

Identifizierung und Charakterisierung LIN-9 regulierter Gene im humanen System

Die Rolle von LIN-9 in der Regulation des Zellzyklus

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Lisa Osterloh

aus Wetzlar

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter :

2. Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie

In Liebe und Dankbarkeit

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
1.1.	DAS HUMANE LIN-9	1
1.2.	DIE REGULATION DES ZELLYKLUS DURCH pRB/E2F	3
1.2.1.	<i>Die Familie der Pocket Proteine</i>	5
1.2.2.	<i>Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren</i>	7
1.2.3.	<i>Mechanismus der pRB/E2F vermittelten Genregulation</i>	9
1.2.4.	<i>Die Kontrolle des G2/M-Übergangs durch E2F</i>	9
1.3.	DIE ROLLE VON pRB UND E2F IN DER DIFFERENZIERUNG	10
1.4.	pRB/E2F-KOMPLEXE IN VERSCHIEDENEN MODELLORGANISMEN	12
1.4.1.	<i>Der DRM-Komplex in Caenorhabditis elegans</i>	12
1.4.2.	<i>Der dREAM/Myb-MuvB-Komplex in Drosophila melanogaster</i>	15
1.5.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
2	MATERIAL	19
2.1.	CHEMIKALIEN	19
2.2.	PUFFER UND LÖSUNGEN	19
2.2.1.	<i>Enzypuffer</i>	21
2.2.2.	<i>Auftragspuffer</i>	22
2.2.3.	<i>Reagenzien für die Elektrophorese</i>	22
2.2.4.	<i>Puffer für Western Blot</i>	22
2.2.5.	<i>Puffer für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)</i>	23
2.3.	ENZYME	24
2.4.	ANTIBIOTIKA	24
2.5.	GRÖßENSTANDARDS	24
2.6.	MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIENSÄTZE	25
2.7.	MOLEKULARBIOLOGISCHE REAGENZIEN	25
2.8.	RADIOAKTIV MARKIERTE STOFFE	25
2.9.	MEDIEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	26
2.10.	ANTIKÖRPER UND ANTISEREN	26
2.10.1.	<i>Sekundärantikörper</i>	26
2.10.2.	<i>Primärantikörper</i>	27
2.11.	OLIGONUKLEOTIDE	28
2.11.1.	<i>Sequenzierprimer</i>	28
2.11.2.	<i>siRNA Oligonukleotide</i>	28
2.11.3.	<i>Oligonukleotide für vektorbasierende RNAi-Anwendungen</i>	28
2.11.4.	<i>Primer für semiquantitative PCR-Analysen</i>	30
2.11.5.	<i>qRT-PCR Primer</i>	30
2.11.6.	<i>qPCR Primer für ChIP-Analysen</i>	31
2.12.	PLASMIDE	32
2.13.	ZELLINIEN	32
2.14.	CDNA-MICROARRAYS	33
2.15.	SPEZIELLE GERÄTE UND MATERIALIEN	33
3	METHODEN	34
3.1.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	34
3.1.1.	<i>Kultivierung eukaryotischer Zellen</i>	34

3.1.2.	<i>Passagieren von Zellen</i>	34
3.1.3.	<i>Einfrieren von Zellen</i>	35
3.1.4.	<i>Auftauen von Zellen</i>	35
3.1.5.	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	35
3.1.6.	<i>Erstellen von Wachstumskurven</i>	35
3.1.7.	<i>Synchronisation von Zellen mit Hydroxyharnstoff</i>	36
3.1.8.	<i>Synchronisation von T98G-Zellen durch Serumentzug</i>	36
3.1.9.	<i>Behandlung von BJ-ET Zellen mit Doxorubicin</i>	36
3.1.10.	<i>Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen</i>	36
3.1.11.	<i>Infektion von BJ-ET Zellen</i>	37
3.1.12.	<i>Immunfluoreszenz</i>	38
3.2.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	39
3.2.1.	<i>Fixierung von Zellen zur FACS-Analyse</i>	39
3.2.2.	<i>Bestimmung der Zellzyklusverteilung</i>	39
3.2.3.	<i>Messung von S-Phase-Zellen: die 2D-FACS-Analyse</i>	39
3.2.4.	<i>Kinetik zum Durchlaufen eines Zellzyklus</i>	40
3.3.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	41
3.3.1.	<i>Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren</i>	41
3.3.2.	<i>Quantifizierung von Nukleinsäuren</i>	42
3.3.3.	<i>Enzymatische Modifikation von DNA</i>	42
3.3.4.	<i>Hitzeschocktransformation von Bakterien</i>	43
3.3.5.	<i>Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen</i>	44
3.3.6.	<i>Anlagern von Oligonukleotiden</i>	44
3.4.	EXPRESSIONSANALYSEN	44
3.4.1.	<i>Reverse Transkription zur cDNA-Synthese</i>	44
3.4.2.	<i>Semiquantitative PCR</i>	44
3.4.3.	<i>quantitative Echtzeit-PCR: Real Time PCR</i>	45
3.4.4.	<i>cDNA-Microarray</i>	46
3.5.	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	49
3.5.1.	<i>Gesamtzelllysate</i>	49
3.5.2.	<i>Zellkernextrakte</i>	49
3.5.3.	<i>Immunpräzipitation</i>	50
3.5.4.	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	50
3.5.5.	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	51
3.5.6.	<i>Western-Blot</i>	51
3.5.7.	<i>Kinase-Assay</i>	53
3.5.8.	<i>Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA</i>	53
3.5.9.	<i>Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)</i>	54
4	ERGEBNISSE	57
4.1.	IDENTIFIZIERUNG LIN-9 REGULIERTER GENE.....	57
4.1.1.	<i>Depletion von LIN-9 in humanen Zellen durch RNA-Interferenz</i>	57
4.1.2.	<i>Genexpressionsanalyse LIN-9 defizienter Zellen</i>	60
4.1.3.	<i>LIN-9 reguliert die Expression bestimmter G2/M-spezifischer Gene</i>	65
4.2.	DIE REPRESSION VON G2/M-GENEN NACH LIN-9 VERLUST IST P53-UNABHÄNGIG	66
4.3.	DIREKTE UND INDIREKTE REGULATION VON LIN-9 ZIELGENEN.....	70
4.3.1.	<i>LIN-9 bindet an die Promotoren der identifizierten G2/M-Gene</i>	70
4.3.2.	<i>Die Regulation von p21 durch LIN-9 erfolgt indirekt</i>	71

4.4.	CHARAKTERISIERUNG LIN-9 UND B-MYB DEFIZIENTER FIBROBLASTEN	73
4.4.1.	<i>Die Proliferation LIN-9 und B-MYB defizienter Fibroblasten ist verlangsamt</i>	74
4.4.2.	<i>Der Verlust von LIN-9 oder B-MYB führt zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase</i>	75
4.4.3.	<i>LIN-9 und B-MYB defiziente Zellen arretieren bereits in der G2-Phase</i>	78
4.4.4.	<i>Abnahme der Cyclin B1 assoziierten Kinaseaktivität nach Verlust von LIN-9</i>	83
4.4.5.	<i>Der beobachtete Zellzyklusdefekt ist spezifisch für die Depletion von LIN-9</i>	84
4.5.	LIN-9 UND B-MYB REGULIEREN GEMEINSAM DIE EXPRESSION VON G2/M-GENEN	86
4.6.	LIN-9 REGULIERTE GENE WERDEN NICHT IMMER DURCH B-MYB KOREGULIERT	87
5.	DISKUSSION	89
5.1	LIN-9 REGULIERT DIE EXPRESSION G2/M-SPEZIFISCHER GENE	89
5.2.	LIN-9 UND B-MYB REGULIEREN DEN EINTRITT IN DIE MITOSE	90
5.3.	MECHANISMUS DER LIN-9 VERMITTELTEN GENREGULATION	92
5.4.	LIN-9 ZIELGENE: EINE ALLGEMEINE BETRACHTUNG	96
5.4.1.	<i>LIN-9 abhängige nicht G2/M-spezifische Gene</i>	96
5.4.2.	<i>Nach LIN-9 Verlust verstärkt exprimierte Gene</i>	97
5.5.	DAS HUMANE LIN-9: ONKOGEN UND TUMORSUPPRESSOR?	99
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
6.1.	DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG	102
6.2.	ENGLISH SUMMARY	104
7	ANHANG	105
8	ABKÜRZUNGEN	109
9	LITERATUR	111
10	INTERNETQUELLEN.....	121
	DANKSAGUNG.....	122
	PUBLIKATIONEN.....	124
	KONFERENZBEITRÄGE	124
	LEBENS LAUF	125
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	126

1 EINLEITUNG

1.1. Das humane LIN-9

Das humane LIN-9 wurde erstmals als ein chromatinassoziiertes und pRB interagierendes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 62 kDa beschrieben (Gagrica et al., 2004). Die Bindung an pRB erfolgt über den N-terminalen Bereich von LIN-9 an die *Pocket*-Domäne von pRB. Der Tumorsuppressor pRB ist ein wichtiger Regulator der Zelldifferenzierung und Zellzyklusprogression (Classon and Harlow, 2002). Eine Schlüsselfunktion von pRB ist die Inhibition des G1/S-Übergangs, indem es mit Mitgliedern der E2F-Transkriptionsfaktoren assoziiert und dadurch die Transkription von Genen reprimiert (Cam and Dynlacht, 2003; Dyson, 1998). Untersuchungen zeigten, dass die Kooperation von LIN-9 und pRB keinen Einfluss auf den pRB-vermittelten G1-Arrest hat. Auch eine Rolle von LIN-9 in der pRB-abhängigen Repression und der E2F-abhängigen Transaktivierung von Genen konnte nicht beobachtet werden (Gagrica et al., 2004). Vielmehr ließen die Studien von Gagrica und Kollegen vermuten, dass LIN-9 eine Rolle in der pRB-vermittelten Differenzierung spielt. Sie konnten zeigen, dass pRB die Anwesenheit von LIN-9 für eine effektive Induktion von so genannten *flat cells* in Saos2-Zellen benötigt (Gagrica et al., 2004). Die Ausbildung von *flat cells* beschreibt einen Seneszenz-ähnlichen Status der Zelle, welcher mit der Expression von Differenzierungsmarkern einhergeht (Sellers et al., 1998). Zudem wurde nachgewiesen, dass LIN-9 zusammen mit pRB in der Transaktivierung differenzierungsspezifischer Gene kooperiert (Gagrica et al., 2004).

Für LIN-9 konnte weiterhin gezeigt werden, dass es die durch RASV12 induzierte onkogene Transformation von primären Zellen inhibiert, wobei diese Fähigkeit von der Anwesenheit von pRB abhängt (Gagrica et al., 2004). Darüber hinaus kann der Verlust von pRB in der onkogenen Transformation humaner Fibroblasten durch den Verlust von LIN-9 ersetzt werden. Nach der Depletion von p53, bei gleichzeitiger Überexpression von SV40 small t und RASV12 führt der zusätzliche Verlust von pRB zur Transformation immortalisierter primärer humaner Fibroblasten (BJ-ET Zellen) (Voorhoeve and Agami, 2003). Transformierte Zellen besitzen die Fähigkeit, sich unabhängig von der Anheftung an eine Oberfläche vermehren zu können. Im Vergleich zu untransformierten Zellen, können transformierte Zellen daher in Kultur in so genanntem Weichagar wachsen. In diesem Zellsystem führte der Verlust von LIN-9 ebenso wie der Verlust von pRB zur Transformation der Zellen. Dies zeigt, dass LIN-9 eine entscheidende Rolle im pRB-Signalweg besitzt und tumorsuppressive Eigenschaften aufweist (Gagrica et al., 2004).

LIN-9 Homologe finden sich im Tier- und Pflanzenreich in verschiedenen Spezies. Abb. 1.1. gibt einen Überblick über die in der Literatur beschriebenen LIN-9 Proteine in Vertebraten und Invertebraten. Es lässt sich erkennen, dass die Struktur der LIN-9 Proteine in den

verschiedenen Spezies sehr ähnlich ist. Die größte Homologie findet sich in zwei konservierten Regionen, Box-1 und Box-2 (Gagrica et al., 2004; White-Cooper et al., 2000). Eine weitere Gemeinsamkeit der verschiedenen LIN-9 Proteine ist das Fehlen von bekannten DNA-Bindemotiven oder Proteininteraktionsdomänen. Eine Vorhersage über die biochemische und molekularbiologische Funktion der verschiedenen LIN-9 Proteine ist daher nicht möglich.

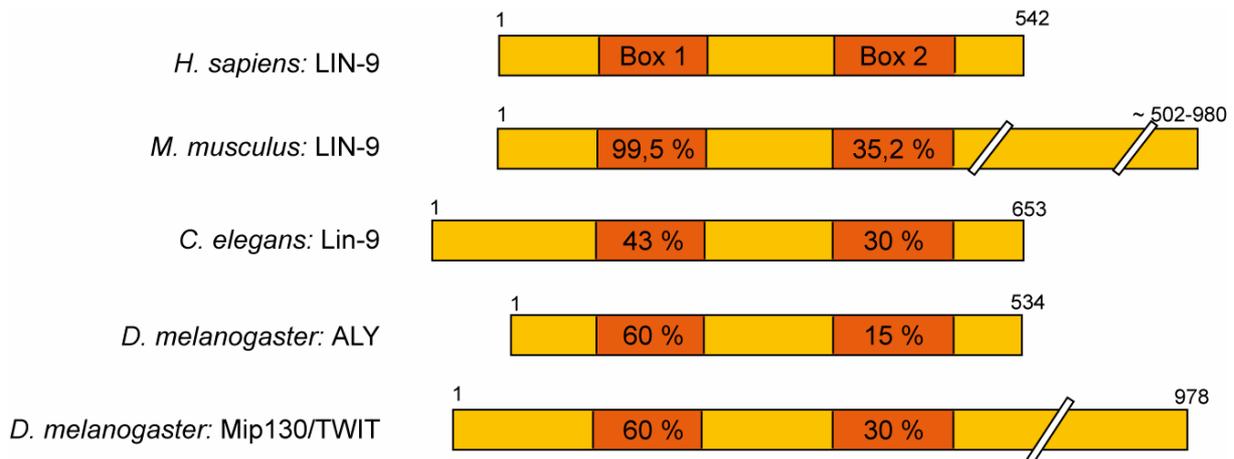


Abb. 1.1.: Die Familie der LIN-9 Proteine. Homologe des humanen LIN-9 Proteins finden sich sowohl in *C. elegans*, als auch in der Fliege und in der Maus. In der Fliege sind 2 paraloge LIN-9 Proteine beschrieben, wobei es sich bei ALY (*Always early*) um ein testisspezifisches Protein handelt. Die größte Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz findet sich in den konservierten Bereichen der Box 1 und Box 2.

Eine Rolle von LIN-9 im pRB-Signalweg wurde bereits zuvor in *C. elegans* beschrieben. Dabei wurde das Homolog von LIN-9 als Mitglied einer Gengruppe identifiziert, welches zusammen mit dem pRB-Homolog LIN-35 im gleichen genetischen Signalweg, die Differenzierung der Vulva kontrolliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das *Drosophila* Homolog Mip130/TWIT Bestandteil eines mehrere Untereinheiten umfassenden pRB/E2F-Komplexes ist, welcher die Expression differenzierungsspezifischer Gene reguliert. Zum Verständnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Zusammenhänge, soll in den folgenden Abschnitten die Rolle von pRB im Zellzyklus und in der Differenzierung, sowie die Funktion von pRB/E2F-Komplexen in den Modellorganismen *C. elegans* und *D. melanogaster* zusammengefasst werden.

1.2. Die Regulation des Zellzyklus durch pRB/E2F

Jede Zelle eines Organismus durchläuft zahlreiche mitotische Teilungen um sich zu vermehren, bevor sie schließlich ausdifferenziert oder stirbt. Damit sich eine Zelle vermehren (proliferieren) kann, muss sie einen fein abgestimmten Zyklus durchlaufen, an dessen Ende die mitotische Teilung erfolgt. Die Progression durch die einzelnen Phasen des so genannten Zellzyklus basiert auf der oszillierenden Aktivierung und Repression zahlreicher Gene. Dies erfordert wiederum ein präzise abgestimmtes Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und deren Regulatoren. Eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellzyklus spielen der Tumorsuppressor pRB und Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktoren (Dyson, 1998; Muller and Helin, 2000).

Die Entdeckung des ersten Tumorsuppressors pRB durch Friend und Kollegen war ein Meilenstein in der Krebsforschung und der Beginn zahlreicher Studien, die zu unserem heutigen Verständnis der Zellzyklusregulation entscheidend beigetragen haben (Friend et al., 1986). Das bis heute gültige Modell der pRB/E2F-Funktion in der Zellzykluskontrolle hat seinen Ursprung in der Erforschung der adenoviralen Infektion (Bagchi et al., 1991; Bandara and La Thangue, 1991; Chellappan et al., 1991; Chittenden et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass pRB von einer Reihe viraler Onkoproteine wie z.B. E1A, E7 und SV 40 large T-Antigen gebunden wird, welche die Transformation von Zellen bewirken (DeCaprio et al., 1988; Dyson, 1998; Nevins, 1994; Whyte et al., 1988). Auch die E2F-Transkriptionsfaktoren wurden erstmals im Zusammenhang mit Untersuchungen des Adenovirus beschrieben (Bagchi et al., 1990; Kovesdi et al., 1986; Kovesdi et al., 1987). Eine darauf folgende Serie an Untersuchungen führte zu dem bis heute gültigen klassischen Modell von pRB und E2F in der Regulation des G1/S-Übergangs, welches in vereinfachter Form in Abb. 1.2. dargestellt ist (Dyson, 1998).

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die Bindung von E2F an pRB durch dessen zellzyklusabhängige Phosphorylierung reguliert (Dyson, 1998; Grana et al., 1998). In ruhenden Zellen (G₀-Phase) und in der frühen G1-Phase liegt pRB in einer hypophosphorylierten aktiven Form vor, welche die Bindung an E2F-Proteine erlaubt und damit die Transaktivierung E2F-regulierter Gene inhibiert (Ludlow et al., 1990; Shirodkar et al., 1992; Weintraub et al., 1992). Die Anwesenheit mitogener Wachstumsfaktoren stimuliert die Expression von Cyclinen des Typs D und E, welche daraufhin Komplexe mit ihren zugehörigen Cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) formen und diese dadurch aktivieren. Während des G1/S-Übergangs katalysieren aktive Komplexe aus Cyclin D/CDK4/6 und Cyclin E/CDK2 die Phosphorylierung von pRB (Lees et al., 1991; Lin et al., 1991; Weinberg, 1995). Dies resultiert in hyperphosphoryliertem pRB und führt zur Dissoziation der E2Fs, wodurch diese ihre Rolle als Aktivatoren in der Transkription von Genen erfüllen, welche für die Progression durch die S-Phase essentiell sind (Dyson, 1998; Flemington et al., 1993; Helin et al., 1993a).

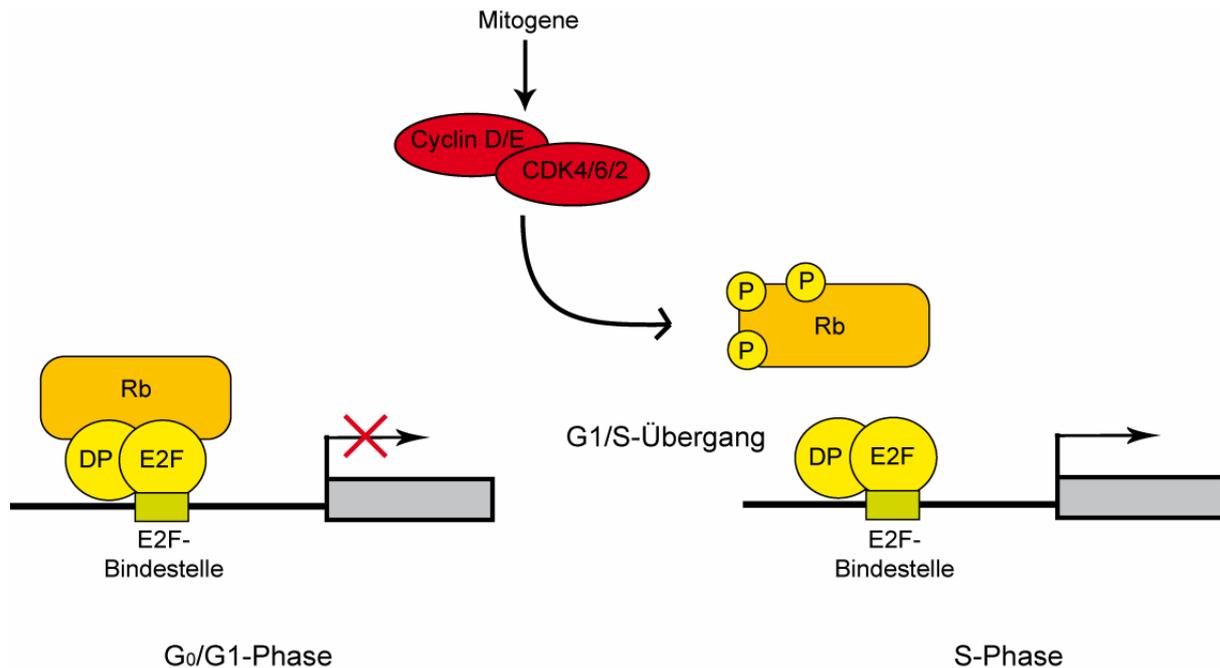


Abb. 1.2.: Die Regulation E2F-regulierter Gene durch pRB. Die Abbildung zeigt das stark vereinfachte klassische Modell der zellzyklusabhängigen Regulation von E2F durch pRB. Während der G₀-Phase bzw. in der G1-Phase des Zellzyklus liegt pRB (orange) in einer hypophosphorylierten aktiven Form vor. Aktives pRB bindet Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktoren (gelb), verhindert dadurch die Transaktivierung E2F-abhängiger Ziel-Promotoren und reprimiert somit die Expression E2F-regulierter Gene. Während des G1/S-Übergangs stimulieren Mitogene die Phosphorylierung von pRB durch Cyclin/CDK Komplexe (rot). Die Hyperphosphorylierung von pRB resultiert in einer Dissoziation der E2Fs von pRB. Freies E2F bindet an die Promotoren von Ziel-Genen und induziert deren Expression.

Die Studien der letzten Jahrzehnte belegen, dass pRB und E2F eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen. Verdeutlicht wird dies durch die Tatsache, dass sowohl pRB als auch Faktoren, die den pRB-Signalweg regulieren in ca. einem Drittel aller humanen Tumore mutiert sind (Sellers and Kaelin, 1997; Weinberg, 1995). Heute weiß man, dass pRB und E2F nicht nur eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellproliferation spielen, sondern auch die Expression von Genen Regulieren welche eine Rolle in der Differenzierung, Entwicklung und Apoptose spielen (Ishida et al., 2001; Muller et al., 2001; Ren et al., 2002). Dass das Netzwerk aus pRB und E2F weitaus komplexer ist und sich nicht nur auf die Regulation des G1/S-Übergangs beschränkt, wurde zudem durch die Entdeckung deutlich, dass pRB und E2F Mitglieder größerer Proteinfamilien sind, die untereinander sowohl strukturell als auch funktionell verwandt sind (Cobrinik, 2005; Grana et al., 1998).

1.2.1. Die Familie der *Pocket Proteine*

Die Proteine p107 und p130 wurden erstmals durch ihre Bindung an virale Onkoproteine identifiziert (Ewen et al., 1991; Hannon et al., 1993; Li et al., 1993; Mayol et al., 1993; Zhu et al., 1993). Zusammen mit pRB werden sie aufgrund gemeinsamer struktureller und funktioneller Merkmale in die Familie der so genannten *Pocket Proteine* eingeordnet. *Pocket Proteine* spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Für alle 3 Mitglieder ist gezeigt, dass sie das Wachstum verschiedener Zelltypen inhibieren können (Mayol et al., 1993). Sowohl die Überexpression von pRB als auch von p107 oder p130 induzieren einen Arrest der Zellen in der G1-Phase (Grana et al., 1998; Mayol et al., 1993; Mulligan and Jacks, 1998). Die Zellzyklus-regulierende Aktivität der *Pocket Proteine* hängt von der Assoziation mit zahlreichen zellulären Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren und anderen transkriptionellen Regulatoren ab. Diese Interaktionen erfolgen in der Regel über die so genannte *Pocket*-Domäne. Diese setzt sich aus zwei hoch konservierten Bereichen, der A-Box und der B-Box zusammen, welche über einen *Spacer* miteinander verbunden sind (Mulligan and Jacks, 1998). Die *Pocket*-Domäne bindet mit hoher Affinität an Proteine, die ein LXCXE-Bindemotiv aufweisen. Dieses Bindemotiv findet man z.B. in einer Reihe von Transkriptionsfaktoren und viralen Onkoproteinen. Aber auch Proteine, die kein LXCXE-Bindemotiv aufweisen, werden über die *Pocket*-Domäne gebunden. So zeichnen sich alle drei *Pocket Proteine* durch ihre Fähigkeit aus, mit Mitgliedern der E2F-Proteinfamilie zu interagieren (Cobrinik, 2005; Grana et al., 1998). Weiterhin vermittelt die *Pocket*-Domäne die Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDACs) und trägt somit zur *Pocket Protein*-abhängigen Repression E2F-regulierter Gene bei (Ferreira et al., 1998; Morrison et al., 2002; Rayman et al., 2002; Takahashi et al., 2000).

Wie zuvor schon für pRB beschrieben, zeigen auch p107 und p130 eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung durch Cyclin/CDK-Komplexe, durch welche die Assoziation mit verschiedenen Interaktionspartnern, wie z.B. den E2Fs und HDACs reguliert wird (Grana et al., 1998). Die Phosphorylierung an mehreren Stellen im C-terminalen Bereich und innerhalb der *Pocket*-Domäne, führt zu intramolekularen Interaktionen und zu einer Konformationsänderung im Bereich der *Pocket*-Domäne (Harbour et al., 1999). Aufgrund dieser Konformationsänderungen ist eine Interaktion mit E2Fs und HDACs nicht mehr möglich.

Neben der zellzyklusabhängigen Phosphorylierung trägt auch die wechselnde Verfügbarkeit der *Pocket Proteine* zur Kontrolle ihrer Funktion bei. Hier unterscheiden sich die einzelnen Familienmitglieder jedoch deutlich voneinander. p130 wird in ruhenden Zellen (G₀) und in G1-Zellen stark exprimiert. Mit der Progression der Zellen von der G1-Phase in die S-Phase nehmen die Level an p130 ab. p107 verhält sich spiegelbildlich zu p130. Während p107 kaum bis gar nicht in ruhenden Zellen exprimiert wird, steigen die Mengen an p107 im Verlauf der späten G1-Phase bis zu Beginn der Mitose dramatisch an. Im Gegensatz zu p130 und p107 ändern sich die Mengen an pRB im Verlauf des Zellzyklus kaum (Grana et al., 1998).

Die Tatsache, dass sich die Expression der einzelnen *Pocket Proteine* im Zellzyklus unterscheidet lässt vermuten, dass sie auch unterschiedliche Funktionen in der Regulation des Zellzyklus haben. Interessant ist, dass p107 und p130 untereinander ähnlicher sind als zu pRB. So zeigen Sequenzvergleiche, dass die *Spacer*-Region und die Bereiche außerhalb der *Pocket*-Domäne zwischen p107 und p130 konserviert sind (Mulligan and Jacks, 1998). Diese Bereiche haben jedoch wenig Ähnlichkeit mit pRB. Die *Spacer*-Region in p107 und p130 weist eine p21-ähnliche Sequenz auf, über welche p107 und p130 in der Lage sind mit Cyclin A/CDK2 und Cyclin E/CDK2 zu interagieren (Adams et al., 1996; Ewen et al., 1991; Faha et al., 1992; Hannon et al., 1993; Lacy and Whyte, 1997; Li et al., 1993; Zhu et al., 1995). Die genaue Funktion dieser Interaktion ist noch unklar, jedoch weiß man, dass die Bindung von p107 an die beiden Cyclin/CDK-Komplexe deren katalytische Fähigkeit inhibiert und einen Zellzyklusarrest der Zellen vermittelt.

Wie zuvor schon erwähnt, hängt die zellzyklusinhibierende Funktion der *Pocket Proteine* von ihrer Fähigkeit ab, mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen zu interagieren und deren Aktivität dadurch zu modulieren. Eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des Zellzyklus durch *Pocket Proteine*, spielt die Interaktion mit Mitgliedern der E2F-Proteinfamilie. Die Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass *Pocket Proteine* einen Arrest der Zellen in der G₀-Phase vermitteln, indem sie die Expression von E2F-regulierten Genen reprimieren. Ein Unterschied zwischen den *Pocket Proteinen* und ein weiterer Hinweis dafür, dass pRB, p107 und p130 unterschiedliche Funktionen in der Zellzyklusregulation besitzen, zeigt sich auch in ihrer Spezifität Mitglieder der E2F-Proteinfamilie zu binden (Cobrinik, 2005; Grana et al., 1998). Während p107 und p130 ausschließlich so genannte „reprimierende“ E2Fs binden, interagiert pRB sowohl mit den „aktivierenden“, als auch mit den „reprimierenden“ E2Fs.

Nicht nur die Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen, sondern auch die Rolle einzelner *Pocket Proteine* in der Tumorgenese unterscheiden die einzelnen Mitglieder voneinander. Wie zuvor bereits erwähnt, ist der Tumorsuppressor pRB häufig in humanen Tumoren mutiert (Sellers and Kaelin, 1997; Weinberg, 1995). Inzwischen belegen mehrere Studien, dass es sich auch bei p107 und p130 um Tumorsuppressoren handelt (Dannenbergh et al., 2004; Scambia et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass p130 in einer Reihe von humanen Tumoren, wie z.B. im Ovarkarzinom, Kleinzelligen Lungenkarzinom und im Adenokarzinom der Lunge mutiert ist (Scambia et al., 2006). Zudem liegt das humane RB2/p130 Gen innerhalb der chromosomalen Region 16q12.2, welche in einigen humanen Tumoren wie z.B. Brust-, Leber- und Prostatakrebs deletiert ist (Howard et al., 1998). Für p107 konnte in der Maus eine Rolle als Tumorsuppressor in der Abwesenheit von pRB nachgewiesen werden. Der zusätzliche Verlust von p107 in RB negativen Mäusen führt hier zur Entwicklung von Retinoblastomen (Robanus-Maandag et al., 1998).

1.2.2. Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren

Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren umfasst 8 Mitglieder. Eine Gemeinsamkeit, die alle E2F-Proteine miteinander teilen, ist das Vorhandensein einer DNA-Bindedomäne, welche Ähnlichkeiten mit einem *winged-helix* Motiv aufweist (Zheng et al., 1999). Über diese DNA-Bindedomäne binden die E2F-Transkriptionsfaktoren an die konservierte Konsensussequenz T(c/g)CCGC(c/g). Mit Ausnahme von E2F6, E2F7 und E2F8 besitzen E2F-Proteine zudem im carboxyterminalen Bereich eine Transaktivierungsdomäne.

E2F-Transkriptionsfaktoren zeichnen sich weiterhin durch die Existenz einer Dimerisierungsdomäne aus. Zwei weitere Proteine, DP1 und DP2 (DP: DRFT1-Polypeptid) gehören funktionell zur E2F-Proteinfamilie und komplexieren über die Dimerisierungsdomäne mit E2Fs. DP1 und DP2 binden ebenfalls an E2F-Konsensussequenzen und werden für die Bindung der E2Fs an die DNA benötigt (Bandara et al., 1993; Helin et al., 1993b; Krek et al., 1993) (Girling et al., 1993).

Ein strukturelles Merkmal von E2F7 und E2F8 ist das Fehlen einer Dimerisierungsdomäne, so dass ihre Funktion unabhängig von der Bindung an DP-Proteine ist (de Bruin et al., 2003; Maiti et al., 2005). Heterodimere Komplexe aus E2Fs und DPs können *in vivo* in allen denkbaren Kombinationen auftreten, wobei die spezifische Funktion einzelner E2F/DP-Komplexe bislang unklar ist (Bandara et al., 1993; Helin et al., 1993b; Krek et al., 1993) (Wu et al., 1995). Die Vielfalt an E2F/DP-Komplexen wird durch alternative Spleißvarianten von DP2 und E2F3 (E2F3a und b) zusätzlich erweitert (Adams et al., 2000; de la Luna et al., 1996).

Hinsichtlich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften werden die E2F-Proteine in 3 Gruppen unterschieden. E2F1, E2F2 und E2F3a gehören zur Gruppe der aktivierenden E2Fs und werden in allen sich teilenden Zellen exprimiert. Dabei tragen sie entscheidend zur positiven Regulation des Zellzyklus bei (DeGregori et al., 1997). Ihre transkriptionelle Aktivität wird durch die Assoziation mit pRB reguliert (Dyson, 1998; Muller and Helin, 2000). Wie eingangs schon erwähnt, wird in der G1-Phase die transaktivierende Funktion von E2F1 bis E2F3 durch die Bindung an hypophosphoryliertes pRB inhibiert. In der späten G1-Phase katalysieren Cyclin D/CDK4/6 und Cyclin E/CDK2 die Phosphorylierung von pRB und führen zur Dissoziation der E2Fs. Freie E2Fs agieren als Transaktivatoren und binden an die Promotoren von Genen, welche für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase und für die weitere Progression durch die S-Phase essentiell sind (Takahashi et al., 2000; Trimarchi and Lees, 2002; Wells et al., 2000). Dazu gehören u.a. Zellzyklusregulatoren wie z.B. Cyclin E, Cyclin A, Cdc2, Cdc6 und B-MYB, aber auch Enzyme der DNA-Synthese wie die Dihydrofolatreduktase (DHFR) und die DNA Polymerase α (Dyson, 1998; Grana et al., 1998).

E2F4 und E2F5 sind als *Pocket Protein*-abhängige Repressoren des Zellzyklus beschrieben und binden bevorzugt an p107 und p130. Die Repression E2F-regulierter Gene durch E2F4 und E2F5 erfolgt über die von den *Pocket Proteinen* rekrutierten chromatinmodifizierenden Enzyme (Rayman et al., 2002). Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) *in vivo* haben gezeigt, dass E2F4, p107 und p130 während der G₀/G₁- Phase des Zellzyklus an die Promotoren E2F-regulierter Gene binden und die Expression dieser Genen dadurch aktiv inhibieren (Bartek et al., 1996; Mann and Jones, 1996; Takahashi et al., 2000; Wells et al., 2000). Beim Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase dissoziieren E2F4, p107 und p130 von den Promotoren und werden durch die aktivierenden E2Fs ersetzt (Abb. 1.3.) (Takahashi et al., 2000).

E2F6, E2F7 und E2F8 unterscheiden sich sowohl strukturell als auch funktionell am meisten von den übrigen E2F-Transkriptionsfaktoren. Diese drei fungieren als *Pocket Protein*-unabhängige Repressoren, durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen und Korepressoren an die Zielpromotoren (de Bruin et al., 2003; Maiti et al., 2005; Ogawa et al., 2002).

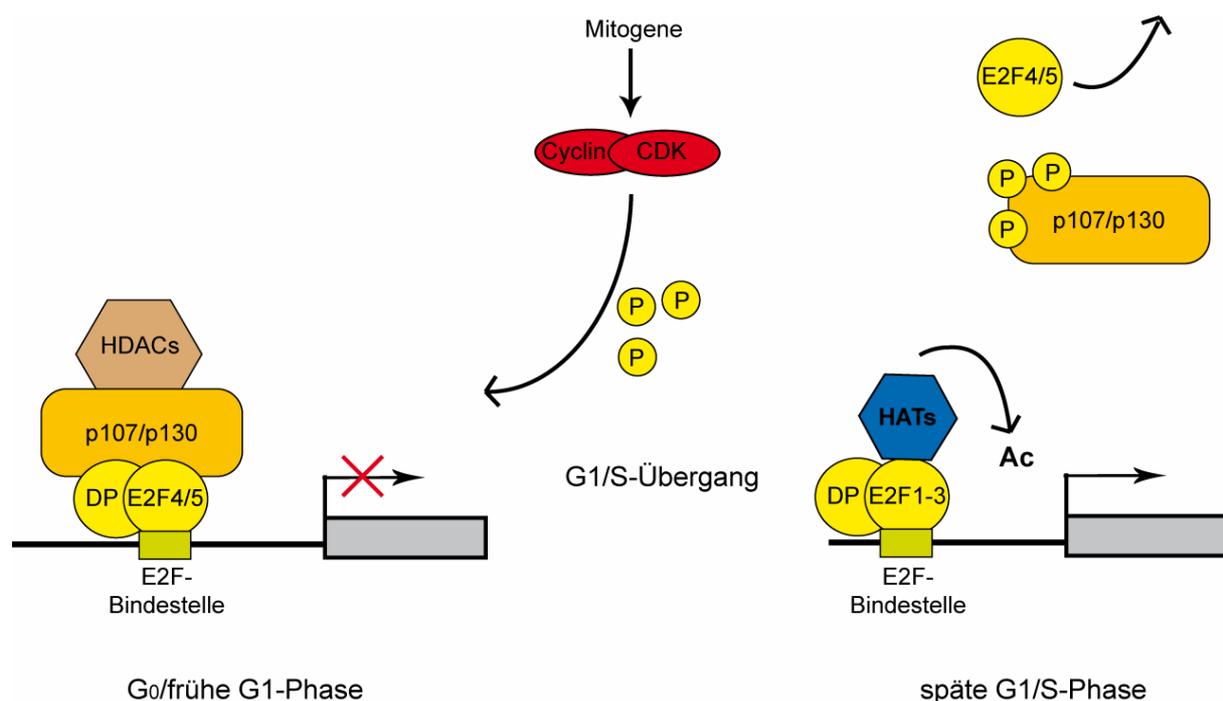


Abb. 1.3.: Die Rolle von *Pocket Proteinen* und E2Fs in der Regulation G1/S-spezifischer Gene. Klassische E2F Zielgene wie z.B. CCNE1 und CDC6 werden während der G₀-Phase und in der frühen G₁-Phase durch Repressor-Komplexe aus E2F4/5 (gelb) und p107/p130 (orange) reprimiert. *Pocket Proteine* rekrutieren Korepressoren wie z.B. HDACs (hellbraun) und vermitteln dadurch eine aktive Repression der Zielgene. Die Phosphorylierung der *Pocket Proteine* in der späten G₁-Phase durch Cyclin D CDK4/6 und Cyclin E/CDK2 (rot) führt zur Dissoziation des Repressor-Komplexes. Die Phosphorylierung führt zudem zum Verlust der Interaktion mit den reprimierenden E2Fs (E2F4 und 5), welche daraufhin aus dem Kern transportiert werden. Die freiwerdenden E2F-Bindestellen werden durch die aktivierenden E2Fs (E2F1-3) ersetzt. Diese vermitteln durch die Rekrutierung von Histonacetylasen (HATs) (blau) eine Aktivierung der Gene. Ac: Acetylierung.

