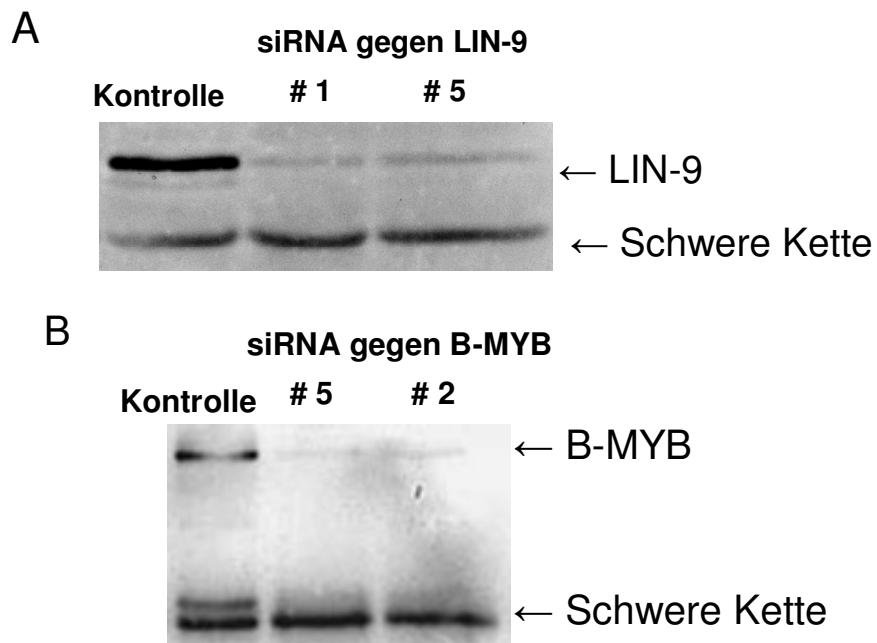


Abb. 3.2: Test der neuen LIN-9 und B-MYB spezifischen shRNAs in HeLa Zellen:

IP und Western Blot gegen LIN-9 bzw. B-MYB nach Lyse in TNN drei Tage nach Transfektion mit dem leeren Kontrollvektor oder shRNA gegen LIN-9 bzw B-MYB. **A)** Im Vergleich zur Kontrolle deutliche Herunterregulation von LIN-9 bei beiden shRNAs, die neue Sequenz # 5 bewirkt einen ebenso guten *knock down* wie die bereits bekannte Sequenz #1. **B)** Im Vergleich zur Kontrolle deutliche Herunterregulation von B-MYB bei beiden shRNAs, die neue Sequenz # 2 bewirkt einen ebenso guten *knock down* wie die bereits bekannte Sequenz #5.

3.1.2 Depletion von B-MYB durch shRNA in SHEP und BJ

Um die in HeLa Zellen funktionierenden shRNA-Sequenzen auch in anderen humanen Zelllinien austesten zu können, mussten sie in einen viralen RNAi-Vektor umkloniert werden (pMSCV). Dieser Vektor ermöglicht nach Transfektion von Phoenix-Zellen

(Humane Packaging Zelllinie zur Herstellung rekombinanter, ekotropher Retroviren) die Herstellung der zur Infektion benötigten Viren. Die bereits in HeLa Zellen gezeigte Depletion von B-MYB durch die shRNA-Sequenz # 2 konnte in SHEP-Zellen (stabile Expression eines ekotrophen Rezeptors) auf Proteinebene im Western Blot (Abb. 3.3.A) und in BJ-Zellen auf mRNA-Ebene mittels qPCR bestätigt werden (Abb. 3.3.B, durchgeführt von Stephanie Heinrich).

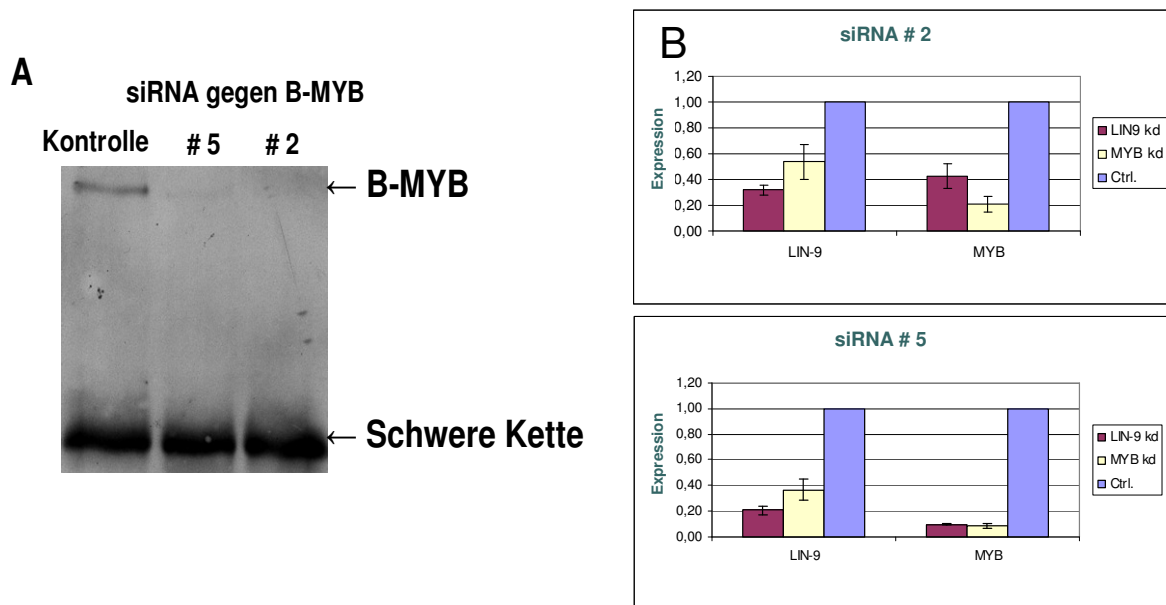


Abb. 3.3: Depletion von B-MYB in SHEP und BJs:

A) Nach Infektion und Selektion von SHEP konnte in TNN-Lysaten mittels IP/Western Blot gegen B-MYB eine deutliche Depletion von B-MYB durch die neu shRNA (#2) beobachtet werden. Als Kontrolle diente der leere pMSCV-Vektor, Sequenz # 5 ist eine bereits bekannte shRNA gegen B-MYB. **B)** Nach Infektion und Selektion von BJ-Zellen konnte mittels qPCR eine deutliche Depletion von B-MYB, sowie die bereits vorbekannte Ko-Regulation von Lin-9 durch die neu shRNA (#2) beobachtet werden. Als Kontrolle diente der leere pMSCV-Vektor, Sequenz # 5 ist eine bereits bekannte shRNA gegen B-MYB (durchgeführt von Stephanie Heinrich).

3.1.3 Neue shRNA gegen LIN-9 führt in SHEP und BJ zu Apoptose

Die in HeLa Zellen erfolgreich getestete shRNA # 5 gegen LIN-9 führt in SHEP Zellen zu Apoptose. Dies zeigte sich unter dem Lichtmikroskop als Verkleinerung und Abrundung von Zelle und Zellkern sowie Ablösung der Zelle von der Kulturschale. Während parallel mit anderen Sequenzen infizierte Zellen gut wuchsen, starben alle mit Sequenz # 5 Zellen unter Selektion innerhalb 2-3 Tagen. Denselben Effekt konnte Lisa Osterloh auch in BJs beobachten (persönliche Kommunikation). Um genauer zwischen shRNA-induzierten Effekten und der Selektion unterscheiden zu können, habe ich in einem neuen Ansatz unter sonst gleichen Bedingungen eine Schale der mit der Sequenz

5 infizierten Zellen mit Blastizidin selektioniert und eine andere ohne Selektion beobachtet. Wie erwartet starben erneut alle Zellen der Selektionsschale innerhalb 2-3 Tagen. Die Zellen ohne Selektion zeigten keine Effekte. Ob Blastizidin als Trigger für die zytotoxischen Effekte benötigt wird oder im zweiten Fall eventuell doch vorhandene apoptotische Zellen durch die ohne Selektion schnell wachsenden nicht infizierten Zellen überdeckt wurden, bleibt unklar.

Sofern nicht anders bezeichnet, wurden in den folgenden Experimenten jeweils die bekannten und getesteten shRNAs gegen LIN-9 (#1) und B-MYB (#5) verwendet.

3.2 Charakterisierung von LIN-9 und B-MYB defizienten Zellen

3.2.1 Die Expression von Checkpoint-Genen ist in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP vermindert

Die von Lisa Osterloh durchgeführten cDNA-Microarrays in BJ-Fibroblasten führten zur Identifikation von Genen mit beschriebener Rolle im G2/M-Übergang, die zum großen Teil schon als direkte E2F- und zum Teil auch als B-MYB-Zielgene beschrieben sind (siehe 1.4). Es sind sowohl Gene, die essentiell für den Übergang von der G2- in die M-Phase sind, als auch Gene mit Funktion in der Mitose. Um diesem genauer nachzugehen, wurde zunächst in SHEP-Zellen die Expression einiger Zielgene mit Funktion in G2/M, speziell im Spindel-Checkpoint, auf RNA-Ebene untersucht. Dazu wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR (qPCR) die Expression verschiedener Gene untersucht. Zur Normalisierung wurde die GAPDH-Expression als Referenz verwendet. Hier sieht man deutlich den durch shRNA induzierten *knock down* von LIN-9 bzw. B-MYB im Vergleich zu kontrollinfizierten Zellen und erkennt zudem eine ko-Regulation dieser Gene. Zudem ist bei allen getesteten Genen die Expression vermindert, auffällig ist besonders die starke Repression von Aurora A (Abb. 3.4).

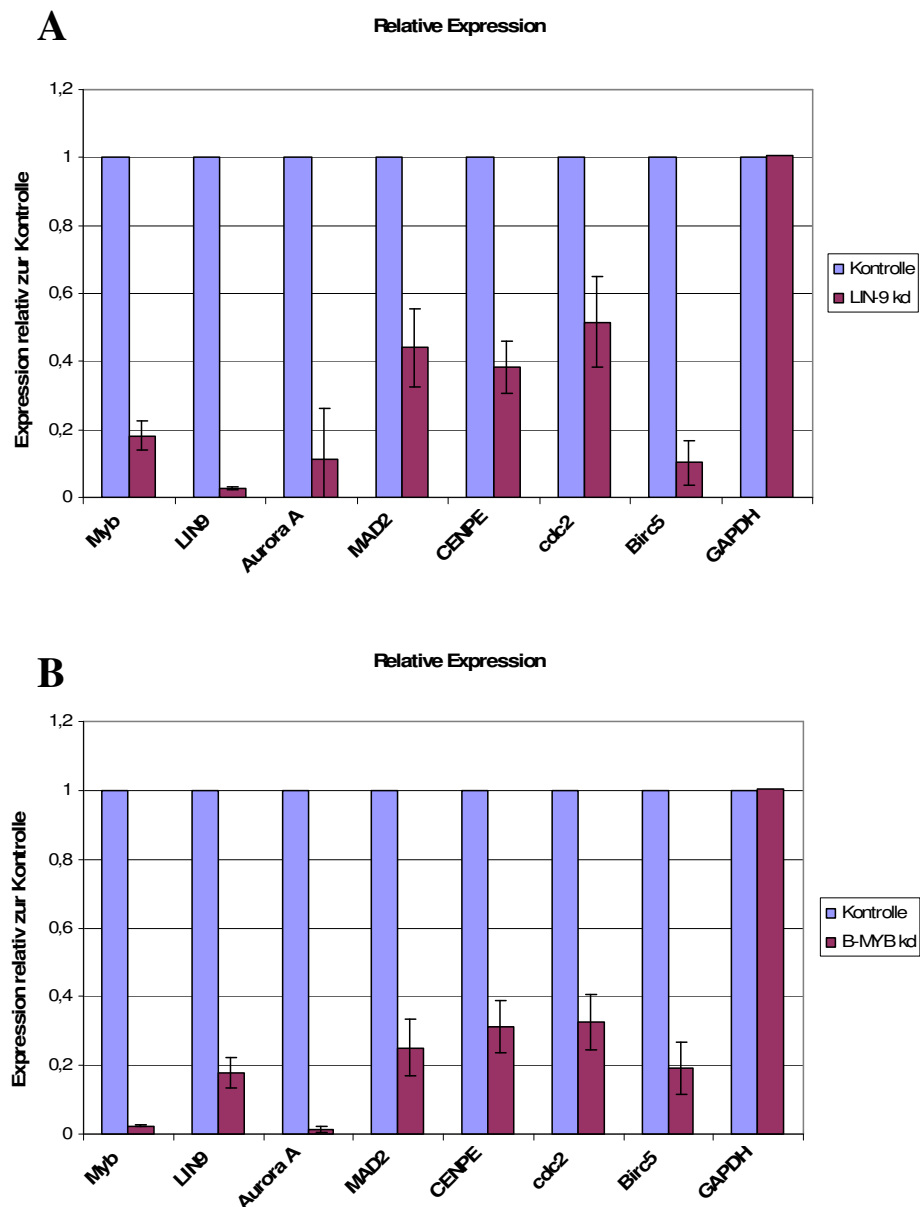


Abb. 3.4: LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen zeigen eine verminderte Expression von Checkpoint-Genen: Aus infizierten und selektionierten SHEP wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR die Expression verschiedener Gene untersucht. **A)** Expression in LIN-9 depletierten Zellen, **B)** Expression in B-MYB depletierten Zellen; Man sieht deutlich den durch shRNA induzierten *knock down* von LIN-9 bzw. B-MYB im Vergleich zu kontrollinfizierten Zellen und erkennt zudem eine ko-Regulation dieser Gene. Zudem ist bei allen getesteten Genen die Expression vermindert, auffällig ist besonders die starke Repression von Aurora A. Die GAPDH-Expression wurde als Referenz verwendet und bleibt bei LIN-9- oder B-MYB-knockdown unbeeinflusst.