1.2.3. Mechanismus der pRB/E2F vermittelten Genregulation

Die transaktivierenden Eigenschaften von E2F1 bis E2F3 beruhen auf der Interaktion mit verschiedenen Histonacetylasen (HATs) über die Transaktivierungsdomäne der E2F-Proteine (Frolov and Dyson, 2004). E2F1 bindet z.B. p300/CBP und p/CAF (Trouche et al., 1996). Aber auch eine Assoziation von E2F1 mit Komponenten des Tip60-Komplexes konnte gezeigt werden (Taubert et al., 2004). Die Acetylierung von Histonen bewirkt eine Auflockerung der Chromatinstruktur und erleichtert somit weiteren Transkriptionsfaktoren und Komponenten der Transkriptionsmaschinerie den Zugang an die Promotoren von Genen.

Bei der *Pocket Protein*-abhängigen Repression der E2F-vermittelten Transaktivierung unterscheidet man zwei Mechanismen. Erstens binden *Pocket Proteine* innerhalb der Transaktivierungsdomäne der E2F-Proteine und blockieren dadurch die Interaktion von E2Fs mit Histonacetylasen (Flemington et al., 1993; Frolov and Dyson, 2004; Helin et al., 1993a). Zum Zweiten kann die Repression durch *Pocket Proteine* auf aktivem Weg, durch die Rekrutierung von chromatinmodifizierenden Enzymen erfolgen (Frolov and Dyson, 2004). Am besten untersucht ist hier die Interaktion von *Pocket Proteinen* mit Histondeacetylasen (Brehm et al., 1998; Cobrinik, 2005; Ferreira et al., 1998; Grana et al., 1998; Luo et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998). Für pRB konnte außerdem gezeigt werden, dass es mit einer Reihe weiterer chromatinmodifizierender Enzyme interagiert. So bindet es z.B. an BRG1 und BRM, zwei Untereinheiten des SWI/SNF-Chromatin-Remodelling-Komplexes (Dunaief et al., 1994; Singh et al., 1995). Auch eine Assoziation von pRB mit Histonmethyltransferasen wie Suv39H1 in der Repression des Cyclin E Promotors konnte gezeigt werden (Nielsen et al., 2001; Vandel et al., 2001). Letztendlich bewirken die Assoziationen mit den verschiedenen chromatinmodifizierenden Enzymen eine Inhibition der Transkription, indem sie eine Kondensation des Chromatins im Bereich der Promotoren erzielen und somit den Zugang von Transkriptionsfaktoren an diese Promotoren blockieren (Kingston and Narlikar, 1999; Kornberg and Lorch, 1999; Wolffe and Hayes, 1999).

1.2.4. Die Kontrolle des G2/M-Übergangs durch E2F

Wie neuere Studien zeigen, spielen die E2F-Transkriptionsfaktoren nicht nur eine Rolle in der Regulation des G1/S-Übergangs. Mehreren Arbeitsgruppen gelang unabhängig voneinander die Identifizierung von E2F-regulierten Genen, mit bereits bekannter Funktion in der Mitose. Dazu gehören z.B. Gene wie cyclin B1, cdc2, Bub1 und cdc20 (Muller et al., 2001) (Ishida et al., 2001). Ren und Kollegen wiesen zusätzlich eine Assoziation von E2F1 und E2F4 an die Promotoren von Genen nach, die an der Chromosomenkondensation (smc2 und smc4) und Chromosomensegregation (Securin) beteiligt sind, bzw. die für Proteine des Spindel-Checkpoints codieren (Ren et al., 2002). Die Frage nach dem zugrunde liegenden Mechanismus blieb jedoch offen. Eine Hypothese ist, dass die G2/M-Gene unter der

Kontrolle von Transkriptionsfaktoren stehen, deren Expression wiederum während der G1/S-Phase durch E2F-Proteine reguliert wird.

Kürzlich konnte durch ChIP-Analysen eine direkte zellzyklusabhängige Regulation der Promotoren von cyclin A2, cyclin B1 und cdc2 durch E2Fs nachgewiesen werden (Zhu et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass in ruhenden Zellen E2F4 an die Promotoren dieser Gene bindet und deren Repression bewirkt. Bei dem Wiedereintritt in den Zellzyklus geht diese E2F4-Bindung verloren und aktivierende E2Fs assoziieren an die Promotoren. Für die Aktivierung von cyclin A2, cyclin B1 und cdc2 durch die aktivierenden E2Fs ist zusätzlich die Bindung des Transkriptionsfaktors B-MYB nötig. Die Bindung von B-MYB an die gezeigten Promotoren erfolgt in der späten S-Phase. B-MYB selbst ist ein E2F-Zielgen, welches in der G1/S-Phase exprimiert wird. Zur Erlangung seiner vollen Aktivität ist wiederum die Phosphorylierung durch Cyclin A2/CDC2 notwendig (positive Rückkopplung) (Sala, 2005). B-MYB stellt somit ein mögliches Bindeglied dar, welches die E2F-abhängige Regulation von G1/S- und G2/M-Genen miteinander verbindet.

1.3. Die Rolle von pRB und E2F in der Differenzierung

Die Rolle von *Pocket Proteinen* und E2Fs *in vivo* wurde in einer Reihe genetischer Studien an Mäusen untersucht, welche durch gezielte homozygote Mutationen defizient für die einzelnen Mitglieder der *Pocket Protein*- und E2F-Familie sind. Diese Arbeiten zeigen, dass die *Pocket Proteine* und die Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktoren nicht nur eine Funktion in der Regulation der Zellzyklusprogression haben, sondern auch eine Rolle in der Entwicklung und Differenzierung spielen.

RB defiziente Mäuse z.B. sterben früh in der Embryonalentwicklung aufgrund zahlreicher gewebespezifischer Defekte in der Entwicklung und Differenzierung (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992). Diese Mäuse weisen Defekte in der Hämatopoese und Myogenese, sowie in der Entwicklung des Zentralen Nervensystems, der Leber und der Linse auf (Du and Pogoriler, 2006; Lipinski and Jacks, 1999). Interessant ist, dass während der Entwicklung von RB^{-/-} Mäusen durchaus die frühen Differenzierungsmarker exprimiert werden, nicht jedoch die späten (Lipinski and Jacks, 1999). So zeigen RB defiziente Mäuse z.B. eine stark verminderte Expression der späten neuronalen Differenzierungsmarker Trk A und B (Lee et al., 1994). Das bedeutet, dass die gewebespezifische Differenzierung in RB^{-/-} Mäusen zwar eingeleitet, aber nicht vollendet wird. Zusätzlich weisen die Zellen des Zentralen und Peripheren Nervensystems dieser Tiere eine erhöhte Apoptose- und Proliferationsrate auf (Lipinski and Jacks, 1999). Die Untersuchungen der Defekte RB defizienter Mäuse ließen daher vermuten, dass pRB zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt. Die Funktionen von pRB reichen dabei von der Induktion und der Aufrechterhaltung eines post-mitotischen Zustandes (Voraussetzung

für die terminale Differenzierung von Zellen), über die Prävention der Apoptose bis hin zur Expression gewebespezifischer Gene (Du and Pogoriler, 2006; Grana et al., 1998; Lipinski and Jacks, 1999). Dabei scheinen diese Funktionen zum Teil von der Interaktion mit Mitgliedern der E2F-Proteinfamilie abzuhängen. So führt z.B. der zusätzliche Verlust von E2F1, E2F2 oder E2F3 zu einer Verminderung der erhöhten Apoptose- und Proliferationsrate in RB defizienten Mäuse (Du and Pogoriler, 2006; Saavedra et al., 2002; Tsai et al., 1998; Ziebold et al., 2001). Zudem zeigen E2F4 defiziente Mäuse ähnliche Defekte in der Erythrozytendifferenzierung wie RB^{-/-} Mäuse, was eine Kooperation dieser beiden Proteine in der Hämatopoese vermuten lässt (Humbert et al., 2000; Rempel et al., 2000). Jedoch lassen sich nicht alle beobachteten Defekte durch eine Deregulation der E2F-Proteine erklären. Weitere Studien lassen außerdem den Schluss zu, dass es sich bei manchen Defekten in RB defiziente Mäusen um sekundäre Effekte, als Folge einer Fehlentwicklung der Plazenta handelt (Du and Pogoriler, 2006).

Die Funktionen von pRB in der Differenzierung sind komplex und bisher noch nicht gut verstanden. Inzwischen weiß man, dass im Zuge der Differenzierung nicht nur die Repression E2F regulierter Gene durch pRB wichtig ist. Die Fähigkeit von pRB, die Differenzierung zu fördern hängt oftmals auch von seiner Fähigkeit ab, unabhängig von der Bindung an E2F die Transkription gewebespezifischer Gene zu aktivieren. So interagiert pRB mit einer Reihe gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. Myf5, MyoD, Cbfa1 und Mitgliedern der C/EBP-Familie, welche Schlüsselrollen in der Differenzierung von Myoblasten, Osteoblasten und Adipozyten spielen (Chen et al., 1996; Du and Pogoriler, 2006; Gu et al., 1993; Lipinski and Jacks, 1999; Thomas et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass pRB als Koaktivator dieser Transkriptionsfaktoren agiert und dadurch die Expression später gewebespezifischer Marker induziert.

Neben der Interaktion mit gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, gibt es noch weitere Hinweise, dass die Rolle von pRB in der Differenzierung nicht immer von der Interaktion mit E2Fs abhängt. Untersuchungen verschiedener pRB-Mutanten ergaben, dass diese trotz ihres Unvermögens Mitglieder der E2F-Familie zu binden in der Lage sind die Expression gewebespezifischer Gene zu induzieren (Sellers et al., 1998).

Die *in vivo* Studien an Mäusen ergänzen das ursprüngliche Modell, dass pRB zusammen mit E2F die G1/S-Progression reguliert und zeigen, dass *Pocket Proteine* und E2Fs weitere Funktionen haben, die sich nicht nur auf die Regulation der Zellzyklusprogression beschränken. Zudem ermöglichten neue innovative Techniken wie z.B. Chromatin-Immunpräzipitationen und Microarray-Analysen, oder die Kombination beider Techniken (ChIP on Chip) die Identifizierung weiterer E2F und *Pocket Protein* regulierter Gene (Ishida et al., 2001; Muller et al., 2001; Polager et al., 2002; Ren et al., 2002; Weinmann et al., 2001; Weinmann et al., 2002; Young et al., 2003). Unter den identifizierten Genen befanden sich neben den erwarteten Genen, die für die Zellzyklusprogression essentiell sind auch solche, die eine Rolle in der DNA-Reparatur, der Apoptose, der Differenzierung und der Entwicklung

spielen. Die Tatsache, dass E2Fs und *Pocket Proteine* an die Promotoren von Genen binden, deren Expression in der Differenzierung und Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt, unterstützt die Beobachtungen in *Pocket Protein*- und E2F-defizienten Mäusen.

1.4. pRB/E2F-Komplexe in verschiedenen Modellorganismen

Die Bedeutung von pRB und E2F in der Regulation zellulärer Ereignisse, zeigt sich vor allem darin, dass pRB/E2F-Komplexe in der Evolution vom Wurm, über die Fliege bis hin zum Menschen hoch konserviert sind. Dies erleichtert die Übertragung der Forschungserkenntnisse von einem Modellorganismus auf einen anderen. Zahlreiche Studien in primitiveren Organismen wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* haben entscheidend zu unserem heutigen Wissenstand über Zellzyklusprogression, Differenzierungsprozesse und Entwicklungsvorgänge beigetragen. Die Signalwege in höheren Organismen wie z.B. der Maus, sind durch das Vorkommen von mehreren Paralogen häufig sehr komplex, was die Interpretation der Versuchsergebnisse erschweren kann. Auf Grund der geringeren Redundanz innerhalb verschiedener Signalwege, eignen sich *C. elegans* und *D. melanogaster* daher besonders gut für molekularbiologische und genetische Untersuchungen.

Erste Hinweise auf eine Rolle von pRB und E2F in der Entwicklung und Differenzierung lieferten genetische Studien in *C. elegans*. Neuere biochemische Untersuchungen in *D. melanogaster* ergänzen diese Studien und erweitern unser Wissen über die verschiedenen Funktionen von pRB und E2F. Die beiden folgenden Abschnitte fassen einige der wichtigsten Aspekte dieser Studien zusammen.

1.4.1. Der DRM-Komplex in *Caenorhabditis elegans*

Der pRB-Signalweg spielt in *C. elegans* eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Vulva. Die Vulva differenziert sich aus drei ektodermalen Vorläuferzellen (VPCs: vulval precursor cells), die entlang der ventralen Mittellinie der Wurmlarve angeordnet sind (Sulston and Horvitz, 1977). Die Differenzierung der VPCs in Vulvazellen wird durch einen konservierten RAS/MAPK-Signalweg gesteuert, welcher durch die Bindung des von der so genannten Ankerzelle abgesonderten EGF-ähnlichen Liganden LIN-3 an die Rezeptor-Tyrosin-Kinase LET-23 aktiviert wird (Greenwald, 1997). Der RAS/MAPK-Signalweg führt schließlich zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren LIN-1 und LIN-31 und damit zur Aktivierung differenzierungsspezifischer Gene (Tan et al., 1998). Würmer, die eine oder mehrere Mutationen aufweisen, die zur Inaktivierung des RAS/MAPK-Signalweges führen, entwickeln keine Vulva. Dieser Phänotyp wird als „*vulvaless*“ bezeichnet. Im umgekehrten Fall, dass Mutationen die konstitutive Aktivierung des RAS/MAPK-Signalweges bewirken, entwickeln sich in der heranwachsenden Wurmlarve mehrere Vulven. Der ausgewachsene Wurm zeigt dann einen so genannten „*multivulva*“-Phänotyp.

Drei weitere ektodermale Zellen, welche direkt an die VPCs angrenzen, besitzen ebenfalls die Voraussetzungen in Vulvazellen zu differenzieren. In der Regel entwickeln sich diese Zellen jedoch in hypodermale Zellen, da sie am weitesten entfernt von der Ankerzelle angeordnet sind. Diese Zellen sind somit geringeren Mengen des LIN-3 Signals ausgesetzt und zeigen daher lediglich eine basale Aktivität des RAS/MAPK-Signalweges. Dieser wird im Normalfall durch eine bestimmte Klasse von Genen, den so genannten SynMuv-Genen (SynMuv: *synthetic multivulva*) inhibiert. Erst der Anstieg der RAS/MAPK-Signalaktivität über einen bestimmten Schwellenwert kann diesen inhibierenden Effekt überwinden. *Loss-of-function*-Mutationen der SynMuv-Gene führen daher ebenfalls wie die konstitutive Aktivierung des Ras/MAPK-Signalweges zur Entwicklung mehrerer Vulven (*SynMuv*-Phänotyp) (Fay and Han, 2000).

Die SynMuv-Gene werden in die 3 Klassen A, B und C unterschieden, welche für Komponenten redundant funktionierender Signalwege in der Vulvadifferenzierung codieren (Ceol and Horvitz, 2004; Ferguson and Horvitz, 1989). Um einen *SynMuv*-Phänotyp zu erhalten, müssen Mutationen in mindestens zwei der drei Klassen auftreten, da ansonsten die beiden intakten Signalwege für den Verlust kompensieren.

Da die bisherigen Erkenntnisse hauptsächlich aus genetischen Studien stammen, ist der genaue Mechanismus, wie der SynMuv-Signalweg die Vulvadifferenzierung inhibiert noch unklar. Bekannt ist, dass einige der SynMuv B-Gene für Proteine codieren, die homolog zu Komponenten des pRB-Signalweges im Menschen sind. Dies sind u.a. Lin-35/pRB; Efl-1/E2F und Dpl-1/DP (Ceol and Horvitz, 2001; Ceol and Horvitz, 2004; Lu and Horvitz, 1998). Harrison und Kollegen gelang es kürzlich einen Komplex aus *C. elegans* aufzureinigen, welcher neben LIN-35/pRB, DPL-1/DP1 und LIN-53/RbAp48 vier weitere SynMuv B-Proteine enthält (Harrison et al., 2006). Dies sind LIN-9, LIN-37, LIN-54 und LIN-52. Da DPL-1 Bestandteil dieses Komplexes ist wird vermutet, dass auch EFL-1 mit diesem so genannten DRM-Komplexes assoziiert ist. Für weitere SynMuv B-Proteine konnte gezeigt werden, dass sie vermutlich einen Komplex formen, welcher dem humanen NuRD (Nucleosome Remodelling and Deacetylase)-Komplex ähnlich ist. Dazu gehören LIN-53/RbAp48, HDA-1/HDAC1 und LET-418/MI-2 (Ceol and Horvitz, 2001; Harrison et al., 2006; Lu and Horvitz, 1998; Solari and Ahringer, 2000). Für den humanen NuRD-Komplex ist bekannt, dass er durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen an die Promotoren von Genen, eine lokale Deacetylierung von Histonen bewirkt. Die resultiert in einer Kondensation des Chromatins in diesem Bereich und erschwert damit die Transkription (Kingston and Narlikar, 1999; Kornberg and Lorch, 1999; Wolffe and Hayes, 1999). Eine Vermutung war, dass der DRM-Komplex und der NuRD-ähnliche Komplex in *C. elegans* als Antagonisten des RAS/MAPK-Signalweges in den VPCs die Transkription RAS-regulierter Gene reprimieren (Ceol and Horvitz, 2001; Harrison et al., 2006; Lu and Horvitz, 1998; Solari and Ahringer, 2000). Neuere Studien hingegen befürworten die Hypothese, dass der SynMuv-Signalweg in dem die VPCs umgebenden hypodermalen Syncytium agiert und dort die Expression von LIN-3/EGF inhibiert (Abb. 1.4.). Nach diesem Modell, resultiert die

Inaktivierung des SynMuv-Signalweges in einer zusätzlichen Expression von LIN-3/EGF in der Hypodermis. Dadurch wird der RAS/MAPK-Signalweg in weiteren VPCs aktiviert und es kommt zur Entwicklung mehrerer Vulven (Cui et al., 2006; Myers and Greenwald, 2005).

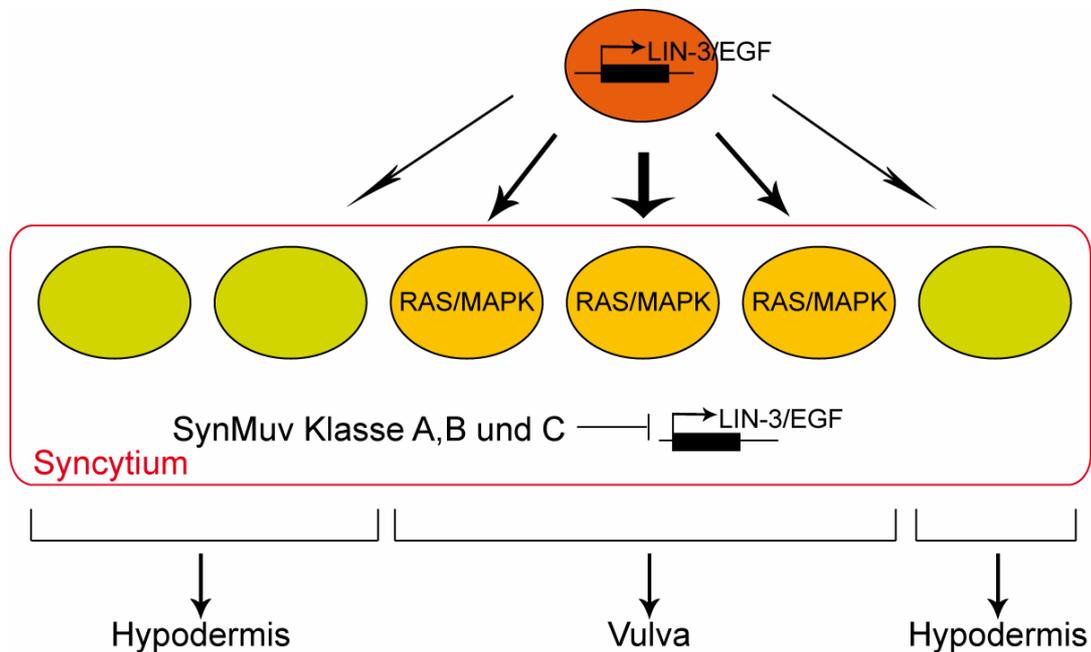


Abb. 1.4.: Die Vulvaentwicklung in *C. elegans*. Gezeigt ist das aktuelle Modell der Differenzierung der 6 Vorläuferzellen in Vulvazellen und hypodermale Zellen. Details sind dem Text zu entnehmen. Das durch die Ankerzelle abgesonderte LIN-3/EGF-Signal führt zur Aktivierung des RAS/MAPK-Signalweges in den Vorläuferzellen. Nach diesem Modell reprimieren die SynMuv-Gene die Expression des LIN-3/EGF-Signals im umgebenden Syncytium, wodurch eine Aktivierung des RAS/MAPK-Signalweges in zusätzlichen VPCs verhindert wird. **Rot:** Ankerzelle; **orange:** VPCs die in Wildtyptieren die zukünftige Vulva bilden; **grün:** VPCs die zu hypodermalen Zellen differenzieren; **rotes Rechteck:** Syncytium. Die Stärke der von der Ankerzelle ausgehenden Pfeile spiegelt die Intensität des LIN-3/EGF-Signals wieder.

Für einige der SynMuv B-Genprodukte ist neben ihrer Rolle in der Vulvadifferenzierung auch eine Funktion in der Zellzykluskontrolle beschrieben. Bekannt ist, dass LIN-9 zusammen mit LIN-35, EFL-1 und LIN-36 die Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus negativ reguliert (Boxem and van den Heuvel, 2002). Zudem ist LIN-9 an der Entwicklung der männlichen Fortpflanzungsorgane und der Entwicklung der Gonaden entscheidend beteiligt (Beitel et al., 2000). Daher sind Würmer mit mutiertem LIN-9 steril (Ferguson and Horvitz, 1989). Die molekulare Funktion von LIN-9 ist jedoch bislang unbekannt.

1.4.2. Der dREAM/Myb-MuvB-Komplex in *Drosophila melanogaster*

Wie zuvor schon erwähnt, ist das Vorkommen von pRB/E2F-Komplexen in der Evolution hoch konserviert. So konnten auch aus *Drosophila*-Embryonen unabhängig voneinander zwei dRb/dE2F-Komplexe aufgereinigt werden: der dREAM (Drosophila RBF, E2F and Myb-interacting Proteins)-Komplex und der Myb-MuvB-Komplex (Korenjak et al., 2004; Lewis et al., 2004). Beide Komplexe setzen sich aus 7 Untereinheiten zusammen, welche homolog zu den SynMuv B-Proteinen in *C. elegans* sind. Dies sind im Einzelnen dE2F2, dDP, RBF1/2, Mip120, Mip130/TWIT, Mip40 und p55/CAF1. Beide Komplexe enthalten zudem dMYB, welches kein bekanntes Homolog in *C. elegans* besitzt. Bei der größten Untereinheit des Komplexes, Mip130/TWIT, handelt es sich um das *Drosophila*-Homolog von LIN-9. Mit dem Myb-MuvB-Komplex konnten zusätzlich 3 weitere SynMuv B-Homologe, LIN-52, RPD3 und L(3)MBT aufgereinigt werden (Lewis et al., 2004). Die Unterschiede in der Zusammensetzung der beiden Komplexe könnten auf die unterschiedlichen Aufreinigungsstrategien zurückzuführen sein. Denkbar wäre auch die Existenz eines Kernkomplexes, welcher in Abhängigkeit vom Zellkontext mit verschiedenen Subkomplexen assoziiert.

In vivo-Analysen haben gezeigt, dass der dREAM/Myb-MuvB-Komplex für die stabile Repression E2F regulierter geschlechts- und differenzierungsspezifischer Gene verantwortlich ist (Korenjak et al., 2004; Lewis et al., 2004). Dies korreliert mit der Assoziation dieses Komplexes an transkriptionell inaktive Regionen polytärer Chromosomen. Die RNAi-vermittelte Depletion einzelner Untereinheiten hat gezeigt, dass alle Komponenten des Komplexes mit Ausnahme von dMYB für die stabile Repression von E2F-Zielgenen der D- und E-Gruppe benötigt werden (Korenjak and Brehm, 2005; Korenjak et al., 2004; Lewis et al., 2004). Diese Gene zeigen in der Fliege eine differenzierungs- und geschlechtsabhängige Expression und spielen zum Teil eine Rolle während der Oogenese und Spermatogenese (Dimova et al., 2003).

Beall und Kollegen beschrieben bereits zuvor einen dMYB-Komplex, welcher die Endoreduplikation chorionspezifischer Gene in Follikelzellen kontrolliert (Beall et al., 2002). Die Arbeiten dieser Gruppe zeigten, dass die Replikation chorionspezifischer Gene durch einen Komplex aktiviert wird, welcher dMYB, Mip130/TWIT, Mip40, Mip120 und CAF1/p55 enthält. Die RNAi vermittelte Depletion einzelner Komplex-Bestandteile lässt erkennen, dass die Stabilität verschiedener Untereinheiten und damit die Stabilität des gesamten Komplexes, von der Anwesenheit der einzelnen Untereinheiten abhängig ist (Beall et al., 2004; Beall et al., 2007). Dabei ist dMYB am sensitivsten gegenüber dem Verlust anderer Komplex-Mitglieder. So führt die Depletion von Mip120, Mip130/TWIT oder p55/CAF1 zu einer dramatischen Destabilisierung des dMYB-Proteins.

dMYB wird in allen sich teilenden Zellen der Fliege exprimiert und hat eine bedeutende Rolle in der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge. So fördert dMYB z.B. die DNA-Replikation und reguliert dadurch den G1/S-Übergang, inhibiert jedoch die Endoreduplikation während der Entwicklung (Fitzpatrick et al., 2002). Dass die Expression von dMYB essentiell ist, zeigt sich darin, dass homozygote Mutationen in dMYB für die Fliege letal sind (Katzen and Bishop, 1996). Im Zusammenhang mit der Charakterisierung des dMYB-Komplexes, gelang es Beall und Kollegen, eine genetische Interaktion zwischen dMYB und der größten Untereinheit des dMYB-Komplexes Mip130/TWIT nachzuweisen, welche die Letalität dMYB-mutierter Fliegen erklären könnte (Beall et al., 2004). Im Gegensatz zu dMYB-Mutanten, sind Mip130/TWIT-Mutanten lebensfähig und zeigen eine unregulierte Endoreplikation der DNA in Follikelzellen, wobei die chorionspezifischen Gene nicht amplifiziert werden. Dies führt zur Sterilität weiblicher Mip130/TWIT Mutanten. Überraschend war, dass dMYB-Mip130/TWIT Doppelmutanten ebenfalls lebensfähig sind. Dies lässt vermuten, dass die Aktivität von Mip130/TWIT für die beobachtete Letalität der dMYB-Mutanten verantwortlich ist. Das von Beall und Kollegen vorgeschlagene Modell besagt, dass Mip130/TWIT als Untereinheit des dMYB-Komplexes, die Replikation inhibiert. Dabei trägt dMYB nicht zur Inhibition der Replikation bei, sondern wird benötigt, um den Repressor-Komplex in einen aktivierenden Komplex umzuwandeln, welcher die Amplifikation der chorionspezifischen Gene induziert (Beall et al., 2004).

Lewis und Kollegen konnten später zeigen, dass der dMYB-Komplex eine Untereinheit des Myb-MuvB-Komplexes ist (Lewis et al., 2004). Daher wird vermutet, dass der Myb-MuvB-Komplex sowohl für die Repression differenzierungsspezifischer Gene, als auch für die Kontrolle der Endoreduplikation der chorionspezifischen Gene verantwortlich ist.

Die Bindung des Komplexes an die DNA erfolgt wahrscheinlich über Mip120, dE2F2 und dMYB. Alle drei Proteine besitzen DNA-Bindedomänen und für Mip120 und dMYB konnte bereits gezeigt werden, dass sie an regulatorische Elemente der Replikation wie z.B. den Oriß-Locus und den ACE3-Locus binden (Beall et al., 2002).

Über die biochemische Funktion des dREAM/Myb-MuvB-Komplexes ist bisher wenig bekannt. Für dE2F2, RBF, Mip120 und Mip130/TWIT konnte eine Lokalisation an chromosomale Regionen festgestellt werden, die nicht transkribiert werden, was ihre Rolle als Untereinheiten eines Repressor-Komplexes unterstreicht. Mit dem dREAM-Komplex wurden jedoch keine chromatinmodifizierenden Enzyme aufgereinigt. Man weiß aber, dass der Komplex *in vitro* an deacetylierte Histon H4-Peptide bindet. Transkriptionell inaktives Chromatin zeichnet sich durch einen geringen Grad an Acetylierung aus. Daher wird für den dREAM-Komplex eine passive Rolle in der Repression von Genen vorgeschlagen, indem er die Acetylierung von Histonen verhindert und somit zur Aufrechterhaltung der Repression beiträgt (Korenjak et al., 2004). Der Myb-MuvB-Komplex hingegen assoziiert in nicht stöchiometrischen Mengen mit der Histondeacetylase RPD3, welche homolog zu HDA-1 in

C. elegans ist. Dies lässt den Schluss zu, dass dieser Komplex durch die Rekrutierung von RPD3 aktiv die Transkription inhibiert (Lewis et al., 2004).

Neben Mip130/TWIT existiert in *D. melanogaster* ein weiteres Protein, *Always early* (ALY), welches Homolog zu LIN-9 in *C. elegans* und im Menschen ist (Korenjak et al., 2004; White-Cooper et al., 2000). ALY ist ein testisspezifisches, chromatinassoziiertes Protein, welches für die Differenzierung der Spermatozyten wichtig ist und eine Rolle in der Zellzyklusprogression während der männlichen Gametogenese spielt. Dabei wird ALY für die Aktivierung zellzyklus- und differenzierungsspezifischer Gene benötigt und reguliert die Chromatinstruktur in den heranreifenden Spermatozyten (White-Cooper et al., 2000; White-Cooper et al., 1998). Der Verlust von ALY führt auf Grund eines meiotischen Arrests der heranreifenden Spermatozyten zur Sterilität der Tiere.

Drei weitere Proteine *Cookie monster* (Comr), *Matotopetli* (Topi) und *Tombola* (Tomb) sind ebenso wie ALY die Produkte so genannter meiotischer Arrest Gene, wobei Tomb starke Ähnlichkeit mit Mip120 hat. Neueste Untersuchungen zeigen, dass ALY, Comr, Topi und Tomb zusammen mit den Myb-MuvB-Untereinheiten Mip40 und CAF1/p55, einen testisspezifischen Komplex, tMAC formen. Die Abkürzung tMAC steht für „testis-specific Meiotic Arrest Complex“, da der Verlust von Mip40 ebenso wie der Verlust von Aly, Comr und Topi zu einem Arrest primärer Spermatozyten in der G2/M-Phase der Meiose führt. In Mip40 Mutanten ist zudem die Transkription von Genen reprimiert, deren Expression für die Differenzierung der Spermatozyten wichtig ist. Daher wird postuliert, dass es sich bei tMAC um einen testisspezifischen Komplex handelt, welcher paralog zum Myb-MuvB-Komplex ist.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das humane LIN-9 wurde in unserem Labor erstmals als pRB-interagierendes Protein beschrieben. Die dieser Arbeit vorhergehenden Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich bei LIN-9 um einen neuen Tumorsuppressor im pRB-Signalweg handelt. Die Struktur des LIN-9 Proteins gibt leider wenig Aufschluss über mögliche biochemische und molekularbiologische Funktionen, da LIN-9 weder bekannte DNA-Bindemotive oder Protein-Interaktionsdomänen besitzt, noch Regionen aufweist, die auf eine enzymatische Aktivität hindeuten könnten. Interessant ist, dass Homologe von LIN-9 in *D. melanogaster* und in *C. elegans* Bestandteile, in der Evolution hoch konservierter pRB/E2F-Komplexe sind, welche die Expression von Genen regulieren. Dies lässt den Schluss zu, dass auch im humanen System LIN-9 einen bedeuteten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Genen haben könnte.

Primäres Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung LIN-9 regulierter Gene durch cDNA-Microarray Analysen. Da die Forschung der letzten Jahre gezeigt hat, dass die Überexpression von Proteinen oftmals zu verfälschten Ergebnissen führen kann, sollte zunächst ein RNAi-basierendes System etabliert werden, um LIN-9 in humanen Zellen effizient zu depletieren. Im weiteren Verlauf sollte der Einfluss von LIN-9 auf die in den cDNA-Microarray Analysen identifizierten Zielgene in alternativen experimentellen Versuchsansätzen verifiziert und näher beschrieben werden.

2 MATERIAL

2.1. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien mindestens in der Qualitätsstufe „zur Analyse“ von den Firmen AppliChem, Merck, Riedel-de-Haën, Carl Roth und Sigma-Aldrich bezogen.

2.2. Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben wurden die Lösungen in ddH₂O angesetzt.

<u>Acrylamidstammlösung</u>	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (H ₂ O) <i>National Diagnostics; Ultra Pure lichtgeschützt bei 4 °C lagern</i>
<u>10% Ammoniumpersulfat (APS)</u>	5 g Ammoniumpersulfat in 50 ml ddH ₂ O
<u>Bradford-Reagenz</u>	50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 23,75 ml Ethanol 50 ml ortho-Phosphorsäure 85 % mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen die Lösung wird 2x gefiltert und anschließend <i>lichtgeschützt bei 4 °C gelagert</i>
<u>DEPC-Wasser</u>	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in ddH ₂ O <i>über Nacht bei RT rühren; autoklavieren</i>
<u>Ethidiumbromidlösung</u>	10 mg/ml in ddH ₂ O
<u>Kinase-Assay-Puffer</u>	50 mM Tris pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT (<i>frisch zugeben</i>)
<u>LB-Agar</u>	40 g Luria Bertani Agar Auf 1 l mit H ₂ O auffüllen und <i>autoklavieren</i>

<u>LB-Medium</u>	25 g Luria Bertani Medium Auf 1 l mit H ₂ O auffüllen und <i>autoklavieren</i>
<u>Miniprep-Lösung I</u>	25 mM Tris pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A <i>bei 4 °C lagern</i>
<u>Miniprep-Lösung II</u>	200 mM NaOH 1 % SDS
<u>Miniprep-Lösung III</u>	5 M Kaliumacetat 29,44 g KAc 11,5 ml konz. Essigsäure 28,5 ml ddH ₂ O
<u>PBST</u>	0,1 % Triton X-100 in 1x PBS
<u>Phenol/Chloroform</u>	Phenol:Chloroform (1:1)
<u>10x Phosphate buffered saline (PBS)</u>	137 mM NaCl 3 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ einstellen des pH-Wertes auf pH 7,4 mit HCl <i>autoklavieren</i>
<u>Puffer-A</u>	10 mM Hepes pH 7,4 10 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ Proteaseinhibitor Cocktail 1:200 (<i>frisch zugeben</i>)
<u>Puffer-B</u>	20 mM Hepes pH 7,4 400 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA 1 % NP-40 15 % Glycerin Poteaseinhibitor Cocktail 1:100 (<i>frisch zugeben</i>)

<u>10x TSE</u>	0,1 M	Tris-HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
	2 M	NaCl
<u>TNN-Puffer</u>	50 mM	Tris-HCl pH 7,5
	120 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	0,5 %	NP-40
	10 mM	Na ₂ P ₂ O ₇
	2 mM	Na ₃ VO ₄
	100 mM	NaF
		einstellen des pH-Wertes auf pH 7,5 mit HCl
		Proteaseinhibitor Cocktail 1:200; 1 M DTT 1:1000
		(<i>frisch zugeben</i>)
<u>Tris-EDTA (TE-Puffer)</u>	10 mM	Tris pH 7,5
	1 mM	EDTA pH 8,0
		<i>autoklavieren</i>
<u>TrizolTM-Lösung</u>		Trizol TM Gebrauchslösung (Invitrogen)
<u>20x SSC</u>	175,3 g	NaCl
	88,2 g	Natriumcitrat
		auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen und pH 7,0 mit NaOH
		einstellen; <i>autoklavieren</i>

2.2.1. Enzypuffer

Alle nicht gesondert aufgeführten Enzypuffer wurden von der jeweiligen Firma als 10x bzw. 5x Puffer geliefert und nach Angaben des Herstellers verwendet.

<u>Proteinase K-Puffer</u>	1 mM	CaCl ₂
	50 mM	Tris pH 8,0
<u>RNase A-Puffer</u>	10 mM	Tris pH 7,4
	150 mM	NaCl

2.2.2. Auftragspuffer

<u>5x DNA</u>	15 %	Ficoll
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol
	0,05 M	EDTA
	in 1x TAE	
<u>3x Elektrophoreseprobenpuffer (ESB)</u>	300 mM	Tris-HCl pH 6,8
	15 mM	Na ₂ EDTA
	150 mM	DTT
	12 % (w/v)	SDS
	15 % (w/v)	Glycerol
	30 mg	Bromphenolblau
	<i>bei -20 °C lagern</i>	

2.2.3. Reagenzien für die Elektrophorese

<u>50x TAE</u>	2 M	Tris-Base
	250 mM	Essigsäure
	50 mM	EDTA, pH 8,0
<u>10x SDS-Laufpuffer</u>	0,25 M	Tris pH 8,3
	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

2.2.4. Puffer für Western Blot

Puffer für Nassblot (Tankblot)

<u>5x Blotting-Puffer</u>	75 g	Tris-Base
	282,2 g	Glycin
	mit ddH ₂ O auf 5 l auffüllen	
<u>Blotting-Puffer</u>	200 ml	5x Blotting-Puffer
	150 ml	Methanol
	mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen	

<u>Ponceau S</u>	0,1 %	Ponceau S
	5 %	Essigsäure
<u>20x TBS</u>	1 M	Tris-HCl pH 7,4
	3 M	NaCl
<u>TBST</u>	0,05 %	Triton X-100 in 1x TBS
<i>Puffer für Semi-Dry-Blot</i>		
<u>Anodenpuffer I</u>	30 mM	Tris-Base
	20 %	Methanol
<u>Anodenpuffer II</u>	300 mM	Tris-Base
	20 %	Methanol
<u>Kathodenpuffer</u>	25 mM	Tris-Base
	40 mM	6-Aminohexansäure
	20 %	Methanol
	0,01 %	SDS

2.2.5. Puffer für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

<u>Lyse-Puffer</u>	5 mM	PIPES pH 8,0
	85 mM	KCl
	0,5 %	NP-40
<u>Kernlyse-Puffer</u>	50 mM	Tris-HCl pH 8,1
	10 mM	EDTA
	1 %	SDS
<u>IP-Verdünnungspuffer</u>	0,01 %	SDS
	1,1 %	Triton X-100
	1,2 mM	EDTA
	16,7 mM	Tris-HCl pH 8,2
	167 mM	NaCl
<u>Elutions-Puffer</u>	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 %	SDS
	10 mM	EDTA

<u>LiCl-Waschpuffer</u>	0,25 M	LiCl
	0,5 %	NP-40
	0,5 %	DOC
	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
<u>Blocking-Puffer</u>	3 ml	IP-Verdünnungspuffer
	150 µl	BSA [20 mg/ml]
	30 µl	ssDNA [10 mg/ml]

2.3. Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs/Invitrogen
T4-DNA-Ligase [400000 U/ml]	New England Biolabs
<i>M-MLV-RT</i> [200 U/µl]	Invitrogen
<i>SAWADY</i> -Taq DNA-Polymerase [5 µg/µl]	Peqlab
DNaseI Rnase-free [10 U/µl]	Roche
Proteinase K [10 mg/ml] in Proteinase K-Puffer; <i>bei -20 °C lagern</i>	AppliChem
RNase A [10 mg/ml] in RNase A-Puffer; <i>zur Inaktivierung der DNasen 15 min bei 95 °C erhitzen; bei -20 °C lagern</i>	Sigma
RQ-RNase-free DNase Set	Qiagen
RiboLock TM (RNase-Inhibitor)	Fermentas

2.4 Antibiotika

Ampicillin [100 mg/ml]	Roth
Blasticidin [10 mg/ml]	Invivogen
Puromycin [10 mg/ml]	Sigma

2.5. Größenstandards

1 Kb DNA Ladder	Invitrogen
MassRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
SDS Page Ruler Mix	Fermentas

2.6. Molekularbiologische Reagenziensätze

Jetstar Gel Extraction Kit	Genomed
Jetstar Plasmid Purification Midi Kit	Genomed
Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAquick Miniprep Kit	Qiagen
qPCR Core Kit mit Sybr Green	Eurogentec
CyScribe Post-labelling Kit	Amersham Biosciences

2.7. Molekularbiologische Reagenzien

Proteaseinhibitor Cocktail	Sigma
PMSF [10 mg/ml] in Isopropanol	Roche
Protein-A-Sepharose	Amersham Biosciences
BSA Fraktion V [20 mg/ml]	Sigma
Random primer [500 µg/ml]	Roche
dNTP Set [100 mM]	Invitrogen
Histone H1 [1mg/ml] in Kinase-Assay-Puffer	Roche
Ziegenserum	Sigma
<i>Human Cot1 DNA</i> [1 mg/ml]	Invitrogen
Poly A [5 µg/µl]	Dr. Michael Krause; IMT Marburg
<i>Mounting Medium</i>	Shandon
Hoechst-Reagenz (H 33258) [1mg/ml]	Sigma
ssDNA (aus Fischesperma; <i>MB Grade</i>)	Roche
Propidiumjodid [1 mg/ml]	Sigma
Phototope HRP (<i>Western Blot Detection System</i>)	NEB

2.8. Radioaktiv markierte Stoffe

[γ^{32} -P]-ATP [50 µCi/µl]	Amersham Biosciences
-------------------------------------	----------------------

2.9. Medien und Reagenzien für die Zellkultur

DMEM (4,5 g Glukose/L-Glutamin)	Cambrex
Penicillin/Streptomycin [1U/μg]	Cambrex
Trypsin-Versene (EDTA); 0,5 g/l Trypsin; 1:250	Cambrex
Foetal Bovine Serum (FCS)	GIBCO
Serum Supreme	Cambrex
Hydroxyurea [100mM]	Sigma
Doxorubicin [1 mg/ml]	Fluka
Polybrene [4mg/ml]	Sigma
Oligofectamine TM Reagent	Invitrogen

BrdU-Lösung 10 mg/ml (32,5 mM) Bromodeoxyuridin
in 1x PBS
sterilfiltrieren; bei -20°C lagern

2x HBS 8,2 g HCl
5,95 g Hepes, acid
0,105 g Na₂PO₄
auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen und
pH 7.05 mit NaOH einstellen

Kalziumchlorid 2,5 M CaCl₂ in ddH₂O
sterilfiltrieren; bei -20°C lagern

2.10. Antikörper und Antiseren

2.10.1. Sekundärantikörper

Bezeichnung/Antigen	Firma/Bestellnr.	Verdünnung
Protein-A-HRP	GE-Healthcare	1:5000
Anti-mouse-HRP	GE-Healthcare	1:5000
Anti-rabbit-Rhodamin	Jackson Immuno Research	1:200

2.10.2. Primärantikörper

Bezeichnung /Antigen	Firma/ Bestellnr.	Merkmal	Verdünnung	Interne Nr.
p53 (Pab 240)	#SC-99	mouse monoclonal IgG1 [100 µg/ml]	WB 1:1000	37
Cyclin A (BF683)	#SC-239	mouse monoclonal IgE [200 µg/ml]	WB 1:1000	39
Cyclin B1 (GNS1)	#SC-245	mouse monoclonal IgG1 [200 µg/ml]	WB 1:1000 IP 1:100	40
Cyclin D1 Ab-1 (DCS-6)	Neomarkers #MS-210-P1	mouse monoclonal [200 µg/ml]	WB 1:1000	41
Cyclin E (M-20)	#SC-481	rabbit polyclonal IgG [200 µg/ml]	WB 1:1000	42
Cdc2 p34 (17)	#SC-54	mouse monoclonal IgG2a [200 µg/ml]	WB 1:1000	44
p-CDC2 (Tyr 15)-R	#SC-7989-R	rabbit polyclonal IgG [200 µg/ml]	WB 1:1000	45
Cdk2 (M-2)	#SC-163	rabbit polyclonal IgG [100 µg/ml]	WB 1:1000	47
anti-phospho-Histon H3 (Ser10)	Upstate #06-579	rabbit polyclonal IgG [200µg/200µl]	IF 1:100	57
B-Myb (N-19)	#SC-724	rabbit polyclonal IgG [200 µg/ml]	WB 1:1000 IP 1:100 in Kombination mit H-115	79
B-Myb (H-115)	#SC-13028	rabbit polyclonal IgG [200 µg/ml]	WB 1:1000 IP 1:100 in Kombination mit N-19	80
lin9 (1) (His)	Davids	rabbit polyclonal; Serum 30.03.2004; (Gagrica et al., 2004)	WB 1:1000 IP 1:100	81
lin9 (1) (His)	Davids	Rabbit polyclonal; Serum 30.03.2004; Protein-A-Sepharose gereinigt;(Gagrica et al., 2004)	ChIP 20 µg	81
β-Tubulin	Chemicon #MAB 3408	mouse monoclonal	WB (1:1000)	102
Anti-BrdU FITC	Beckton Dickenson #347583	mouse monoclonal	FACS 20 µl pro Reaktion	---
IgG	Sigma I5006	[1 mg/ml]	ChIP 8 µl	104
Survivin (BIRC5)	Novus (Acris)	rabbit polyclonal	WB 1:1000	124
PLK (F-8)	Santa Cruz	mouse monoclonal	WB 1:1000	---

2.11. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth und Metabion bezogen. Die Konzentration der Stammlösungen wurde mit Ausnahme für die siRNA Oligonukleotide auf 100 pmol/μl mit TE-Puffer eingestellt.

2.11.1. Sequenzierprimer

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
SG 445	5´-TCTGGGAAATCACCATA-3´	pRetroSuper-nah; 3´-Primer zur Sequenzierung von RNAi-Konstrukten; bindet am 3´-Ende des H1-Promoters

2.11.2. siRNA Oligonukleotide

Die siRNA Oligonukleotide wurden von der Firma Dharmacon bezogen und mit 1x RNAi-Puffer (von der Firma mitgeliefert) auf 75μM eingestellt.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
siControl	5´-UAGCGACUAAACACAUCAA-3´	unspezifische siRNA
LIN9-4	5´-GGAAGAGAGAUCAUUAUU-3´	siRNA gegen LIN-9; Position 546-564 (Accession Nr. NM_173083)

2.11.3. Oligonukleotide für vektorbasierende RNAi-Anwendungen

Diese Oligonukleotide wurden nach Angaben der Firma OligoEngine designed. Die Zielsequenzen wurden nach den Richtlinien in Reynolds *et al.* 2004 ermittelt. Die Oligonukleotide wurden nach der Synthese HPLC-gereinigt.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
SG 197	5´-GATCCCCGGAGGAGACCTGAATTCCTTTCAAGA GAAGGAATTCAGGTCTCCTCTTTTTGGAAA-3´	RNAi-Oligonukleotid (sense) gegen LIN9 Position 1438-1457 (cDNA; Accession Nr. NM_173083); Sequenz #2

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
SG 198	5´-AGCTTTTCCAAAAAGGAGAGACCTGAATTCCT TCTCTTGAAAGGAATTCAGGTCTCCTCCGGG-3´	RNAi-Oligonukleotid (antisense) gegen LIN9 Position 1438-1457 (cDNA; Accession Nr. NM_173083); Sequenz #2
SG 345	5´-GATCCCGGAAGAGAGATCAGCATTATTCAAGAG ATAATGCTGATCTCTCTTCCTTTTTTA-3´	RNAi-Oligonukleotid (sense) gegen LIN9 Position 546-564 (cDNA; Accession Nr. NM_173083); Sequenz #1
SG 346	5´-AGCTTAAAAAGGAAGAGAGATCAGCATTATCTC TTGAATAATGCTGATCTCTCTTCCGG-3´	RNAi-Oligonukleotid (antisense) gegen LIN9 Position 546-564 (cDNA; Accession Nr. NM_173083); Sequenz #1
SG 558	5´-GATCCCGCAGAGGACAGTATCAACATTCAAGAG ATGTTGATACTGTCCTCTGCTTTTTTA-3´	RNAi-Oligonukleotid (sense) gegen B-MYB Position 1165-1183 (cDNA; Accession Nr. NM_002466); Sequenz #1
SG 559	5´-AGCTTAAAAAGCAGAGGACAGTATCAACATCTC TTGAATGTTGATACTGTCCTCTGCGG-3´	RNAi-Oligonukleotid (antisense) gegen B-MYB Position 1165- 1183 (cDNA; Accession Nr. NM_002466) Sequenz #1

2.11.4. Primer für semiquantitative PCR-Analysen

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
SG 106	5´-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3´	sense Primer für β -Aktin
SG 107	5´-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3´	antisense Primer für β -Aktin
SG 150	5´-CGGCTTATGGGAAAACCACGGAG-3´	sense Primer für LIN-9
SG 151	5´-CCATCATGAACACCACGTAATCGTGC-3´	antisense Primer für LIN-9

2.11.5. qRT-PCR Primer

Die Primer für die Real Time PCR Analysen wurden mit Hilfe des Programms *Probe Library* (www.roche-applied-biosystems.com) designed.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
SG 566	5´-TGGCATCAAAACAGAAAAATGA-3´	sense Primer für STK-6
SG 567	5´-GGCGACCAATTTCAAAGTCT-3´	antisense Primer für STK-6
SG 568	5´-GCCCAGTGTTTCTTCTGCTT-3´	sense Primer für BIRC5
SG 569	5´-CCGGACGAATGCTTTTTATG-3´	antisense Primer für BIRC5
SG 570	5´-GGAGAACGCTCTGTCAGCA-3´	sense Primer für BUB1
SG 571	5´-TCCAAAACTCTTCAGCATGA-3´	antisense Primer für BUB1
SG 572	5´-GGTACTGAAGTCCGGGAACC-3´	sense Primer für CCNA2
SG 573	5´-GAAGATCCTTAAGGGGTGCAA-3´	antisense Primer für CCNA2
SG 574	5´-CGCCTGAGCCTATTTTGGT-3´	sense Primer für CCNB1
SG 575	5´-GCACATCCAGATGTTTCCATT-3´	antisense Primer für CCNB1
SG 576	5´-TGGATCTGAAGAAATACTTGGATTCTA-3´	sense Primer für CDC2
SG 577	5´-CAATCCCCTGTAGGATTTGG-3´	antisense Primer für CDC2
SG 578	5´-TCAAGTTTAGGCCTTTGTCCA-3´	sense Primer für CENP-E
SG 579	5´-CCTGGCTGAGAATCCACACT-3´	antisense Primer für CENP-E
SG 580	5´-CCCCACCACGGTTACATTAT-3´	sense Primer für LIN-9
SG 581	5´-CGGCGACTGTCCTAATAAAGG-3´	antisense Primer für LIN-9
SG 590	5´-TGCCGAGCTCTGGAAAAA-3´	sense Primer für UBCH10
SG 591	5´-AAAAGACGACACAAGGACAGG-3´	antisense Primer für UBCH10
SG 620	5´-GGCAGACCGAGATGAATCCTCA-3´	sense Primer für S14
SG 621	5´-CAGGTCCAGGGTCTTGGTCC-3´	antisense Primer für S14
SG 628	5´-TCACTGTCTTGTACCCCTGTGC-3´	sense Primer für p21
SG 629	5´-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3´	antisense Primer für p21

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
SG 630	5´-TCCACACTGCCCAAGTCTCT-3´	sense Primer für B-MYB
SG 631	5´-AGCAAGCTGTTGTCTTCTTTGA-3´	antisense Primer für B-MYB
SG 645	5´-GCCCAATACGACCAAATCC-3´	sense Primer für GAPDH
SG 646	5´-AGCCACATCGCTCAGACAC-3´	antisense Primer für GAPDH
SG 680	5´-AAGATCTGGAGGTGAAAATAGGG-3´	sense Primer für PLK1
SG 681	5´-AGGAGTCCCACACAGGGTCT-3´	antisense Primer für PLK1
SG 771	5´-AGGCCTTGGAActCAAGGAT-3´	sense Primer für p53
SG 772	5´-CCCTTTTTGGACTTCAGGTG-3´	antisense Primer für p53
SG 810	5´-GTGCTGGCCACAGAATCC-3´	sense Primer für ADFP
SG 811	5´-TCTGAATCAGCCATCAACTCA-3´	antisense Primer für ADFP
SG 812	5´-GTTAGAGGGCCACCAGAGG-3´	sense Primer für FLOT1
SG 813	5´-CTGAGAATTTCTGCCTGTCCTT-3´	antisense Primer für FLOT1
SG 814	5´-GTATTACATCCAGCAGCCAGAA-3´	sense Primer für CCT4
SG 815	5´-GGTGCCATCTCCTGCTTCTA-3´	antisense Primer für CCT4
SG 816	5´-AAACATTGGAAAAGAAATCCTGA-3´	sense Primer für DPYD
SG 817	5´-ACCAAGAGTCGTGTGCTTGA-3´	antisense Primer für DPYD

2.11.6. qPCR Primer für ChIP-Analysen

Die Primer für die Real Time PCR Analysen wurden mit Hilfe des Programms *Probe Library* (www.roche-applied-biosystems.com) designed.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
SG 540	5´-GGCAGCAAGAGTCACTCCA-3´	sense Primer für GAPDH2
SG 541	5´-TGTCTCTTGAAGCACACAGGTT-3´	antisense Primer für GAPDH2
SG 552	5´-GCCCTTTAATGGTTAGCGTTT-3´	sense Primer für UBCH10
SG 553	5´-GCTGCCATTAActAACGAATCC-3´	antisense Primer für UBCH10
SG 584	5´-CGTTCTTTGAAAGCAGTCGAG-3´	sense Primer für BIRC5
SG 585	5´-GCCGGGAGTTGTAGTCCTC-3´	antisense Primer für BIRC5
SG 828	5´-AAAGGGGGCTCATTCTAACAG-3´	sense Primer für p21 #3
SG 829	5´-CTTGAGAAATGAGTTGGCACT-3´	antisense Primer für p21 #3
SG 840	5´-CCCTTCTCACCTGAAAACA-3´	sense Primer für p21 #1
SG 841	5´-GTGGCTCTGATTGGCTTTCTG-3´	antisense Primer für p21 #1
SG 842	5´-ACCGGCTGGCCTGCTGGAAct-3´	sense Primer für p21 #2
SG 843	5´-TCTGCCGCCGCTCTCTCACCT-3´	antisense Primer für p21 #2

2.12. Plasmide

<i>Interne Nr.</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Beschreibung</i>
# 574	pSuperior-puro	Expressionsvektor für RNAi (OligoEngine)
# 608	pSuperior-puro-shlin9	shRNA-Expression gegen LIN-9 (SG 197/198); enthält H1-Promotor
# 610	pSuperior-puro-shin9	shRNA-Expression gegen LIN-9 enthält (SG 345/346); enthält H1-Promotor
# 652	pMSCV-480-blasticidin	retroviraler Expressionsvektor für RNAi (Voorhoeve and Agami, 2003)
# 653	pMSCV-blast-shlin9 [1438-1457]	retrovirale shRNA-Expression gegen LIN-9 (SG 197/198); (Gagrica et al., 2004)
# 654	pMSCV-blast-shlin9 [546-564]	retrovirale shRNA-Expression gegen LIN-9 (SG 345/346); (Gagrica et al., 2004)
# 756	pMSCV-blast-shmyb [1165-1183]	retrovirale shRNA-Expression gegen B-MYB (SG 558/559)
# 679	pMSCV-480-blast-p53	retrovirale shRNA-Expression gegen p53 (Voorhoeve and Agami, 2003)
# 746	pBabe-H2B-GFP	retrovirale H2B-GFP-Expression zur Kontrolle der Transfektions- und Infektionseffizienz
# 174	pcDNA3-GFP	GFP-Expression zur Transfektionskontrolle

2.13. Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Herkunft/Beschreibung</i>
BJ-ET	Primäre humane Fibroblasten; stabile Expression des ekotrophen Rezeptors; immortalisiert durch hTERT (Voorhoeve and Agami, 2003)
T98G	Humanes Glioblastom; Fibroblasten (ATCC)
Phoenix ^{Eco}	Verpackungszelllinie (basierend auf 293T) zur Herstellung ekotropher Viren (Grignani et al., 1998)
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (ATCC)
Saos2	Humane Osteosarkom-Zelllinie (ATCC)

2.14. cDNA-Microarrays

Die cDNA-Microarrays wurden am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg (IMT), in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Krause angefertigt. Auf den Microarrays befanden sich 11.552 cDNA-Spots der humanen cDNA-Library „*Human Sequence-Verified cDNA UniGene Gene Sets gf200, gf201u and gf202*“ (ResGen/Invitrogen; Katalognummer 97001.V).

Im Einzelnen wurden cDNA-Microarrays der D-Serie mit den laufenden Nummern 24_D_02/06/03 bis 35_D_02/06/03 verwendet.

2.15. Spezielle Geräte und Materialien

ABI <i>Prism</i> 7700	Applied Biosystems
Durchflusszytometer FACSCalibur	Beckton Dickinson
Durchflusszytometer FC 500 CXP	Beckman Coulter
Galaxy S CO ₂ -Inkubator	Nunc/New Brunswick
Gelelektrophorese-/Blotkammern	BioRad
Hyperfilm TM ECL	Amersham Biosciences
Microarrayscanner „Scan Array Express“ und Software	Perkin Elmer
NanoDrop [®] ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies Inc.
PVDF-Membran (0,45 µm)	Millipore
Real Time PCR-Gerät Mx3000P	Stratagene
Röntgenfilme	Kodak
SemiDry Blotter	BioRad
Sonifier W250D	Branson
T1 Thermocycler	Biometra
Ultraspec 2100 pro Photometer	Amersham Biosciences

3 METHODEN

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die verschiedenen Zelllinien wurden in den entsprechenden Vollmedien (siehe unten) in Adhäsionskultur auf Gewebekulturschalen gehalten und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert.

Zelllinie	Vollmedium
HeLa	DMEM/4,5 g/l Glutamin; 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin
Saos-2	DMEM/4,5 g/l Glutamin; 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin
BJ-ET	DMEM/4,5 g/l Glutamin; 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin
T98G	DMEM/4,5 g/l Glutamin; 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin
Phoenix ^{Eco}	DMEM/4,5 g/l Glutamin; 10 % Serum Supreme; 1 % Penicillin/Streptomycin

3.1.2. Passagieren von Zellen

Die Kultivierung von Zelllinien erfordert in Abhängigkeit vom Wachstumsverhalten, ein regelmäßiges Passagieren der Zellen. Damit wird ein Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition verhindert und eine optimale Nährstoffversorgung gewährleistet.

Die zu 90 – 100 % konfluenten Zellen wurden zunächst mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin von den Kulturschalen für max. 5 min bei 37 °C gelöst. Die Menge an Trypsin richtete sich nach der Größe der Kulturschale (0,5 – 2 ml). Die trypsinierten Zellen wurden mit frischem Vollmedium von der Kulturschale abgespült, resuspendiert und verdünnt auf eine neue Kulturschale ausgesät. Der Verdünnungsgrad richtete sich dabei nach dem Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Verdünnung von Zelllinien

Zelllinie	Verdünnung/Häufigkeit	
HeLa	1:10	alle 2 - 3 Tage
Saos-2	1:5	alle 2 - 3 Tage
BJ-ET	1:3	alle 3 - 4 Tage
Phoenix ^{Eco}	1:4 – 1:5	jeden 2. Tag
T98G	1:3 – 1:4	jeden 2. Tag

3.1.3. Einfrieren von Zellen

Die konfluenten Zellen wurden zunächst wie unter 3.1.2. beschrieben trypsiniert, in 10 ml frischem Vollmedium aufgenommen und für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml frischem Einfriermedium aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 5 bis 10 min auf Eis wurden die Einfrierröhrchen bei -80 °C für 2 – 4 Tage gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und ermöglicht so eine Lagerung der Zellen über mehrere Monate.

Einfriermedium: 10 % DMSO

im entsprechenden Vollmedium

vor dem Gebrauch Sterilfiltrieren (0,25 µm Porengröße)

3.1.4. Auftauen von Zellen

Um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, sollte der Auftauvorgang möglichst schnell erfolgen. Dazu wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und sofort bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml Vollmedium aufgenommen, für 5 min bei 1200 rpm pelletiert und anschließend in frischem Vollmedium resuspendiert und ausgesät.

3.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit einer modifizierten *Neubauer Zählkammer* unter Berücksichtigung folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen [ml}^{-1}\text{]} = (\text{Zellzahl/Zahl der gezählten Großquadrate}) \times 10^4$$

3.1.6. Erstellen von Wachstumskurven

Um das Proliferationsverhalten von Zellen in Kultur bestimmen zu können, wurden je 1×10^5 Zellen in Triplikaten auf 9,6 cm²-Kulturplatten ausgesät. Über einen Zeitraum von 12 - 15 Tagen wurden die Zellen alle 3 - 4 Tage trypsiniert, die Zellzahl bestimmt und erneut 1×10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die aus den Mittelwerten der Triplikate gebildeten Zellzahlen wurden in einer kumulativen Darstellung gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Ebenso wurde die Standardabweichung der Triplikate ermittelt.

3.1.7. Synchronisation von Zellen mit Hydroxyharnstoff

Hydroxyharnstoff (HU) ist ein Inhibitor der Ribonukleotidreduktase und hemmt dadurch die DNA-Synthese. Werden Zellen mit Hydroxyharnstoff behandelt, führt dies zu einem Zellzyklusarrest während des G1/S-Übergangs. Die Behandlung erfolgte durch direkte Zugabe von 700 µM HU zum Medium. Nach einer Inkubation von 20 h wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von frischem Vollmedium in den Zellzyklus entlassen. Zellen die auf diese Weise behandelt wurden, durchliefen den weiteren Zellzyklus synchron.

3.1.8. Synchronisation von T98G-Zellen durch Serumentzug

Serum enthält Mitogene, welche die Progression von Zellen stimulieren. Einige Zelllinien, z.B. T98G, bieten den Vorteil, dass sie durch den Entzug von Serum in der G₀-Phase des Zellzyklus arretieren (Mayol et al., 1995). Hierzu wurden die T98G-Zellen zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend in Hungermedium (Medium ohne Serum mit 1 % Penicillin/Streptomycin) weiter kultiviert. Nach 72 h wurden die Zellen durch Zugabe von Medium mit 15 % Serum in den Zellzyklus entlassen und proliferierten synchron.

3.1.9. Behandlung von BJ-ET Zellen mit Doxorubicin

Zur Aktivierung von p53 durch DNA-Schäden wurden BJ-ET Zellen mit Doxorubicin behandelt. Doxorubicin führt zu DNA-Schäden aufgrund der Inhibition der Topoisomerase II und der Generierung freier Radikale (Hurley, 2002; Kurz et al., 2004).

BJ-ET Zellen wurden einen Tag vor der Behandlung so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 60 - 70 % erreichten. Die Behandlung erfolgte für 24 h durch direkte Zugabe von 0,2 µg Doxorubicin in das Medium.

3.1.10. Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Kalziumphosphat-Präzipitation

Mit Hilfe von Kalziumphosphat-Präzipitaten können Fremdgene in kultivierte Zellen eingeschleust werden. Wird eine Kalziumlösung mit einer Phosphatlösung vermischt, so fällt das Kalzium als mikroskopisch sichtbare Präzipitate aus. Durch die Zugabe von DNA zur Kalziumlösung, fällt die DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen mit aus (Chen and Okayama, 1987; Wigler et al., 1979). Die Aufnahme der Präzipitate in die Zellen erfolgt durch Phagozytose (Loyter et al., 1982).

Die Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu ca. 70 - 80 % konfluent waren. Die zu transfizierende DNA wurde mit ddH₂O auf 450 µl aufgefüllt und mit 50 µl einer 2,5 M Kalzium-Lösung versetzt. In einem 15 ml

Reaktionsgefäß wurden 500 µl 2x HBS vorgelegt. Anschließend wurde die DNA-Kalzium-Mischung tropfenweise zugegeben. Während der Zugabe wurde mit einer Pasteurpipette Luft in das 2x HBS geblasen, wodurch sich die beiden Lösungen mit einander vermischten. Die Zugabe des Gemisches zu den Zellen erfolgte tropfenweise nach einer Inkubation von 5 - 15 min. Nach ungefähr 16 h wurden die Präzipitate durch ein- bis zweimaliges Waschen mit 1x PBS entfernt und die Zellen anschließend in frischem Vollmedium weiter kultiviert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde wahlweise eine separate Kontrollschale mit einem **GFP (Green Fluorescent Protein)**-Konstrukt transfiziert, oder das GFP-Konstrukt mit der gewünschten DNA cotransfiziert.

Transfektion von siRNA mit OligofectamineTM

Das Einschleusen von Oligonukleotiden bzw. siRNA in Zellen in Kultur erfolgte mit OligofectamineTM Reagenz.

Am Tag vor der Transfektion wurden je nach Zelltyp 0,75 – 1,5x 10⁵ Zellen in Triplikaten auf 9,6 cm²-Kulturplatten ausplattiert. Für die Transfektion einer Vertiefung wurden 15 µl OligofectamineTM zunächst mit 60 µl DMEM (ohne Serum und Antibiotika) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. 4 µl einer 75 µM siRNA-Stammlösung wurden mit 250 µl DMEM (ohne Serum und Antibiotika) gemischt und anschließend mit dem verdünnten OligofectamineTM vereinigt. Die Zugabe dieses Transfektionsansatzes zu den Zellen erfolgte nach einer Inkubation von 15 min bei RT. Eine signifikante Depletion der gewünschten mRNA wurde nach ca. 72 h erreicht.

3.1.11. Infektion von BJ-ET Zellen

Herstellung rekombinanter Retroviren

Durch Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren können Fremdgene bzw. RNAi-Konstrukte in das Genom von Zellen transferiert und stabil integriert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten BJ-ET Zellen exprimieren stabil den so genannten *ekotrophen Rezeptor*, welcher die Infektion mit (murinen) ekotrophen Viren ermöglicht.

Zur Herstellung der rekombinanten Retroviren wurden *Phoenix^{Eco}* Zellen verwendet, welche durch Transfektion eingeschleuste DNA in Viruspartikel verpacken und in das Medium abgeben. Die *Phoenix^{Eco}* Zellen wurden 1:4 ausplattiert, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 70 - 80 % erreichten. Die Transfektion erfolgte mit Kalzium-Phosphat, wobei pro 10 cm Kulturschale 40 µg der gewünschten DNA transfiziert wurden. Etwa 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 6,5 ml 10 % Serum Supreme-haltigem Medium über Nacht kultiviert. Am nächsten morgen wurde der Virusüberstand abgenommen und entweder direkt für eine Infektion eingesetzt, oder nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert. Für die Infektion wurde der gefrorene Virusüberstand direkt vor der Infektion bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut.

Infektion

Zur Infektion von BJ-ET Zellen, wurden diese einen Tag vor der Infektion mit einer Verdünnung von 1:3 auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert.

Zur Erhöhung der Infektionseffizienz wurde der Virusüberstand zunächst mit 8 µg/ml Polybrene versetzt und anschließend sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße). Nach dem Absaugen des Mediums von den ausplattierten BJ-ET Zellen, wurden je eine 10 cm Schale mit 6ml des fertigen Virusüberstandes für 16 h inkubiert. Danach wurde der Virusüberstand entfernt und die Zellen mit frischem Vollmedium weiter kultiviert.

BJ-ET Zellen wurden grundsätzlich mit DNA-Konstrukten infiziert, welche für *Blasticidin* als Selektionsmarker codieren. Die Selektion positiver Zellen erfolgte mit 5 µg/ml Blasticidin, 48 h nach der Infektion für 4 Tage. In der Regel wurden die infizierten Zellen 72 h nach der Infektion (bzw. 24 h nach Beginn der Selektion) in einem Verhältnis von 1:2 auf 10 cm Kulturschalen neu ausplattiert.

3.1.12. Immunfluoreszenz

Färbung von mitotischen Zellen

Entsprechend ihres Wachstumsverhaltens wurden $0,75 - 1 \times 10^5$ infizierte und vollständig selektionierte BJ-ET Zellen auf sterilen Deckgläschen (in 9,6 cm²-Kulturplatten) in 2 ml Vollmedium ausplattiert. Ein weiterer Selektionsdruck war nicht erforderlich. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und für 10 min in 3 % Paraformaldehyd/2 % Glucose (in 1x PBS) fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS zweimal gespült und einmal für 5 min gewaschen. Bei Bedarf konnten die fixierten Zellen an dieser Stelle für mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei RT.

Durch die folgende Inkubation von 5 min in PBS/0,2 % Triton X-100 wurden die Zellen permeabilisiert. Nach fünfmaligem Waschen für je 5 min mit PBST wurden die Zellen für mindestens 15 min in PBS/5 mM MgSO₄ geblockt. Als Marker für mitotische Zellen wurde ein Phospho-Histon-H3 Antikörper (Ser 10) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/MgSO₄ verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h in einer lichtgeschützten *feuchten Kammer*. Durch dreimaliges Waschen für je 3 min in PBST wurde der Erstantikörper entfernt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 30 min mit einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper (1:200 in PBST) ebenfalls in einer *feuchten Kammer* inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x 3 min) mit PBST wurden die Zellkerne für 5 min mit Hoechst-Reagenz (Hoechst 33258; 1:500 in PBS) gefärbt. Abschließend wurden die Zellen mit 1x PBS einmal gespült und für 5 min gewaschen. Zum Einbetten der Deckgläschen auf Objektträger wurde *Mounting Medium* (Shandon) verwendet und mit Nagellack versiegelt.

3.2. Durchflusszytometrie

Die Verteilung einer Zellpopulation im Zellzyklus wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (**FACS-Analyse: *Fluorescent-Activated-Cell-Sorting***) bestimmt. Messung und Auswertung erfolgten mit Durchflusszytometern und zugehöriger Software der Firmen Beckton Dickinson (**FACSCalibur**) und Beckmann Coulter (**FX 500 CXP**).

3.2.1. Fixierung von Zellen zur FACS-Analyse

Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin von den Kulturschalen gelöst und in 10 ml Vollmedium für 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen durch gleichzeitiges Vortexen und Zutropfen von 1 ml eiskaltem 80%igen Ethanol fixiert. Zur vollständigen Fixierung wurden die Zellen mindestens über Nacht bei -20 °C gelagert.

3.2.2. Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Propidiumjodid interkaliert in die Basenpaarsequenz der DNA und fluoresziert im roten Bereich bei einer Wellenlänge von 617 nm. Durch die Intensität der Fluoreszenz lässt sich mit dem Durchflusszytometer der DNA-Gehalt einer einzelnen Zelle bestimmen. Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus befinden haben einen einfachen DNA-Gehalt (1n) und fluoreszieren somit schwächer, als Zellen, deren DNA-Gehalt sich während der S-Phase verdoppelt hat (2n; G₂/M-Phase). Die mit Propidiumjodid gefärbten Zellen können daher anhand ihres DNA-Gehaltes einer bestimmten Phase des Zellzyklus zugeordnet werden. Die gleichzeitige Bestimmung der Zellzahl ermöglicht somit die Quantifizierung von Zellen in einer bestimmten Phase des Zellzyklus. Die Verteilung der gemessenen Zellen im Zellzyklus lässt sich anhand eines Histogramms darstellen.

Für die Propidiumjodid-Färbung wurden die fixierten Zellen zunächst bei 1200 rpm für 10 min bei 4 °C pelletiert und im Anschluss mit kaltem 1x PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl Natriumzitat (38 mM Stammlösung) resuspendiert. Da die in der Zelle vorhandene RNA bei der Bestimmung des DNA-Gehaltes stört, erfolgte eine RNase-Behandlung mit 25 µl RNase A [10 mg/ml] für mindestens 30 min bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C. Vor Beginn der Messung wurde die DNA durch Zugabe von 15 µl Propidiumjodid gefärbt.

3.2.3. Messung von S-Phase-Zellen: die 2D-FACS-Analyse

Bei der Propidiumjodid-Färbung sind die Grenzen zwischen Zellen in G₁- und in S-Phase bzw. zwischen Zellen in S- und in G₂/M-Phase nur schwer festzulegen. Zur genaueren Quantifizierung der S-Phase Zellen, werden diese daher zusätzlich mit BrdU gefärbt.

Dazu wurden 1 h vor der Fixierung 10 μM BrdU direkt in das Zellmedium gegeben. Während der einstündigen Inkubation im Brutschrank wurde das BrdU während der S-Phase in die sich replizierende DNA eingebaut. Im Anschluss wurden die Zellen wie unter 3.2.1. beschrieben fixiert. Die fixierten Zellen wurden zunächst für 10 min bei 1000 rpm und 4 °C sedimentiert und das Zellpellet in 1 ml 2 M HCl/0,5 % Triton X-1000 resuspendiert. Zur Denaturierung der DNA erfolgte eine Inkubation von 30 min bei RT. Dabei wurde die Probe alle 10 min vorsichtig gemischt. Nach dem Zentrifugieren für 10 min bei 1000 rpm und RT wurde das Zellpellet zur Neutralisation der Salzsäure in 1 ml 0,1 M Natriumborat (pH 8,5) aufgenommen. Um BrdU-positive Zellen im Durchflusszytometer detektieren zu können, wurde die Probe mit einem Fluorophor-gekoppelten (*FITC*) spezifischen BrdU-Antikörper markiert. Für diese Markierung wurden 1×10^6 Zellen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, kurz zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 50 μl PBS/0,5 % Tween 20/1 % BSA aufgenommen und mit 20 μl Anti-BrdU-FITC Antikörper für 1 h bei RT und im Dunkeln inkubiert. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurden die Zellen mit 50 μl PBS/0,5 % Tween 20/1 % BSA gewaschen und im Anschluss in 500 μl 38 mM Natriumzitat aufgenommen. Durch Zugabe von 25 μl RNase A [10 mg/ml] wurden RNA-Kontaminationen für mindestens 30 min bei 37 °C oder über Nacht, entfernt. Direkt vor der Messung wurden die Zellen zusätzlich mit 15 μl Propidiumjodid gefärbt.