3.2.2 LIN-9 und B-MYB depletierte SHEP-Zellen weisen mitotischen Spindel-Checkpoint-Defekt auf

Da die oben gezeigte verminderte Expression von Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, Bub3 und CENP-E Proteine betrifft, die essentiell (Meraldi et al., 2004) an der Checkpointaktivierung beteiligt sind und als mitotischer Checkpoint Complex (MCC) bezeichnet werden (Sudakin 2001, Morrow, 2005), ergibt sich nun die Frage, ob dieser Checkpoint in LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen funktionstüchtig ist. Es ist zu erwarten, dass Zellen mit einem Defekt im mitotischen Spindel-Checkpoint die Mitose auch nach Behandlung mit einem Spindelgift vorzeitig verlassen (Paulovich et al. 1997 und Nicklas et al. 1997). Nach Behandlung der SHEP-Zellen mit Nocodazol (verhindert die Depolymerisation der Mikrotubuli) und Färbung mit Bisbenzamid zeigt sich unter einem UV-Mikroskop in den Kontrollzellen (infiziert mit dem leeren pMSCV-Vektor) wie erwartet eine Akkumulation von Zellen mit kondensierten Chromosomen, was auf einen mitotischen Block und somit einen intakten Checkpoint hinweist. LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen hingegen weisen in zwei unabhängigen Experimenten deutlich weniger mitotische Zellen auf, der flachere Kurvenverlauf ist charakteristisch für Zellen mit einem defekten mitotischen Checkpoint (Cahill et al., 1998) (Abb. 3.5).

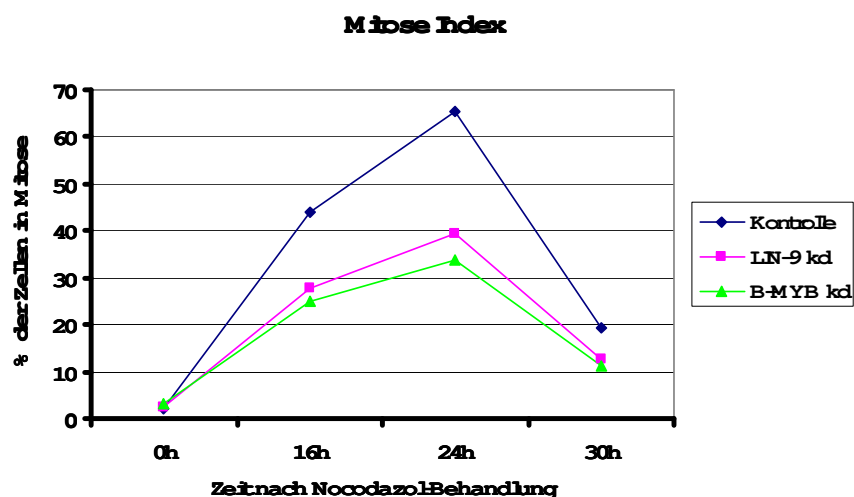
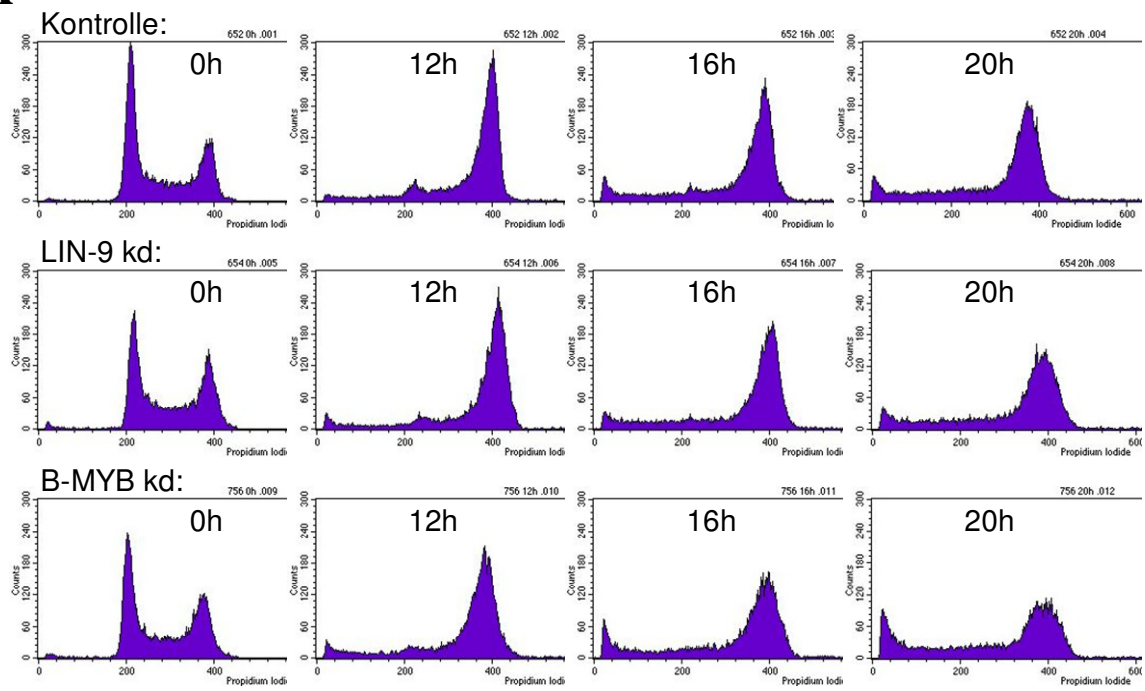
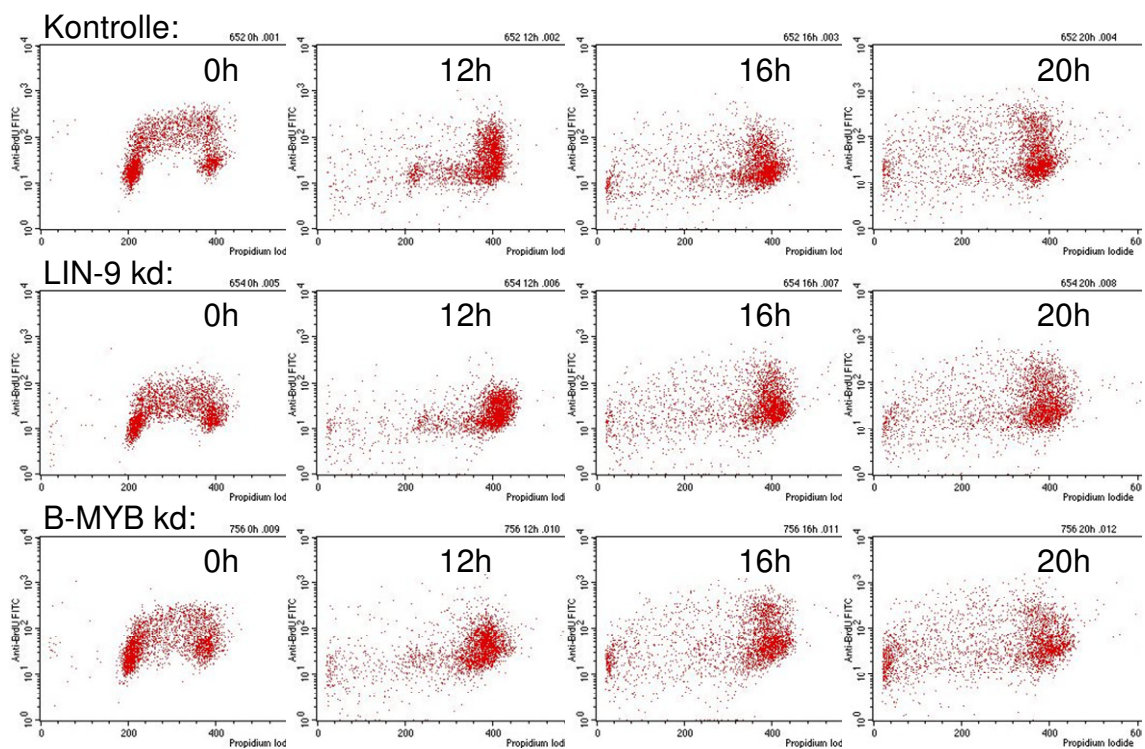
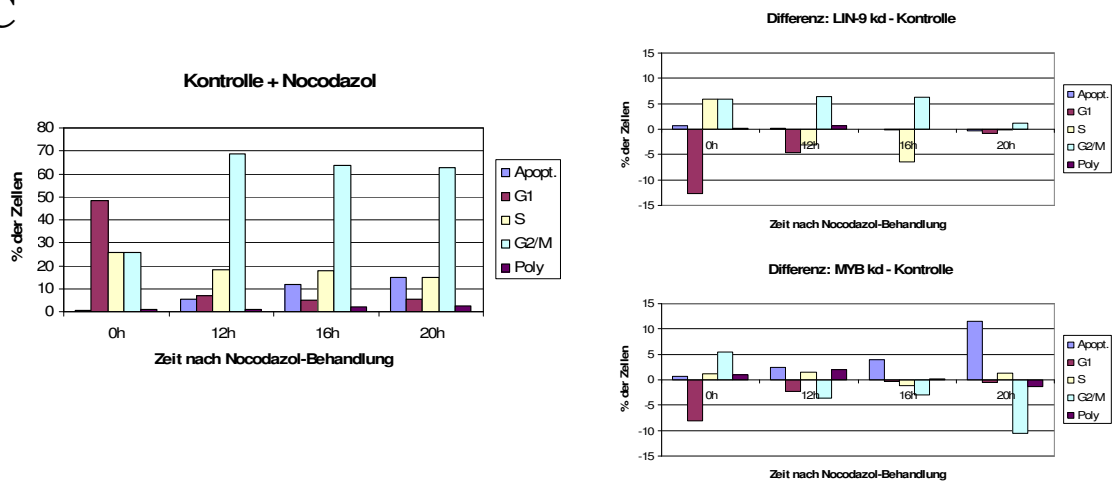


Abb. 3.5: Mitotischer Spindel-Checkpoint-Defekt in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP: Infizierte und selektionierte SHEP-Zellen (Kontrolle = Leerer pMSCV-Vektor) wurden mit Nocodazol behandelt, mit Bisbenzamid gefärbt und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Mindestens 500 Zellen wurden pro Zeitpunkt ausgezählt und die Ergebnisse repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Es zeigte sich, dass die LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP zu einem deutlich geringeren Prozentsatz Nocodazol-bedingt in der Anaphase arretieren.

Dieses Ergebnis konnte ich mittels FACS-Analysen bestätigen. Hierzu wurden infizierte und selektionierte unsynchronisierte SHEP Zellen zunächst für 1 Stunde mit BrdU gepulst und anschließend mit Nocodazol behandelt. Die sich zum Zeitpunkt des BrdU-Pulses (0 h) in der S-Phase befindenden Zellen (je 25-30%) bauen das Thymidin-Analogon in ihre DNA ein und können so im FACS-Profil durch den Zellzyklus verfolgt werden. Im PI-FACS zeigten sich nur wenig signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und *knock down*-Zellen, lediglich die B-MYB depletierten Zellen weisen eine geringfügig höhere Apoptoserate und niedrigere Werte in G2/M auf. Sowohl LIN-9 als auch B-MYB depletierte unsynchronisierte Zellen zeigen jedoch zum 0 h-Wert mehr Zellen in G2/M im Vergleich zu den Kontrollzellen (jeweils größer 5%), so dass allem Anschein nach auch in Tumorzellen ein leichter G1-Block zu beobachten ist (Abb. 3.6). Bezieht man sich nur auf die BrdU-positiven Zellen, also nur auf diejenigen, die während des BrdU-Pulses in der S-Phase waren, so zeigt sich erneut der oben beschriebene Checkpoint-Defekt: Obwohl sich ein größerer Anteil der LIN-9 kd Zellen zu den frühen Zeitpunkten (12 und 16 h) in G2/M befindet (+ 8,01 bzw. 3,91%), sind nach 20 h 13,08 % (Kontrolle: 43,08%, Lin-9 kd: 34,82%) weniger Zellen in G2/M arretiert. Wie schon zuvor sind auch hier die Effekte bei B-MYB depletierten Zellen stärker: Hier sind zu jedem Zeitpunkt deutlich weniger Zellen in G2/M (B-MYB kd: 12 h 19,1%; 16 h 25,42%; 20 h 18,82% / Kontrolle: 12 h 22,83%; 16 h 30,91%; 20 h 43,08%). (Für die Kontrolle des *knock downs* im Western Blot siehe Abb. 3.9.)