3.2.4. Kinetik zum Durchlaufen eines Zellzyklus

BrdU-pulse-Assay

Um das Verhalten von Zellen während des Zellzyklus besser zu studieren, wurde die Progression BrdU-positiver Zellen während eines Zyklus verfolgt. Dazu wurden die Zellen für 1 h mit 10 μM BrdU inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS wurde überschüssiges BrdU im Medium vollständig entfernt. Danach wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in 80%igem Ethanol fixiert (3.2.1.) und anschließend wie unter 3.2.3. mit einem BrdU-spezifischen Antikörper und Propidiumjodid gefärbt.

Messung der Länge der S-Phase

Die Länge der S-Phase einer Zellpopulation wurde in einem BrdU-*pulse*-Assay nach der von Begg (Begg et al., 1985) beschriebenen Methode bestimmt.

$$\text{RM (relative movement)} = (\mathbf{F_L - F_{G1}}) / (\mathbf{F_{G2/M} - F_{G1}})$$

- Mit **F_L** : Mittelwert der Propidiumjodid-Fluoreszenz-Werte der BrdU-positiven Zellen
 F_{G1} : Mittelwert der Propidiumjodid-Fluoreszenz-Werte der G_1 -Zellen
 $F_{G2/M}$: Mittelwert der Propidiumjodid-Fluoreszenz-Werte der $G_{2/M}$ -Zellen

Die Zeit, die von den Zellen zur DNA-Synthese benötigt wird, lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$T_s \text{ (DNA-Synthese-Zeit)} = [0,5/(RM-0,5)] \times t$$

Mit t : Dauer [h] von der BrdU-Entfernung bis zur Fixierung.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minipräparation)

Sofern nicht anders angegeben erfolgten sämtliche Zentrifugationsschritte bei RT und 13000 rpm in einer Tischzentrifuge. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 5 ml Übernachtskultur eines Einzelklons angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden für 1 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellsediment wurde in 250 µl kalter Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl der Lösung II (RT) zugegeben und die Suspension durch sechsmaliges Invertieren gemischt. Der Ansatz sollte an dieser Stelle nicht länger als 5 min bei RT inkubieren. Nach der Zugabe von 250 µl Lösung III wurde der Ansatz erneut durch vorsichtiges Invertieren gemischt und für 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA. Diese wurde nach Zugabe von 600 µl Isopropanol durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C gefällt und das Präzipitat anschließend mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das DNA-Pellet nach dem Trocknen bei RT in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *Jetstar Plasmid Purification Maxi-* bzw. *Midi Kit* der Firma Genomed gemäß den Angaben des Herstellers.

Isolierung von Gesamt-RNA mit TrizolTM Reagenz

Hierzu wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in 1 ml *TrizolTM Reagenz* geerntet und für 5 min bei RT inkubiert. An dieser Stelle konnten die Proben bei -80 °C über Monate gelagert werden und wurden bei Bedarf bei 37 °C aufgetaut. Zur weiteren Isolierung der RNA erfolgte die Zugabe von 200 µl kaltem Chloroform. Durch Vortexen von 15 sek wurden die Proben gemischt und anschließend für 2 bis 5 min bei RT inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4 °C. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die RNA durch Zentrifugieren für 10 min bei 12000 x g und 4 °C gefällt. Anschließend wurde das RNA-Pellet mit 500 µl 75%igem Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen. Nach dem Abnehmen des Überstandes und Trocknen des Pellets bei RT wurde die RNA in 25 µl DEPC-H₂O gelöst.

Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasyTM Mini Kit

Für manche Anwendungen (z.B. cDNA-Microarrays) wird RNA mit einer höheren Qualität benötigt. In einem solchen Fall wurde die Gesamt-RNA mit dem *RNeasyTM Mini-Kit* (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Um Kontaminationen durch DNA zu verhindern wurden die Proben zusätzlich einer DNase-Behandlung unterzogen. Diese erfolgte mit dem *RQ-DNaseI-Kit* (Qiagen) ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

3.3.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des DNA- oder RNA-Gehaltes einer Lösung wurde die Absorption eines verdünnten Aliquots in einer Quarzglasküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsspektrum von Nukleinsäuren, im Photometer gemessen.

1 A_{260} entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA
 40 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA oder RNA
 20 $\mu\text{g/ml}$ ss Oligonukleotid

Im Photometer lässt sich weiterhin auch der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Probe bestimmen. Hierzu wurde die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Durch das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} kann der Reinheitsgrad abgeschätzt werden. Saubere DNA-Lösungen weisen hier ein Verhältnis von 1,8 auf, RNA-Lösungen ein Verhältnis von 2,0. Durch Kontamination mit Proteinen werden diese Werte entsprechend kleiner.

Alternativ wurde der DNA- bzw. RNA-Gehalt einer Lösung mit einem *NanoDrop* Spektrophotometer bestimmt. Hierzu wurde 1 μl der Lösung gemessen.

3.3.3. Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktion von Plasmid-DNA

Zur spezifischen Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Klasse II verwendet. Die Restriktionsenzyme wurden in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer verwendet. Manche Enzyme benötigen für ihre volle Aktivität den Zusatz von BSA (Bovines Serum Albumin). Die Inkubation der Reaktion erfolgte bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) für 3 - 4 h oder über Nacht bei RT.

Ein typischer präparativer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Plasmid-DNA	1-5 µg
10x Reaktionspuffer	1 µl
10x BSA	5 µl
Restriktionsenzym	5-10 U
ddH ₂ O	ad 50 µl

Für eine analytische Restriktion wurde in der Regel 0,5-1 µg Plasmid-DNA eingesetzt und das Endvolumen auf 20 µl reduziert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von überhängenden komplementären oder glatten doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Für die Ligation sollte das molare Verhältnis von Vektor und *insert* etwa 1:5 betragen.

Standard-Ligationsansatz mit einem Endvolumen von 10 µl:

T4-DNA-Ligase	1 U
10x Ligase-Puffer	1 µl
Vektor-DNA	50 ng
<i>insert</i>	5-facher molarer Überschuss

Die Ligation erfolgte bei RT für min. 3 - 4 h oder über Nacht. Die Ligase kann durch Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktiviert werden.

3.3.4. Hitzeschocktransformation von Bakterien

Für Standardklonierungen wurde der *E. coli*-Stamm *DH5α* verwendet. Die Herstellung kompetenter *DH5α* erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983).

Zur Hitzeschocktransformation von Plasmiden in *E. coli* wurden 40 µl kompetente *DH5α* mit 5-10 µl Ligationsansatz gemischt und für 10–30 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min dem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach einer Inkubation von 30 bis 40 min bei 37 °C in LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die Bakterien abzentrifugiert (1 min 13000 rpm), das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten (mit Antibiotika) ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.3.5. Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde der *Jetstar Gel Extraction Kit* (Genomed) verwendet. Das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers.

3.3.6. Anlagern von Oligonukleotiden

Je 10 µl der beiden Oligonukleotide [100 pmol/µl] wurden mit 10 µl 10x TSE gemischt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. In einem Wasserbad (2,5 l) wurde der Ansatz für 5 min aufgekocht und anschließend in dem sich abkühlenden Wasserbad über Nacht inkubiert.

Für eine Ligation wurden 7,5µl angelagertes Oligonukleotid eingesetzt.

3.4. Expressionsanalysen

3.4.1. Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Die Gewinnung von cDNA aus RNA-Proben erfolgte durch *Reverse Transkription* mit Hilfe der *M-MLV-RT* (Invitrogen). Für die Reaktion wurden zwischen 0,8 und 2,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Diese wurde mit 5 µl dNTP-Mix [2 mM] und 0,5 µl *random primern* [0,5 µg/µl] gemischt und mit DEPC-H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 65 °C und kurzem Abkühlen auf Eis wurde der Reaktion ein Gemisch aus 4 µl 5x *First Strand Buffer*, 2 µl DTT [0,1 M] und 1 µl *Ribolock* (RNase-Inhibitor) zugegeben und für weitere 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktion 1 µl *M-MLV-RT* [200 U] zugemischt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 50 min bei 37 °C und folgenden 15 min bei 70 °C.

3.4.2. Semiquantitative PCR

Zur semiquantitativen Analyse von RNA wurde diese vor der Amplifikation zunächst wie unter 3.4.1. beschrieben in cDNA umgeschrieben. Die spezifische Amplifikation der cDNA erfolgte durch konventionelle PCR-Reaktionen. Dafür wurden pro Ansatz standardmäßig 2 µl cDNA eingesetzt. Die Temperatur- und Reaktionsbedingungen wurden empirisch ermittelt und an die Anforderungen der entsprechenden Oligonukleotide angepasst. Dabei war darauf zu achten, dass die Menge des Endproduktes im linearen Bereich lag, um eine semiquantitative Analyse der Genexpression zu gewährleisten. Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem T1 Thermocycler.

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>PCR-Programm:</u>		
cDNA	2 µl	94 °C	2 min	
10x PCR-Puffer	5 µl	94 °C	30 sek	} 25-30 Zyklen
50 mM MgCl ₂	1,5 µl	T _m -5 °C	30 sek	
dNTP-Mix [2mM]	5 µl	72 °C	1 min	
5'-Primer [10 µM]	1 µl	72 °C	10 min	
3'-Primer [10 µM]	1 µl	10 °C	∞	
<u>Taq-Polymerase</u>	<u>0,5 µl</u>			
ddH ₂ O	ad 50 µl			

3.4.3. quantitative Echtzeit-PCR: *Real Time PCR*

Sämtliche hierfür notwendigen Reagenzien wurden mit dem *qPCR Core Kit* (Eurogentec) bezogen. Die Durchführung erfolgte mit dem *ABI Prism 7700* (Applied Biosystems) bzw. mit dem *Mx3000* (Stratagene). Für die *Real Time PCR* wurde je nach experimentellem Ansatz 1 - 2 µl cDNA (qRT-PCR) oder 1 µl immunpräzipitiertes Chromatin (siehe 3.5.9.) eingesetzt. Jede Probe wurde grundsätzlich in Triplikaten gemessen.

Ein Reaktionsansatz setzte sich standardmäßig wie folgt zusammen:

Matrize	1-2 µl
10x Puffer	2,5 µl
5 mM dNTP Mix	1 µl
50 mM MgCl ₂	1,75 µl
SYBR [®] Green I	0,75 µl
5'-Primer [10 µM]	0,5 µl
3'-Primer [10 µM]	0,5 µl
<u>Hot GoldStar Polymerase</u>	<u>0,125 µl</u>
H ₂ O	ad 25 µl

PCR-Programm:

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

Die differentielle Expression eines Gens wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Aktivierung/Repression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Referenz}} \quad \text{mit} \quad \Delta Ct = Ct_{\text{Gen}} - Ct_{\text{Standard}}$$

Berechnung der Standardabweichung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte:

$$s = \sqrt{s_1^2 + s_2^2} \quad \text{mit } s_1: \text{Standardabweichung Gen}$$

$$s_2: \text{Standardabweichung Standard (z.B. Gapdh)}$$

Für die Funktion $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wurde anschließend der Fehlerbereich $2^{-\Delta\Delta Ct \pm s}$ berechnet. Der Fehler wurde dann folgendermaßen angegeben:

$$\text{Fehler} = (2^{-\Delta\Delta Ct + s}) - (2^{-\Delta\Delta Ct})$$

Bei Chromatin-Immunpräzipitationen wurde die Bindung von Proteinen an DNA in der Regel als **% des Input** angegeben:

$$\% \text{ des Input} = 2^{Ct(1\% \text{ Input}) - Ct(IP)} \times \% \text{ Input}$$

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte wie oben bereits beschrieben.

3.4.4. cDNA-Microarray

Die Microarray-Technologie bietet die Möglichkeit das Expressionsmuster (Transkriptom) von einzelnen Zellen, einer Zellpopulation, oder Gewebeproben, für eine Vielzahl von Genen zu erfassen und miteinander zu vergleichen. Ein Microarray basiert auf einem Träger (z.B. ein Objektträger aus Glas), auf welchem eine große Anzahl von cDNAs oder Oligonukleotiden aufgebracht sind. Diese so genannten *Spots* werden mit Hilfe eines Roboters an definierter Stelle auf den Träger übertragen. Zur Erfassung des Transkriptoms, muss zunächst aus den zu untersuchenden Proben und aus einer Referenzprobe die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA der Probe und der Referenz werden anschließend mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, z.B. *Cy3* und *Cy5* markiert, miteinander gemischt und mit dem Microarray-Objektträger hybridisiert. Mit Hilfe eines speziellen Scanners kann im Anschluss das Fluoreszenzmuster visualisiert und dokumentiert werden. Mit einer geeigneten Software können die unterschiedlichen Fluoreszenzmuster der Probe und der Referenz quantifiziert, miteinander verglichen und statistisch ausgewertet werden. Die Intensität der Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge an Transkripten im Ausgangsmaterial an. Ist daher das Fluoreszenzsignal der Probe für einen bestimmten *Spot* stärker oder schwächer als das der Referenzprobe, so weist dies auf eine im Vergleich zur Referenz veränderte Expression des entsprechenden Gens hin.

Versuchsaufbau

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Microarrays wurden am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg (MIT) in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Krause angefertigt. Auf den Microarrays befanden sich 11.552 cDNA-Spots der humanen cDNA-Library „*Human Sequence-Verified cDNA UniGene Gene Sets gf200, gf201u and gf202*“ (Invitrogen).

Grundsätzlich wurde jeder Microarray als technisches Replik (*Sandwich*-Hybridisierung mit zwei Objektträgern) und als *Flip colour*-Experiment durchgeführt. Bei einem *Flip colour*-Experiment wurden die Probe und die Referenz jeweils mit einem der beiden Fluoreszenzfarbstoffe markiert und die beiden Kombinationen auf getrennten Objektträgern analysiert. Jede cDNA wurde somit 4x mit dem gleichen *Spot* hybridisiert. Dadurch ließen sich Unterschiede in der Fluoreszenzintensität durch technische Mängel feststellen und konnten bei der Auswertung berücksichtigt werden.

RNA-Isolierung und Probenvorbereitung

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *RNeasyTM Mini Kit* der Firma Qiagen isoliert und zusätzlich mit RNase-freier DNase (Qiagen) von DNA-Kontaminationen befreit. Im Anschluss wurden je 30 - 60 µg der Gesamt-RNA durch Zugabe des gleichen Volumenanteils an 5 M Ammoniumacetats (pH 5,7) und des 4-fachen Volumenanteils an 100%igem Ethanol bei -80 °C gefällt. Durch Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde die RNA pelletiert, anschließend mit 70%igem Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen und das RNA-Pellet in 8 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

cDNA-Synthese und Fluoreszenzmarkierung

Für die cDNA-Synthese und die Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 wurde der *CyScribe cDNA Post Labelling Kit* (Amersham Biosciences) verwendet. Bei dieser Zwei-Schritt-Methode wird während der cDNA-Synthese zunächst Aminoallyl-dUTP anstelle von dUTP in die cDNA integriert. In einem zweiten Schritt erfolgt die kovalente Bindung der Cy-Farbstoffe an die Aminoallyl-modifizierte cDNA durch die Ausbildung von NHS-Esterbindungen.

Dazu wurden 8 µl Gesamt-RNA-Lösung zuerst mit 3 µl Oligo dT Primern gemischt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach weiteren 10 min bei RT wurden folgende Reagenzien zugegeben und gut gemischt:

- 4 µl 5x *CyScript*-Puffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl 20x dNTP Mix
- 1 µl aadUTP
- 1 µl *CyScript* Reverse Transkriptase

Zur Synthese der cDNA wurde der Reaktionsansatz für 90 min bei 42 °C in einem *Thermocycler* inkubiert. Die fertige cDNA wurde mit 2 µl 2,5 M NaOH für 15 min bei 37 °C inkubiert (Degradation der restlichen RNA) und im Anschluss mit 10 µl 2 M HEPES (freie Säure) neutralisiert und gut gemischt. Zur Aufreinigung der cDNA wurde der *QIAquick PCR Purification KitTM* nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Die Elution der cDNA erfolgte mit 2x 30 µl DEPC-H₂O (pH 8,0).

Zur Fluoreszenzmarkierung wurde die eluierte Probe zunächst in einer Vakuumzentrifuge auf ein Endvolumen von je 15 µl ankonzentriert. Der lyophilisierte Cy3 bzw. Cy5 Farbstoff wurde in 15 µl 0,1 M Natriumbikarbonat gelöst und mit der konzentrierten Probe gemischt. Die Ausbildung der Esterbindungen erfolgte lichtgeschützt für 1 h bei RT.

Die Probe wurde erneut über eine Säule mit dem *QIAquick PCR Purification KitTM* aufgereinigt und dabei auf der Säule mit der entsprechenden andersfarbig markierten Referenzprobe vereinigt. Die Elution der markierten Proben erfolgte in 2x 30 µl DEPC-H₂O (pH 8,0).

Vorbereitung der Microarray-Objektträger und Hybridisierung

Zur Denaturierung der cDNA-*Spots* wurden die Microarray-Objektträger für 3 min in entgastem ddH₂O gekocht und anschließend in 100 % Ethanol bei -20 °C fixiert. Durch Zentrifugation für 3 min bei 1500 rpm wurden die Objektträger getrocknet. Um unspezifische Bindungen der markierten Proben an die Objektträger zu vermeiden wurden diese zunächst für 20 bis 30 min bei 55 °C in warmem Blocking-Reagenz (1 % BSA/4,5x SSC/0,1 % SDS) abgesättigt, und nach dreiminütigem Waschen in entgastem ddH₂O durch Zentrifugation (3 min 1500 rpm) getrocknet.

Die markierten und vereinigten Proben wurden zusammen mit 20 µl *human Cot1 DNA* (1 mg/ml; Invitrogen) und 4 µl Poly A (5 µg/µl; Dr. Michael Krause) in einer Vakuumzentrifuge auf 26 µl ankonzentriert. Nach der Zugabe von 10 µl 20x SSC und 4 µl 2%igem SDS wurden die Proben für 2 min bei 95 °C denaturiert und direkt im Anschluss auf die geblockten und auf 55 °C vorgewärmten Microarray-Objektträger gegeben. Anstelle eines Deckgläschens, wurde ein zweiter Objektträger verwendet (*Sandwich*-Hybridisierung). Zur Inkubation wurde das „*Mircoarray-Sandwich*“ vorsichtig in ein vorgewärmtes 50 ml Reaktionsgefäß geschoben, welches mit einem mit 3x SSC/0,1 % SDS angefeuchteten und fusselfreien Papiertuch ausgelegt war. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55 °C in einem Ofen.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger von einander getrennt und 3x 5 min mit einer Stringenz von 0,1x SSC/0,1 % SDS und 2x 5 min mit einer Stringenz von 0,1x SSC (alles in entgastem ddH₂O) gewaschen. Zum Abschluss wurden die Objektträger kurz in entgastem ddH₂O gespült und durch dreiminütige Zentrifugation bei 1500 rpm getrocknet. Die gewaschenen und getrockneten Objektträger konnten entweder direkt gescannt oder für mehrere Wochen lichtgeschützt bei RT gelagert werden. Zum Einscannen und Auswerten der

Objektträger wurden der *ScanArray Express* und die zugehörige Software von *Perkin Elmer* verwendet.

Statistische Auswertung

Jede Microarray-Analyse wurde in drei unabhängigen Experimenten als *Flip colour*-Experiment und *Sandwich*-Hybridisierung durchgeführt. Die gesamte statistische Auswertung der Microarrays erfolgte durch Dipl. Biologin Birgit Samans (IMT Marburg). Für jeden *Spot* wurde der Median beider Fluoreszenzsignale und die entsprechende Hintergrundintensität ermittelt. Die auf den Hintergrund normalisierte Ratio beider Fluoreszenzintensitäten wurde berechnet und \log_2 transformiert. Um Unterschiede in den Fluoreszenzeigenschaften der beiden Farbstoffe auszugleichen und um verschiedene Objektträger miteinander vergleichen zu können wurden die Rohdaten wie in Yang *et al* (Yang et al., 2002) beschrieben standardisiert. Zusätzlich wurden die Daten wie auf www.r-project.org beschrieben normalisiert. Um differentiell exprimierte Gene heraus zu filtern wurde die **SAM** (*Significance Analysis of Microarrays*) Statistik verwendet (Tusher et al., 2001). Sämtliche Rohdaten wurden nach den Richtlinien von **MIAME** (*Minimal Information About a Microarray Experiment*) bei *Array Express* (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) archiviert und der Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

3.5. Biochemische Methoden

3.5.1. Gesamtzellysate

Gesamtzellysate (Proteinlysate) wurden durch Lyse der Zellen in TNN-Puffer gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die kultivierten Zellen wurden einmal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, anschließend in 1 ml 1x PBS mit einem Zellschaber geerntet und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Durch Zentrifugieren für 5 min bei 3000 rpm wurden die Zellen pelletiert. Bei Bedarf können die Zellpellets an dieser Stelle nach dem Schockgefrieren in fl. Stickstoff für längere Zeit bei -80 °C gelagert werden. Im Anschluss wurden die Zellen im 10-fachen ihres Volumens in TNN-Puffer aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren (20x) gut resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis und folgendem kurzen Vortexen der Proben, wurden die lysierten Zellen für 10 min bei 14000 rpm sedimentiert. Der Überstand (Ganzzellysat) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und direkt weiterverwendet.

3.5.2. Zellkernextrakte

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. 4°C durchgeführt. Um Proteinextrakte aus Nuklei zu erhalten wurden die kultivierten Zellen zunächst mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und anschließend in 1 ml 1x PBS mit einem Zellschaber in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geerntet.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm pelletiert und anschließend in 1 ml Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines *Douncers* (tight) lysiert und die Nuklei im Anschluss durch Zentrifugieren für 5 min bei 2800 rpm pelletiert. Die Lyse der Nuklei erfolgte in 200 – 300 µl (pro 10 cm Kulturschale) Puffer B für 20 min auf Eis. Durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm wurde der Zellkernextrakt (Überstand) von den restlichen Zellfragmenten getrennt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

3.5.3. Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation können Proteine und Proteinkomplexe aus einer Proteinlösung aufgereinigt und nachgewiesen werden. Diese Methode dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen und Proteininteraktionen *in vivo*.

Zur Präzipitation des gewünschten Proteins wurde das Proteinlysate (Ganzzelllysate) bzw. der Zellkernextrakt mit 1-3 µg eines spezifischen Antikörpers gemischt und über Nacht bei 4 °C auf einem Rad inkubiert. Durch Zugabe von 30 µl Protein-A bzw. Protein-G-Sepharose (1:1 *slurry* in 1x PBS) und erneuter Inkubation für 1 bis 2 h bei 4 °C wurden die Antikörper-Protein-Komplexe an Sepharose-*beads* gekoppelt. Im Anschluss wurden diese 5x mit TNN-Puffer gewaschen (1 min 3000 rpm 4°C). Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand mit einer *Hamilton*-Pipette vollständig abgesaugt und die Sepharose-*beads* in 2x ESB aufgenommen. Durch Kochen der Proben für 5 min wurden die Antikörper-Protein-Komplexe von den Sepharose-*beads* eluiert. Die Proben konnten direkt auf einem SDS-Polyacrylamidgel (3.5.5.) aufgetrennt und durch Western-Blot (3.5.6.) detektiert oder für längere Zeit bei -20 °C gelagert werden.

Als Ladekontrollen (*Input*) dienten sofern nicht anders angegeben 10 % des eingesetzten Lysates bzw. Extraktes.

Co-Immunpräzipitation

Co-Immunpräzipitationen dienen zum spezifischen Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Die Immunpräzipitation wurde zunächst wie oben beschrieben durchgeführt und die Probe auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis des Interaktionspartners erfolgte durch Western-Blot, indem die Membran mit einem für den Interaktionspartner spezifischen Antikörper inkubiert wurde.

3.5.4. Proteinbestimmung nach *Bradford*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Lysaten aus Zellen erfolgte mit der von *Bradford* beschriebenen Methode. Anhand einer BSA-Referenzgeraden konnte der Proteingehalt der untersuchten Proteinlösung abgelesen werden. Zur Erstellung der BSA-Referenzgeraden wurden je 1, 2, 4, 6 und 8 µl einer 1 mg/ml konzentrierten BSA-Lösung mit

150 mM NaCl auf ein Volumen von 100 µl gebracht und anschließend mit 1 ml *Bradford*-Reagenz gemischt. Parallel wurde in der gleichen Weise mit 1 und 2 µl der zu messenden Proteinlösung verfahren. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 min bei RT wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm im Vergleich zu einer Leerprobe photometrisch bestimmt.

3.5.5. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlösungen wurden in vertikalen eindimensionalen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen nach *Laemmli* (1970) aufgetrennt. Die Proben passierten zunächst ein Sammelgel mit einer großen Polyacrylamid-Porenweite von 5 %. Beim anschließenden Durchlaufen des kleinporigeren Trenngels (8 - 14 %) wurden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Für eine gute Auftrennung im großen Molekulargewichtsbereich wurden niedrigprozentige Gele verwendet. Eine gute Auftrennung von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht, wurde durch die Verwendung von höher prozentigen Gelen erreicht. Beispiel für die Zusammensetzung eines Sammel- und Trenngels:

<u>5 % Sammelgel</u>		<u>10 % Trenngel</u>	
Bis-Acrylamid	1,6 ml	Bis-Acrylamid	5,0 ml
0,5 M Tris pH 6,8	1,4 ml	1,5 M Tris pH 8,8	3,7 ml
20 % SDS	50 µl	20 % SDS	75 µl
10 % APS	50 µl	10 % APS	100 µl
Temed	10 µl	Temed	10 µl
ddH ₂ O	6,9 ml	ddH ₂ O	6,1 ml

Vor dem Auftragen auf das Gel, wurden die Proteinproben in 3x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte durch Western-Blot. Die Größe der Proteine konnte anhand eines mit aufgetrennten Größenstandards abgeschätzt werden.

3.5.6. Western-Blot

Beim Western-Blot wurden die verschiedenen Komponenten einer Proteinlösung zunächst über eine SDS-PAGE (3.5.5.) elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der transferierten Proteine erfolgte mit spezifischen Erstantikörpern und Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpern.

Elektrophoretischer Transfer auf PVDF-Membran

PVDF-Membranen besitzen eine sehr hohe Bindekapazität für Proteine und eignen sich besonders gut für einen Nachweis durch Chemilumineszenz. Vor Gebrauch wurde die

PVDF-Membran zunächst für mindestens 1 min in Methanol equilibriert. Der elektrophoretische Transfer auf die Membran erfolgte wahlweise im *Nass*- oder *Semi-Dry*-Verfahren. Dabei war darauf zu achten, dass sich zwischen den einzelnen Komponenten des Blots keine Luftblasen bildeten.

Nass (Tank)-Blot

Zunächst wurde eine PVDF-Membran in der Größe des Gels in Methanol inkubiert und anschließend in *Blotting*-Puffer gewaschen. Ebenso wurde *Whatman*-Papier auf die Größe des Gels zugeschnitten und in *Blotting*-Puffer kurz inkubiert. Der Aufbau des Blots erfolgte von der Anode zur Kathode in einem Plastikrahmen in folgender Reihenfolge: 1 Schwammtuch, 1 *Whatman*-Papier, PVDF-Membran, Gel, 1 *Whatman*-Papier, 1 Schwammtuch. Der Plastikrahmen wurde zwischen Anode und Kathode fixiert und zusammen mit einem Eisakku (zur Kühlung) in eine vollständig mit *Blotting*-Puffer gefüllte *Blot*-Kammer getaucht. Der Transfer erfolgte für 75 min bei 300 mA.

Semi-Dry-Blot

Beim diesem *Blotting*-Verfahren wurden zunächst je drei *Whatman*-Papiere in der Größe des Gels in Anodenpuffer I, Anodenpuffer II oder Kathodenpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran wurde in Methanol equilibriert und anschließend in Anodenpuffer I gewaschen. Der Aufbau des Blots erfolgte von der Anode zur Kathode in folgender Reihenfolge:

3 *Whatman*-Papiere in Anodenpuffer II

3 *Whatman*-Papiere in Anodenpuffer I

PVDF-Membran in Anodenpuffer I

Gel

3 *Whatman*-Papiere in Kathodenpuffer

Der Transfer erfolgte für 90 min bei 25 V.

Ponceau S-Färbung

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran nach dem Blotten mit Ponceau S gefärbt. Die Anfärbung mit Ponceau S ist nicht permanent und daher mit dem eigentlichen Nachweisverfahren kompatibel.

Für die Färbung wurde die Membran direkt nach dem Transfer kurz in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit entsalztem Wasser gewaschen. Nach der Transferkontrolle wurde die Membran durch weiteres Waschen vollständig entfärbt.

Nachweisreaktion

Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte mit Chemilumineszenz-kombinierten immunologischen Nachweisreaktionen. Um unspezifische Bindungen der Nachweisreagenzien an die Membran zu verhindern, wurde diese zunächst in 3%igem Milchpulver (in TBST) für mindestens 30 min bei RT und unter leichtem Schütteln

abgesättigt. Die Inkubation mit Erstantikörper erfolgte ebenfalls in 3%igem Milchpulver und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Sofern nicht anders angegeben, wurde der Erstantikörper 1:1000 verdünnt eingesetzt. Anschließend wurde die Membran durch dreimaliges Waschen in TBST (1x 10 min, 2x 5 min) vom Erstantikörper befreit. Als Zweitantikörper wurde standardmäßig ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter anti-Maus bzw. anti-Protein-A-Antikörper 1:5000 in TBST verwendet. Nach einer Inkubation von 1 - 2 h bei RT wurde die Membran erneut 3x mit TBST gewaschen (1x 10 min, 2x 5 min) und sofort entwickelt. Zum Entwickeln wurde die Membran für mindestens 1 min in frisch angesetzter Entwicklerlösung (Phototope HRP Western Blot Detection System; Cell Signalling) inkubiert und im Anschluss in Haushaltsfolie eingeschlagen. Die Dokumentation der Nachweisreaktion erfolgte durch Exposition eines ECL-Films.

3.5.7. Kinase-Assay

Der Kinase-Assay wurde dazu verwendet, um die mit Cyclinen assoziierte Kinase-Aktivität nachzuweisen. Dazu wurde aus kultivierten Zellen zunächst ein Gesamtzelllysat (siehe 3.5.1.) gewonnen und das zu untersuchende Cyclin immunpräzipitiert (siehe 3.5.3.). Die Sepharose wurde 4x mit 200 µl TNN-Puffer und anschließend mit 2x 800 µl Kinase-Assay-Puffer gewaschen (je 1 min bei 3000 rpm und 4 °C). Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose in 35 µl Kinase-Assay-Puffer aufgenommen und mit 2 µl ATP [100 µM] und 20 µCi [γ^{32} -P]-ATP inkubiert. Zusätzlich wurden 5 µl Histone-H1 [1 mg/µl] als Substrat zugegeben. Der Ansatz wurde für 15 min bei 30 °C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 40 µl 2x ESB und Kochen für 5 min gestoppt. Durch Zentrifugation wurde die Sepharose sedimentiert und 20 µl des Überstandes auf einem 14%igen SDS-Polyacrylamidgel (3.5.5.) aufgetrennt. Die Detektion des durch die Kinase phosphorylierten Histone-H1 erfolgte durch die Exposition eines Röntgenfilms.

3.5.8. Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Doppelsträngige DNA-Fragmente und Plasmid-DNA wurden sowohl zur Analyse als auch zur präparativen Isolierung in nativen TAE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Konzentration an Agarose richtete sich nach der Größe der erwarteten Fragment- bzw. Plasmidgrößen. Zur Visualisierung der DNA wurde der erkaltenden Gelmatrix je nach Volumen 2,5-5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugemischt. Die Dokumentation erfolgte fotografisch nach Anregung durch UV-Licht.

3.5.9. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Durch Chromatin-Immunpräzipitation kann *in vivo* die Assoziation von Proteinen an spezifische Bereiche der DNA nachgewiesen werden. Dazu werden die an die DNA gebundenen Proteine und Proteinkomplexe zunächst mit der DNA reversibel kreuzvernetzt. Nach der Isolierung des Chromatins wird dieses durch Ultraschallbeschallung (Sonifizieren) fragmentiert. Durch Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper werden die gewünschten Proteine und die daran gebundene DNA isoliert. Der Nachweis des gebundenen DNA-Fragments erfolgt durch PCR mit Hilfe spezifischer Primer.

Das in dieser Arbeit verwendete modifizierte Protokoll basiert auf dem in Wells und Kollegen beschriebenen Protokoll (Wells et al., 2000). Sofern nicht anders angegeben, erfolgten sämtliche Arbeitsschritte aus Eis bzw. bei 4 °C.

Kreuzvernetzung und Chromatin-Isolierung

Zur Kreuzvernetzung von Proteinen und DNA wurde Formaldehyd verwendet, da diese Form des *cross-links* reversibel ist. Dazu wurden pro 20 ml Kulturmedium tropfenweise 540 µl Formaldehyd direkt in das Medium zu den Zellen gegeben und für 10 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 ml 1 M Glycin gestoppt und die Zellen für weitere 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und in 6 ml 1x PBS (+ PMSF) mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Bei Bedarf konnten die Zellpellets an dieser Stelle nach dem Schockgefrieren in fl. Stickstoff für längere Zeit bei -80 °C gelagert werden.

Für die weitere Chromatin-Isolierung wurden die Zellpellets im 10-fachen ihres Volumens in Lyse-Puffer (+ PMSF/+ PI) resuspendiert und für 10 min inkubiert. Nach dem Transfer der Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden die Zellkerne für 5 min bei 2800 rpm sedimentiert. Die Zellkerne von 1×10^7 (BJ-ET) bzw. 2×10^7 (T98G) Zellen wurden in 800 µl Kernlyse-Puffer (+ PMSF/+ PI) aufgenommen, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall behandelt. Die Beschallung wurde in 15 ml Reaktionsgefäßen aus Polystyrol durchgeführt. Die zuvor empirisch ermittelten Sonifizierungsbedingungen richteten sich nach dem Zelltyp. Die Bedingungen sind im Einzelnen in Tabelle 3.2 angegeben.

Tabelle 3.2: Sonifizierungsbedingungen für die verschiedenen Zelltypen.

	BJ-ET	T98G
Mikrospitze	1/8'' (3mm)	1/8'' (3mm)
Amplitude	10 %	25 %
Schallzeit	6x 10 sek	12x 10 sek
Pause	45 sek	45 sek

Nach der Sonifizierung sollte die Lösung klar sein. Die chromatinhaltige Lösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Chromatin-Lösung 1:10 mit IP-Verdünnungspuffer (+ PMSF/+ PI) verdünnt.

Zur Kontrolle der Größe der erhaltenen Chromatinfragmente wurden 50 µl der unverdünnten Chromatin-Lösung über Nacht mit 2 µl NaCl (5 M) und 1 µl RNase A bei 65 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch diese Behandlung wurden die Kreuzvernetzungen zwischen DNA und Proteinen aufgehoben. Zusätzlich wurde die Lösung mit Mineralöl überschichtet, um eine Kondensation am Gefäßdeckel zu vermeiden. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 2 µl Proteinase K [10 mg/ml] und die Probe wurde für weitere 3 h bei 55 °C inkubiert. Zur Kontrolle der Fragmentgrößen wurde die Probe auf einem 1,2%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Größe der Chromatinfragmente sollte zwischen 500 und 1000 bp liegen.

Preclear

Um unspezifische Bindungen von DNA und Proteinen an die Sepharose-*beads* zu vermeiden, wurde die benötigte Menge an Sepharose vor dem Gebrauch abgesättigt (geblockt). Hierzu wurden 0,125 g Protein-A-Sepharose zunächst mit 5 ml IP-Verdünnungspuffer equilibriert und für 2 min bei 1000 rpm sedimentiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde die Sepharose in 2,5 ml Blocking-Puffer aufgenommen und für mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Durch erneute Zentrifugation für 2 min bei 1000 rpm wurde die Sepharose sedimentiert und im Anschluss in 0,5 ml Blocking-Puffer aufgenommen. Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden zusätzlich 10 µl Natriumazid (5%) zugesetzt.

Durch die Präinkubation der Chromatinlösung, dem so genannten *Preclear*, mit geblockter Protein-A-Sepharose wurden weitere unspezifische Bindungen abgesättigt. Dazu wurde die verdünnte Chromatinlösung mit 60 µl geblockter Protein-A-Sepharose pro 2ml für 2x 45 min auf einem Rotator bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 1000 rpm sedimentiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Immunpräzipitation und Ladekontrolle (Input)

Für eine Immunpräzipitation wurden 2 ml der verdünnten und geblockten Chromatin-Lösung eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Antikörper variierte in der Regel zwischen 4 und 8 µg und hing vom jeweiligen Antikörper ab (siehe 2.10.2.). Als Ladekontrolle dienten 20 µl (1 %) der verdünnten und geblockten Chromatinlösung.

Das Chromatin-Antikörper-Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator und am nächsten Tag für weitere 1 bis 2 h mit 40 µl geblockter Protein-A-Sepharose inkubiert. Durch Zentrifugation für 1 min bei 3000 rpm wurde die Sepharose sedimentiert und 7x mit je 1 ml LiCl-Waschpuffer (+ PMSF/+ PI) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer *Hamilton*-Pipette vollständig abgenommen. Zur Elution der immunpräzipitierten Chromatin-Protein-Komplexe wurde die Sepharose in 120 µl Elutionspuffer (+ PMSF/+ PI) aufgenommen und für 15 min bei RT unter starkem Schütteln inkubiert. Durch Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm wurde das Eluat von der Sepharose separiert und 100 µl davon in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde mit weiteren 150 µl Elutionspuffer wiederholt, 150 µl abgenommen und mit dem ersten Eluat kombiniert (Endvolumen 250 µl).

Reverser Crosslink und Aufreinigung der Chromatinfragmente

Zur Auflösung der Kreuzvernetzungen zwischen Chromatin (*reverser Crosslink*) und Proteinen wurden 250 µl des Eluats mit 10 µl 5 M NaCl gemischt. Die Input-Probe wurde zunächst mit Elutions-Puffer auf 250 µl aufgefüllt und dann ebenfalls mit 10 µl 5 M NaCl versetzt. Nach dem Überschichten mit Mineralöl, wurden die Proben über Nacht bei 65 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von je 2 µl Proteinase K [10 mg/ml] wurden die Proben für weitere 3 h bei 55 °C inkubiert.

Zur Aufreinigung wurden die Proben zunächst einer Phenol/Chloroform-Behandlung unterzogen. Dazu wurden 230 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 230 µl Phenol/Chloroform 15 sek durch Vortexen gemischt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm wurden 200 µl der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Anschluss mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) ein weiteres Mal aufgereinigt. Die Aufreinigung über die Säulen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Durch die Elution mit Puffer EB (Qiagen), wurden 50 µl immunpräzipitierte DNA-Fragmente erhalten.

Nachweis spezifischer DNA-Fragmente

Der Nachweis spezifischer DNA-Fragmente erfolgte durch quantitative *Real Time* PCR unter Verwendung promotorspezifischer Primer. Die Durchführung der PCR erfolgte wie unter 3.4.3. beschrieben. Als Matrize wurde grundsätzlich 1 µl der von der Säule eluierten Probe eingesetzt.

4 ERGEBNISSE

4.1. Identifizierung LIN-9 regulierter Gene

Die Struktur des LIN-9 Proteins gab wenig Aufschluss über eine mögliche Funktion von LIN-9. So verfügt LIN-9 z.B. über keine bekannten DNA-Bindedomänen, oder über Motive, die eine enzymatische Aktivität von LIN-9 vermuten ließen. Aus einer vorhergehenden Arbeit war jedoch bekannt, das LIN-9 zusammen mit dem Tumorsuppressor pRB bei der Transaktivierung bestimmter Gene kooperiert. Zudem weiß man, dass LIN-9 im Zellkern lokalisiert ist und an Chromatin assoziiert (Gagrica et al., 2004). Die LIN-9 Homologe in *D. melanogaster* und *C. elegans* sind Bestandteile von pRB/E2F-Komplexen, für welche kürzlich eine Rolle in der Regulation der Expression bestimmter Gene beschrieben wurde (siehe Einleitung). Dies lässt eine Funktion von LIN-9 in der Genregulation vermuten. Primäres Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung LIN-9 regulierter Gene, um so Anhaltspunkte über mögliche Funktionen von LIN-9 zu erhalten. Dazu sollten die Genexpressionsmuster LIN-9 defizienter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen in cDNA-Microarray-Analysen verglichen werden.

Die Wahl des Zellsystems

Für LIN-9 konnte gezeigt werden, dass es in BJ-ET Zellen, dabei handelt es sich um hTERT-immortalisierte primäre humane Fibroblasten (Voorhoeve and Agami, 2003), einen Tumorsuppressor-Phänotyp und eine damit assoziierte Rolle im pRB-Signalweg aufweist (Gagrica et al., 2004). Daher eignete sich dieses Zellsystem besonders gut zur Suche nach LIN-9 regulierten Genen, um so möglicherweise die tumorsuppressiven Eigenschaften von LIN-9 erklären zu können.

Ein weiterer Vorteil dieses Zellsystems ist, dass diese primären Zellen aufgrund der Expression der Reversen-Transkriptase Untereinheit der Telomerase (hTERT) in Kultur unbegrenzt proliferieren können und dabei ihre phänotypischen und funktionellen Charakteristika beibehalten. Weiterhin exprimieren diese Zellen stabil den so genannten *ekotrophen Rezeptor* (Eco^R). Dadurch lassen sich die Zellen durch retrovirale Infektion mit murinen Viren genetisch manipulieren.

4.1.1. Depletion von LIN-9 in humanen Zellen durch RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt einen im Tier- und Pflanzenreich natürlich vorkommenden Mechanismus, bei dem das Einschleusen doppelsträngiger RNA (dsRNA) zu einer sequenzspezifischen posttranskriptionellen Genrepression führt (Sharp, 1999). Die dsRNA, welche homolog zu der Sequenz des reprimierten Gens ist, wird durch den RISC-Komplex erkannt und in kleinere RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-22

Nukleotiden gespalten. Diese so genannten siRNAs (*small interfering RNAs*) vermitteln eine effiziente und sequenzspezifische Degradation der Ziel-mRNA durch den RISC-Komplex (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001c).

Für den Laborbedarf ist das Einschleusen dsRNA weniger geeignet, da dies oft zu zytotoxischen Reaktionen führt (Hunter et al., 1975). Um dies zu umgehen werden daher anstelle dsRNA kleine synthetische siRNAs (21-22 Nukleotide) in die Zellen eingeschleust (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001c). Diese exogen eingebrachten siRNAs werden in Säugerzellen jedoch nicht amplifiziert und können daher nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden. Dadurch bleibt die durch exogene siRNAs vermittelte Genrepression transient und auf die entsprechende Zelle beschränkt. Für viele Untersuchungen ist aber eine stabile Reduktion der Genexpression über einen längeren Zeitraum nötig. In den letzten Jahren wurden daher vektorbasierende RNAi-Systeme entwickelt, welche die stabile Expression von so genannten shRNAs (*short hairpin RNAs*) ermöglichen (Brummelkamp et al., 2002a; Brummelkamp et al., 2002b). Diese shRNAs werden in der Zelle sofort in funktionelle siRNA-Moleküle gespalten. Die Plasmide pSuper und pSuperior (OligoEngine) bilden die Basis eines solchen RNAi-Systems und wurden auch in dieser Arbeit verwendet.

Konstruktion eines LIN-9-spezifischen shRNA-Plasmids zur retroviralen Infektion

Eine für humanes LIN-9 spezifische shRNA-Sequenz wurde nach den von Reynolds (Reynolds, 2004) beschriebenen Kriterien und mit Hilfe eines siRNA-Selektionsprogramms (Yuan, 2004) bestimmt. Diese Sequenz ist komplementär zur Position 902 – 924 in humanem LIN-9 (NCBI Accession Nr. BC045625). Im Folgenden wird diese Sequenz als Sequenz #1 zitiert. Zur Kontrolle wurde eine bereits publizierte shRNA-Sequenz (Sequenz #2; (Gagrica et al., 2004)) mitgeführt. Diese Sequenz ist komplementär zur Position 1794 – 1816 in humanem LIN-9 (NCBI Accession Nr. BC045625).

In Vorversuchen wurden HeLa und Saos-2 Zellen mit den verschiedenen gegen LIN-9 gerichteten shRNA-Konstrukten bzw. mit den entsprechenden Kontrollvektoren transfiziert. Nach 3 Tagen Selektion mit je 1 µg/µl Puromycin wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und die Expression von lin-9 in RT-PCRs analysiert. Wie in Abb. 4.1. A zu erkennen, führen beide shRNA-Sequenzen zu einer spezifischen Reduktion der lin-9 Expression in HeLa und Saos-2 Zellen. Die Expression des Haushaltsgens β-Aktin wurde dadurch nicht beeinflusst. Die Kombination beider Sequenzen führte zu keiner weiteren Verstärkung des Effekts. Um zu überprüfen, ob die shRNA-vermittelte Reduktion der lin-9 Expression auch zu einer Abnahme der LIN-9 Proteinmenge führt, wurden aus transfizierten und selektionierten HeLa Zellen Gesamtzelllysate gewonnen. Aus diesen wurde LIN-9 mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und anschließend im Western Blot detektiert (Abb. 4.1. B). Dabei zeigte sich, dass beide shRNA-Sequenzen im Vergleich zu Kontrollzellen, zu einer signifikanten Abnahme der LIN-9 Proteinmenge führten.

Die Vorversuche zeigten, dass Sequenz #1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene zu einer stärkeren Repression der LIN-9 Expression als Sequenz #2 führte. Daher wurde für die weiteren Versuche in BJ-ET Zellen standardmäßig Sequenz #1 verwendet.

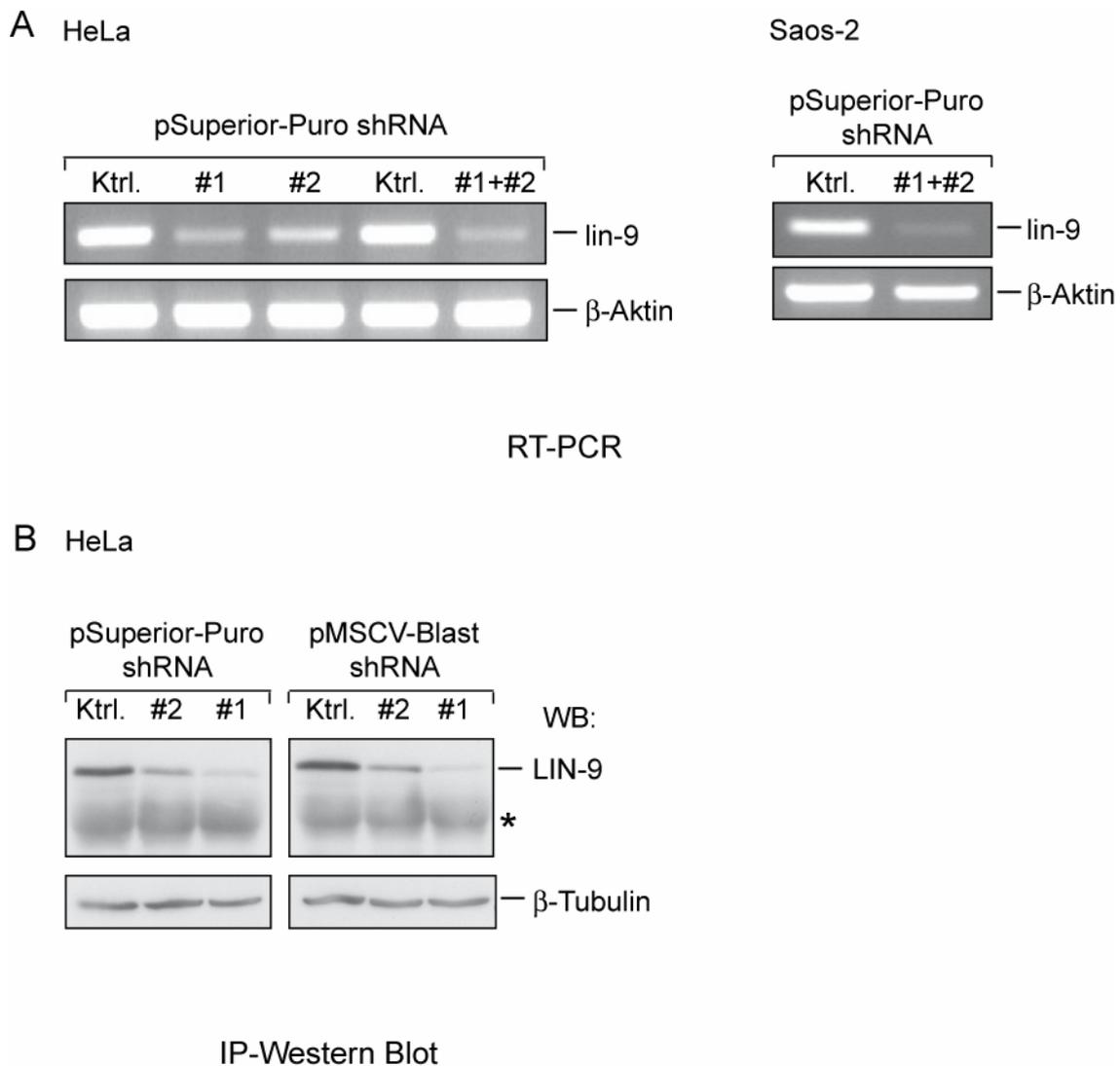


Abb. 4.1.: Depletion von LIN-9 in verschiedenen humane Zelllinien. HeLa bzw. Saos-2 Zellen wurden mit Hilfe der Kalziumphosphat-Präzipitation mit den verschiedenen shRNA-Konstrukten bzw. den entsprechenden Kontrollen transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA isoliert bzw. Gesamtzelllysate gewonnen. **(A)** Für die RT-PCR wurden 2,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die cDNA im Anschluss mit lin-9 bzw. β-Aktin spezifischen Primern amplifiziert. Die Proben wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. **(B)** Der Nachweis von LIN-9 auf Protein-Ebene erfolgte mit IP-Western Blot. Zur Kontrolle wurde die Expression von β-Tubulin im direkten Western Blot analysiert. *: schwere Kette des Antikörpers.

4.1.2. Genexpressionsanalyse LIN-9 defizienter Zellen

Das Genexpressionsmuster LIN-9 defizienter Zellen wurde mit Hilfe von cDNA-Microarrays analysiert (siehe 3.4.4.). Dabei wurde das Expressionsmuster von LIN-9 depletierten BJ-ET Zellen mit dem Kontroll-infizierter BJ-ET Zellen verglichen. Dafür wurden die Zellen mit der gegen LIN-9 gerichteten shRNA-Sequenz #1 bzw. mit einem Kontrollvirus infiziert und im Anschluss für 4 Tage mit 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Blasticidin selektiert (siehe 3.1.11.). Die Effizienz der LIN-9 Depletion wurde sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene überprüft. Dazu wurde aus den selektierten Zellen die Gesamt-RNA isoliert bzw. Gesamtzelllysate gewonnen. Der Nachweis der LIN-9 Depletion auf RNA-Ebene erfolgte durch quantitative RT-PCR Analysen (qRT-PCR; siehe 3.4.1. und 3.4.3.) unter Verwendung LIN-9 spezifischer Primer, wobei die Expression von LIN-9 auf die Expression des Haushaltsgens S14 normalisiert wurde. Wie in Abb. 4.2. A zu erkennen, wurde durch die Infektion mit der shRNA #1 eine starke Repression der lin-9 Expression erzielt. Immunpräzipitationen aus Gesamtzelllysaten LIN-9 depletierter Zellen und Kontrollzellen zeigten im Western Blot, dass mit dieser Methode auch eine effiziente Reduktion der endogenen LIN-9 Proteinexpression erzielt wurde (Abb. 4.2. B).

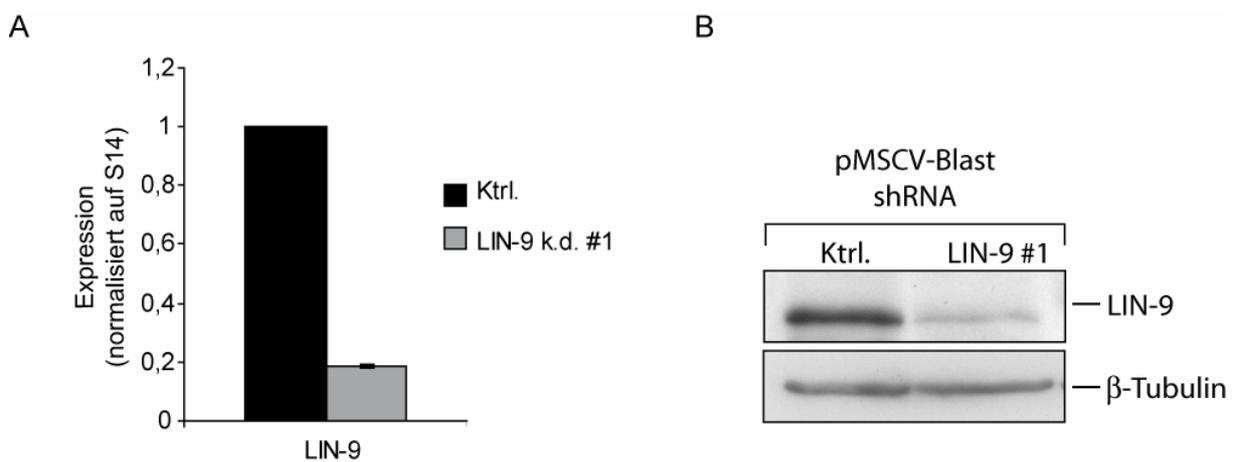


Abb. 4.2.: Depletion von LIN-9 in BJ-ET Zellen durch retrovirale Infektion. BJ-ET Zellen wurden mit einem retroviralen shRNA-Vektor (Sequenz #1) bzw. mit einem Kontrollvektor infiziert und im Anschluss für 4 Tage mit 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Blasticidin selektiert. **(A)** Aus den selektierten Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und 2,5 μg RNA in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis der LIN-9 Expression mit Hilfe von qRT-PCRs erfolgte in Triplikaten mit Hilfe sequenzspezifischer Primer. Die Expression von LIN-9 wurde auf die Expression von S14 normalisiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Triplikate wieder. **(B)** Aus den infizierten Zellen wurden Gesamtzelllysate gewonnen und LIN-9 mit Hilfe eines LIN-9 spezifischen Antikörpers immunpräzipitiert. Die Detektion von immunpräzipitiertem LIN-9 erfolgte im Western-Blot. Zur Kontrolle wurde die Expression von β -Tubulin im direkten Western Blot analysiert.

Für den cDNA-Microarray wurde die RNA von LIN-9 depletierten Zellen bzw. Kontrollzellen direkt im Anschluss an die Selektion (4 Tage mit 5µg/µl Blasticidin) mit Hilfe des RNeasy Kits (Qiagen) isoliert, anschließend in cDNA umgeschrieben und mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert (siehe 3.4.4.). Abbildung 4.3. zeigt einen schematischen Überblick des Versuchsaufbaus. Auf den Microarray-Trägern, waren jeweils 11.552 humane cDNAs der cDNA-Library „*Human Sequence-Verified cDNA UniGene Set; Gene Sets gf200, gf201u and gf202*“ der Firma Invitrogen fixiert. Der Microarray wurde sowohl als technisches Replik (Hybridisierung von zwei Objektträgern mit der gleichen Probe) als auch als so genanntes *Flip colour*-Experiment (Umkehrung der Farbmarkierung von Probe und Referenz) durchgeführt und in drei voneinander unabhängigen Experimenten (biologische Replika) wiederholt. Damit wurden insgesamt 12 Hybridisierungen durchgeführt.

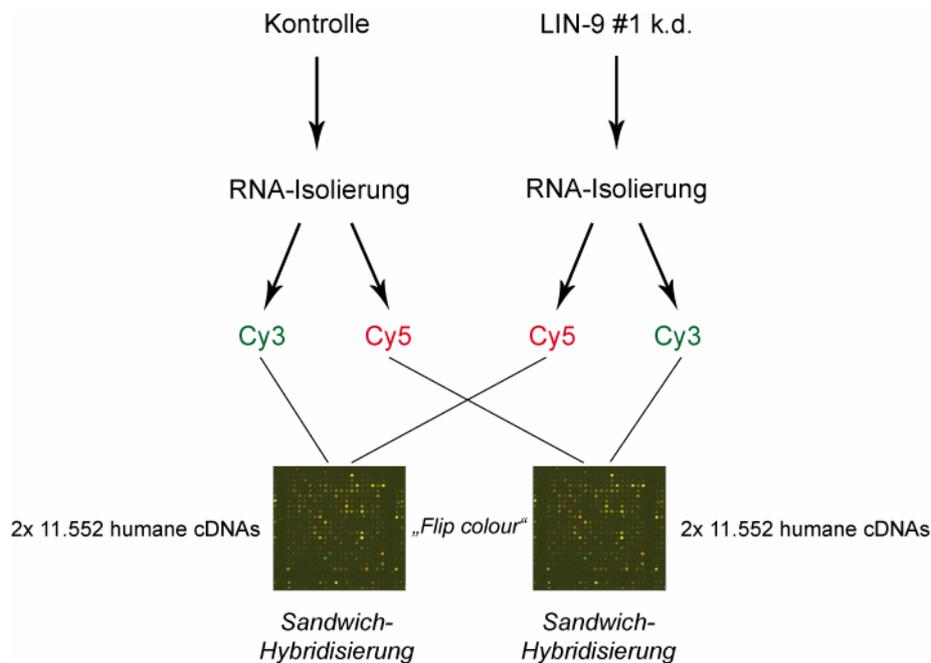


Abb. 4.3.: Versuchsaufbau zur cDNA-Microarray-Analyse LIN-9 depletierter Zellen. BJ-ET Zellen wurden mit einem gegen LIN-9 gerichteten shRNA-codierenden Virus (shRNA #1) bzw. mit einem Kontroll-Virus infiziert. Aus den vollständig selektionierten Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Cy3- bzw. Cy5-Farbstoffen markiert. Die Hybridisierungen erfolgten als *Flip colour* und *Sandwich*-Hybridisierung. Auf den Microarray-Trägern waren jeweils 11.552 humane cDNAs fixiert. k.d.: *knock down*.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Dipl. Biol. Birgit Samans (IMT; Philipps-Universität Marburg).

Für jede fixierte cDNA wurde die mittlere Signalintensität des Cy3 und des Cy5 Signals bestimmt, auf die zugehörige Hintergrundintensität abgeglichen und anschließend zur Basis 2 logarithmiert (M-Wert). Die *Sandwich*-Hybridisierungen und *Flip colour*-Experimente dienten als Qualitätskontrolle und zur Minimierung der Fehler durch technische Mängel. Jede cDNA wurde pro Experiment 4x mit der gleichen Probe hybridisiert. War das Verhältnis zwischen der Cy3-Signalintensität und der Cy5-Signalintensität nicht reproduzierbar, wurde diese cDNA aus der Auswertung ausgeschlossen. Um die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe auf einander abzugleichen und um die 3 unabhängigen Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten nach dem von Yang und Kollegen beschriebenen Prinzip normalisiert ((Yang et al., 2002) <http://www.r-project.org/>). Die Expressionsänderung eines Gens (X-fache Änderung) wurde durch Delogarithmierung des M-Wertes der cDNA berechnet.

Durch die Anwendung der SAM-Statistik (*Significance Analysis of Microarrays*) wurden differenziell exprimierte Gene identifiziert (Tusher et al., 2001). Bei dieser Signifikanz-Analyse wird jeder cDNA ein Wert zugeordnet, welcher definiert ist, als die Expressionsänderung im Verhältnis zur Standardabweichung des für jede cDNA berechneten Mittelwertes dieser Expressionsänderungen. Aus diesen Werten wird anhand eines Permutationsverfahrens die Fehlerwahrscheinlichkeit (FDR: *False Discovery Rate*) ermittelt (Benjamini and Hochberg, 1995). Die FDR ist der erwartete prozentuale Anteil an zufällig signifikanten cDNAs. Der daraus abgeleitete q-Wert [%] beschreibt die minimale FDR unter welcher eine cDNA als signifikant eingeordnet wird. Als differentiell exprimierte Gene wurden cDNAs betrachtet, welche einen M-Wert $\geq \pm 0,5$, einen A-Wert ≥ 7 , und einen q-Wert ≥ 5 % aufweisen. Ein M-Wert von $\geq \pm 0,5$ entspricht einer mindestens $\pm 1,41$ -fachen Änderung der Genexpression im Vergleich zur Referenz.

Das Genexpressionsprofil im Vergleich zur Referenz wird als so genannter MA-Plot dargestellt. Dabei werden die M-Werte jeder cDNA gegen die A-Werte aufgetragen, welche als arithmetisches Mittel der Intensitäten des Cy3 und des Cy5 Signals eines jeden Punktes definiert werden (Abb. 4.4.).

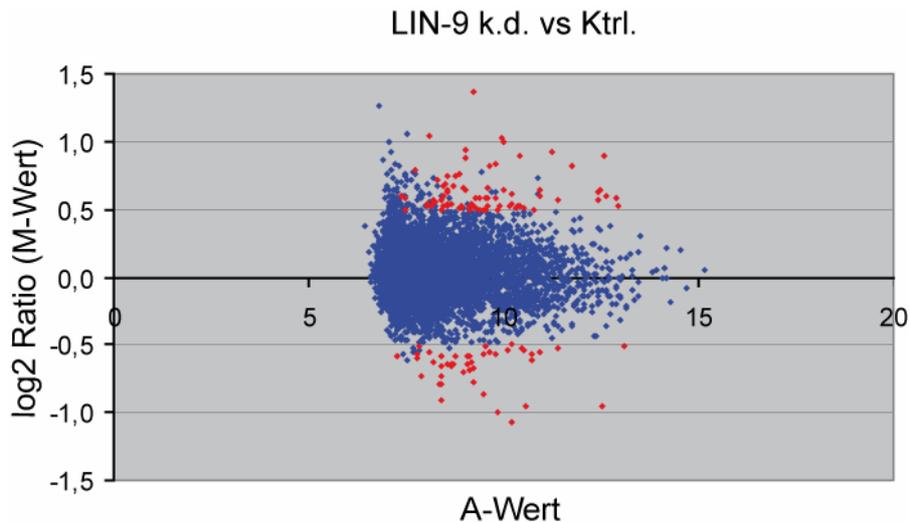
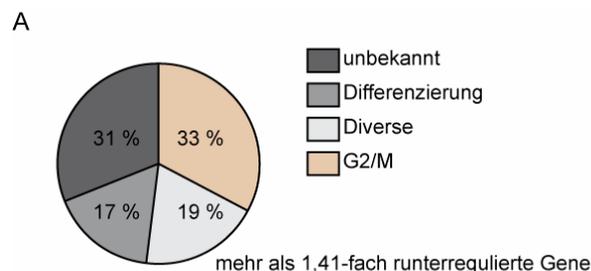


Abb. 4.4.: Genexpressionsprofil LIN-9 depletierter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (MA-Plot). Jeder Punkt im Streudiagramm entspricht einer der 11.552 fixierten cDNAs auf dem Microarray. Auf der x-Achse sind die A-Werte aufgetragen, welche als arithmetisches Mittel der Intensitäten des Cy3 und des Cy5 Signals eines jeden Punktes definiert werden. Der M-Wert (\log_2 Ratio) ist das auf den Hintergrund korrigierte Verhältnis der Intensitätswerte des Cy3 und des Cy5 Signals und wird auf der y-Achse aufgetragen. Als differentiell exprimierte Gene wurden cDNAs betrachtet, welche einen M-Wert $\geq \pm 0,5$, einen A-Wert ≥ 7 , und einen q-Wert $\geq 5\%$ aufweisen (rote Punkte). Negatives Vorzeichen: herunterreguliert in LIN-9 depletierten Zellen; Positives Vorzeichen: hochreguliert in LIN-9 depletierten Zellen.

Nach der Depletion von LIN-9 zeigten insgesamt 103 Gene eine schwach, aber signifikant veränderte Expression um mindestens das 1,41-fache im Vergleich zur Referenz (Abb. 4.4.). Davon wiesen 67 Gene nach dem Verlust von LIN-9 eine erhöhte Expression auf (siehe Anhang Tabelle A2), wohingegen 36 Gene eine Abnahme der Expression zeigten (siehe Anhang Tabelle A1). Jedes Gen wurde zudem gemäß seiner Funktion in eine bestimmte Gengruppe eingeordnet. Gene mit bislang unbekannter Funktion wurden zusammen in eine Gruppe geordnet. Eine Beschreibung der einzelnen Genfunktionen wurde über das Suchwerkzeug *Source* der *Stanford MicroArray Datenbank* erhalten (Birgit Samans) und bei Bedarf durch Literaturrecherchen ergänzt.

Aus der Liste der herunterregulierten Gene konnten 33 % der Gene als solche klassifiziert werden, die ihr Expressionsmaximum in der G2- und M-Phase des Zellzyklus besitzen bzw. für welche eine Rolle in der Mitose belegt ist. Abbildung 4.5. fasst die Array-Daten zusammen und gibt einen Überblick über die potenziellen G2/M-Zielgene. Für Cyclin A2, Cyclin B1, CDC2 und PLK1 z.B. ist bekannt, dass sie für den Übergang von der G2-Phase in die Mitose essentiell sind (Fung and Poon, 2005; van Vugt and Medema, 2005; Xie et al., 2005). BUB1, CENP-E, PLK1, Aurora A und BIRC5 (Survivin) sind wichtige Bestandteile des mitotischen Spindel-Checkpoints (Andrews et al., 2003; Lens et al., 2003; Meraldi and Sorger, 2005; van Vugt and Medema, 2005; Wheatley and McNeish, 2005; Xie et al., 2005; Yen et al., 1991). UBCH10, BIRC5 und PLK1 regulieren den Austritt aus der Mitose (Lens et

al., 2006; Townsley et al., 1997; van Vugt and Medema, 2005). Weitere 17 % der herunterregulierten Gene konnten in die Gruppe differenzierungs-spezifischer Gene eingeordnet werden und 19 % der Gene kodierten für Proteine mit ganz unterschiedlichen Funktionen.



B

Unigene ID	Symbol	Bezeichnung	X-fache Änderung	Expression	Funktion
Hs.93002	UBCH10	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	- 2,09	G2/M	Austritt aus der Mitose
Hs.514527	BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (Survivin)	- 1,99	G2/M	Mitotischer Checkpoint
Hs.334562	CDC2	Cell division cycle 2	- 1,93	G2/M	Eintritt in die Mitose
Hs.14559	Cep55	Centrosomal protein, 55 kDa	- 1,88	G2/M	Zytokinese
Hs.58974	CCNA2	Cyclin A2	- 1,74	S/G2/M	Eintritt in S- und M-Phase
Hs.23960	CCNB1	Cyclin B1	- 1,72	G2/M	Eintritt in die Mitose
Hs.11355	LAP2	Lamin associated polypeptide 2	- 1,56	unbekannt	Mitotische Kernarchitektur
Hs.75573	CENPE	Centromere Protein E	- 1,55	G2/M	Mitotische Spindel/Checkpoint
Hs.469649	BUB1	Budding uninhibited by benzimidazoles 1	- 1,49	G2/M	Spindel-Checkpoint
Hs.77695	DLG7	Disc, large 7 homolog 7	- 1,49	G2/M	Unbekannt
Hs.250822	AURKA	Serine/threonine kinase 6; Aurora A	- 1,47	G2/M	Mitotische Spindel
Hs.592049	PLK1	Polo-like kinase 1	- 1,47	G2/M	Eintritt in die Mitose

Abb. 4.5.: Übersicht und Zusammenfassung über die durch LIN-9 differentiell exprimierten Gene. (A) Einteilung der nach LIN-9 Depletion herunterregulierten Gene in funktionelle Gruppen. **(B)** Liste der potentiellen G2/M-spezifischen LIN-9 Zielgene. X-fache Änderung: gibt die Änderung der Genexpression in LIN-9 depletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wieder.

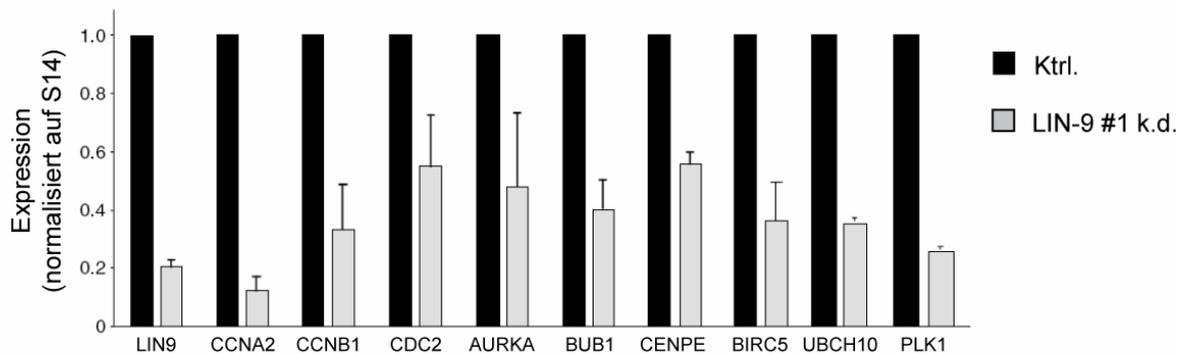
Bei der Liste der hochregulierten Gene, handelte es sich um Gene mit sehr heterogener Funktion. Für einen Teil der Gene ist eine Rolle in der Differenzierung und Entwicklung bekannt. Dennoch war keine signifikante Anhäufung von Genen in einer bestimmten funktionellen Gruppe zu erkennen.

Die aus den cDNA-Microarray-Analysen erhaltenen Daten wurden in der öffentlich zugänglichen Datenbank „*ArrayExpress*“ unter Zuhilfenahme der Internet-Software MIAME (Minimal Information About An Microarray Experiment) gespeichert (siehe Anhang Abb. A1). Sämtliche Details über Versuchsaufbau, Durchführung und Auswertung, sowie die Rohdaten aller drei Arrays sind mit dem Zugangscode „E-MEXP-752“ über die Internetseite <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> abrufbar.

4.1.3. LIN-9 reguliert die Expression bestimmter G2/M-spezifischer Gene

Gesamtheitlich betrachtet, lieferten die cDNA-Microarray-Analysen einen ersten Hinweis, dass LIN-9 einen Einfluss auf die Expression G2/M-spezifischer Gene hat. Zur Validierung wurde mit alternativen Methoden die Expression dieser potenziellen Zielgene nach Verlust von LIN-9 überprüft. Quantitative RT-PCR-Analysen (qRT-PCR) bestätigten, dass die Depletion von LIN-9 zu einer verminderten Expression der untersuchten Gene führt (Abb. 4.6. A). Dabei traten die stärksten Effekte bei Cyclin A2 (CCNA2), Cyclin B1 (CCNB1), PLK1 und UBCH10 auf. Auch mit der zweiten unabhängigen shRNA-Sequenz #2 gegen LIN-9 konnte der Effekt beobachtet werden (Abb. 4.6. B). Die qRT-PCR-Analysen bestätigten die Array-Daten und belegten, dass LIN-9 die Expression einer bestimmten Gruppe von G2/M-spezifischen Genen reguliert.

A



B

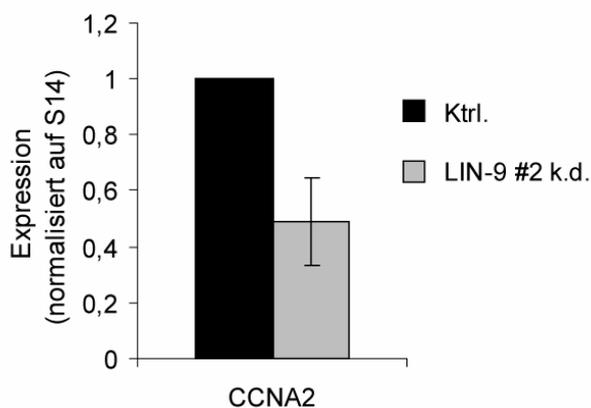


Abb. 4.6.: Validierung der Array-Daten durch qRT-PCR. Aus LIN-9 depletierten BJ-ET Zellen bzw. aus Kontrollzellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und 2,5 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Für die qRT-PCR wurde 1 µl der cDNA als Matrize eingesetzt. Die Expression der Zielgene wurde auf die Expression des Haushaltsgens S14 normalisiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten ausgeführten PCR-Reaktionen wieder. **(A)** Expression von Zielgenen nach Depletion von LIN-9 durch Sequenz #1. **(B)** Expression von Cyclin A2 nach Depletion von LIN-9 durch Sequenz #2. k.d.: *knock down*.

Nicht nur die Transkriptmengen der LIN-9 Zielgene nahmen ab. Auch im Western Blot war eine Abnahme der entsprechenden Proteinmengen zu beobachten (Abb. 4.7.). Während die Proteinmenge an Cyclin A, Cyclin B, PLK1 und BIRC5 nach LIN-9 Depletion stark abnahm, war für CDC2 nur ein geringer Effekt zu beobachten. Die Expression von Proteinen die eine wichtige Rolle beim G1/S-Übergang spielen, wie z.B. Cyclin E, Cyclin D1 und CDK2 wurde hingegen nicht durch den Verlust von LIN-9 beeinflusst. Ebenso blieb die Menge an β -Tubulin konstant.

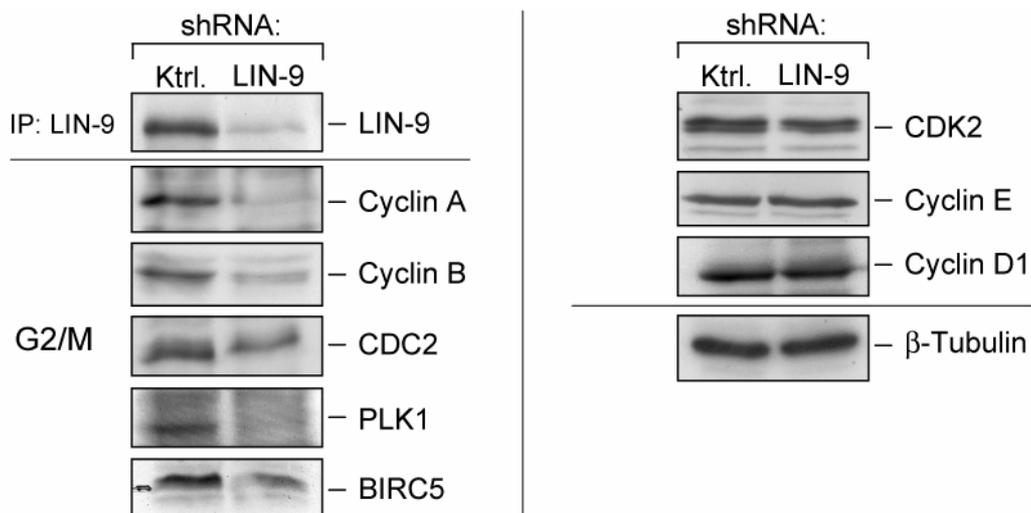


Abb. 4.7.: Validierung der Array-Daten durch Western-Blot. Aus LIN-9 depletierten Zellen bzw. aus Kontroll-infizierten Zellen wurden Gesamtzelllysate gewonnen. Der Nachweis der untersuchten Proteine erfolgte durch Western Blot unter Verwendung spezifischer Erstantikörper. LIN-9 wurde zunächst mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und anschließend im Western Blot detektiert.