A**B**

C



D

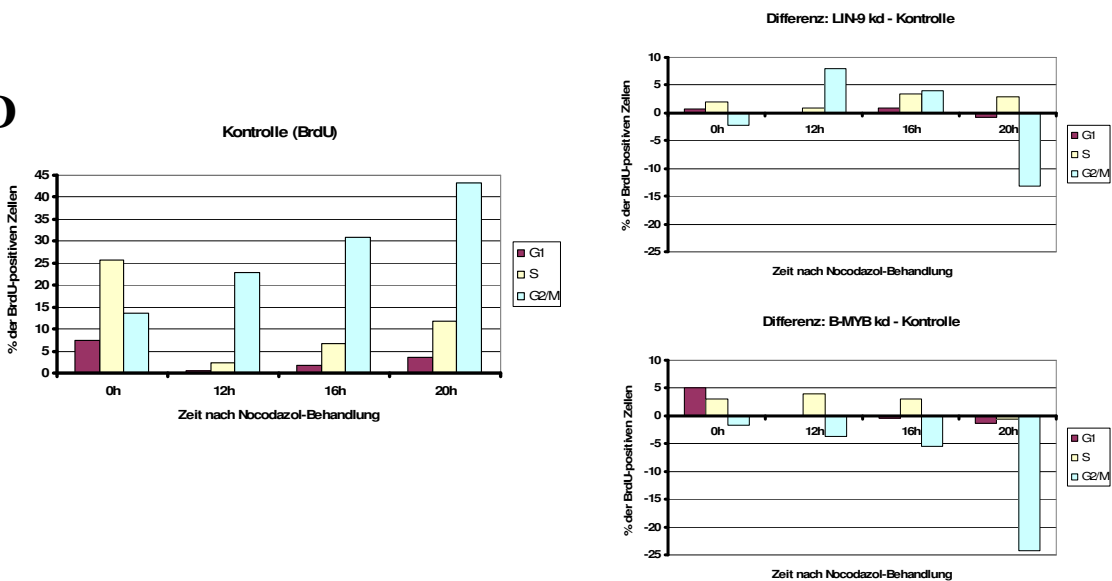


Abb. 3.6: Checkpointdefekt: Infizierte und selektionierte SHEP werden unsynchronisiert zunächst 1 h mit BrdU gepulst und anschließend mit Nocodazol behandelt. Die sich zum Zeitpunkt des BrdU-Pulses (0 h) in der S-Phase befindenden Zellen (je 25-30%) bauen das Thymidin-Analogon in ihre DNA ein und können so im FACS-Profil durch den Zellzyklus verfolgt werden. **A und B)** Zellzyklusprofil (A: PI; B: PI + AntiBrdU FITC) mit wenig erkennbaren Unterschieden zwischen Kontroll- und *knock down*-Zellen, lediglich die B-MYB depletierten Zellen scheinen zum 16 und 20 h-Wert mehr apoptotische Zellen aufzuweisen. **C)** Auswertung aller Zellen (PI) bestätigt geringe, aber immer noch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und *knock down*-Zellen, besonders der Block in G1 in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen wird hier offensichtlich. **D)** Auswertung nur BrdU-positiver Zellen zeigt den beschriebenen Checkpoint-Defekt.

3.2.3 Nach Thymidin-Block und Nocodazol-Behandlung in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP-Zellen tritt vermehrt Apoptose auf

Zur genaueren Analyse des Spindel-Checkpoint-Defekts wurden infizierte SHEP zunächst mit Thymidin am G1/S-Übergang synchronisiert, nach Entlassen in den Zellzyklus mit Nocodazol behandelt und im FACS analysiert. Dabei zeigte sich, nach einem deutlichen G1/S-Block bei 0 h, wie erwartet eine Akkumulation der Kontrollzellen in G2/M nach 12 h und nach 24 h eine Zunahme der apoptotischen Zellen, da der durch das Nocodazol induzierte Spindel-Defekt nicht repariert werden kann. Bei LIN-9 *knock down*-Zellen sind zu allen Zeitpunkten mehr apoptotische und weniger Zellen in G2/M gemessen worden. Dabei ist die Zunahme der Apoptose vergleichbar mit dem Rückgang der Zellen in G2/M. Besonders stark ist der Unterschied zur Kontrolle bei 24 h: Hier sind bei den LIN-9 depletierten Zellen 39,5% der Zellen apoptotisch und nur 37,6% in G2/M. Bei den Kontrollzellen sind dagegen 22,3% der Zellen apoptotisch und 56,3% in G2/M. Noch deutlicher fiel das Ergebnis bei B-MYB depletierten Zellen aus: Hier waren schon nach 12 h deutliche Unterschiede zu sehen (B-MYB *knock down*: 54,42% apoptotisch, 34,86% in G2/M; Kontrolle: 20,97% apoptotisch, 52,8% in G2/M), die nach 18 h am größten waren: In B-MYB depletierten Zellen sind 62,06% der Zellen apoptotisch und nur 25,92% in G2/M. Bei den Kontrollzellen sind dagegen 22,3% der Zellen apoptotisch und 56,3% in G2/M. Nach 24 h haben sich die Ergebnisse in den verschiedenen Zellpopulationen durch die Zunahme der apoptotischen Zellen in der Kontrolle wieder angenähert. Die Ergebnisse konnten in einem zweiten, unabhängigen Experiment bestätigt werden (Abb. 3.7).

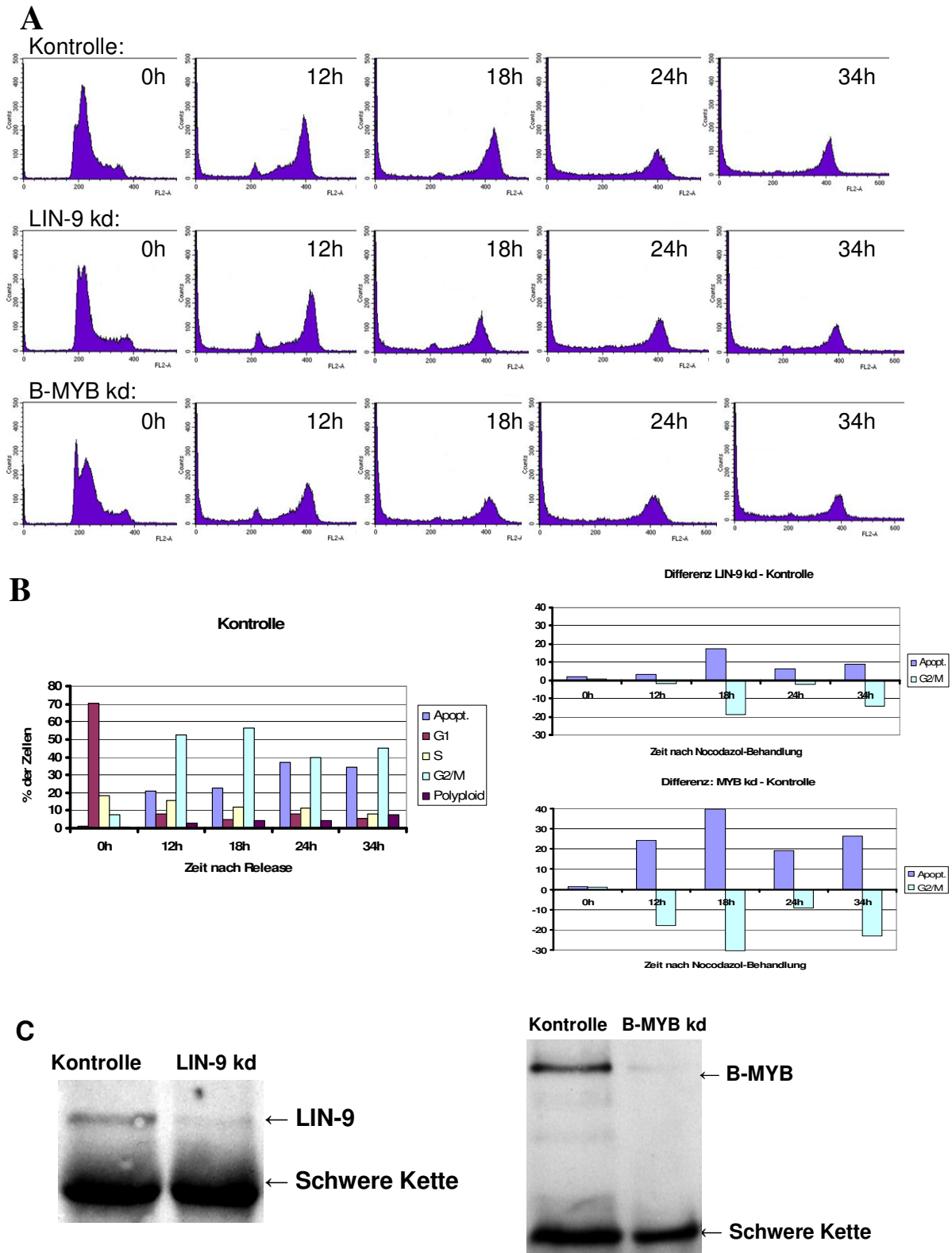


Abb. 3.7: Vermehrte Apoptose in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEPZellen:

Infizierte (Kontrolle = leerer pMSCV-Vektor) und selektierte SHEP Zellen wurden 24 h mit Thymidin behandelt, um sie in G1/S zu blocken und dann durch Entfernen des Thymidin in den Zellzyklus entlassen. Gleichzeitig wurde Nocodazol zugegeben. Nach den jeweils angegebenen Stunden wurden die Zellen geerntet und in FACS analysiert. Es konnte eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen und in Folge davon eine Abnahme der Zellen in G2/M beobachtet werden. **A)** Zellzyklusanalyse im FACS, **B)** Auswertung der FACS-Daten, **C)** Kontrolle der LIN-9 und B-MYB Depletion durch IP-Western.

3.2.4 Geringere Konzentration von phospho-Histon H3 nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion

Parallel zu dem oben beschriebenen Experiment wurde die Phosphorylierung von Serin 10 an Histon H3 (pH3) im Western-Blot nachgewiesen. Phosphoryliertes Histon H3 ist ein Marker für mitotische Zellen (Hendzel et al., 1997). Histon H3 wird während der späten G2-Phase und zu Beginn der Mitose an Serin 10 phosphoryliert. Mit Beginn der Anaphase erfolgt die Dephosphorylierung von Histon H3. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der FACS-Analyse konnte pH3 besonders 18 h und 24 h nach Nocodazol-Behandlung in den Kontrollzellen nachgewiesen werden. In LIN-9 depletierten Zellen war pH3 nach 18 h und 24 h deutlich schwächer, zu den anderen Zeitpunkten kaum nachweisbar. B-MYB depletierte Zellen hingegen zeigen nach 18 Stunden einen mit den Kontrollzellen vergleichbaren pH3-Level, was nicht mit der im FACS gesehenen hohen Rate an apoptotischen Zellen und der geringen Ansammlung in G2/M übereinstimmt. Auch zu späteren Zeitpunkten bleibt die pH3-Expression in LIN-9 depletierten Zellen gering bzw. kaum nachweisbar, 24 Stunden nach Release ist bei den Kontrollzellen eine massive Expression nachweisbar (Abb. 3.8). Die verminderte bzw. geringere Konzentration von phospho-Histon H3 nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion weist darauf hin, dass diese Zellen entweder bereits vor Eintritt in die Mitose arretieren oder diese trotz des Spindelgiftes Nocodazol bereits wieder verlassen haben.

3.2.5 Die durch Nocodazol und Thymidin induzierte Apoptose zeigt keine Abhängigkeit von p53 und p21

Als zelluläre Antwort auf Stress wie z.B. DNA-Schäden reagiert die Zellen mit einer erhöhten Expression bzw. Aktivierung von p53 und es kommt zur Induktion von Apoptose, DNA-Reparatur und dem Arrest der Zellen in G1 (Hinds and Weinberg, 1994). Der p53-abhängige G1-Arrest wird u.a. durch die erhöhte Synthese an CDK-Inhibitoren wie z.B. p21 stimuliert. Außerdem ist bekannt, dass die durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung von p53 auch zu einer starken Repression G2/M-spezifischer Gene und zu einem Arrest der Zellen in G2/M führen kann (Agarwal et al., 1995; Badie et al., 2000; Crawford and Piwnica-Worms, 2001; Jackson et al., 2005).

Um auszuschließen, dass die verminderte Expression der G2/M-Gene und die erhöhten Apoptoseraten in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen auf die durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung von p53 zurückzuführen ist, wurde im oben beschriebenen Versuch zusätzlich die Expression von p53 und p21 analysiert.

Die Expression des Tumorsuppressors p21 war in Kontrollzellen am höchsten und in LIN-9 depletierten Zellen deutlich reduziert, während B-MYB depletierte Zellen eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Expression vorwiesen. In der Expression von p53 konnten zu keinem der gewählten Zeitpunkte signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 3.8).

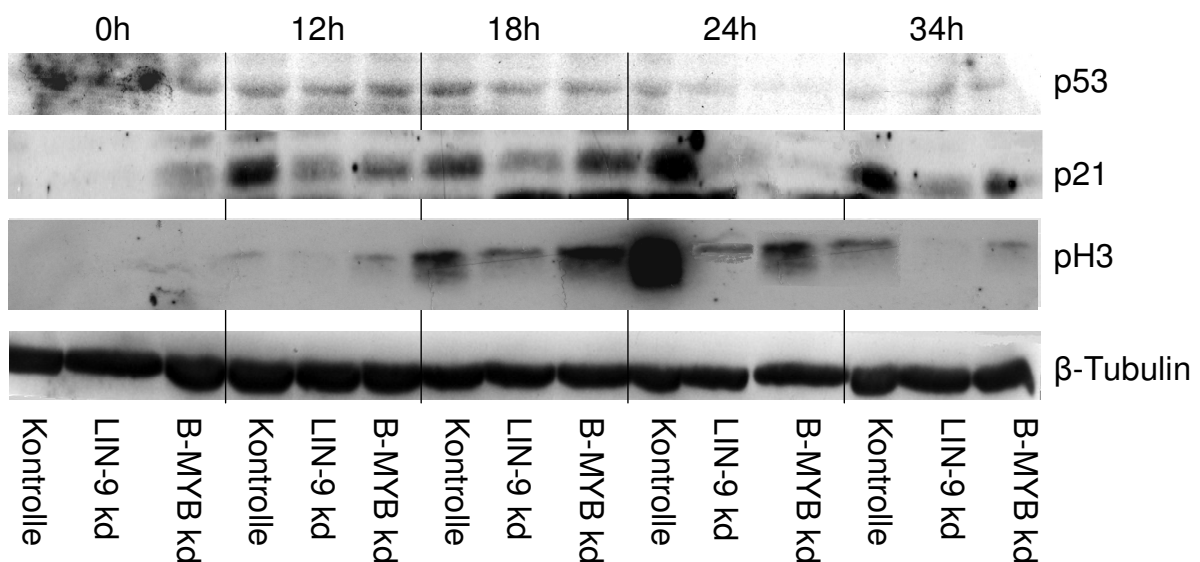


Abb.3.8: Expression von p53 und p21 und Phosphorylierungsstatus von H3 im Zellzyklus

Infizierte (Kontrolle = leerer pMSCV-Vektor) und selektionierte SHEP Zellen wurden 24 h mit Thymidin behandelt, um sie in G1/S zu blocken und dann durch Entfernen des Thymidin in den Zellzyklus entlassen. Gleichzeitig wurde Nocodazol zugegeben. Nach den jeweils angegebenen Stunden wurden die Zellen geerntet und die Expression mittels Western Blot nachgewiesen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der p53-Expression. p21 und pH3 sind jeweils in LIN-9 depletierten Zellen am schwächsten nachweisbar.