4.2. Die Repression von G2/M-Genen nach LIN-9 Verlust ist p53-unabhängig

Interessanterweise war der CDK-Inhibitor p21 in der Liste der nach Verlust von LIN-9 hochregulierten Gene zu finden (siehe Anhang Tabelle A2). Die Hochregulation von p21 nach Verlust von LIN-9 konnte auch in unabhängigen Experimenten mit qRT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 4.8.).

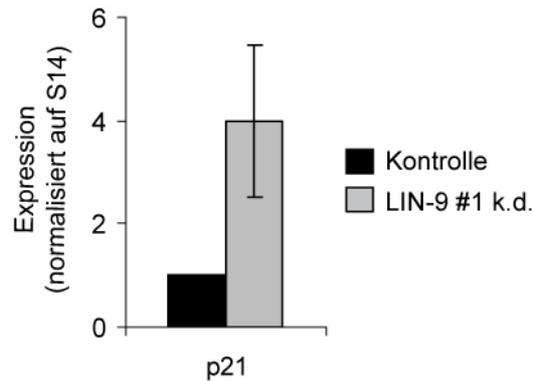


Abb. 4.8.: Der Verlust von LIN-9 führt zu einer verstärkten Expression von p21. Die Depletion von LIN-9 in BJ-ET Zellen erfolgte durch virale Infektion mit einer für LIN-9 spezifischen shRNA (shRNA #1). Nach der Selektion wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Expression von p21 im Vergleich zu Kontroll-infizierten Zellen verglichen. Dabei wurden die Expressionslevel auf S14 normalisiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten ausgeführten PCR-Reaktionen wieder.

Bei p21 handelt es sich um ein bekanntes p53-Zielgen. 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. Inzwischen weiß man, 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 Piwnicka-Worms, 2001; Jackson et al., 2005).

Um zu testen, ob die transkriptionelle Repression von G2/M-Genen nach LIN-9 Verlust p53-abhängig ist sollte überprüft werden, ob der Verlust von p53 in LIN-9 depletierten Zellen zu einer Derepression der G2/M-Gene führt.

BJ-ET Zellen wurden zunächst mit einem p53-spezifischen retroviralen shRNA-Konstrukt bzw. mit einem Kontrollvirus infiziert und für 4 Tage mit 5 µg/µl Blasticidin selektioniert. Um zu prüfen, ob die verwendete shRNA zu einer effizienten Depletion von p53 in BJ-ET Zellen führt, wurden die Zellen im Anschluss an die Selektion für 24 h mit Doxorubicin behandelt. Doxorubicin führt zu DNA-Schäden auf Grund der Inhibition der Topoisomerase II und der Generierung von freien Radikalen und induziert somit die Aktivierung von p53 (Hurley, 2002; Kurz et al., 2004). Die Gesamt-RNA Doxorubicin behandelter bzw. unbehandelter Zellen wurde isoliert und die Expression von p53 und p21 mit Hilfe der qRT-PCR analysiert (Abb. 4.9.).

Die Behandlung mit Doxorubicin führte zu einer schwachen Induktion der p53 Expression in den Kontroll-infizierten Zellen. Wie erwartet führte die Doxorubicin-Behandlung zu einer starken Zunahme der p21-Expression. Die Infektion mit der shRNA bewirkte eine effiziente Repression der p53-Expression, wodurch auch die Expression von p21 stark abnahm. Die

zusätzliche Behandlung mit Doxorubicin hatte keinen Effekt auf die p53 Expression, führte jedoch zu einer signifikanten Induktion der p21-Expression. Die Infektion mit der p53-spezifischen shRNA führte zwar zu einer starken aber nicht zu einer vollständigen Repression des p53-Gens. Die verbleibende Menge an p53 in diesen Zellen reicht vermutlich aus, um die Expression von p21 nach Doxorubicin Behandlung zu induzieren. Die Infektion mit der verwendeten shRNA führte demnach zu einer starken Repression der p53 Expression, jedoch nicht zu einem vollständigen funktionellen *knock down* von p53.

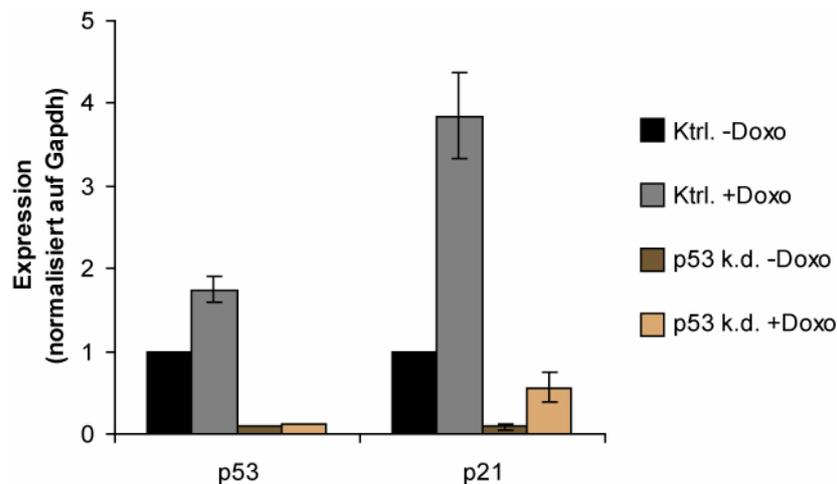


Abb. 4.9.: Depletion von p53 durch retrovirale Infektion und Induktion von DNA-Schäden durch Doxorubicin-Behandlung. Die Depletion von p53 erfolgte durch retrovirale Infektion mit einer spezifischen shRNA bzw. mit einem Kontrollvirus in BJ-ET Zellen. Wenn angegeben, wurden die Zellen nach der Selektion für 24 h mit Doxorubicin behandelt. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Expression von p53 und p21 mit Hilfe der qRT-PCR analysiert. Dabei wurden die Expressionslevel auf Gapdh normalisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der in Triplikaten ausgeführten PCR-Reaktionen wieder.

Für den weiteren Versuch wurden Kontrollzellen und p53-depletierte BJ-ET Zellen mit einem Kontroll-Oligonukleotid bzw. mit einem LIN-9 spezifischen RNAi-Oligonukleotid transfiziert (siehe 3.1.10.). 72 h nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Expression verschiedener Gene mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt.

Wie der oben beschriebene Vorversuch bereits gezeigt hatte, gelang durch virale Infektion der spezifischen shRNA eine effiziente Depletion von p53 (Abb. 4.10.). Auch die anschließende Depletion von LIN-9 durch Transfektion von spezifischen RNAi-Oligonukleotiden war erfolgreich. Wie zu erwarten führte der Verlust von p53 zu einer stark verminderten Expression von p21 (A). Der zusätzliche Verlust von LIN-9 hingegen ließ das Expressionslevel von p21 wieder schwach ansteigen. Dies lässt vermuten, dass die Hochregulation von p21 in LIN-9 defizienten Zellen, nicht durch p53 induziert wird. Betrachtet man die Expressions-Level von LIN-9 Zielgenen wie z.B. Cyclin A2 und Cyclin B1, so erkennt man, dass der zusätzliche Verlust von p53 zu keiner Reaktivierung der

G2/M-Gene in LIN-9 defizienten Zellen führte (Abb. 4.10. B). Zwar nahm die Expression von Cyclin A2 und Cyclin B1 in diesen Zellen geringfügig zu, dies könnte jedoch auf die, in p53 defizienten Zellen, etwas schwächere LIN-9 Depletion zurückzuführen sein. Diese Beobachtungen konnten in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Aufgrund der gezeigten Daten, ließ sich ausschließen, dass es sich bei der durch Depletion von LIN-9 induzierten Repression der G2/M-Gene, um einen p53-abhängigen Mechanismus handelt. Weiterhin war daraus ersichtlich, dass für die Repression der G2/M-Zielgene keine erhöhte Expression von p21 nötig ist.

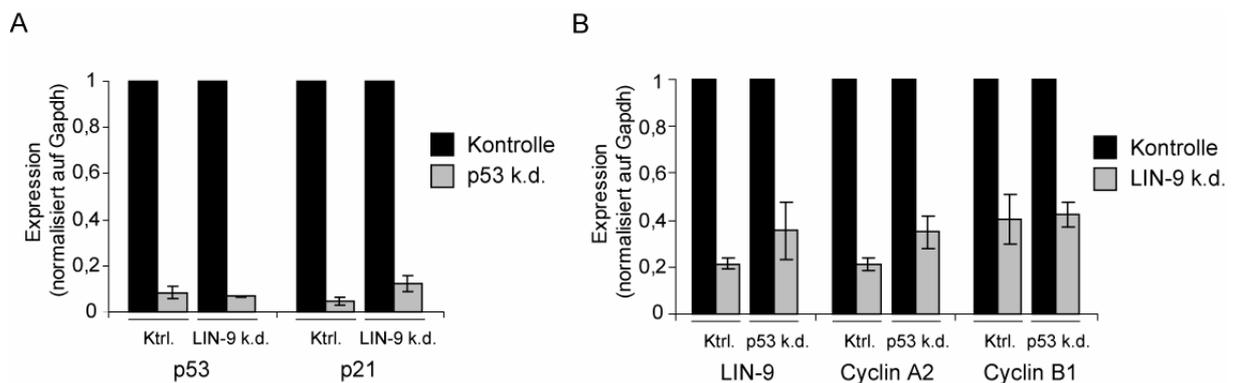


Abb. 4.10.: Die Depletion von LIN-9 führt nicht zu einer p53-abhängigen Repression der G2/M-Gene. BJ-ET Zellen wurden mit einer p53-spezifischen shRNA bzw. mit einem Kontrollvirus infiziert. Im Anschluss wurden die selektionierten Zellen mit einem Kontroll-Oligonukleotid bzw. einem LIN-9 spezifischen RNAi-Oligonukleotid transfiziert. Die Gesamt-RNA wurde 72 h nach der Transfektion isoliert und die Expression der angegebenen Gene in Triplikaten durch qRT-PCR bestimmt. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der PCR-Triplikate wieder. **(A)** Expressionslevel von p53 und p21 nach gleichzeitigem *knock down* von p53 und LIN-9. **(B)** Expressionslevel von LIN-9 und LIN-9 regulierten Genen nach *knock down* von p53 und LIN-9.

Zellen die auf Stress wie DNA-Schäden reagieren, zeigen eine Reihe typischer Kennzeichen. Hierzu gehört z.B. eine Stabilisierung des p53 Proteins (Weinberg, 2007) und ein Anstieg der Phosphorylierung von CDC2 an Tyrosin 15 (O'Connell et al., 1997). Wie Abb. 4.11. zeigt, war nach Verlust von LIN-9 weder eine Zunahme der p53 Proteinmenge noch eine Zunahme der Phosphorylierung von CDC2 an Tyrosin 15 zu erkennen. Auch dies war ein Indiz dafür, dass der Verlust von LIN-9 zu keiner Stressantwort der Zelle führte, die eine transkriptionelle Repression der G2/M-Gene hätte hervorrufen können.

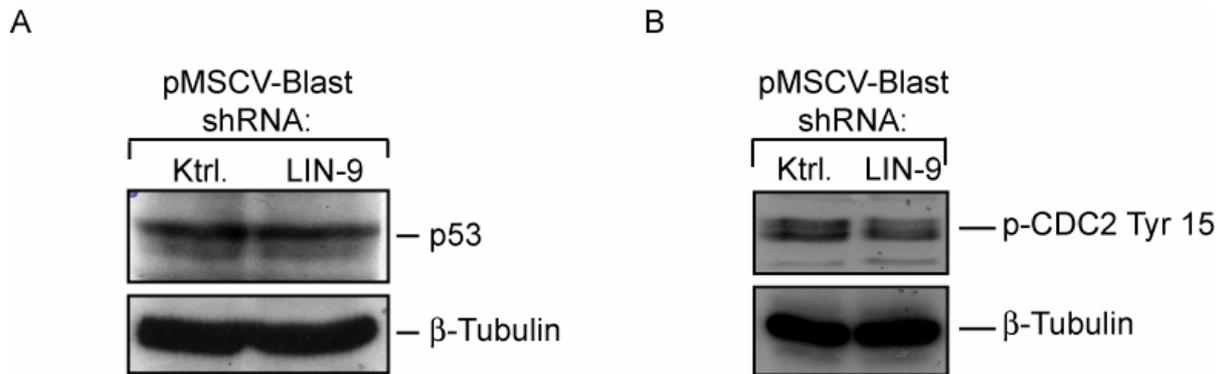


Abb. 4.11.: p53 Proteinexpression und Phosphorylierung von CDC2 an Tyrosin 15 nach LIN-9 Depletion. BJ-ET Zellen wurden mit der LIN-9 spezifischen shRNA #1 bzw. mit einem Kontrollvirus infiziert und für 4 Tage mit 5 µg/µl Blasticidin selektiert. Aus den Zellen wurden Gesamtzelllysate gewonnen und (A) p53 bzw. (B) an Tyrosin 15-phosphoryliertes CDC2 (p-CDC2 Tyr 15) im Western Blot detektiert. β-Tubulin diente als Kontrolle.

4.3. Direkte und indirekte Regulation von LIN-9 Zielgenen

4.3.1. LIN-9 bindet an die Promotoren der identifizierten G2/M-Gene

Die Microarray-Analysen ergaben, dass der Verlust von LIN-9 zu einer Repression der identifizierten G2/M-Gene führt. Daher lag der Schluss nahe, dass LIN-9 in normal wachsenden Zellen für die Aktivierung dieser Gene wichtig ist. Aus den zuvor beschriebenen Versuchsansätzen war jedoch nicht ersichtlich, ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Aktivierung durch LIN-9 handelt. Daher wurden in unserem Labor parallel zu dieser Arbeit Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Analysen) durchgeführt (durchgeführt von Björn von Eyß). Da die LIN-9 Zielgene ihre Expressionsmaxima in der S/G2/M-Phase des Zellzyklus haben, wurde für die ChIP-Analysen (siehe 3.5.9.) Chromatin aus BJ-ET Zellen verwendet, welche zuvor durch Behandlung mit Hydroxyharnstoff in der S/G2/M-Phase synchronisiert wurden (siehe 3.1.7.). Der Nachweis von gebundenem LIN-9 an die Promotoren der einzelnen G2/M-Gene erfolgte mit Hilfe spezifischer Primer in qPCRs. Die ChIP-Analysen ergaben, dass LIN-9 an die Promotoren der untersuchten Gene, wie z.B. CCNA2, CCNB1, Bub 1 und UbcH10 bindet (Abb. 4.12.) und ließen vermuten, dass die in den Microarray-Analysen identifizierten G2/M-Gene direkt durch LIN-9 reguliert werden könnten.

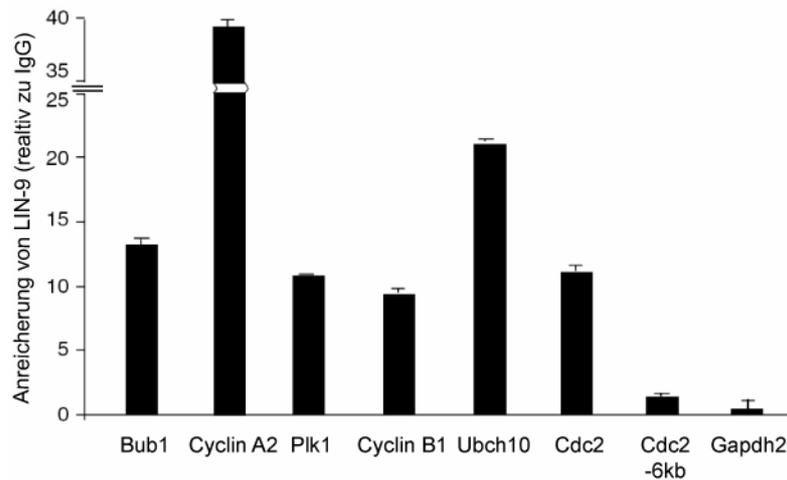


Abb. 4.12.: LIN-9 bindet an die Promotoren G2/M-spezifischer Gene. Der Nachweis von gebundenem LIN-9 an die Promotoren der angegebenen Gene erfolgte durch ChIP-Analysen. Dazu wurde Chromatin S/G2/M-synchronisierter BJ-ET Zellen mit einem LIN-9 Antikörper bzw. mit einem unspezifischen IgG Antikörper als Kontrolle immunpräzipitiert. Der Nachweis der gebundenen Chromatinfragmente erfolgte durch qPCR unter Verwendung spezifischer Primer. Primer für Gapdh2 und für einen 6 kb stromabwärts gelegenen Bereich des Cdc2-Promotors dienten als Kontrollen. Angegeben ist die X-fache Anreicherung von LIN-9 gegenüber der Input-DNA. Durchgeführt von Björn von Eyß. Abbildung entnommen aus (Osterloh et al., 2007) und modifiziert.

4.3.2. Die Regulation von p21 durch LIN-9 erfolgt indirekt

In den Microarray-Analysen konnte p21 ebenfalls als LIN-9 reguliertes Gen identifiziert werden. Davon unabhängige Expressionsanalysen mit Hilfe der qRT-PCR konnten eine Hochregulation von p21 nach LIN-9 Verlust bestätigen (siehe Abb. 4.8.) und ließen vermuten, dass die Regulation von p21 durch LIN-9 p53-unabhängig ist (siehe Abschnitt 4.2.). ChIP-Analysen hatten ergeben, dass LIN-9 die Expression G2/M-spezifischer Gene durch die direkte Bindung an die Promotoren regulieren könnte. Es wäre daher möglich, dass LIN-9 ebenfalls direkt zur Expressionsregulation von p21 durch die Bindung an dessen Promotor beiträgt. Ob LIN-9 an den Promotor von p21 bindet, wurde durch Chromatin-Immunpräzipitation (siehe 3.5.9.) in BJ-ET Zellen analysiert. Auf eine vorhergehende Synchronisation der Zellen wurde verzichtet, da die Expression von p21 nicht zellzyklusreguliert ist.

Der Nachweis von LIN-9 gebundenem Chromatin erfolgte durch qPCR (siehe 3.4.3.). Zum einen wurden drei verschiedene Primer-Paare verwendet, welche unterschiedliche ca. 200 - 300 bp große Bereiche des p21 Promotors amplifizierten (Abb. 4.13. A). Zur Kontrolle unspezifischer Bindung an DNA, dienten Primer für die Promotorregion des Haushaltgens Gapdh2. Spezifische Primer-Paare für den Ubch10- und Birc5-Promotor wurden als Positivkontrollen mitgeführt.

Abbildung 4.13. B zeigt eine Zusammenfassung der ChIP-Analysen. Angegeben ist die Bindung von LIN-9 bzw. IgG in % des Inputs. Die zuvor nachgewiesene Bindung von LIN-9

an die Promotoren von *Ubch10* und *Birc5* konnte bestätigt werden (zum Vergleich siehe Abb. 4.12.). Für den *p21*-Promotor konnte bei allen 3 Amplikons keine spezifische Bindung von LIN-9 gegenüber IgG nachgewiesen werden. Sowohl die für IgG als auch für LIN-9 erhaltenen Werte lagen in etwa in dem für den *Gapdh2*-Promotor (Negativkontrolle) ermittelten Bereich. Die unter Verwendung von Primer-Paar II schwache Anreicherung von LIN-9 in einem der parallelen Ansätze konnte in einem weiteren Experiment nicht bestätigt werden. Mit den in diesem Versuch verwendeten Primer-Paaren war daher keine Bindung von LIN-9 an den *p21*-Promotor nachweisbar. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass LIN-9 in dem ca. 1,8 kb großen Bereich des Promotors bindet, der nicht durch die drei verschiedenen Primer-Paare abgedeckt wird.

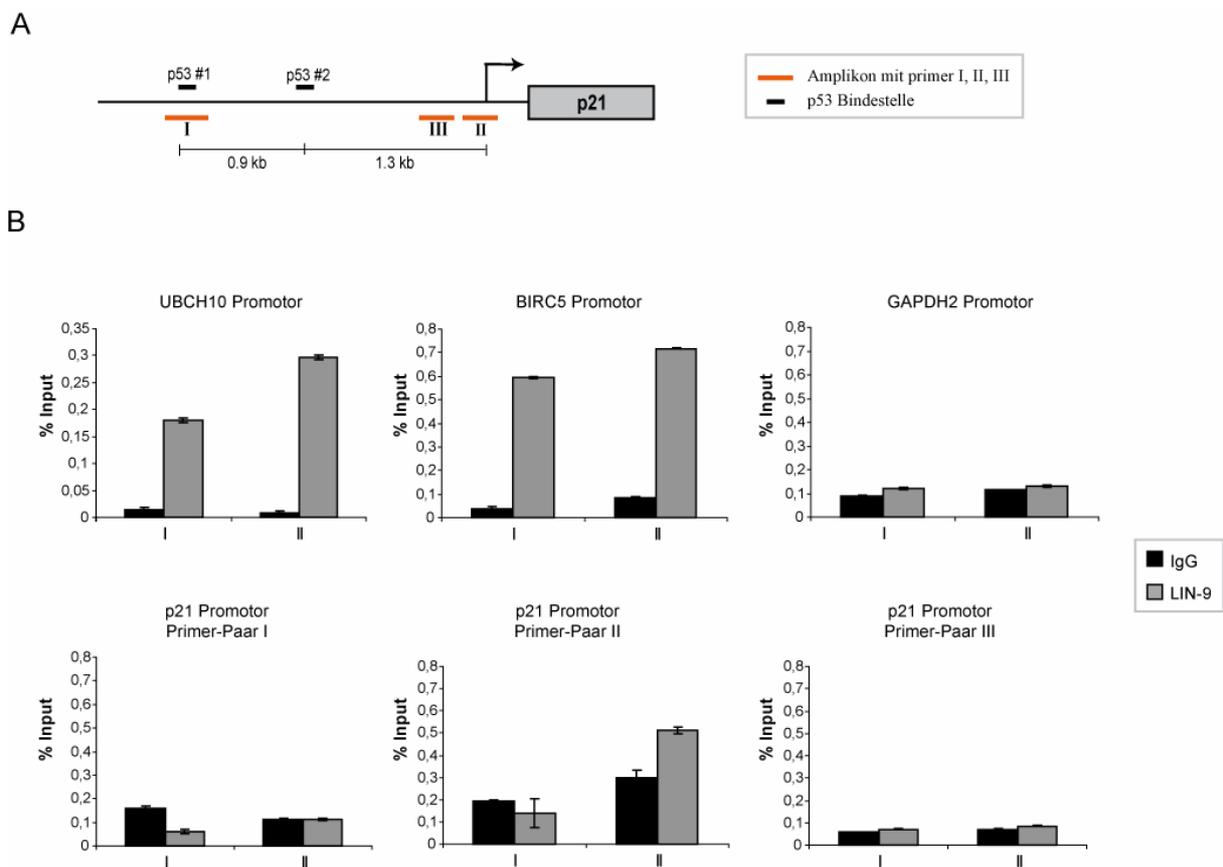


Abb. 4.13.: Keine Bindung von LIN-9 an den p21-Promotor. (A) Schematische Darstellung der p21 Promotorregion. p53-Bindestellen sind als schwarze Balken dargestellt. Die roten Balken kennzeichnen die Amplikons der drei verschiedenen p21 spezifischen Primer-Paare. (B) Der Nachweis von gebundenem LIN-9 an den p21 -Promotor erfolgte durch ChIP-Analysen. Dazu wurde Chromatin asynchron wachsender BJ-ET Zellen mit einem LIN-9 Antikörper bzw. mit einem unspezifischen IgG Antikörper als Kontrolle immunpräzipitiert. Der Nachweis der gebundenen Chromatinfragmente erfolgte durch qPCR in Triplikaten unter Verwendung spezifischer Primer. Primer für *Gapdh2*, *Ubch10* und *Birc5* dienen als Kontrollen. Angegeben ist die Bindung von LIN-9 als % des Inputs. Die ChIP-Analysen wurden als Duplikate (I und II) durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der PCR-Triplikate wieder.

4.4. Charakterisierung LIN-9 und B-MYB defizienter Fibroblasten

Unwahrscheinlich ist, dass LIN-9 direkt an die DNA in den Promotorregionen der G2/M-Gene bindet, da LIN-9 selbst über keine DNA-Bindedomänen verfügt. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen G2/M-Promotorregionen fiel auf, dass diese sowohl Bindestellen für die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren enthielten, als auch Bindestellen für den Transkriptionsfaktor B-MYB (Abb. 4.14.).

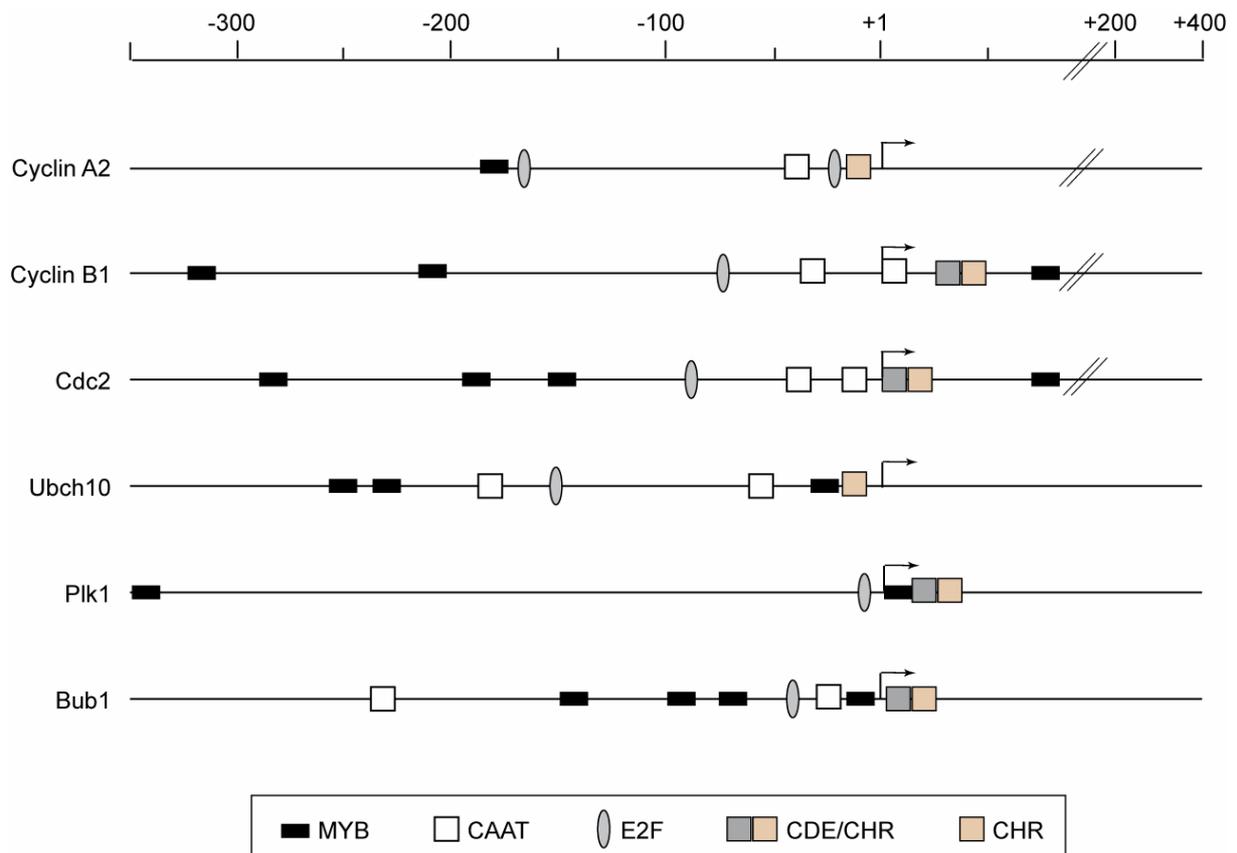


Abb. 4.14.: Schematische Darstellung der Promotorregionen der LIN-9 regulierten G2/M-Zielgene. Angegeben sind die potenziellen Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren E2F und B-MYB, sowie CAAT-Boxen, CDE/CHR- und einzelne CHR-Elemente. Die Angaben basieren auf bereits publizierten Daten und auf Sequenzvergleichen mit den bekannten Konsensussequenzen.

Darüber hinaus sind CCNA2, CCNB1 und Cdc2 in der Literatur bereits als B-MYB regulierte Gene beschrieben (Zhu et al., 2004). Untersuchungen in der humanen Glioblastom Zelllinie T98G zeigten, dass der RNAi-vermittelte Verlust von B-MYB zu einer verminderten Expression dieser Gene führt.

Daher lag die Vermutung nahe, dass LIN-9 indirekt über B-MYB an die Promotoren der identifizierten Zielgene bindet. Erste Evidenz dafür war die Arbeit von Michael Korenjak und Kollegen (Korenjak et al., 2004). Diese konnten in *D. melanogaster* die Homologe von LIN-9

und B-MYB zusammen, als Bestandteile eines großen mehrere Untereinheiten umfassenden RB/E2F-Komplexes aufzureinigen. Entscheidend war jedoch die Tatsache, dass es in unserem Labor gelang, eine Interaktion von B-MYB und LIN-9 *in vivo* nachzuweisen (durchgeführt von Björn von Eyß).

Die Tatsache, dass LIN-9 eine Reihe von Genen reguliert, die für den ordnungsgemäßen Ablauf des Zellzyklus essentiell sind ließ vermuten, dass der Verlust von LIN-9 eine Deregulation des Zellzyklus zur Folge haben könnte. Daher sollten LIN-9 defiziente BJ-ET Fibroblasten hinsichtlich ihres Zellzyklusverhaltens genauer untersucht werden. Wenn LIN-9 und B-MYB tatsächlich zusammen für die Aktivierung der identifizierten G2/M-Gene benötigt werden, sollte der Verlust von B-MYB zu einem analogen Phänotyp führen wie der Verlust von LIN-9. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte daher parallel zur Charakterisierung der LIN-9 defizienten Zellen, der Phänotyp B-MYB depletierter BJ-ET Fibroblasten dokumentiert werden.

4.4.1. Die Proliferation LIN-9 und B-MYB defizienter Fibroblasten ist verlangsamt

Zunächst wurde das Proliferationsverhalten LIN-9 bzw. B-MYB defizienter Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen analysiert. Dazu wurden BJ-ET Zellen entweder mit dem gegen LIN-9 gerichteten shRNA-Konstrukt #1, oder mit einer B-MYB spezifischen shRNA (gerichtet gegen Position 1165-1183 in der cDNA von humanem B-MYB; NCBI Accesion Nr. NM_002466) bzw. mit dem entsprechenden Leervektor als Kontrolle infiziert. Die Effizienz der Depletion von LIN-9 und B-MYB wurde in qRT-PCR Analysen überprüft (Abb. 4.15. A und B). Nach der Selektion wurden je 1×10^5 Zellen in Triplikaten auf $9,6 \text{ cm}^2$ -Platten ausgesät. Über einen Zeitraum von 16 Tagen wurden die Zellen alle 4 Tage von den Platten gelöst, die Zellzahl bestimmt und nach jeder Zählung erneut 1×10^5 Zellen ausgesät (siehe 3.1.6.). Die aus den Triplikaten gebildeten Mittelwerte der Zellzahl wurden in einer kumulativen Darstellung gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 4.15.). Daraus war ersichtlich, dass sowohl LIN-9 (A) als auch B-MYB (B) depletierte Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich langsamer proliferierten.

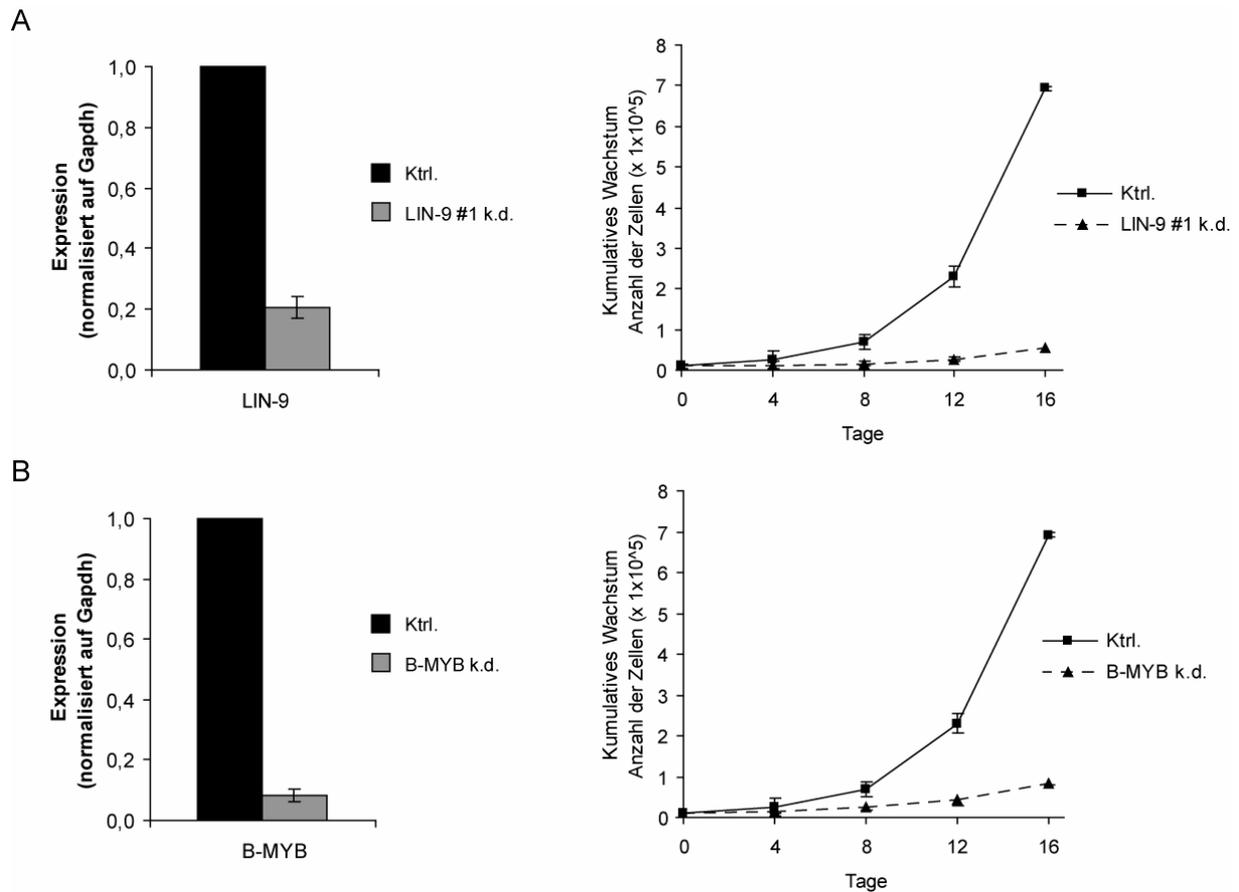


Abb. 4.15.: LIN-9 bzw. B-MYB depletierte BJ-ET Zellen sind in der Proliferation retardiert. Die Expression von LIN-9 und B-MYB nach Infektion mit spezifischen shRNA-Konstrukten bzw. mit einem Kontrollvirus, wurde mit Hilfe der qRT-PCR ermittelt. LIN-9 (A) oder B-MYB (B) depletierte Zellen bzw. Kontrollzellen wurden in Triplikaten nach einem 3T3-Protokoll passagiert. Nach jeder Passage wurde die Zellzahl bestimmt, die Zunahme der Zellzahl ermittelt und als kumulative Zellzahl gegenüber der Zeit aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Triplikate zum jeweiligen Zeitpunkt wieder. k.d.: *knock down*.

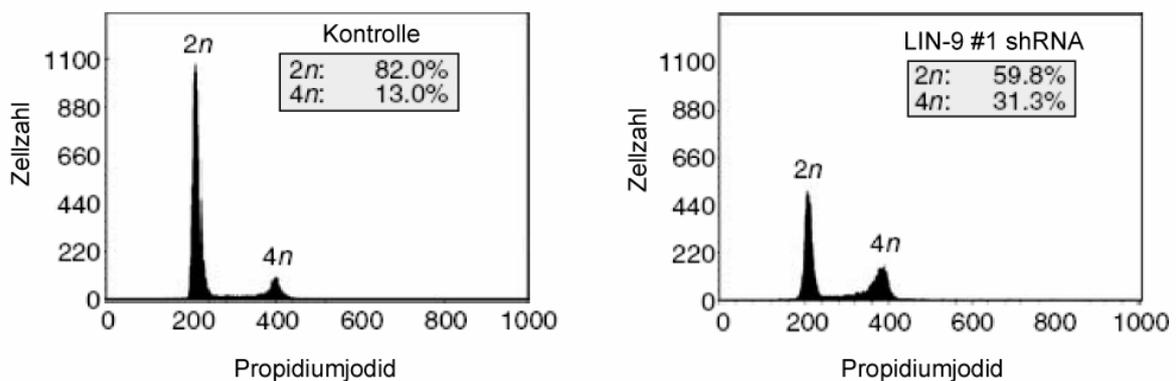
4.4.2. Der Verlust von LIN-9 oder B-MYB führt zu einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase

Um das Proliferationsverhalten LIN-9 bzw. B-MYB defizienter Zellen genauer zu untersuchen, wurde die Verteilung dieser Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen im Durchflusszytometer analysiert (FACS-Analyse). Für die FACS-Analyse wurden die shRNA-infizierten Zellen bzw. Kontroll-infizierte Zellen nach 4 Tagen Selektion mit 5 µg/µl Blasticidin mit Ethanol fixiert und die DNA mit Propidiumjodid gefärbt (siehe 3.2.1. und 3.2.2.). Im Anschluss wurden die Zellen direkt im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellzyklusprofile LIN-9 depletierter Zellen wiesen im Vergleich zu Kontrollzellen eine abnormale Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen auf. Diese war gekennzeichnet durch eine verminderte Anzahl von Zellen in der G1-Phase (2n) und eine deutliche Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase (4n). Der Anteil an Zellen in der

G2/M-Phase stieg dabei ungefähr um das Zweifache an. Abbildung 4.16. A zeigt ein repräsentatives Experiment.