Zusätzlich wurden bereits p53-depletierte SHEP Zellen mit shRNA gegen LIN-9 oder B-MYB ko-infiziert und selektioniert. Wie oben beschrieben wurden die Zellen dann nach Synchronisation mit Thymidin mit Nocodazol behandelt und zu den gegebenen Zeitpunkten im FACS analysiert. Bei einem entsprechend abgewandelten Versuchsansatz wurden lediglich LIN-9 oder B-MYB depletierte Zellen zugleich mit Nocodazol und Pifithrin- α (p-fifty three inhibitor) behandelt. Pifithrin- α blockiert die

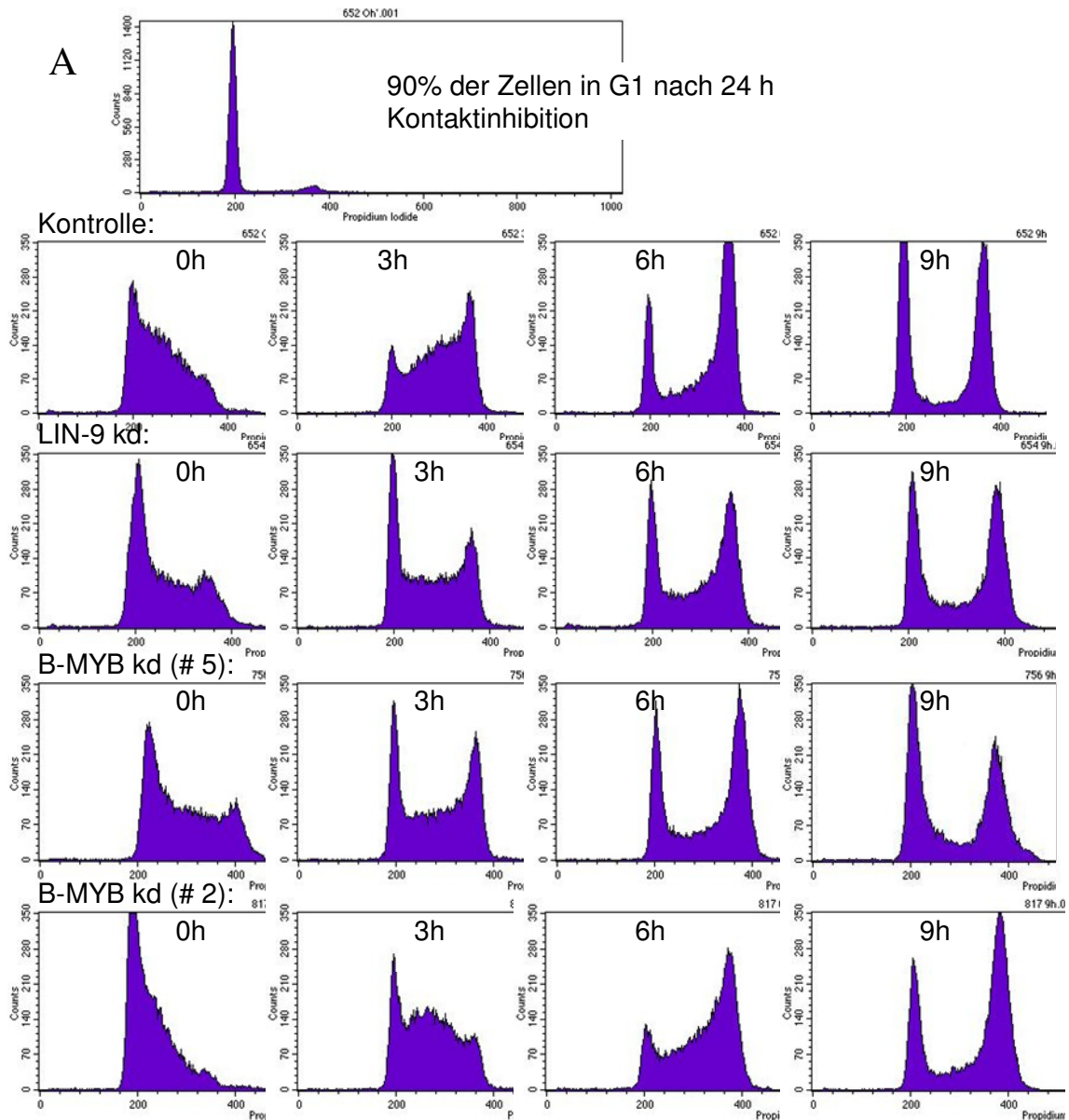
p53-abhängige Transkription und Apoptose, ohne die Bildung von Tumoren zu fördern (Komarov et al., 1999).

Bei beiden Versuchsansätzen zeigte sich keine Reduktion der apoptotischen Zellen im Vergleich zu LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen ohne gleichzeitige p53 Depletion. Daraus kann man schließen, dass die Depletion von LIN-9 und B-MYB zu keiner Stressantwort der Zelle führt, die durch Vermittlung von p53 zur transkriptionellen Repression der G2/M-Gene führt und vermehrten Apoptose nach sich zieht.

Im Gegenteil: Ohne erkennbares Muster waren zu einigen Zeitpunkten deutlich mehr (bis +40%) oder deutlich weniger (bis -20%) apoptotische Zellen als in der jeweiligen Kontrollpopulation zu finden. Mögliche Erklärungen hierfür wären durch die doppelte Infektion und Selektion herbeigeführte Zellschäden oder Nebeneffekte durch das Pifithrin. (Daten nicht gezeigt.)

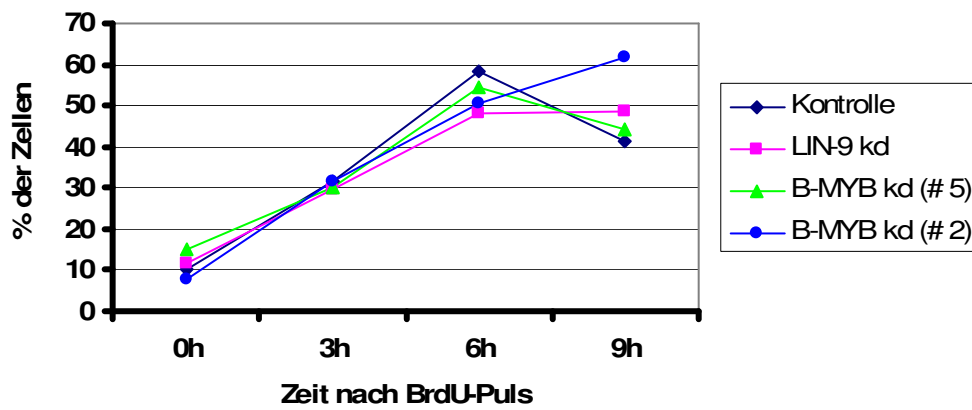
3.2.6 Hinweise auf Verzögerung in G2/M in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen

In einem weiteren Experiment wurden die infizierten und selektierten SHEP per Kontaktinhibition synchronisiert (nach 24 h ca. 90% in G1), so dass das Thymidin als mögliche Ursache unspezifischer Effekte wegfiel. Zum Entlassen der Zellen in den Zellzyklus wurden sie 1:5 gesplittet. Ab 19 h nach Release (Zeitpunkt 0h), als sich 30% der Zellen in der S-Phase befanden, wurden die Zellen alle drei 3 Stunden im FACS untersucht. Die Analyse im FACS brachte einen Hinweis, dass in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen die G2/M-Phase mit Verzögerung durchlaufen wird: Schon im Zellzyklusprofil erkennbar, erreichen zuvor in der S-Phase synchronisierte LIN-9 oder B-MYB depletierte Zellen langsamer die G1-Phase als die entsprechenden Kontrollzellen. Im Vergleich zu den mit dem leeren pMSCV-Vektor infizierten Kontrollzellen verlief die Kurve der Zunahme und dann auch wieder der Abnahme der Zellen in G2/M in LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen flacher (Abb.: 3.9). Wann genau diese Verzögerung stattfand, ließ sich jedoch mit diesem Versuchsaufbau nicht ermitteln.



B

Zellen in G2/M



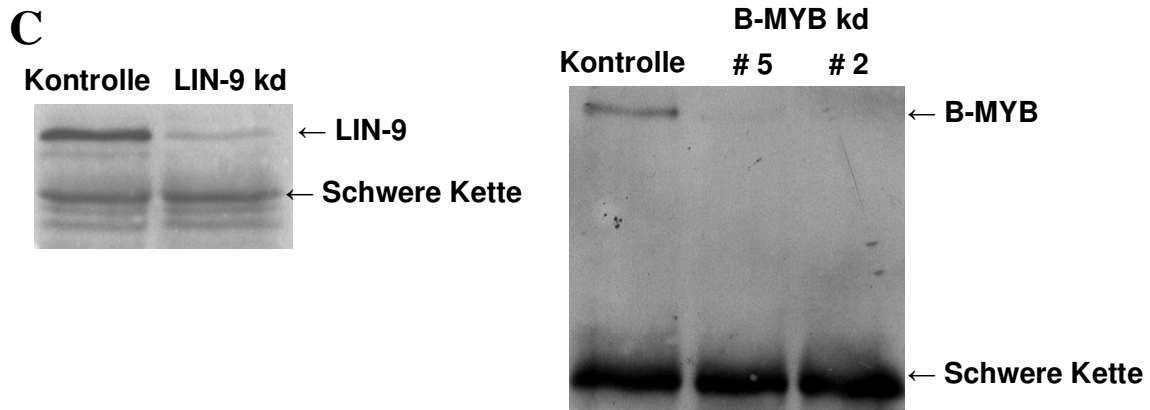


Abb. 3.9: Verzögerung in G2/M in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP:

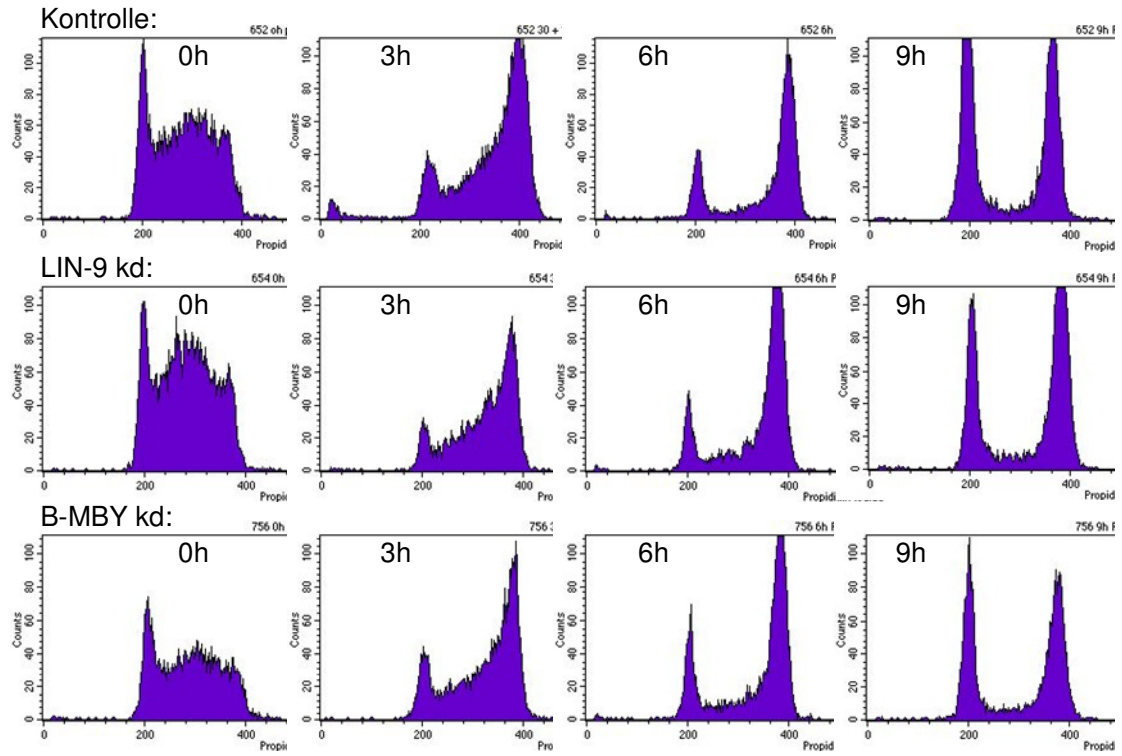
A) Schon im Zellzyklusprofil erkennbar erreichen zuvor in der S-Phase synchronisierte LIN-9 oder B-MYB depletierte Zellen langsamer wieder die G1-Phase als die Kontrollzellen. **B)** Zu- und besonders Abnahme der LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen in G2/M folgt einem flacheren Kurvenverlauf als in den Kontrollzellen (dunkelblau). **C)** Herunterregulation von LIN-9 oder B-MYB durch shRNA auf Proteinebene (Western Blot).