Die Zellzyklusprofile B-MYB depletierter Zellen zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie LIN-9 depletierte Zellen. Im Vergleich zu den Kontrollzellen nahm die Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase (4n) zu (Abb. 4.16. B). Jedoch war die Akkumulation B-MYB defizienter Zellen in der G2/M-Phase weniger deutlich zu erkennen, als in LIN-9 depletierten Zellen. Zudem führte der Verlust von B-MYB zu keiner starken Abnahme an G1-Zellen (2n).

A



B

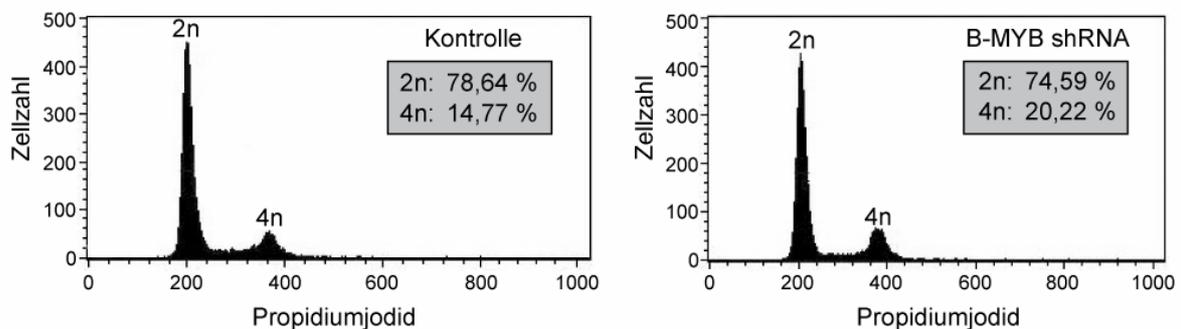
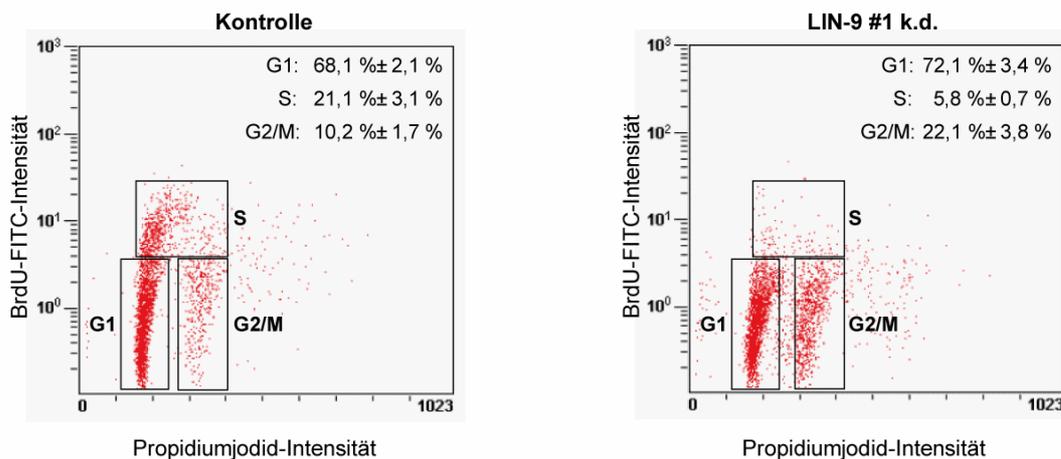


Abb. 4.16.: LIN-9 bzw. B-MYB depletierte Zellen akkumulieren in der G2/M-Phase. BJ-ET Zellen wurden entweder mit der LIN-9 spezifischen shRNA #1 (A) bzw. mit einer B-MYB spezifischen shRNA (B) oder mit einem Kontrollvirus infiziert. Nach der Selektion wurden die Zellen fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und der DNA-Gehalt in einem Durchflusszytometer gemessen. 2n: Zellen mit einfachem DNA-Gehalt/G1-Phase. 4n: Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt/G2/M-Phase.

Um den beobachteten Zellzyklusdefekt LIN-9 und B-MYB defizienter Zellen genauer zu analysieren, wurden als nächstes 2D-FACS-Profile erstellt. Mit dieser Methode lässt sich die Verteilung der Zellen im Zellzyklus genauer auflösen und erlaubt daher eine quantitative Auswertung der FACS-Daten. Zu diesem Zweck wurden LIN-9 bzw. B-MYB depletierte Zellen und Kontrollzellen vor der Fixierung für 1 Stunde mit 10 μ M BrdU behandelt, welches während der S-Phase in die sich replizierende DNA eingebaut wird (siehe 3.2.3.). Nach der

Fixierung wurde die DNA der Zellen wie gewohnt mit Propidiumjodid gefärbt. Durch die zusätzliche Verwendung eines gegen BrdU gerichteten Fluoreszenzmarkierten Antikörpers können im Durchflusszytometer die S-Phase Zellen von den G1- und G2/M-Phase Zellen eindeutig unterschieden werden. Die Ergebnisse aus jeweils 3 voneinander unabhängigen Experimenten sind in Abb. 4.17. dargestellt. Wie zuvor schon beobachtet, nahm die Anzahl an Zellen in der G2/M-Phase nach LIN-9 (A) oder B-MYB (B) Depletion von ca. 10 % auf ca. 22% zu. Weiterhin ließ sich in beiden Fällen eine starke Abnahme an S-Phase Zellen von ca. 21 % auf ca. 6 % erkennen. Bei dem Vergleich mit den in Abb. 4.16. gezeigten Zellzyklusprofilen, war in diesem Fall für B-MYB ein deutlich stärkerer Effekt zu beobachten. Hier nahm im Vergleich zu den Kontrollzellen die Zahl an G2/M-Zellen um ca. das 2,5-fache zu. Als Grund hierfür könnte ein stärkerer *knock down* von B-MYB in Frage kommen. Im Gegensatz zu LIN-9 depletierten Zellen war auch in der 2D-FACS Analyse keine reduzierte Zahl an B-MYB depletierten Zellen in der G1-Phase zu erkennen. Dies stimmte mit den zuvor erstellten Zellzyklusprofilen (Abb. 4.16.) überein.

A



B

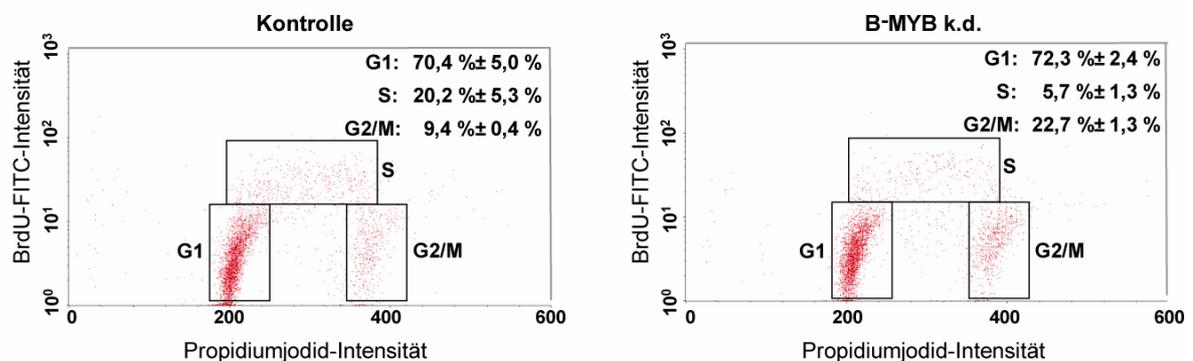


Abb. 4.17.: Reduzierte Anzahl von Zellen in der S-Phase nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion. Kontroll- und LIN-9 (A) bzw. B-MYB (B) defiziente BJ-ET Zellen wurden für 1h mit 10 µM BrdU gefärbt und anschließend fixiert. Im FACS wurde die Anzahl an Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus analysiert. Die Angaben fassen die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Experimenten zusammen.

4.4.3. LIN-9 und B-MYB defiziente Zellen arretieren bereits in der G2-Phase

Wie die FACS-Analysen zeigten, war die verlangsamte Proliferation LIN-9 bzw. B-MYB depletierter Zellen offensichtlich auf eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus zurückzuführen. Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem mitotischen Marker sollten Aufschluss geben, ob die Zellen bereits in der G2-Phase, oder erst später in der Mitose arretierten. Als Marker für mitotische Zellen wurde ein Antikörper verwendet, mit welchem sich spezifisch an Serin 10 phosphoryliertes Histon H3 nachweisen lässt. Histon H3 wird während der späten G2-Phase und zu Beginn der Mitose an Serin 10 phosphoryliert. Mit Beginn der Anaphase wird Histon H3 wieder dephosphoryliert (Hendzel et al., 1997). Sind die Zellen am Durchlaufen der Mitose gehindert, kommt es zu einer Anhäufung von mitotischen Zellen und damit zu einem Anstieg Phospho-Histon H3 positiver Zellen. Findet der Arrest hingegen vor der späten G2-Phase statt, erwartet man eine verminderte Phosphorylierung von Histon H3 (Ser 10).

LIN-9 bzw. B-MYB depletierte Zellen, sowie Kontrollzellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, am nächsten Tag fixiert und mit dem Phospho-Histon H3 spezifischen Antikörper gefärbt (siehe 3.1.12.). Der Nachweis der mitotischen Zellen erfolgte mit einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst-Reagenz (Hoechst 33258) angefärbt. Mit Hilfe eines Immunfluoreszenz-Mikroskops wurden in jeweils 3 unabhängigen Experimenten mindestens je 500 Zellkerne gezählt und die Anzahl Phospho-Histon H3 positiver Zellen bestimmt.

Im Kontrollansatz befanden sich $11,1 \pm 1,1$ % Phospho-Histon H3 positive Zellen, wohingegen in LIN-9 defizienten Zellen nur $2,2 \pm 1,1$ % Phospho-Histon H3 positive Zellen nachzuweisen waren (Abb. 4.18. A). Die Depletion von LIN-9 führte somit zu einer deutlichen Abnahme an Phospho-Histon H3 positiven Zellen. Ebenfalls war mit $3,2 \pm 1,17$ % die Anzahl an Phospho-Histon H3 positiven Zellen nach B-MYB Depletion deutlich geringer als im entsprechenden Kontrollansatz ($9,2 \pm 1,93$ %) (Abb. 4.18. B). Dies deutete darauf hin, dass LIN-9 bzw. B-MYB defiziente Zellen bereits vor dem Eintritt in die Mitose im Zellzyklus arretierten.

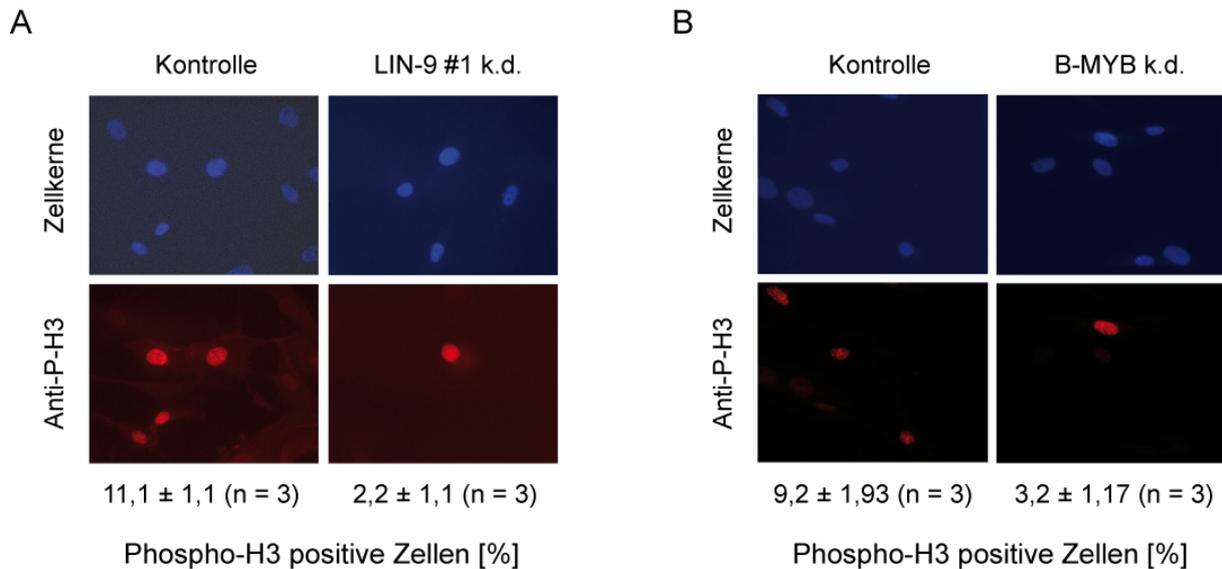


Abb. 4.18.: LIN-9 (A) und B-MYB (B) defiziente BJ-ET Zellen arretieren vor dem Eintritt in die Mitose. Als Marker für mitotische Zellen wurde ein Phospho-Histon H3 (Ser 10) spezifischer Antikörper verwendet. Die Detektion Phospho-Histon H3 positiver Zellen erfolgte durch Immunfärbung mit einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt. Es wurden je 500 Zellkerne von Kontrollzellen und LIN-9 bzw. B-MYB depletierten BJ-ET Zellen gezählt und die Anzahl an Phospho-Histon H3 positiven Zellen ermittelt. Angegeben sind die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten. (Fotos in (A): Denise Hübner).

Um zu klären, an welcher Stelle der Zellzyklus in LIN-9 bzw. B-MYB depletierten Zellen tatsächlich blockiert war, wurde die Kinetik dieser Zellen beim Durchlaufen eines Zellzyklus im Vergleich zu Kontrollzellen analysiert. In *BrdU-pulse-Assays* (siehe 3.2.4.) wurde die Progression BrdU-positiver Zellen durch den Zellzyklus beobachtet. Dafür wurden die infizierten Zellen zunächst 1 Stunde mit 10 μ M BrdU gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und nach 9 h mit Ethanol fixiert. BrdU-positive Zellen wurden mit einem FITC-gekoppelten BrdU-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Abbildung 4.19. zeigt je eine repräsentative Darstellung von Kontroll- und LIN-9 bzw. B-MYB depletierten Zellen zum Zeitpunkt 9h. Die angegebenen Daten stammen aus jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

In den Kontrollansätzen befanden sich nach 9 h ca. 30 % der BrdU-positiven Zellen in der nächsten G1-Phase (A). Innerhalb der gleichen Zeitspanne hatten in den LIN-9 depletierten Zellen hingegen nur ca. 12 % der BrdU-positiven Zellen die nächste G1-Phase erreicht. Die Progression LIN-9 defizienter Zellen von der S-Phase in die nächste G1-Phase war also deutlich verlangsamt. Auch B-MYB defiziente Zellen ließen eine ähnlich veränderte Kinetik erkennen (B). Während nach 9 h ca. 35 % der BrdU-positiven Kontrollzellen die nächste G1-Phase erreichten, waren im gleichen Zeitraum in B-MYB depletierten Zellen nur ca. 15 % BrdU-positive Zellen in der nächsten G1-Phase nachweisbar.

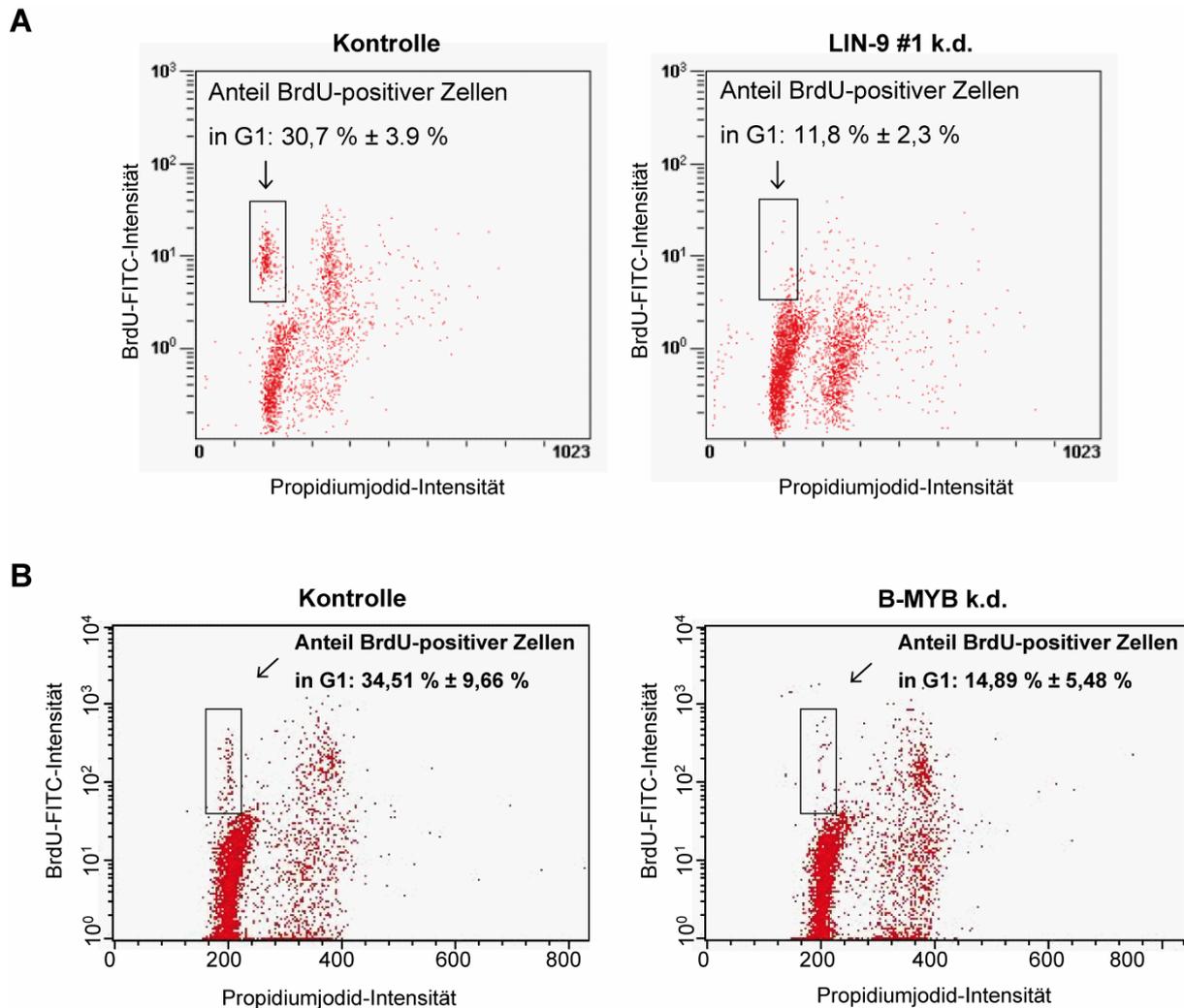


Abb. 4.19.: Verlangsamte Zellzyklusprogression LIN-9 bzw. B-MYB defizienter Zellen. Kontroll- infizierte sowie LIN-9 (A) bzw. B-MYB (B) depletierte Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert und anschließend gewaschen. Nach 9h wurden die Zellen fixiert und die Progression BrdU-positiver Zellen durch den Zellzyklus im Durchflusszytometer verfolgt. Die Daten stammen jeweils aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Eine Akkumulation in der frühen Mitose konnte durch die zuvor gezeigten Immunfärbungen weitgehend ausgeschlossen werden. Daher musste geklärt werden, ob die verlangsamte Zellzyklusprogression LIN-9 bzw. B-MYB defizienter Zellen auf eine verlängerte S-Phase oder auf einen Defekt in der G2-Phase zurückzuführen war. Eine von Begg und Kollegen 1985 beschriebene Methode ermöglicht die Berechnung der S-Phasen-Länge einer Zellpopulation anhand der Werte einer Einzelmessung (Begg et al., 1985). Die in *BrdU-pulse*-Assays erstellten Kinetiken dienten dabei als Grundlage (siehe 3.2.4). Zunächst wurden die mittleren Propidiumjodid-Fluoreszenz-Werte von BrdU-positiven Zellen (F_L), G1-Zellen (F_{G1}) und G2/M-Zellen ($F_{G2/M}$) mit Hilfe der FACS-Software ermittelt (siehe Abb. 4.20. A und B). Daraus lässt sich das *Relative Movement* RM von S-Phase Zellen, also die Bewegung

BrdU-positiver Zellen relativ zur Position von G1- und G2/M-Zellen im FACS-Profil, nach folgender Formel berechnen:

$$\mathbf{RM = (F_L - F_{G1}) / (F_{G2/M} - F_{G1})}$$

Die von den Zellen benötigte Zeit zur DNA-Synthese T_S ergibt sich aus folgendem Zusammenhang:

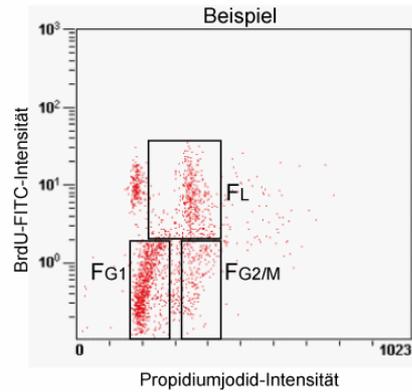
$$\mathbf{T_S = [0,5 / (RM - 0,5)] \times \text{Zeitspanne von der BrdU-Entfernung bis zur Fixierung [h]}$$

In Abbildung 4.20. C sind die S-Phase-Längen von Kontroll- und LIN-9 bzw. B-MYB depletierten Zellen als Mittelwert aus je drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Mit 13,4 h war die S-Phase LIN-9 depletierter Zellen nur geringfügig gegenüber Kontrollzellen (11,7 h) verlängert. Die stark verzögerte Progression LIN-9 defizienter Zellen ließ sich daher durch eine Verlängerung der S-Phase nicht erklären. In den B-MYB defizienten Zellen war dies sogar noch deutlicher zu erkennen. Hier betrug die Länge der S-Phase 12,6 h, im Vergleich zu den Kontrollzellen mit 11,8 h. Eine verlängerte S-Phase schied somit für LIN-9 bzw. B-MYB defiziente Zellen als Ursache für den verzögerten Wiedereintritt in die G1-Phase aus.

Zusammenfassend konnte man aus den oben gezeigten Untersuchungen schließen, dass die Ursache für die verlangsamte Zellzyklusprogression nach Depletion von LIN-9 bzw. B-MYB eine Verzögerung in der G2-Phase ist.

A



B

	F_L	F_{G1}	$F_{G2/M}$	RM	t [h]	T_S [h]	MW T_S [h]	Exp.
Ktrl.	365	222	376	0,92857143	9	10,50		I
Ktrl.	329	202	374	0,73837209	6	12,59	11,7	II
Ktrl.	330	202	373	0,74853801	6	12,07		III
LIN-9 k.d.	353	218	385	0,80838323	9	14,59		I
LIN-9 k.d.	317	195	367	0,70930233	6	14,33	13,4	II
LIN-9 k.d.	325	195	365	0,76470588	6	11,33		III

	F_L	F_{G1}	$F_{G2/M}$	RM	t [h]	T_S [h]	MW T_S [h]	Exp.
Ktrl.	310	207	381	0,59195402	3	16,31		I
Ktrl.	362	227	387	0,84375	6	8,73	11,8	II
Ktrl.	365	222	376	0,92857143	9	10,50		III
B-MYB k.d.	324	217	394	0,60451977	3	14,35		I
B-MYB k.d.	355	221	396	0,76571429	6	11,29	12,6	II
B-MYB k.d.	383	228	407	0,86592179	9	12,30		III

C

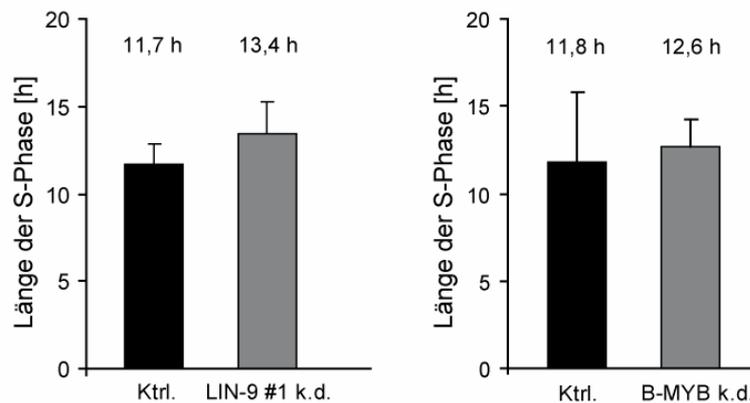


Abb. 4.20.: Länge der S-Phase nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion. (A) Beispiel zur Bestimmung der mittleren Propidiumjodid-Fluoreszenzintensitäten aus einem 2D-FACS-Profil. (B) Übersicht über die für Kontrollzellen und LIN-9 bzw. B-MYB depletierte Zellen ermittelten Fluoreszenzwerte. Die Länge der S-Phase wurde nach der von Begg *et al.* (Begg *et al.*, 1985) beschriebenen Methode aus den in *BrdU-pulse-Assays* erstellten Kinetiken berechnet. (C) Die Länge der S-Phase ist in LIN-9 bzw. B-MYB depletierten Zellen nur geringfügig verlängert. Die Daten geben jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten wieder. F_L : mittlere Propidiumjodid-Fluoreszenz BrdU positiver Zellen; F_{G1} : mittlere Propidiumjodid-Fluoreszenz von G1-Zellen; $F_{G2/M}$: mittlere Propidiumjodid-Fluoreszenz von G2/M-Zellen; **RM**: *relative Movement*; **t**: Zeitspanne von der BrdU-Entfernung bis zur Fixierung; T_S : Länge der S-Phase.

4.4.4. Abnahme der Cyclin B1 assoziierten Kinaseaktivität nach Verlust von LIN-9

Der Übergang von der G2-Phase in die Mitose wird durch Cyclin B/CDK1 (CDC2) gesteuert. In der Metaphase phosphoryliert dieser Komplex u.a. den so genannten *Anaphase-promoting-complex* (APC), welcher den Übergang in die Anaphase reguliert.

Wie die bisherigen Experimente zeigten, reguliert LIN-9 sowohl die Expression von Cyclin B als auch von CDC2. Da Cyclin B und die zugehörige Kinase CDC2 die entscheidenden Regulatoren beim G2/M-Übergang sind, lag die Vermutung nahe, dass deren verminderte Expression in LIN-9 defizienten Zellen maßgeblich zum Arrest der Zellen in der G2-Phase beiträgt.

In Kinase-Assays (siehe 3.5.7.) wurde daher der Status der Cyclin B-assoziierten Kinase-Aktivität in Lysaten aus LIN-9 depletierten BJ-ET Zellen und Kontrollzellen verglichen (Abb. 4.21.). Als Substrat diente Histon H1. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Verlust von LIN-9 zu einer starken Abnahme an phosphoryliertem Histon H1 führte. Ob dies auf einen direkten Einfluss von LIN-9 auf die Kinase-Aktivität zurückzuführen war, konnte mit diesem Versuchansatz nicht geklärt werden. Da aber die Proteinmenge an CDC2 nach Verlust von LIN-9 nur geringfügig abnahm (Abb. 4.7.), ist es wahrscheinlich, dass die Abnahme der Kinase-Aktivität auf die Reduktion von Cyclin B zurückzuführen ist.

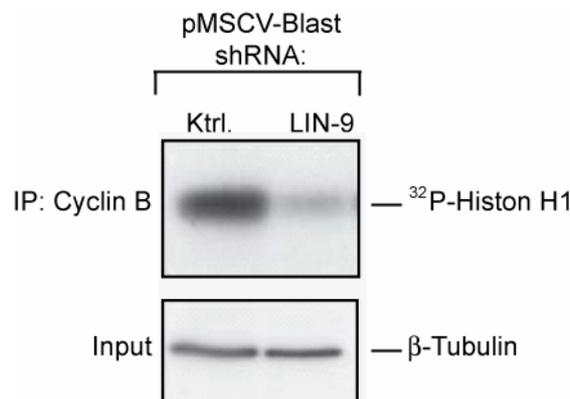


Abb. 4.21.: Abnahme der Cyclin B-assoziierten Kinase Aktivität nach Depletion von LIN-9. Cyclin B wurde aus Lysaten von Kontrollzellen und LIN-9 depletierten BJ-ET Zellen immunpräzipitiert und anschließend mit Histon H1 als Substrat und γ^{32} -P-ATP als Donor inkubiert. Die Detektion von phosphoryliertem Histon H1 erfolgte durch Autoradiographie. Zur Kontrolle wurde β -Tubulin aus den gleichen Lysaten im direkten Western Blot nachgewiesen. IP: Immunpräzipitation.

4.4.5. Der beobachtete Zellzyklusdefekt ist spezifisch für die Depletion von LIN-9

In vielen Fällen sind die durch das Einschleusen der siRNA zu beobachtenden Effekte nicht auf den Abbau der entsprechenden Ziel-mRNA zurückzuführen. Solche Effekte bezeichnet man als *off-target*-Effekte. Um auszuschließen, dass der beobachtete Zellzyklusdefekt LIN-9 defizienter Zellen auf einem solchen *off-target*-Effekt beruht, wurde LIN-9 in BJ-ET Zellen unter Verwendung einer zweiten unabhängigen shRNA-Sequenz (#2) depletiert. Wie zuvor schon beobachtet (siehe Abb. 4.1.), führte die shRNA-Sequenz #2 zu einer signifikanten, aber im Vergleich zu Sequenz #1 schwächeren Depletion des LIN-9 Proteins (Abb. 4.22. A). Auch in diesem Fall proliferierten LIN-9 defiziente Zellen deutlich langsamer als die Kontrollzellen (B). Die FACS-Profile ließen nach Depletion von LIN-9 mit Sequenz #2 eine Zunahme an Zellen in der G2/M-Phase erkennen (C). Wie auch für Sequenz #1 beobachtet, stieg die Zahl an Zellen mit einem 4n DNA-Gehalt ungefähr auf das 2-fache an. Auch in *BrdU-pulse-Assays* zeigten die mit Sequenz #2 infizierten BJ-ET Zellen den gleichen Phänotyp wie nach Infektion mit Sequenz #1 (D).

Da beide shRNA-Sequenzen in unabhängigen Versuchen zu dem gleichen Phänotyp führten, ist ein *off-target*-Effekt unwahrscheinlich. Der beobachtete Zellzyklusdefekt ist demnach spezifisch für den Verlust von LIN-9.

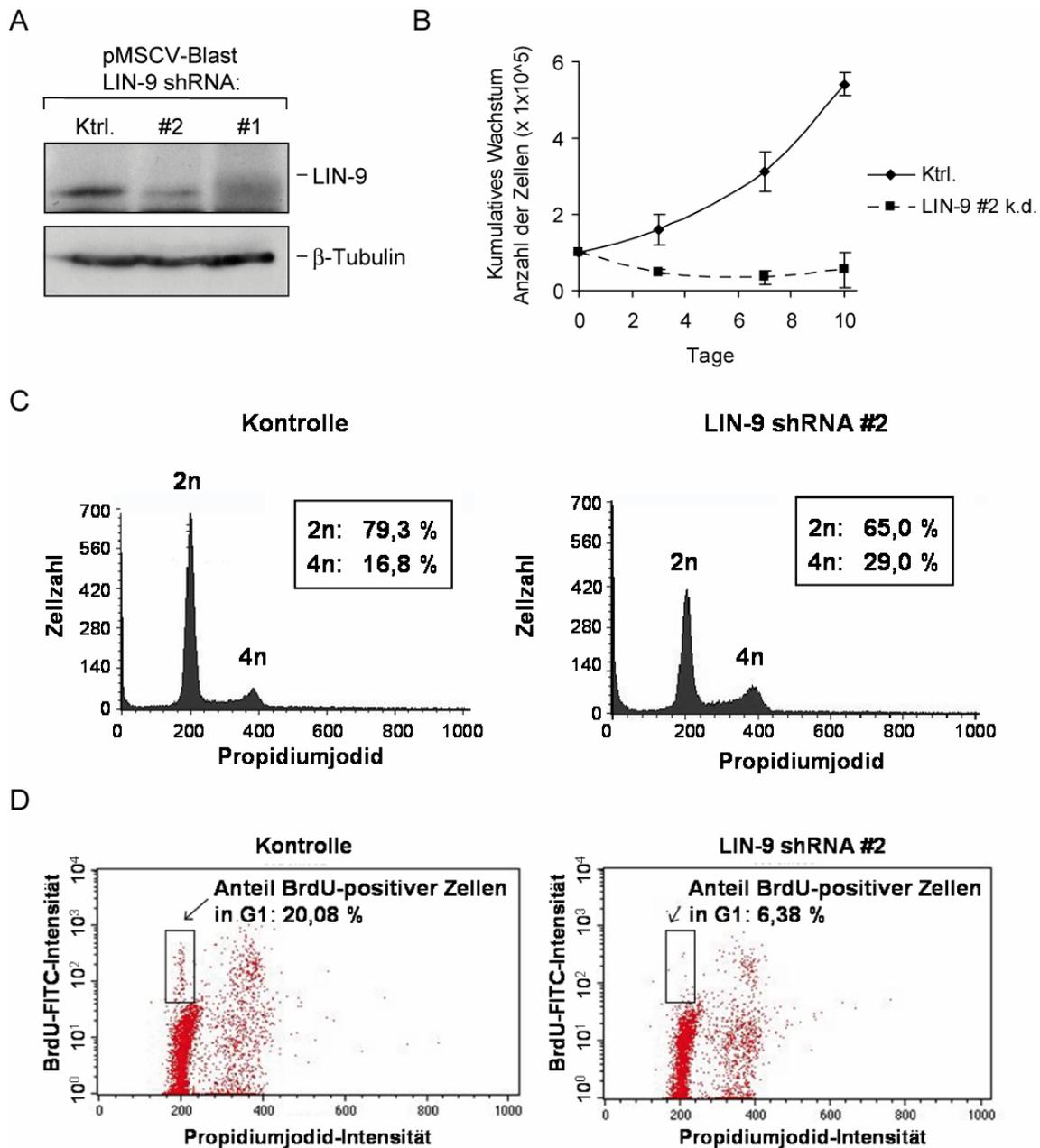


Abb. 4.22.: Die Depletion von LIN-9 mit einer zweiten shRNA-Sequenz führt zum gleichen Phänotyp. (A) Depletion von LIN-9 in BJ-ET Zellen mit zwei verschiedenen shRNA-Sequenzen. BJ-ET Zellen wurden entweder mit einem shRNA-Virus oder mit einem Kontrollvirus infiziert. Nach der Selektion wurden Gesamtzelllysate präpariert und LIN-9 in einem IP-Western Blot nachgewiesen. β -Tubulin wurde in einem direkten Western Blot analysiert. (B) LIN-9 defiziente Zellen sind im Wachstum retardiert. LIN-9 depletierte Zellen (Sequenz #2) bzw. Kontrollzellen wurden in Triplikaten nach einem 3T3-Protokoll passagiert. Nach jeder Passage wurde die Zellzahl bestimmt, die Zunahme der Zellzahl ermittelt und als kumulatives Wachstum gegenüber der Zeit aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Triplikate zum jeweiligen Zeitpunkt wieder. (C) Zellzyklusprofile von LIN-9 depletierten Zellen vs. Kontrollzellen. BJ-ET Zellen wurden mit der shRNA #2 bzw. mit einem Kontrollvirus infiziert. Nach der Selektion wurden die Zellen fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und der DNA-Gehalt in einem Durchflusszytometer gemessen. (D) *BrdU-pulse-Assay* mit LIN-9 depletierten Zellen und Kontrollzellen. Die infizierten Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert und im Anschluss mehrmals gewaschen. Nach 9 h wurden die Zellen fixiert und die Progression BrdU-positiver Zellen im Durchflusszytometer verfolgt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

4.5. LIN-9 und B-MYB regulieren gemeinsam die Expression von G2/M-Genen

Aus der Tatsache, dass der Verlust von B-MYB den analogen Phänotyp LIN-9 defizienter Zellen hervorruft, konnte man spekulieren, dass LIN-9 und B-MYB zusammen die Expression der in den Microarray-Analysen identifizierten G2/M-Gene regulieren. Interessant ist, dass in *D. melanogaster* die Abwesenheit des LIN-9 Homologs, Mip130, zu einer dramatischen Destabilisierung des MYB-Proteins führt (Beall et al., 2004). Daher sollte untersucht werden, ob die beobachteten Effekte auf die G2/M-Gene nach LIN-9 Depletion auf eine verminderte Menge an B-MYB Protein zurückzuführen sind.

LIN-9 wird während des gesamten Zellzyklus exprimiert, wobei das Expressionsmaximum in der S-Phase liegt. B-MYB hingegen wird in der späten G1-Phase und in der S-Phase exprimiert. Eine Interaktion von LIN-9 und B-MYB ist daher vor allem in der S-Phase zu erwarten. Aus diesem Grund sollten für das Experiment in der S-Phase synchronisierte Zellen verwendet werden. Da sich BJ-ET Zellen jedoch nicht vollständig durch Serumentzug im Zellzyklus arretieren ließen, wurde der Versuch in der humanen Glioblastomzelllinie T98G durchgeführt. Diese Zellen lassen sich durch Serumentzug in der G₀-Phase arretieren. Nach der Zugabe von Serum treten diese Zellen erneut in den Zellzyklus ein und proliferieren synchron (Mayol et al., 1995).