3.2.7 LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen treten verzögert in die G1-Phase ein

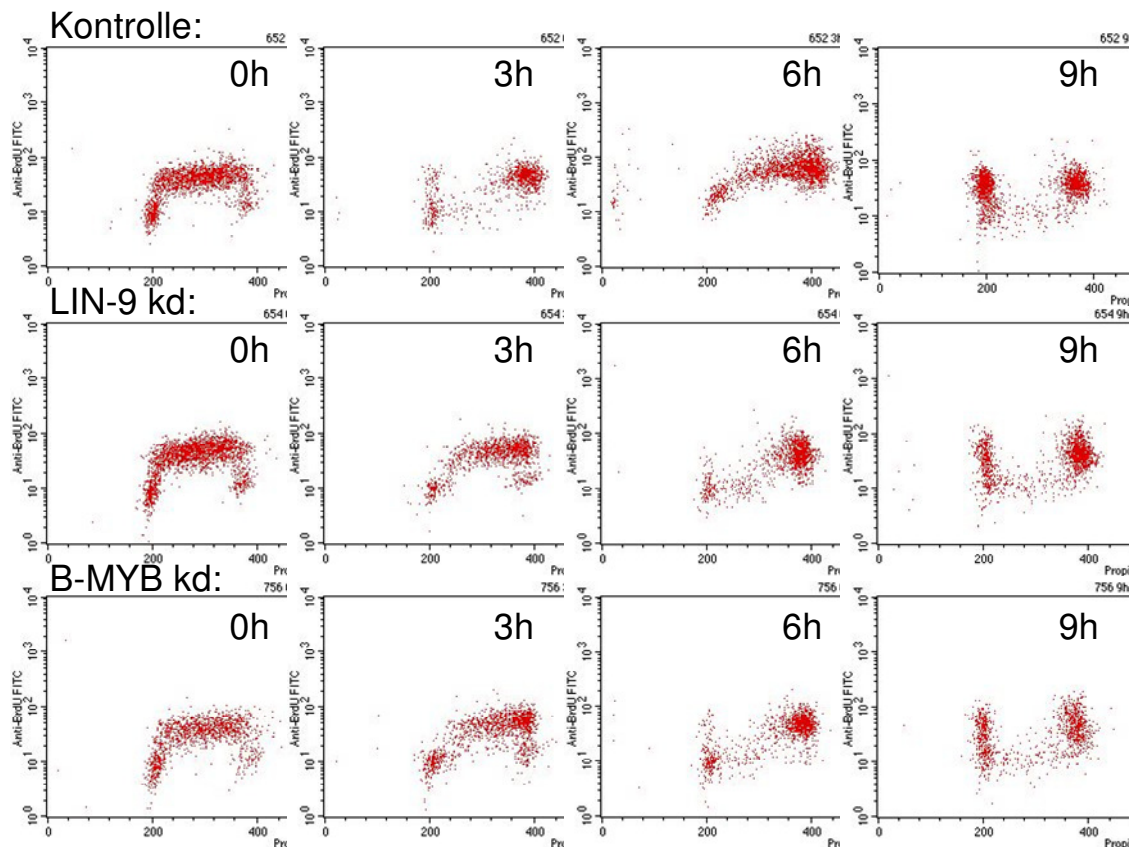
Um auszuschließen, dass diese Verzögerung z.B. schon durch eine verzögerte S-Phase zustande kommt, wurde dieses Experiment, geringfügig geändert, wiederholt. Die infizierten und selektionierten Zellen wurden jetzt 18 h nach Release zunächst eine Stunde mit BrdU gepulst und dann zu den zuvor gewählten Zeitpunkten geerntet. Wieder konnte im Zellzyklusprofil das verzögerte Wiedereintreten in die G1-Phase beobachtet werden. Zudem ließ das zweidimensionale FACS eine genauere Analyse der Zellzykluskinetik zu: Die anhand der BrdU-positiven Zellen (waren zum Zeitpunkt der Pulses in der S-Phase und haben das Thymidin-Analogon BrdU in die DNA eingebaut) berechnete Dauer der DNA-Synthese (Begg et al., 1985) für die unterschiedlichen Zelltypen und Zeitpunkte lässt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollzellen und *knock down*-Zellen erkennen. Auch die Zunahme der Zellen in G2/M verläuft in allen drei Zellpopulationen parallel, allerdings verlassen die LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen die G2/M-Phase langsamer, wie man an den Verbleibenden 53,95% (LIN-9 *knock down*) bzw. 38,86% (B-MYB *knock down*) der Zellen in G2/M nach 9 h (Vergleich Kontrolle: 26,05%) erkennen kann. Dies spiegelt sich auch in der Kinetik der Zellen in G1 wieder: Nach 6 h divergieren die Kurven der verschiedenen Zellpopulationen auseinander, von den Kontrollzellen erreichen nach 9 h bereits 42,47% die G1-Phase, während zu diesem Zeitpunkt erst 17,5% (LIN-9 *knock*

down) bzw. 25,36% (B-MYB knock down) der Zellen die Zellteilung abgeschlossen haben (Abb. 3.10).

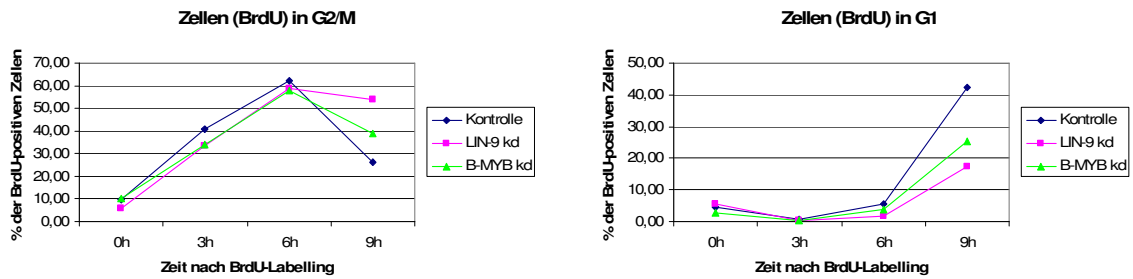
A



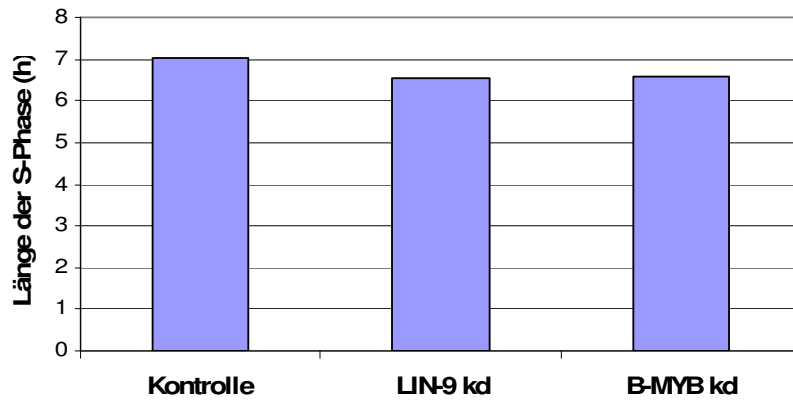
B



C



D



E

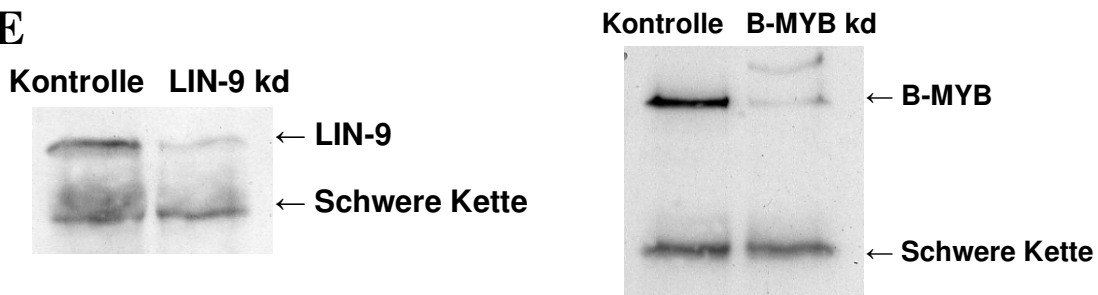


Abb. 3.10: Gleiche DNA-Synthese-Zeit aber Verzögerung in G2/M-G1-Übergang bei LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen: Die infizierten und selektierten Zellen wurden 18 h nach Release aus Kontaktinhibition zunächst eine Stunde mit BrdU gepulst und nach angegebener weiterer Inkubationszeit im FACS analysiert. **A und B)** Im Zellzyklusprofil (A: PI; B: PI + AntiBrdU FITC) erkennbare Verzögerung der Eintritts in G1. **C)** Die Zunahme der Zellen in G2/M verläuft in allen drei Zellpopulationen parallel, allerdings verlassen die LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen die G2/M-Phase langsamer und treten verzögert in G1 ein. **D)** Die berechnete Dauer der DNA-Synthese (Begg et al., 1985) ist bei Kontrollzellen und *knock down*-Zellen nahezu gleich. **E)** Kontrolle des *knock downs* im Western Blot.

4. DISKUSSION

4.1 Synthese und Test neuer shRNA-Sequenzen gegen LIN-9 und B-MYB

Die Synthese und Testung weiterer shRNA-Sequenzen gegen LIN-9 und B-MYB war notwendig, um die durch Depletion von LIN-9 oder B-MYB erzeugten Effekte spezifisch diesen Proteinen zuzuordnen und „off-target“-Effekte ausschließen zu können. Die für B-MYB neusynthetisierte Sequenz führte in verschiedenen Zellsystemen auf Protein- und mRNA-Ebene zur Herunterregulation des Zielgens und konnte in weiterführenden Versuchen parallel zu der bekannten Sequenz verwendet werden. Hierbei zeigten sich unabhängig von der benutzten shRNA-Sequenz reproduzierbare Ergebnisse, so dass anzunehmen ist, dass beide Sequenzen spezifische Effekte bewirken.

Die in HeLa-Zellen zunächst erfolgreich getestete shRNA gegen LIN-9, führte nach Infektion in andere Zellsysteme im Gegensatz zu der schon bekannten Sequenz bei den selektionierten Zellen zur Apoptose. Hier ist nun fraglich, ob dieser Effekt durch eine sehr starke Herunterregulation von LIN-9 hervorgerufen wird, also ein LIN-9 spezifischer Effekt ist. Ist dies der Fall, so muss die Apoptose durch eine Zufuhr von LIN-9 zu verhindern sein (= Rescue). Andernfalls ist von einem „Off-target“-Effekt auszugehen, wobei nicht nur die mRNA des Zielgens durch den RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) zerstört wird, sondern auch andere Proteine herunterreguliert werden, was zu weiteren unspezifischen Effekten führen kann.

4.2 Charakterisierung von LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen

4.2.1 LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen zeigen Mitose-Checkpoint-Defekt Phänotyp

Das Herunterregulieren von entweder LIN-9 oder B-MYB geht mit verschiedenen Phänotypen einher, darunter die reduzierte Proliferation, Akkumulation der Zellen in G2 und der verzögerte Eintritt in die Mitose, die mit der reduzierten Expression von G2-Genen in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen übereinstimmen. Mit dem Hintergrund, dass mit cDNA Microarray G2/M-spezifische Gene gefunden wurden, die durch LIN-9 und B-MYB reguliert werden (Lisa Osterloh) und dieses Ergebnis von mir

auf RNA-Ebene reproduziert werden konnte, stellte sich die Frage, wie sich dies auf den Ablauf des Zellzyklus und die Mitose auswirkt. Der dazu ermittelte Mitose-Index von LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen zeigte eine abnormal niedrige Akkumulation von Zellen in der Mitose, was auf einen Defekt im Mitosecheckpoint hinweist. Auch mittels FACS-Analyse ließ sich der genannte Checkpoint-Defekt nachweisen. Auch hier zeigte sich die deutlich geringere Anzahl von Zellen mit LIN-9- oder B-MYB-kd in der Mitose. Damit stimmt auch der niedrigere Level an Phospho-Histon H3 nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion überein. Dieses Ergebnis ist kohärent mit einem von Garcia and Frampton 2006 publizierten Arrest von B-MYB depletierten humanen HEL Zellen in der Mitose.

4.2.2 LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen zeigen eine erhöhte Apoptoserate

Bei den durchgeführten Zellzyklus-Experimenten mit nachfolgender FACS-Analyse, kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen nach Thymidin-Block und Nocodazol-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der apoptotischen Zellen und einem nahezu entsprechenden Rückgang der Zellen in der Mitose. Wann genau diese Zellen allerdings apoptotisch werden, bleibt bei diesem Ansatz noch offen. Zu diskutierende Möglichkeiten sind sicherlich der bereits beobachtete Block im G2/M-Übergang bei LIN-9 oder B-MYB depletierten Zellen (d.h., die Zellen erreichen die Mitose nicht) oder durch den defekten Mitose-Checkpoint auftretende Schäden, die in oder nach Ablauf der Mitose zum Zelltod führen. Ein hierbei beobachteter leichter Anstieg von Aneu- bzw. Polyploidie war jedoch nicht signifikant.

4.2.3 Die Effekte in LIN-9- und B-MYB depletierten Zellen sind p53-unabhängig

Um auszuschließen, dass die gesehenen Effekte (Repression der G2/M-Gene und vermehrte Apoptose) lediglich auf eine zelluläre Antwort auf Stress wie z.B. DNA-Schäden und somit durch eine erhöhte Expression bzw. Aktivierung von p53 vermittelt sind (Hinds and Weinberg, 1994; Agarwal et al., 1995; Badie et al., 2000; Crawford and Piwnica-Worms, 2001; Jackson et al., 2005), untersuchte ich die Expression von p53

und p21 in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen. Weder bei diesem Ansatz, noch durch Repression bzw. Inhibition von p53 zeigten sich signifikante Unterschiede zu den Kontrollzellen, so dass keine Abhängigkeit von p53 anzunehmen ist.

Dazu passt, dass auch die Stimulierung eines p53-abhängigen G1-Arrest durch die erhöhte Synthese am CDK-Inhibitor p21 nicht nachgewiesen werden konnte. Die Expression des Tumorsuppressors p21 war in Kontrollzellen und B-MYB depletierten Zellen vergleichbar und in LIN-9 depletierten Zellen deutlich reduziert. Dies widerspricht der von Lisa Osterloh gesehenen Hochregulation von p21 bei Verlust von LIN-9. Die entsprechenden Versuche wurden jedoch ohne Nocodazol durchgeführt, so dass hier andere Mechanismen zum Tragen kommen können.

4.2.4 Die DNA-Synthese ist unbeeinflusst von LIN-9- und B-MYB-Depletion

Es ist also wahrscheinlich, dass die gesehenen Effekte auf einen verzögerten Eintritt in die Mitose als auch auf einen nicht voll funktionsfähigen mitotischen Checkpoint zurückzuführen sind. Diese Hypothese wird durch die LIN-9/ B-MYB regulierten Gene unterstützt. *Drosophila* dMYB scheint für die regelrechte Progression durch die S-Phase notwendig zu sein (Fitzpatrick et al, 2002; Manak et al, 2002) und auch in der Differenzierung von humanen Megakaryozyten wurde eine entsprechende Funktion für B-MYB beschrieben (Garcia and Frampton, 2006). Diese Ergebnisse konnte ich für humane SHEP-Zellen in zweidimensionalen FACS-Analysen von in der S-Phase mit BrdU gepulsten Zellen nicht bestätigen. Hier war im Gegenteil deutlich zu sehen, dass die DNA-Synthesezeit durch die Herunterregulation von LIN-9 oder B-MYB unbeeinflusst bleibt. Auch der Übergang von der S-Phase in die G2-Phase verläuft in den unterschiedlichen Zellpopulationen simultan. Zudem führt die Depletion von LIN-9 nicht zu einer Zunahme der γ -H2AX Färbung, einem Kennzeichen der DNA-Schadensantwort und es führte nicht zu einer Zunahme der Phosphorylierung von cdc2 an Tyrosin-15 (mündliche Kommunikation: Lisa Osterloh), was erneut darauf hinweist, dass die DNA-Schadensantwort in LIN-9 depletierten Zellen nicht aktiviert sind. Allerdings zeigte sich auch in diesem Experiment deutlich ein verzögerter Übergang der B-MYB und LIN-9 depletierten Zellsysteme von G2/M in G1, der vermutlich auf einen Defekt in der späten G2-Phase zurückzuführen ist.

4.2.4 Führt der Verlust von Lin-9 bzw. B-Myb zu einem defekten Mitose-Checkpoint?

Es ist also wahrscheinlich, dass die gesehenen Effekte auf die bereits oben erwähnte negative Regulation der Checkpointproteine mit Verlust des bzw. eines nicht voll funktionsfähigen Checkpoints zurückzuführen sind. Aufgrund der Auswahl von bereits durch Lisa Osterloh in BJ getesteten Genen kam es bei meinen Experimenten bei allen getesteten Genen (Aurora A, MAD2, CENPE, cdc2, birc5) zu einer durch ko-Regulation induzierten, verminderten Expression, auffällig ist besonders die massive Repression von Aurora A. Survivin (BIRC5), CENP-E und Aurora A sind Bestandteile des mitotischen Spindelcheckpoints. Mad2 und CENP-E sind essentiell an dessen Aktivierung beteiligt (Meraldi et al., 2004). Der Spindelcheckpoint überprüft während der Metaphase die Anheftung der Chromosomen an die mitotische Spindel und stellt somit sicher, dass die Schwesterchromatiden während der Anaphase ordnungsgemäß getrennt werden. (Andrews et al., 2003; Carvalho et al., 2003; Lengauer and Wang, 2004; Lens and Medema, 2003; Meraldi et al., 2004; Meraldi and Sorger, 2005; Tanudji et al., 2004; Weaver et al., 2003; Yang et al., 2004).

Hierbei wird unphosphoryliertes Mad2 von Mad1 zu ungebundenen Kinetochoren rekrutiert, inhibiert dort die Ubiquitin-Ligase APC/C^{Cdc20} und verhindert somit durch den Erhalt von Securin die Trennung der Schwesterchromatiden (Chen et al., 1998). Reguliert wird diese Assoziation mit Mad1 und APC/C - und somit die Aktivität des Checkpoints - durch des Phosphorylierungsstatus von Mad2 (Wassmann et al., 2003). In Säugetierzellen interagiert CENP-E (Centromere-associated protein-E) mit BubR1 (Chan et al., 1999) und vermittelt dessen Bindung an den Kinetochoren (Johnson et al., 2004). Dies stimuliert wiederum die Aktivität von BubR1, solange keine Mikrotubuli gebunden sind (Mao et al., 2003), wodurch das basale Signal des Checkpoints verstärkt wird. In Zellen mit reduziertem CENP-E-Gehalt ist ein einzelnes nicht an Mikrotubuli gebundenes Chromosom nicht mehr ausreichend, um den Übergang in die Anaphase zu verhindern (Weaver et al., 2003). Außerdem reguliert Mad2 gemeinsam mit BubR1 nicht nur die ordnungsgemäße Trennung der Chromosomen, sondern steuert unabhängig vom Kinetochor auch den zeitlichen Ablauf der Mitose (Gorbsky et al., 1998, Meraldi et al., 2004).

Da der Verlust von LIN-9 und B-MYB unter anderem zu einer Expressionsabnahme von Survivin, CENP-E, Aurora A und Mad2 führt, kann dies wie beobachtet einen Defekt des Spindel-Checkpoints zur Folge haben. Dies könnte einerseits zu Apoptose

und andererseits zu einer fehlerhaften Segregation der Chromosomen führen. Letzteres würde zu einer Fehlverteilung der Chromosomen und damit zur Aneuploidie der Tochterzellen führen. Gezielte Untersuchungen, ob LIN-9 oder B-MYB für den Erhalt der Euploidie wichtig sind, wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es waren jedoch schwache Anzeichen für das Auftreten von Aneuploidie nach Verlust von LIN-9 und B-MYB zu erkennen (Daten nicht gezeigt). So ließ sich z.B. in FACS-Analysen beobachten, dass die Depletion von LIN-9 oder B-MYB zu einem geringfügigen (nicht signifikanten!) Anstieg an Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 4n$ führte. Hier wären weiterführende Arbeiten, wie z.B. eine cytogenetische Karyotypanalyse oder eine FISH-Analyse (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) in Interphasezellen und eine γ -Tubulin Färbung zur Darstellung der Zentromere hilfreich.

Als verbreitetes Phänomen in Tumorzellen und Ausgangspunkt für weitere Neumutationen und chromosomalen Instabilität und Tumorgenese gewinnt die Frage nach Aneuploidie an Bedeutung (Kops et al., 2005; Rajagopalan and Lengauer, 2004; Weaver et al., 2007). Durch eine solche Ansammlung von zusätzlichen Mutationen könnten die Zellen den bereits vorbeschriebenen Wachstumsdefekt und die beschriebene Akkumulation in G2 überkommen.

Ob die veränderte Expression dieser Gene tatsächlich zu dem beobachteten Phänotyp führt und einige dieser untersuchten Gene als primär verantwortlich für den gesehenen Effekt anzusehen sind, wird durch weiterführende Experimente zu klären sein. Hier wäre besonders interessant zu sehen, ob die Überexpression einiger dieser Gene (speziell Aurora A) den gesehenen Effekt aufheben kann, wie es z.B. Katzen et al., 1998 beschrieb. Hier konnte in *Drosophila*, wo eine G2-Akkumulation der Flügelzellen in temperatursensitiven *dMyb*-Mutanten beschrieben ist, dieser Effekt durch Überexpression von *cdc2* aufgehoben werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das humane LIN-9 wurde zuerst als pRB-interagierendes Protein beschrieben und spielt eine Rolle als Tumorsuppressor im Kontext des pRB-Signalweges. Die Homologe von LIN-9 in *D. melanogaster* und in *C. elegans*, sind an der transkriptionellen Regulation verschiedener Genen beteiligt. B-MYB ist als direktes E2F-Zielgen in *D. melanogaster* als Transkriptionsfaktor an der Genregulation differenzierungsspezifischer und zellzyklusregulierender Gene beteiligt und auch in Vertebraten (Zebrafisch) konnte ihm die Rolle eines haploinsuffizienten Tumorsuppressors zugewiesen werden. Der Verlust von B-MYB führte jeweils zu einem Anstieg von aneu- und polyploiden Zellen. Dies und die Tatsache, dass sowohl LIN-9 als auch B-MYB in der Genregulation von G2/M-Zielgenen eine Rolle spielen, ließ bedeutende Funktionen dieser Proteine in der Zellzyklusregulation vermuten. Primäres Ziel dieser Arbeit war daher die molekularbiologische Funktion von LIN-9 und B-MYB, besonders im Hinblick auf ihre Bedeutung während der Mitose, zu untersuchen. Dazu sollte mit Hilfe von FACS-Analysen, das Zellzyklusprofil LIN-9 oder B-MYB depletierter primärer humaner Neuroblastomzellen (SHEP-Zellen) im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst weitere shRNAs getestet, um die posttranskriptionelle Expression von LIN-9 in BJ-ET Zellen effizient zu reprimieren.

In dieser Arbeit konnten zunächst Ergebnisse reproduziert werden, die zeigten, dass der Verlust von LIN-9 und B-MYB zu einer verminderten Expression einer Gruppe G2/M-spezifischer Gene führt, deren Produkte für die Funktion des Mitose-Checkpoints benötigt werden. Die verminderte Expression von G2/M-Genen in LIN-9 bzw. B-MYB depletierten Zellen geht mit einer Reihe phänotypischer Veränderungen einher, wie einen Defekt im mitotischen Spindel-Checkpoint, der dazu führt, dass die Zellen die Mitose auch nach Behandlung mit einem Spindelgift vorzeitig verlassen. Bei zusätzlichem Trigger kommt es in LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen, bei weiterhin geringer ausgeprägtem G2/M-Block, zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate, ohne signifikanten Anstieg von Aneu- oder Polyploidie. Eine Abhängigkeit von p53 oder p21 konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei Hinweisen auf eine deutlich verlangsamte Proliferation und einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase, ergaben die mit Hilfe eines Durchflusszytometers erstellten Zellzykluskinetiken, dass die Progression LIN-9 bzw. B-MYB depletierter Neuroblastomzellen von der S-Phase durch die G2/M-Phase und in die nächste G1-

Phase deutlich verzögert ist. Es konnte weder ein Arrest dieser Zellen in der Mitose noch eine veränderte Länge der S-Phase nach LIN-9 oder B-MYB Depletion festgestellt werden. Daher ist die verlangsamte Zellzyklusprogression nach LIN-9 bzw. B-MYB Verlust höchstwahrscheinlich auf einen Defekt in der späten G2-Phase zurückzuführen, welcher in einem verzögerten Eintritt in die Mitose resultiert.

In *D. melanogaster* und in *C. elegans* sind die Homologe von LIN-9 und B-MYB zusammen, als Bestandteile hoch konservierter RB/E2F-Komplexe, an der Regulation von Genen entscheidend beteiligt. Daher liegt es nahe, dass im humanen System LIN-9 und B-MYB ebenfalls Bestandteile eines ähnlichen Komplexes sind und dadurch in die Zellzyklusregulation eingreifen.

Schlüsselwörter: LIN-9; B-MYB; Zellzyklus; G2/M-Übergang; Mitose

6. English Summary

The human LIN-9 Protein was first identified as a novel pRB-interacting Protein which acts as a tumorsuppressor in context of the pRB-pathway. The homologs of LIN-9 in *D. melanogaster* and *C. elegans* are required for the transcriptional regulation of different genes. B-MYB is a direct target-gene of E2F in *D. melanogaster* and acts as a transcriptionfactor and participates in the activation of differentiation specific and cellcycle regulating genes. Also, in vertebrates (zebra fish) B-MYB was described as a haploinsufficient Tumorsuppressor and depletion of B-MYB leads to increased numbers of an- and polyploid cells. This and the fact, that both LIN-9 and B-MYB cooperate with pRB in the activation of differentiation specific genes let to the hypothesis, that these genes could play an important role in the transcriptional regulation of genes.

Thus, the primary goal of this thesis was to identify the function of LIN-9 and B-MYB, specifically during mitosis. For that purpose, the progression through the cell cycle of LIN-9 or B-MYB depleted SHEP-cells in comparison to control cells should be analyzed (FACS). Therefore an RNAi-based system was established, that efficiently represses the posttranscriptional expression of LIN-9 and B-MYB in SHEP cells.

It was possible to reproduce results which showed that the loss of LIN-9 or B-MYB lead to a reduced expression of a cluster of G2/M-specific genes, whose products are required for the mitotic checkpoint. The reduced expression of these genes is accompanied by phenotypically changes, such as a defect of the mitotic spindle checkpoint, which leads to an early termination of mitosis after nocodazole treatment. With an additional trigger LIN-9 and B-MYB depleted cells show a high rate of apoptotic cells, while the G2/M-Block is less characteristic but still existent. There was no significant increase of an- or polyploidy and no dependency on p53 or p21. Cell cycle kinetics generated by flowcytometry revealed that the progression of LIN-9 or B-MYB depleted cells from S-phase to G2/M-phase and into the next G1-Phase is significantly delayed.

In summary, depletion of LIN-9 or B-MYB results neither in an arrest in mitosis nor in a significantly changed S-phase length of these cells. This indicates that the slowed progression through the cell cycle is most likely due to a defect in the late G2-phase, which results in a delayed entry into mitosis.

The homologes of LIN-9 and B-MYB in *D. melanogaster* and *C. elegans* act together as subunits of highly conserved RB/E2F-complexes in the regulation of genes, which

suggests, that LIN-9 and B-MYB are also components of a similar complex in humans and thereby mediate the regulation of the cell cycle.

Keywords: LIN-9; B-MYB; cell cycle; G2/M-transition; mitosis; transcription

7. ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Der RB-Signalweg in humanen Karzinomen (in Anlehnung an Dimova and Dyson 2005)
Abb. 1.2	Interaktion von Pocket Proteinen und E2F Transkriptionsfaktoren
Abb. 1.3	Die Rolle von E2Fs und Pocketproteinen im G1/S-Übergang
Abb. 1.4	Die Rolle des RAS-MAPK-Signalweges bei der Vulvainduktion in <i>C.elegans</i>
Abb. 1.5:	Schematischer Vergleich von Lin-9 Proteinen
Abb.: 1.6	Der aktivierte M-A Kontrollpunkt im Säugetier (aus Wassmann and Benezra 2001)
Abb. 1.7	Gene silencing durch RNAi
Abb. 3.1	Schematische Darstellung des pSuperior.puro-Vektors und Kontrolle der Klonierung
Abb. 3.2	Test der neuen LIN-9 und B-MYB spezifischen shRNAs in HeLa Zellen
Abb. 3.3	Depletion von B-MYB in SHEP und BJs
Abb. 3.4	LIN-9 und B-MYB depletierte Zellen zeigen eine verminderte Expression von Checkpoint-Genen
Abb. 3.5	Mitotischer Spindel-Checkpoint-Defekt in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP
Abb. 3.6	Checkpointdefekt
Abb. 3.7	Vermehrte Apoptose in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP Zellen
Abb. 3.8	Konzentratio/Expression von pH3 / p53 und p21 im Zellzyklus
Abb. 3.9	Verzögerung in G2/M in LIN-9 und B-MYB depletierten SHEP
Abb. 3.10	Gleiche DNA-Synthese-Zeit aber Verzögerung in G2/M-G1-Übergang bei LIN-9 und B-MYB depletierten Zellen

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Homologe der SynMuv Gene Klasse B in Drosophila und Mensch
Tab. 1.2	LIN-9 regulierte Gene
Tab. 2.1	Zelllinien
Tab. 2.2	Plasmide
Tab. 2.3	Oligonukleotide für shRNA
Tab. 2.4	qRT-PCR-Primer
Tab. 2.5	Primärantikörper
Tab. 2.6	Sekundärantikörper
Tab. 2.7	Kitsysteme
Tab. 2.8	Geräte
Tab. 2.9	Firmen

7.3 Literaturverzeichnis

- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R. and Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8493-8497.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N. and DePinho, R. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387, 49-55.
- Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 9, 69-75.
- Andrews, P. D., Knatko, E., Moore, W. J. and Swedlow, J. R. (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol* 15, 672-683.
- Apostolova, M. D., Ivanova, I. A., Dagnino, C., D'Souza, S.J. and Dagnino, L. (2002). Active nuclear import and export pathways regulate E2F-5 subcellular localization. *J Biol Chem* 277, 34471-34479.
- Ayyar, S., Jiang, J., Collu, A., White-Cooper, H. and White, R. A. (2003). Drosophila TGIF is essential for developmentally regulated transcription in spermatogenesis. *Development* 130, 2842-2852.
- Babu, J. R., Jeganathan, K. B., Baker, D. J., Wu, X., Kang-Decker, N. and van Deursen, J. M. (2003). Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J. Cell Biol.* 160, 341-353.
- Badie, C., Itzhaki, J. E., Sullivan, M. J., Carpenter, A. J. and Porter, A. C. (2000). Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells. *Mol Cell Biol*, 20, 2358-2366.
- Baker, D. J., Jeganathan, K. B., Cameron, J. D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R. B., de Groen, P. C., Roche, P. and van Deursen, J. M. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat. Genet.* 36, 744-749.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1997). The Retinoblastoma Protein Pathway in Cell Cycle Control and Cancer. *Experimental Cell Research* 237, 1-6.
- Bass, B.L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235 – 238.
- Beall, E. L. (2004). Dm-myb mutant lethality in Drosophila is dependent upon mip 130: positive and negative regulation of DNA replication. *Genes Dev* 8, 1667-80.
- Beall, E. L., Manak, J. R., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J. S. and Botchan, M. R. (2002). Role for Drosophila Myb-containing complex in site-specific DNA replication. *Nature* 420, 833-837.

- Begg, A.C., McNally, N.J., Shrieve, D.C. and Karche, H. (1985). A Method to Measure the Duration of DNA Synthesis and the Potential Doubling Time From a Single Sample. *Cytometry* 6, 620-626.
- Bernards, R. (1997). E2F: a nodal point in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1333, 33-40.
- Blais, A. and Dynlacht, B. D. (2004). Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr Opin Genet Dev* 14, 527-532.
- Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R. (2002). A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 296, 550-553.
- Burke, D. J. (2000). Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* 10, 26-31.
- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K. V., Markovitz, S. D., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300-303.
- Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9742 - 9747.
- Carvalho, A., Carmena, M., Sambade, C., Earnshaw, W. C. and Wheatley, S. P. (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 116, 2987-2998.
- Ceol, C. J. and Horvitz, H. R. (2004). A new class of *C. elegans* SynMuv genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of Ras signalling. *Dev Cell* 6, 563-576.
- Ceol, C. J., and Horvitz, H. R. (2001). Dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signalling in *C. elegans* vulval development. *Mol Cell* 7, 461-473.
- Chan, G. K., Jablonski, S. A., Sudakin, V., Hittle, J. C. and Yen, T. J. (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* 146, 941-954.
- Chen, K. and Rajewsky, N. (2007). The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Publishing Group* 8, 93-103.
- Chen, R. H., Shevchenko, A., Mann, M. and Murray, A. W. (1998). Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J Cell Biol* 143, 283-295.
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A., Dixon, J. E. (2000). Use of doublestranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6499 - 6503.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796–2809.

- Crawford, D. F. and Piwnica-Worms, H. (2001). The G(2) DNA damage checkpoint delays expression of genes encoding mitotic regulators. *J Biol Chem*, 276, 37166-37177.
- Cui, M., Chen, J., Myers, T.R., Hwang, B.J., Sternberg, P.W., Greenwalg, I. and Han, M. (2006). SynMuv Genes Redundantly Inhibit lin-3/EGF Expression to Prevent Inappropriate Vulval Induction in *C. elegans*. *Dev Cell* 10, 667-672.
- De Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. and Leone, G. (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 278, 42041-42049.
- Dimova, D.K. and Dyson, N.J. (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintance with new faces. *Oncogene* 24, 2810-2826.
- Duesberg, P., Li, R., Rasnick, D., Rausch, C., Willer, A., Kraemer, A., Yerganian, G. and Hehlmann, R. (2000). Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.* 119, 83-93.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12, 2245-62.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Fitzpatrick, C. A., Sharkov, N. V., Ramsay, G. and Katzen, A. L. (2002). *Drosophila myb* exerts opposing effects on S-phase, promoting proliferation and suppressing endoreduplication. *Development* 129, 4497-4507.
- Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M. and Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-646.
- Fung, S. M., Ramsay, G. and Katzen, A. L. (2002). Mutations in *Drosophila myb* lead to centrosome amplification and genomic instability. *Development* 129, 347-359.
- Gagrica, S., Hauser, S., Kolschoten, I., Osterloh, L., Agami, R. and Gaubatz, S. (2004). Inhibition of oncogenic transformation by mammalian Lin-9, a pRB-associated protein. *Embo J* 23, 4627-4638.
- Garcia, P. and Frampton, J. (2006). The transcription factor B-Myb is essential for S-phase progression and genomic stability in diploid and polyploid megakaryocytes. *J Cell Sci* 119, 1483-1493.
- Gaubatz, S., Lees, J. A., Lindeman, G. J. and Livingston, D. M. (2001). E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol Cell Biol* 21, 1384-1392.
- Gaubatz, S., Wood, J. G. and Livingston, D. M. (1998). Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9190-9195.

- Golay, J., Capucci, A., Arsur, M., Castellano, M., Rizzo, V. and Introna, M. (1991). Expression of c-myb and B-myb, but not A-myb, correlates with proliferation in human hematopoietic cells. *Blood* 77, 149-158.
- Gorbsky, G. J., Chen, R. H. and Murray, A. W. (1998). Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J. Cell Biol.* 141, 1193-1205.
- Gunawardena, R. W., Siddiqui, H., Solomon, D. A., Mayhew, C. N., Held, J., Angus, S. P., and Knudson, E. S. (2004). Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. *J Biol Chem* 279, 29278-29285.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- Harrison, M.M., Ceol, C.J., Lu, X. and Horvitz, H.R. (2006). Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Dev. Biol.* 103 , 45, 16782–16787.
- Helin, K., Wu, C. L., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dynlacht, B. D., Ngwu, C. and Harlow, E. (1993). Heterodimerisation of the transcription factor E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* 7, 1850-1861.
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma.* 106, 348-60.
- Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., Lowe, S. W. and Cordon-Cardo, C. (2004). Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 430, 797-802.
- Hernando, E., Orlow, I., Liberal, V., Nohales, G., Benezra, R. and Cordon-Cardo, C. (2001). Molecular analysis of the mitotic checkpoint components hsMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int. J. Cancer* 95, 223-227.
- Hinds, P. W. and Weinberg, R. A. (1994) Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, 4, 135-141.
- Horvitz, H. R. and Sulston, J. E. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 96, 435-454.
- Hoyt, M.A. (2000). Exit from mitosis: spindle pole power. *Cell* 102, 267-270.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R. J., Robertson, H. D. (1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 250, 409-417.

- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J. R. (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol* 21, 4684-4699.
- Jackson, M. W., Agarwal, M. K., Yang, J., Bruss, P., Uchiumi, T., Agarwal, M. L., Stark, G. R. and Taylor, W. R. (2005). p130/p107/p105Rb-dependent transcriptional repression during DNA-damage-induced cell-cycle exit at G2. *J Cell Sci*, 118, 1821-1832.
- Jiang, J., White-Cooper, H. (2003). Transcriptional activation in *Drosophila* spermatogenesis involves the mutually dependent function of aly and a novel meiotic arrest gene cookie monster. *Development* 130, 563-573.
- Jiang, Y., Saavedra, H. I., Holloway, M. P., Leone, G., and Altura, R. A. (2004). Aberrant regulation of surviving by the RB/E2F family of proteins. *J Biol Chem* 279, 40511-40520.
- Joaquin, M. and Watson, R. J. (2003). Cell cycle regulation by the B-Myb transcription factor. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2389-2401.
- Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., and Nevins, J. R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S Phase. *Nature* 365, 349-352.
- Johnson, L. R., Johnson, T. K., Desler, M., Luster, T. A., Nowling, T., Lewis, R. E., and Rizzino, A. (2002). Effects of B-Myb on gene transcription: phosphorylation-dependent activity and acetylation by p300. *J Biol Chem* 277, 4088-4097.
- Johnson, V. L., Scott, M. I., Holt, S. V., Hussein, D. and Taylor, S. S. (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J. Cell Sci.* 117, 1577-1589.
- Kallio, M., Weinstein, J., Daum, J. R., Burke, D. J., Gorbsky, G. J. (1998). Mammalian p55CDC mediates association of the spindle checkpoint protein Mad2 with the cyclosome/anaphase-promoting complex, and is involved in regulating anaphase onset and late mitotic events. *J Cell Biol* 141, 1393-1406.
- Katzen, A. L., and Bishop, J. M. (1996). Myb provides an essential function during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13955-13960.
- Katzen, A. L., Jackson, J., Harmon, B. P., Fung, S. M., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1998). *Drosophila myb* is required for the G2/M transition and maintenance of diploidy. *Genes Dev* 12, 831-843.
- Kienitz, A., Vogel, C., Morales, I., Müller, R. und Bastians, H. (2005). Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene* 24, 4301-4310.
- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V., Gudkov, A. V. (1999). A Chemical Inhibitor of p53 that protects Mice from the Side Effects of Cancer Therapy. *Science* 285, 1733-1737.

- Kops, G. J., Weaver, B. A. and Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5, 773-785.
- Korenjak, M., Taylor-Harding, B., Binne, U. K., Satterlee, J. S., Stevaux, O., Aasland, R., White-Cooper, H., Dyson, N., and Brehm, A. (2004). Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* 119, 181-193.
- Kramer, A., Neben, K. and Ho, A.D. (2002). Centrosome replication, genomic instability and cancer. *Leukemia* 16, 767-775.
- Lam, E. W. and Watson, R. J. (1993). An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *Embo J* 12, 2705-2713.
- Lam, E. W., Robinson, C., and Watson, R. J. (1992). Characterization and cell cycle-regulated expression of mouse B-myb. *Oncogene* 7, 1885-1890.
- Lengauer, C. and Wang, Z. (2004). From spindle checkpoint to cancer. *Nat Genet* 36, 1144-1145.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-649.
- Lens, S. M. and Medema, R. H. (2003). The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell Cycle* 2, 507-510.
- Lewis, P. W., Beall, E. L., Fleischer, T. C., Georlette, D., Link, A. J., and Botchan, M. R. (2004). Identification of a *Drosophila* Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. *Genes Dev* 18, 2929-2940.
- Li, F. X., Zhu, J. W., Hogan, C. J. and DeGregori, J. (2003). Defective Gene Expression, S Phase Progression, and Maturation during Hematopoiesis in E2F1/E2F2 Mutant Mice. *Mol Cell Biol* 23, 3607-3622.
- Li, X., and McDonnell, D. P. (2002). The transcription factor B-Myb is maintained in an inhibited state in target cells through its interaction with the nuclear corepressors N-CoR and SMRT. *Mol Cell Biol* 22, 3663-3673.
- Maiti, B., Li, J., de Bruin, A., Gordon, F., Timmers ; C., Opavsky, R., Patil, K., Tuttle, J., Cleghorn, W. and Leone, G. (2005). Cloning and Characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 280, 18211-18220.
- Manak, J. R., Mitiku, N. and Lipsick, J. S. (2002). Mutation of the *Drosophila* homologue of the Myb protooncogene causes genomic instability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7438-7443.
- Mao, Y., Abrieu, A. und Cleveland, D. W. (2003). Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* 114, 87-98.

- Meraldi, P. and Sorger, P. K. (2005). A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *Embo J* 24, 1621-1633.
- Meraldi, P., Draviam, V. M., Sorger, P. K. (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* 7, 45–60.
- Michel, L. S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P. K., Murty, V. V. und Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insuffizienz causes premature anaphase and chromosomal instability in mammalian cells. *Nature* 409, 355-359.
- Morgan, D. O. (1999). Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat Cell Biol* 1, 47-53.
- Morrow, C. J., Tighe, A., Johnson, V. L., Scott, M. I. F., Ditchfield, C. and Taylor, S. S. (2005). Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/C^{Cdc20}. *J. Cell Sci.* 118, 3639-3652.
- Murphy, P. J. M., Galigniana, M. D., Morishima, Y., Harrell, J. M., Kwok, R. P. S., Ljungman, M. and Pratt, W. B. (2004). Pifithrin- α Inhibits p53 Signaling after Interaction of the Tumor Suppressor Protein with hsp90 and Its Nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 279, 30195-30201.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.
- Nevins, J.R. (1998). Towards the understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell growth Differ.* 9, 585-93.
- Nicklas, R. B. (1997). How cells get the right chromosomes. *Science* 275, 632–637.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S. And Ishizaki, R. (1988). Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-myb and B-myb. *Nucleic Acids Res* 16, 11075-11089.
- Paulovich, A. G., Toczyski, D. P. and Hartwell, L. H. (1997). When checkpoints fail. *Cell* 88, 315–321.
- Rajagopalan, H. and Lengauer, C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature* 432, 338-341.
- Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V. B., Dannenberg, J. H., Catchpole, S., Watson, R. J., te Riele, H. and Dynlacht, B. D. (2002). E2F mediates cell cycle dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 16, 933-947.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. A. and Dynlacht, B. D. (2002). E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev* 16, 245-256.

- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W. S. and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotech.* 22, 326-330.
- Scolnick, D. M., Halazonetis, T. D. (2000). Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 406, 430-434.
- Shepard, J. L., Amatruda, J. F., Stern, H. M., Subramanian, A., Finkelstein, D., Ziai, J., Finley, K. R., Pfaff, K. L., Hersey, C., Zhou, Y., Barut, B., Freedman, M., Lee, C., Spitsbergen, J., Neubergh, D., Weber, G., Golub, T. R., Glickman, J. N., Kutok, J. L., Aster, J. C. and Zon, L. I. (2005). A zebrafish bmyb mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13194–13199.
- Sieber, O. M., Heinemann, K. und Tomlinson, I. P. (2003). Genomic instability – the engine of tumorigenesis? *Nat. Rev. Cancer* 3, 701-708.
- Sudakin, V., Chan, G. K. und Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* 154, 925-936.
- Takahashi, Y., Rayman, J. B. and Dynlacht, B. D. (2000). Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* 14, 804-816.
- Tan, P. B., Lackner, M. R. and Kim, S. K. (1998). Map kinase signalling specificity mediated by the LIN-1 Ets/LIN-31 WH transcription factor complex during *C. elegans* vulval induction. *Cell* 93, 569-580.
- Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S. and Ishigatsubo, Y. (2002). Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem* 277, 10719-10726.
- Tanaka, Y., Pateston, N. P., Makaekawa, T. and Ishii, S. (1999). B-myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J Biol Chem* 274, 28067-28070.
- Tanudji, M., Shoemaker, J., L'Italien, L., Russell, L., Chin, G. and Schebye, X. M. (2004). Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Mol Biol Cell* 15, 3771-3781.
- Taubert, S., Gorrini, C., Frank, S. R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H. M., Livingston, D. M. and Amati, B. (2004). E2F-dependent Histone acetylation and recruitment of the Tip60 acetyltransferase complex to chromatin in late G1. *Mol Cell Biol* 24, 4546-4556.
- Taylor, S. S. (1999). Chromosome segregation: dual control ensures fidelity. *Curr Biol* 9, 562-564.
- Thomas, J. H., Ceol, C. J., Schwartz, H. T. and Horvitz, H. R. (2003). New genes that interact with lin-35 Rb to negatively regulate the let-60 ras pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 164, 135-151.

- Trauth, K., Mutschler, ., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G. and Klempnauer, K. H. (1994). Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *Embo J* 13, 5994-6005.
- Trimarchi, J.M. and Lees, J.A. (2002). *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, 11-20.
- Van de Wetering, M., Oving, I., Mucan, V., Pon Fong, M. T., Brantjes, H., van Leenen, D., Holstege, F. C., Brummelkamp, T. R., Agami, R., Clevers, H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stable integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO* 4, 609-615.
- Wang, X., Jin, D.-Y., Ng, R. W. M., Feng, H., Wong, Y. C., Cheung, A. L. M. und Tsao, S. W. (2002). Significance of MAD2 Expression to Mitotic Checkpoint Control in Ovarian Cancer Cells. *Cancer Research* 62, 1662-1668.
- Wassmann, K. and Benezra, R. (2001). Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr. Opin Genet Dev* 11:83–90.
- Wassmann, K., Liberal, V. und Benezra, R. (2003). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *EMBO* 22, 797-806.
- Weaver, B. A. A., Bonday, Z. Q., Putkey, F. R., Kops, G. J.P.L., Silk, A. D. and Don W. Cleveland (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J. Cell Biol.* 162, 551-563.
- Weaver, B. A., Silk, A. D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P. and Cleveland, D. W. (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* 11, 25-36.
- Weinmann, A. S., Yan, P. S., Oberly, M. J., Huang, T. H. and Farnham, P. J. (2002). Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG islands microarray analysis. *Genes Dev* 16, 235-244.
- White-Cooper, H., Leroy, D., MacQueen, A., Fuller, M. T. (2000). Transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes depends on a conserved chromatin associated protein, whose nuclear localisation is regulated. *Development* 127, 5463–5473.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H. I., Sang, L., Chong, G. T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F. A., Field, S. J. et al. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 414, 457-462.
- Yang, D., Welm, A. and Bishop, J. M. (2004). Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15100-15105.
- Zachariae, W. (1999). Progression into and out of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11, 708-716.
- Zachariae, W., Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 13, 2039-2058.

- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25 - 33.
- Zhang, H. S., Gavin, M., dahiya, A., Postigo, A. A., Ma, D., Luo, R. X., Harbour, J. W. and Dean, D. C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101, 79-89.
- Zheng, N., Fraenkel, E., Pabo, C. O. and Pavletich, N. P. (1999). Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev* 13, 666-674.
- Zhu, W., Giagrande, P. H. and Nevins, J. R. (2004). E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *Embo J* 23, 4615-4626.
- Ziebold, U., Bartsch, O., Marais, R., Ferrari, S., and Klemptner, K. H. (1997). Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2. *Curr Biol* 7, 253-260.
- Ziebold, U., Lee, e. Y., Bronson, R. T. and Lees, J. A. (2003). E2F3 Loss Has Opposing Effects on Different pRB-Deficient Tumors, Resulting in Suppression of Pituitary Tumors but Metastasis of Medullary Thyroid Carcinomas. *Mol Cell Biol* 23, 6542-6552.
- Ziebold, U., Reza, T., Caron, A. and Lees, J. A. (2000). E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev* 15, 386-391.

7.4 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APC/C	Anaphase-promoting complex/Cyclosome
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BIRC5	Survivin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Karzinom
CCNA2	Cyclin A2
CCNB1	Cyclin B1
cdk	Cyklin-abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
CDC2	Cell division cell cycle 2
cDNA	copy DNA
CTP	Cytosintriphosphat
cm	Zentimeter
CENPE	Centromere protein E
crb	crash&burn-Phänotyp
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DEPEC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d. h.	Das heißt
DMEM	Zellkulturmedium (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dREAM	drosophila RBF, E2F and Myb-interacting proteins
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E2F	Aktivator des adenoviralen E2 Gens (Early gene 2 factor)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epithelial growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
ESB	Elektrphorese-Probenpuffer (electrophoresis sample buffer)
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Flourescenz-insitu-Hybridisierung
G	Guanin
g	Gramm
G1-Phase	Gap 1 phase
G2-Phase	Gap 2 phase
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HAT	Histonacetyltransferase
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HDAC	Histonacetylase
HEPES	N2-Hydroxyethylpiperazin-N2-Ethansulfosäure
HRP	hoarse radish protein
IP	Immunpräzipitation
kd	knock down
kDa	Kilo-Dalton
kb	Kilobasen

LB-Medium	Luria Bertani Medium
M	Mitose
M	Mol pro Liter (Molar)
mA	Milliampere
MCC	mitotischer Checkpoint Complex
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten (mouse embryonic fibroblasts)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimol pro Liter (millimolar)
mRNA	Messenger RNA
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
PI	Propidiumiodid
PLK1	Polo-like kinase 1
PP	Pocket Proteine
pRb	Genprodukt von Rb
P/S	Penicillin/Streptomycin
Rb	Retinoblastom und Retinoblastom-Gen
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium: Roswell Park Memorial Institut

RT	Raumtemperatur
rt-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sek.	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
s.o.	Siehe oben
S-Phase	Synthese Phase des Zellzyklus
SynMuv	synthetischer multivulva Phänotyp
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
u.a.	unter anderem
UBCH10	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
w/w	Gewicht pro Gewicht (weight per weight)
z. B.	zum Beispiel

Des Weiteren wurden für Aminosäuren der übliche Ein- bzw. Dreibuchstabencode, für Restriktionsenzyme die international üblichen Abkürzungen und für Chemikalien, sofern nicht anders erwähnt, die IUPAC Nomenklatur verwendet.

7.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Basler, Baum, Boudriot, Cetin, Czubayko, Donner-Banzhoff, Eilers, Feuser, Gerdes, Gress, Grundmann, Grzeschik, Herrmann-Lingen, Hilt, Kill, Klenk, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Lang, Lenz, Lill, Lohoff, Löw, Maier, Mandrek, Moll, Mueller, Mutters, Oertel, Printz, Renschmidt, Renz, Richter, Schäfer, Schmidt, L., Schmidt, S., Schrader, Vogelmeier, Waldegger, Weihe, Weiler, Werner, Westermann, Wulf

in Kassel:

Plum, Wolf

in Berlin:

Haas, Kienapfel, Mackert

in Lübeck:

Bethge

in Mullingar, Irland:

O'Brian

in Hamilton, Kanada:

Bennett, Miller, Young

7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich während meiner Doktorarbeit, von der ersten Idee bis zum letzten Punkt dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Allen voran gilt mein größter Dank Prof. Dr. Stefan Gaubatz, unter dessen Anleitung ich diese interessante und spannende Arbeit anfertigen durfte. Ich danke ihm für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, für viele wertvolle Ratschläge und Ideen, für seine Geduld und für die mitreißende Begeisterung und Motivation, mit der er meine Arbeit begleitet und vorangetrieben hat.

Mein herzlichster Dank den Mitgliedern der AG Gaubatz, auf die ich mich stets verlassen konnte. Lisa, Fabienne, Nina, Björn, Denise, Elena, Kathrin, Steffi und Martina, ich danke Euch für eine tolle und unvergessliche Zeit auch jenseits der Labortür. Ich danke Euch für Eure Freundschaft, Euren Humor, fachliche Diskussionen und praktische Anleitungen, Kaffeepausen, Caipi-Abende,...

Mein besonderer Dank gilt Fabienne, für „blitzschnelles“ Korrekturlesen, und Denise, deren Unterstützung und praktische Hilfe entscheidend zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben und unter deren Anleitung ich meine allerersten Schritte im Labor bewältigt habe.

Besonderer Dank gilt auch meinen Freunden und meiner Familie für ihr Verständnis, für die manchmal notwendige Ablenkung und für ihre bedingungslose Unterstützung. Danke dafür, dass Ihr mich immer umsort, motiviert und an mich geglaubt habt.

Danke...

7.7 Erklärung an Eides statt

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Rolle von LIN-9 und B-MYB in der Zellregulation humaner Zellen“ im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Gaubatz ohne sonstige Hilfsmittel selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Osterloh, L., von Eyss, B., Schmit, F., **Rein, L.**, Hübner, D., Samans, B., Hauser, S. and Gaubatz, S. (2007) The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis. *Embo J*, **26**, 144-157.

Marburg, den