Um T98G Zellen in der G₀-Phase zu arretieren wurden die Zellen zunächst durch zweimaliges Waschen vom serumhaltigen Medium befreit und für drei Tage in Hungermedium (0 % Serum) weiterkultiviert (siehe 3.1.8.). Nach 72 h wurden die gehungerten T98G Zellen mit Hilfe von Oligofectamine mit einem LIN-9 spezifischen RNAi-Oligonukleotid bzw. mit einem Kontroll-Oligonukleotid transfiziert (siehe 3.1.10.). Weitere 48 h nach der Transfektion wurden die gehungerten Zellen durch Zugabe von serumhaltigem Medium (15 % FCS) in den Zellzyklus entlassen. 20 h nach der Serumzugabe wurden aus den transfizierten Zellen Zellkernextrakte (siehe 3.5.2.) gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich ca. 70 % der Zellen in der S-Phase (Allen et al., 1997). Der Nachweis von B-MYB und LIN-9 erfolgte durch IP-Western Blot. Wie in Abb. 4.23. zu sehen, führte die Transfektion des RNAi-Oligonukleotids zu einer Depletion des LIN-9 Proteins. Die Proteinmenge an B-MYB blieb dabei unverändert. Die nach Depletion von LIN-9 beobachteten Effekte auf die Expression der G2/M-Gene sind folglich nicht auf eine Destabilisierung des B-MYB Proteins zurückzuführen.

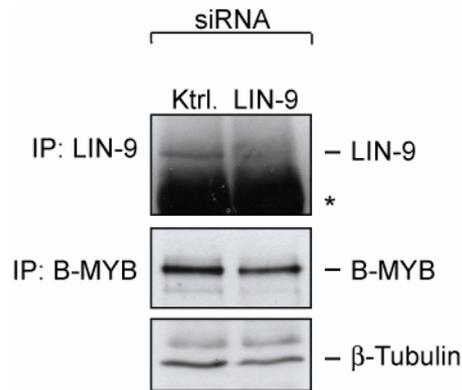


Abb. 4.23.: Expression von B-MYB und LIN-9 auf Proteinebene nach LIN-9 Depletion. Serumgehungerte T98G Zellen wurden mit einem LIN-9 spezifischen RNAi-Oligonukleotid bzw. mit einem Kontroll-Oligonukleotid transfiziert und ca. 48 h später durch Serumzugabe in den Zellzyklus entlassen. Nach 20 h (S-Phase) wurden aus den Zellen Zellkernextrakte gewonnen. Der Nachweis von B-MYB und LIN-9 erfolgte durch Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot unter Verwendung von spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurde β -Tubulin im direkten Western Blot detektiert. *: Schwere Kette des Antikörpers.

4.6. LIN-9 regulierte Gene werden nicht immer durch B-MYB koreguliert

Die in den vorherigen Abschnitten gezeigten Versuchsergebnisse zeigten, dass für den G2/M-Übergang sowohl LIN-9 als auch B-MYB benötigt wird. Eine Frage, die sich daher bei der Betrachtung der Gesamtliste LIN-9 regulierter Gene ergab war, ob LIN-9 für die transkriptionelle Regulation dieser Gene immer B-MYB benötigt, oder ob die beobachtete Koregulation exklusiv für die Aktivierung der untersuchten G2/M-spezifischen Gene nötig ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Expressionslevel weiterer LIN-9 Zielgene untersucht, für welche bisher keine Rolle in der G2/M-Phase bekannt ist.

Hierzu wurde LIN-9 bzw. B-MYB in BJ-ET Zellen durch virale Infektion mit den entsprechenden shRNAs depletiert und im Anschluss an die Selektion (4 Tage mit 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Blasticidin) die Gesamt-RNA isoliert. In qRT-PCRs wurden die Expressionslevel verschiedener LIN-9 Zielgene im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt. Wie erwartet kam es nach dem Verlust von LIN-9 zu einer stark verminderten Expression von Cyclin A2 (Abb. 4.24. A). Eine signifikante etwas schwächere Herunterregulation von Cyclin A2 konnte auch nach Depletion von B-MYB beobachtet werden (B). Für die Gene CCT4, DPYD und FLOT1 ist in der Literatur keine G2/M-spezifische Funktion beschrieben. Diese Gene waren nach der Depletion von LIN-9 herunterreguliert (siehe Anhang Tabelle A1 und Abb. 4.24 A). Die Depletion von B-MYB hingegen führte zur keiner signifikanten Expressionsänderung von DPYD und FLOT1 und zu einer schwachen Aktivierung der CCT4-Expression (Abb. 4.24. B).

Die Expression von ADFP und p21 ist in LIN-9 defizienten Zellen hochreguliert (siehe Anhang Tabelle A2 und Abb. 4.24. A). Diese Gene spielen eine Rolle in der Differenzierung bzw. in der Zellzykluskontrolle, besitzen jedoch keine nachweisbare G2/M-spezifische Funktion. Im Fall von ADFP führte der Verlust von B-MYB zu keiner signifikanten Expressionsänderung. p21 hingegen zeigte eine schwache Abnahme der Expression.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, dass nicht alle LIN-9 Zielgene durch B-MYB koreguliert werden. Eine Koregulation von LIN-9 und B-MYB konnte nur in Bezug auf die Aktivierung G2/M-spezifischer Gene festgestellt werden.

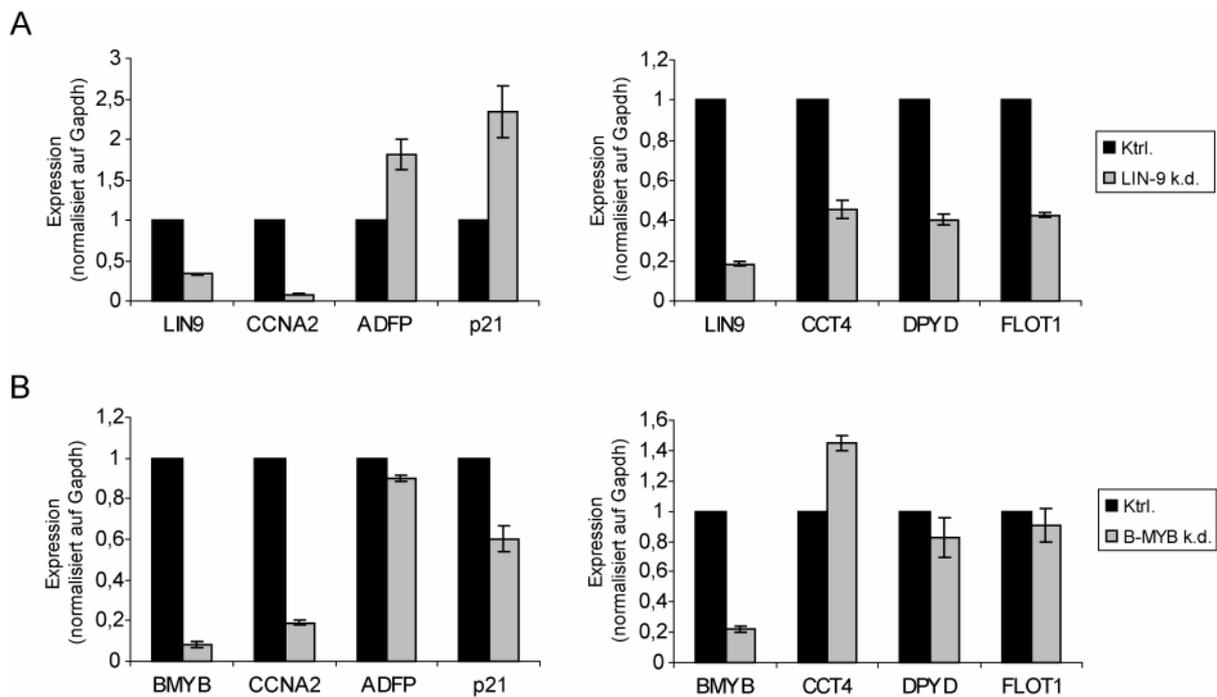


Abb. 4.24.: Nicht alle LIN-9 regulierten Gene werden gleichzeitig durch B-MYB koreguliert. Die Expression der angegebenen Gene aus LIN-9 (A) bzw. B-MYB (B) depletierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-infizierten Zellen wurde in qRT-PCR Analysen untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Die Expression jedes Gens in den verschiedenen Ansätzen wurde in Triplikaten bestimmt und auf Gapdh normalisiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Triplikate wieder.

5. DISKUSSION

Das humane LIN-9 wurde zuerst als ein neues pRB-interagierendes Protein beschrieben, welches im Kontext des pRB-Signalweges als Tumorsuppressor fungiert. Doch die exakte Funktion von LIN-9 ist bisher unverstanden. Von den LIN-9 Homologen in *D. melanogaster* (Mip130/TWIT und ALY) und *C. elegans* ist bekannt, dass sie als Untereinheiten, in der Evolution hoch konservierter RB/E2F-Komplexe, an der transkriptionellen Regulation von Genen beteiligt sind. Für das humane LIN-9 konnte gezeigt werden, dass es mit pRB in der transkriptionellen Aktivierung differenzierungsspezifischer Gene kooperiert. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass LIN-9 auch im humanen System eine Rolle in der transkriptionellen Regulation der Genexpression spielt. Daher sollten weitere Gene identifiziert werden, welche in Abhängigkeit von LIN-9 reguliert werden. Dafür wurde zunächst ein RNAi-basierendes System etabliert, mit welchem es gelang die posttranskriptionelle Expression von LIN-9 in primären humanen Fibroblasten (BJ-ET Zellen) effizient zu reprimieren. Mit Hilfe von cDNA-Microarray Analysen wurde das Genexpressionsprofil LIN-9 depletierter BJ-ET Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht. Davon ausgehende Analysen sollten Aufschluss über die genaue Funktion von LIN-9 in der Regulation dieser Gene geben.

5.1 LIN-9 reguliert die Expression G2/M-spezifischer Gene

Die Liste der nach LIN-9 Depletion differentiell exprimierten Gene umfasst insgesamt 103 Gene, wovon 67 Gene nach LIN-9 Verlust verstärkt und 36 vermindert exprimiert werden. Ordnet man diese Gene anhand ihrer Funktion in verschiedene Subgruppen ein, ist offensichtlich, dass LIN-9 einen Einfluss auf die Expression von Genen hat, deren Produkte eine Funktion in der G2/M-Phase besitzen. Diese bilden innerhalb der Liste der nach LIN-9 Depletion herunterregulierten Gene, mit einem Anteil von 33 %, die größte funktionelle Gruppe. Die RNAi-vermittelte Depletion von LIN-9 in primären humanen Fibroblasten hat gezeigt, dass der Verlust von LIN-9 zu einer Expressionsabnahme bestimmter G2/M-spezifischer Gene wie z.B. Cyclin A2, Cyclin B1, CDC2, PLK1 und UBCH10 führt. Damit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass LIN-9 eine entscheidende Rolle in der Aktivierung zellzyklusspezifischer Gene spielt.

In qRT-PCR und Western Blot Analysen war zwar zu sehen, dass der Verlust von LIN-9 zwar zu einer starken, nicht jedoch zu einer vollständigen Repression der G2/M-Gene führt. Dies ist zum einen vermutlich darauf zurückzuführen dass LIN-9 durch RNAi nicht vollständig aus der Zelle entfernt werden konnte. Zudem ist es sehr wahrscheinlich, dass auch andere Faktoren zur Expression dieser Gene in LIN-9 depletierten Zellen beitragen. Bekannt ist, dass z.B. die Transkriptionsfaktoren FOXM1 und CBF/NF-Y für die Aktivierung einer

überlappenden Gruppe an Genen wie z.B. Cyclin B1, Cyclin A2, CDC2, PLK1 und Aurora A benötigt werden (Fung and Poon, 2005; Hu et al., 2006; Laoukili et al., 2005).

Für 6 der LIN-9 regulierten G2/M-Gene ist zudem in verschiedenen Organismen eine Regulation durch den Transkriptionsfaktor B-MYB nachgewiesen (Anhang Tabelle A1). Zhu und Kollegen konnten bereits zeigen, dass die RNAi-vermittelte Depletion von B-MYB zu einer verminderten Expression der G2/M-Gene Cyclin A2, Cyclin B1 und CDC2 führt (Zhu et al., 2004). Ein signifikanter Überlapp zwischen LIN-9 Zielgenen und B-MYB regulierten Genen findet sich auch im Zebrafisch. cDNA-Microarray Analysen der *loss-of-function*-Mutante *crash&burn* (crb), welche auf eine Mutation in *bmyb* zurückzuführen ist ergaben, dass B-MYB u.a. für die Transaktivierung von Cyclin B, CDC2, BIRC5, Cep55 und DLG7 benötigt wird (Shepard et al., 2005) (siehe Anhang Tabelle A1). Untersuchungen in dem Modellorganismus *D. melanogaster* haben gezeigt, dass die Homologe von LIN-9 und B-MYB zusammen an der transkriptionellen Regulation von Genen beteiligt sind (Korenjak et al., 2004; Lewis et al., 2004). Eine Vermutung war, dass LIN-9 und B-MYB auch im humanen System gemeinsam die Expression von Genen regulieren.

5.2. LIN-9 und B-MYB regulieren den Eintritt in die Mitose

Die Produkte der in Abhängigkeit von LIN-9 regulierten Gene Cyclin A2, Cyclin B1 und CDC2 triggern maßgeblich den Übergang von der G2-Phase in die Mitose (Murray, 2004; Nigg, 2001; Pines, 1999; Sanchez and Dynlacht, 2005). PLK1, dessen Expression in der späten G2-Phase ebenfalls durch LIN-9 aktiviert wird, ist eine Serin/Threonin Kinase und begünstigt den Eintritt in die Mitose indem es die Aktivierung von Cyclin B/CDC2 fördert (Takai et al., 2005; van Vugt and Medema, 2005). Weitere Produkte von LIN-9 regulierten Zielgenen, deren Expressionsmaximum in der G2/M-Phase liegt, haben eine bereits bekannte Funktion in der Kontrolle der Mitose. Beispielsweise sind Survivin (BIRC5), CENP-E, Aurora A und BUB1 Bestandteile des mitotischen Spindel-Checkpoints (Andrews et al., 2003; Carvalho et al., 2003; Lengauer and Wang, 2004; Lens and Medema, 2003; Meraldi et al., 2004; Meraldi and Sorger, 2005; Weaver et al., 2003; Yang et al., 2004).

Da LIN-9 und B-MYB für die Aktivierung von zellzyklusfördernden Genen benötigt werden, war zu vermuten, dass sich der Verlust von LIN-9 oder B-MYB negativ auf die Proliferation von Zellen auswirken könnte. Tatsächlich proliferieren LIN-9 bzw. B-MYB defiziente Fibroblasten deutlich langsamer. Die Zellzyklusprofile zeigen zudem eine signifikante Akkumulation dieser Zellen in der G2/M-Phase. Eine genauere Analyse ergab, dass die Progression LIN-9 bzw. B-MYB depletierter Fibroblasten von der S-Phase durch die G2/M-Phase und in die nächste G1-Phase deutlich verzögert ist. Die verlangsamte Zellzyklusprogression und die Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase, erklärt die verminderte Proliferation LIN-9 bzw. B-MYB defizienter Zellen.

Immunfluoreszenzfärbungen ließen eine Abnahme an Phospho-Histon H3 positiven Zellen nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion erkennen. 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. Die verminderte Anzahl an Phospho-Histon H3 positiven Zellen nach LIN-9 bzw. B-MYB Depletion ist demzufolge ein Indiz dafür, dass diese Zellen bereits vor Eintritt in die Mitose arretieren. Wahrscheinlicher ist daher, dass die verlangsamte Zellzyklusprogression LIN-9 bzw. B-MYB defizienter Zellen auf einen Defekt in der S-Phase oder in der G2-Phase zurückzuführen ist.

In humanen Megakaryozyten konnte gezeigt werden, dass B-MYB für den ordnungsgemäßen Ablauf der S-Phase essentiell ist (Garcia and Frampton, 2006). B-MYB depletierte Megakaryozyten durchlaufen die S-Phase im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich langsamer. Eine ähnliche Funktion in der Aktivierung der DNA-Replikation wurde auch in *D. melanogaster* für dMYB nachgewiesen (Fitzpatrick et al., 2002; Manak et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte weder für LIN-9 noch für B-MYB depletierte Zellen eine signifikant veränderte Länge der S-Phase nachgewiesen werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die verlangsamte Zellzyklusprogression nach LIN-9 bzw. B-MYB Verlust, auf einen Defekt in der S-Phase zurückzuführen ist. Die Daten zeigen vielmehr, dass die verlangsamte Progression LIN-9 bzw. B-MYB depletierter Zellen, auf einen Defekt der Zellen in der späten G2-Phase und auf einen, daraus resultierenden verzögerten Eintritt in die Mitose zurückzuführen ist.

Die Beobachtung, dass der Verlust von B-MYB offensichtlich zu einem Defekt in der G2-Phase führt, deckt sich zum Teil mit bereits publizierten Daten. Darin zeigen Santilli und Kollegen, dass die RNAi-vermittelte Depletion von B-MYB in Wi38-Zellen (primäre humane Fibroblasten) zu einem partiellen Arrest der Zellen in der G2-Phase führt (Santilli et al., 2005). Auch in *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass der Verlust von dMYB zu einem Arrest von Flügelzellen in der G2/M-Phase führt, welcher durch die Überexpression von CDC2 aufgehoben wird (Katzen et al., 1998). Dies steht jedoch im Widerspruch zu Studien in *D. melanogaster*, im Zebrafisch und in humanen Proerythrozyten (HEL-Zellen). Hier konnte gezeigt werden, dass MYB-defiziente Zellen die G2-Phase normal durchlaufen und erst in der Mitose arretieren (Fung et al., 2002; Garcia and Frampton, 2006; Okada et al., 2002; Shepard et al., 2005). Eine Möglichkeit, die diese gegensätzlichen Aussagen miteinander vereinbaren könnte ist, dass es vom Zelltyp abhängt, ob der Verlust von B-MYB zu einem Arrest der Zellen in der späten G2-Phase oder in der Mitose führt.

Die Tatsache, dass LIN-9 die Expression einer ganzen Gruppe von G2/M-Genen reguliert, macht es unwahrscheinlich, dass es nur ein kritisches LIN-9 Zielgen gibt, welches für den beobachteten Zellzyklusdefekt verantwortlich ist. Dennoch lässt die bedeutende Rolle von Cyclin B1 als regulatorische Untereinheit der Kinase CDC2, welche maßgeblich den

Übergang von der G2- in die M-Phase triggert vermuten, dass die verminderte Expression von Cyclin B1 in LIN-9 depletierten Fibroblasten hauptsächlich zu dem beobachteten G2-Arrest der Zellen beiträgt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die verminderte Cyclin B1 Expression mit einer starken Reduktion der Cyclin B1 assoziierten Kinase Aktivität einhergeht. Es konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Reduktion auf einem direkt Einfluss von LIN-9 auf die Kinase Aktivität von CDC2, oder auf die verminderte Menge an Cyclin B1 zurückzuführen ist. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Reexpression von Cyclin B1 in LIN-9 defizienten Zellen den Arrest der Zellen in der G2/M-Phase aufheben kann.

5.3. Mechanismus der LIN-9 vermittelten Genregulation

Eine Frage die sich stellte war, ob LIN-9 die Expression der G2/M-Gene direkt oder indirekt reguliert. ChIP-Analysen haben gezeigt, dass LIN-9 während der S/G2/M-Phase an die Promotoren der untersuchten Gene assoziiert (durchgeführt von Björn von Eyß). Dies war eine erste Evidenz dafür, dass die Regulation der G2/M-Gene durch LIN-9 direkt erfolgen könnte. LIN-9 besitzt keine bekannten DNA-Bindedomänen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass LIN-9 direkt an die Promotoren bindet. Eine Vermutung war, dass LIN-9 indirekt, durch die Interaktion mit anderen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, an die Promotoren der G2/M-Gene rekrutiert wird. Als potenzieller Interaktionspartner kam B-MYB in Frage, da bekannt war, dass 6 der LIN-9 regulierten G2/M-Gene ebenfalls durch B-MYB aktiviert werden.

Erste Evidenz für eine mögliche biochemische und funktionelle Interaktion von LIN-9 und B-MYB, lieferten Untersuchungen in *D. melanogaster*. In diesem Modellorganismus konnte gezeigt werden, dass die Homologe von LIN-9 und B-MYB Untereinheiten eines größeren RB/E2F-Komplexes sind, welcher die Transkription von Genen reguliert (Korenjak et al., 2004; Lewis et al., 2004). Die Hypothese ist, dass LIN-9 durch die Interaktion mit B-MYB die Expression der G2/M-Gene reguliert. Diese wird durch Co-Immunpräzipitationen unterstützt, die eine molekulare Interaktion von LIN-9 und B-MYB in verschiedenen humanen Zelllinien belegen (durchgeführt von Björn von Eyß). Zudem weisen ChIP-Analysen die Bindung von B-MYB während der S/G2/M-Phase an die Promotoren der LIN-9 regulierten G2/M-Gene nach (Björn von Eyß). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass LIN-9 indirekt durch die Assoziation mit B-MYB an die Promotoren der G2/M-Gene rekrutiert wird.

Eine Frage die sich stellt ist, welcher genaue Mechanismus der LIN-9 und B-MYB vermittelten Genregulation zugrunde liegt. Dass LIN-9 und B-MYB sehr wahrscheinlich als Komplex an die G2/M-Promotoren binden schließt nicht aus, dass auch weitere Proteine an der Regulation dieser Promotoren durch LIN-9 und B-MYB beteiligt sind. Von den insgesamt

12 G2/M-Genen, die durch LIN-9 reguliert werden, sind bisher 9 als E2F-regulierte Gene in der Literatur beschrieben (Anhang Tabelle A1). Zhu und Kollegen zeigten zudem, dass die Aktivierung der Cyclin A2, Cyclin B1 und CDC2 Genexpression durch B-MYB von einer intakten E2F-Bindestelle abhängig ist (Zhu et al., 2004). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass für die Regulation der untersuchten G2/M-Promotoren durch LIN-9 und B-MYB auch die Bindung von E2F benötigt wird. In *D. melanogaster* wurden Mip130/LIN-9 und dMYB gemeinsam mit E2F als Untereinheiten des dREAM/Myb-MuvB-Komplexes beschrieben (Korenjak et al., 2004; Lewis et al., 2004). Eine Überlegung ist, dass ein ähnlicher Komplex mit LIN-9 und B-MYB als Untereinheiten, auch in Vertebraten existiert und für die Aktivierung der in dieser Arbeit gezeigten G2/M-spezifischen Gene verantwortlich ist. Der dREAM/Myb-MuvB-Komplex ist bis jetzt nur als Repressor-Komplex E2F-abhängiger differenzierungs- und geschlechtsspezifischer Gene beschrieben (Korenjak and Brehm, 2005; Lewis et al., 2004). Jedoch wurde bisher nicht überprüft, ob dieser Komplex auch ein breiteres Spektrum an Genen reguliert. Die Rolle eines humanen dREAM/Myb-MuvB-ähnlichen Komplexes in der Aktivierung der LIN-9 abhängigen G2/M-Gene ist daher nicht auszuschließen.

Hier stellt sich die Frage, welche molekulare Funktion LIN-9 innerhalb eines solchen Komplexes übernimmt und wie diese Funktion die Regulation der G2/M-Gene durch B-MYB beeinflusst. Verschiedene Modelle sind denkbar, wobei diese sich nicht gegenseitig ausschließen würden:

Hat LIN-9 einen Einfluss auf die Stabilität von B-MYB?

Pilkinton und Kollegen zeigten kürzlich, dass der Verlust von LIN-9 zu einer posttranskriptionellen Repression von B-MYB führt und in einer Abnahme der Cyclin A und Cyclin B Expression resultiert (Pilkinton et al., 2007). Cyclin A und Cyclin B werden wie zuvor schon beschrieben, u.a. durch B-MYB aktiviert. Die Hypothese von Pilkinton ist, dass LIN-9 die Expression von Cyclin A und Cyclin B nicht direkt fördert, sondern indirekt, indem LIN-9 für die Stabilisierung des B-MYB Proteins notwendig ist. Eine solche Abhängigkeit zwischen LIN-9 und B-MYB wurde bereits zuvor für den dREAM/Myb-MuvB-Komplex in *D. melanogaster* beschrieben (Beall et al., 2004). Hier konnte gezeigt werden, dass der Verlust einzelner Untereinheiten, in einer Destabilisierung anderer Komplex-Bestandteile resultiert und der Komplex dadurch vermutlich an Integrität verliert. Insbesondere die Abwesenheit des LIN-9 Homologs Mip130/TWIT führt zu einer dramatischen Destabilisierung des dMYB-Proteins.

In dem in dieser Arbeit verwendeten System konnte jedoch kein Effekt von LIN-9 auf die Expression von B-MYB beobachtet werden. Die Proteinmenge von B-MYB blieb nach Depletion von LIN-9 unverändert. LIN-9 scheint daher in primären humanen Fibroblasten weder einen Einfluss auf die B-MYB Expression, noch auf die Stabilität des B-MYB Proteins zu haben. Wahrscheinlicher ist, dass LIN-9 eine direktere Rolle in der B-MYB vermittelten Transaktivierung der G2/M-Gene spielt.

Vermittelt LIN-9 die Rekrutierung von Koaktivatoren an B-MYB?

Für B-MYB ist beschrieben, dass es zur Erlangung seiner vollen transaktivierenden Eigenschaften u.a. die Interaktion mit Koaktivatoren wie z.B. CBP/p300, Cyclin D1, PARP1 und p107 benötigt (Sala, 2005). Eine Möglichkeit wäre daher, dass LIN-9 die Interaktion von Koaktivatoren mit B-MYB vermittelt und somit die Aktivierung von Genen durch B-MYB fördert. Dies würde implizieren, dass B-MYB auch in der Abwesenheit von LIN-9 an die Promotoren bindet, jedoch nicht in der Lage ist, die Expression dieser Gene zu aktivieren.

Induziert LIN-9 Änderungen in der Chromatinstruktur?

Das testisspezifische LIN-9 Homolog in *D. melanogaster*, ALY, ist ein chromatinassoziiertes Protein. ALY ist ein transkriptioneller Aktivator von differenzierungsspezifischen Genen während der Spermatogenese (White-Cooper et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von ALY zur partiellen Kondensierung von Chromosomen in primären Spermatozyten führt (Lin et al., 1996). Es wird daher vermutet, dass ALY die Transkription der Differenzierungsgene durch die Regulation der Chromatinstruktur kontrolliert.

Demzufolge wäre es möglich, dass LIN-9 eine Auflockerung der Chromatinstruktur im Bereich der Promotoren induziert und dadurch die Transaktivierung der nachgeschalteten Gene durch B-MYB fördert.

Vermitteln LIN-9 und B-MYB den Wechsel von einem Repressor-Komplex in einen Aktivator-Komplex?

Wie zuvor schon erwähnt, ist für einen Grossteil der LIN-9 regulierten G2/M-Gene eine Regulation in Abhängigkeit von E2F-Transkriptionsfaktoren beschrieben. Für einige der E2F-regulierten G2/M-Gene konnte gezeigt werden, dass sie in der G₀-Phase durch einen E2F4/p130-Komplex reprimiert werden. In der S- und G2/M-Phase hingegen erfolgt eine Aktivierung durch E2F1-E2F3. Durch ChIP-Analysen gelang es zu zeigen, dass LIN-9 nicht nur während der S/G2/M-Phase, sondern bereits in der G₀-Phase, zusammen mit E2F4/p130 an die Promotoren der G2/M-Gene lokalisiert ist. In der S-Phase hingegen dissoziieren E2F4/p130 wie erwartet von den Promotoren und anstelle dessen bindet B-MYB (durchgeführt von Fabienne Schmit). Daher kann man annehmen, dass LIN-9 in der G₀-Phase durch einen reprimierenden E2F4/p130-Komplex an die Promotoren rekrutiert wird. Während des Wiedereintritts in den Zellzyklus hingegen bindet LIN-9 über einen aktivierenden B-MYB-Komplex an die Promotoren.

Ein ähnliches Repressor/Aktivator-Modell wurde bereits in *D. melanogaster* für Mip130/LIN-9 und dMYB in der Regulation der Replikation vorgeschlagen. Hier konnte gezeigt werden, dass Mip130/LIN-9 Bestandteil des, die Replikation inhibierenden Myb-MuvB-Komplexes ist. dMYB wird hier nicht für die Repression der Replikation benötigt, sondern um den Repressor-Komplex in einen, die Replikation aktivierenden Komplex umzuwandeln (Beall et al., 2004). Unterstützt wird dieses Modell durch genetische

Studien die zeigen, dass die Mutation von Mip130/LIN-9 den letalen Phänotyp von dMYB-Mutanten supprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass die Repressoraktivität von Mip130/LIN-9 für die Letalität der dMYB-Mutanten verantwortlich ist (Beall et al., 2004).

Inzwischen ist es gelungen, die Existenz eines humanen Komplexes (LINC für LIN-Complex) nachzuweisen, welcher in seiner Zusammensetzung dem dREAM/Myb-MuvB-Komplex und dem DRM-Komplex in Invertebraten sehr ähnlich ist (Fabienne Schmit und Stefan Gaubatz, unveröffentlicht). LIN-9 ist neben 4 weiteren SynMuv B-homologen Proteinen, LIN-37, LIN-52, LIN-54 und RbAp48, fester Bestandteil des LINC-Kernkomplexes. Die RNAi-vermittelte Depletion der LINC-Untereinheiten LIN-9, LIN-52 oder LIN-54 zeigen, dass LINC die Expression G2/M-spezifischer Gene aktiviert und bestätigen die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Rolle von LIN-9 als positiver Regulator G2/M-spezifischer Gene.

Im Gegensatz zur Situation in *D. melanogaster*, gehören E2F und *Pocket Proteine* nicht zum stabilen Kernkomplex. An Stelle dessen interagiert der LINC-Kernkomplex in Abhängigkeit vom Zellzyklus mit weiteren Subkomplexen, die entweder E2F4/p130 oder B-MYB/p107 enthalten. Schmit und Kollegen zeigen, dass LINC in ruhenden Zellen (G₀-Phase) mit E2F4/p130 assoziiert und an die Promotoren E2F-regulierter Gene bindet. In der S-Phase geht die Assoziation mit E2F4/p130 verloren. Stattdessen bindet LINC zusammen mit B-MYB/p107 an die Promotoren B-MYB und LIN-9 regulierter G2/M-Gene. Eine weitere Überlegung ist daher, dass LIN-9 als eine Art Adapter fungiert, welcher die Assoziation des LINC-Kernkomplexes mit E2F4/p130 bzw. B-MYB/p107 vermittelt. In einem solchen Modell würden LIN-9 und B-MYB benötigt werden, um E2F4/p130 von den Promotoren zu verdrängen und LINC von der reprimierenden Form in die aktivierende Form zu überführen. Bei einem Verlust von LIN-9 könnte keine Inaktivierung von E2F4/p130 erfolgen und die G2/M-Gene bleiben reprimiert. Zudem wäre es durchaus möglich, dass sich der Verlust von LIN-9 auf die Stabilität anderer LINC-Untereinheiten und damit auf die Integrität des Komplexes auswirken könnte.

Die Aufreinigung des LINC-Komplexes bestätigt die Vermutung, dass LIN-9 und B-MYB als Untereinheiten eines dREAM/Myb-MuvB-ähnlichen Komplexes die Expression G2/M-spezifischer Gene regulieren. Daraus geht jedoch nicht hervor, ob und welche der zuvor genannten Hypothesen, für die molekulare Funktion von LIN-9 innerhalb des LINC-Komplexes zutreffen. Hier wären Co-Immunpräzipitationen und ChIP-Analysen in LIN-9 depletierten Zellen sinnvoll. Diese könnten Aufschluss darüber geben, ob und in welcher Form sich die Zusammensetzung des LINC-Komplexes und dessen Bindung an die Promotoren durch den Verlust von LIN-9 ändert.

Aufgrund der Tatsache, dass LINC während der G₀-Phase über E2F4/p130 an die Promotoren E2F-regulierter Gene bindet, überrascht es, dass die Depletion einzelner Untereinheiten wie

z.B. LIN-9, LIN-52 oder LIN-54, keinen Einfluss auf die Repression dieser Gene zu haben scheint (Fabienne Schmit und Stefan Gaubatz, unveröffentlicht). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Repression dieser Gene, das Zusammenwirken von LINC mit weiteren Repressor-Komplexen oder chromatinmodifizierenden Komplexen erfordert. In einem solchen Fall, würde die Depletion einzelner LINC-Untereinheiten vermutlich nicht ausreichen, um einen Effekt auf die Repression der Gene beobachten zu können. Hinweise, die ein solches Modell unterstützen, liefern Untersuchungen in *C. elegans*. Hier konnte gezeigt werden, dass mindestens 3 der SynMuvB-Genprodukte einen Komplex formen, welcher Ähnlichkeit zum NuRD (*Nucleosome Remodelling and Deacetylase*)-Komplex in Säugetieren aufweist (Harrison et al., 2006). Es wird vermutet, dass der DRM-Komplex und der NuRD-ähnliche Komplex gemeinsam für die Repression differenzierungsspezifischer Gene während der Vulvaentwicklung verantwortlich sind.

5.4. LIN-9 Zielgene: eine allgemeine Betrachtung

5.4.1. LIN-9 abhängige nicht G2/M-spezifische Gene

Betrachtet man sich die Gesamtliste der nach LIN-9 Verlust differentiell exprimierten Gene, stellen die G2/M-Gene mit ca. 11 % nur einen kleinen Anteil der möglichen LIN-9 Zielgene dar. Daher wurden auch weitere Gene der Gesamtliste hinsichtlich ihrer Regulation durch LIN-9 untersucht. Für die Gene CCT4, DPYD, FLOT1, ADFP und p21, welche keine nachweisbare G2/M-spezifische Expression oder Funktion besitzen, konnte die Regulation durch LIN-9 bestätigt werden. Unklar ist, ob es sich bei diesen Genen um direkte LIN-9 Zielgene handelt und wie diese durch LIN-9 reguliert werden könnten. Eine Koregulation durch B-MYB konnte für CCT4, DPYD, FLOT1, ADFP und p21 nicht nachgewiesen werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Kooperation von LIN-9 und B-MYB in der Genregulation exklusiv für die Aktivierung von G2/M-Genen ist.

Für 17 % der nach LIN-9 Verlust herunterregulierten Gene ist beschrieben, dass sie eine Funktion in der Differenzierung und Entwicklung erfüllen. Vorhergehende Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass LIN-9 zusammen mit pRB in der Aktivierung differenzierungsspezifischer Gene kooperiert (Gagrica et al., 2004). Und auch in *D. melanogaster* kontrolliert Mip130/LIN-9 die Expression geschlechts- und differenzierungsspezifischer Gene (Korenjak et al., 2004; Lewis et al., 2004). Eine weiterführende Untersuchung dieser potenziellen LIN-9 Zielgene erscheint daher sinnvoll und könnte dazu beitragen, die Funktion von LIN-9 in der Zelldifferenzierung besser zu verstehen. Wobei zu überprüfen wäre, ob es sich hierbei um primäre oder sekundäre Effekte von LIN-9 auf die Expression dieser Gene handelt und ob diese Regulation tatsächlich in Kooperation mit pRB erfolgt.

Ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen ist auch das bekannte p53-Zielgen p21, welches nach Depletion von LIN-9 verstärkt exprimiert wird. Unwahrscheinlich ist, dass LIN-9 die Expression von p21 direkt reguliert, da unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Bindung von LIN-9 an den p21 Promotor beobachtet werden konnte. Eine wichtige Funktion ist der durch p53 und p21 induzierte G1-Arrest nach DNA-Schädigung (Agarwal et al., 1995; Sherr and Roberts, 1995; Vogelstein et al., 2000). Bekannt ist, dass eine p53-induzierte Stressantwort auch in einer starken Repression von G2/M-Genen resultieren kann (Agarwal et al., 1995; Badie et al., 2000; Crawford and Piwnica-Worms, 2001; Jackson et al., 2005). Gegen eine solche Stressantwort der Zellen nach LIN-9 Depletion spricht die Beobachtung, dass der zusätzliche Verlust von p53 zu keiner Derepression der untersuchten G2/M-Gene führt. Die gleichzeitige Depletion von LIN-9 und p53 hat zudem gezeigt, dass für die Repression der G2/M-Gene keine erhöhte Expression an p21 nötig ist. Außerdem ließen die Analysen LIN-9 defizienter Fibroblasten weder eine Zunahme der p53-Proteinmenge noch einen Anstieg der Phosphorylierung von CDC2 an Tyrosin 15 erkennen. Dies sind zwei typische Kennzeichen für Zellen, die auf DNA-Schäden reagieren. Daher kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass die Repression der G2/M-Gene nach Verlust von LIN-9 durch eine indirekte p53-vermittelte Stressantwort induziert wird. Die gleichzeitige Depletion von LIN-9 und p53 zeigte ferner, dass die Hochregulation von p21 nach Verlust von LIN-9 vermutlich nicht durch p53 aktiviert wird. Dies lässt vermuten, dass die Regulation von p21 durch LIN-9 in keinem Zusammenhang mit einer durch DNA-Schäden induzierten Stressantwort steht.

p21 ist ein multifunktionelles Protein und spielt u.a. auch eine Rolle in der Apoptose, DNA-Reparatur, Zellalterung und Differenzierung (Dotto, 2000). Die Untersuchung, ob die Repression von p21 durch LIN-9 eine Rolle in einem dieser Prozesse spielt wäre durchaus interessant und könnte möglicherweise neue Funktionen von LIN-9 offenbaren.

5.4.2. Nach LIN-9 Verlust verstärkt exprimierte Gene

Aus der Liste der nach LIN-9 Verlust hochregulierten Gene konnten in dieser Arbeit ADFP und p21 als LIN-9 Zielgene verifiziert werden. Wobei es nach wie vor unklar ist, ob es sich hier um direkte Zielgene handelt. Der Versuch weitere Gene dieser Liste zu validieren, stellte sich als problematisch heraus. In qRT-PCR Analysen wurde die Expression der zufällig aus der Liste ausgewählten Gene FBXO32, CITED2, TDG, IGFBP3 und GREM1 hinsichtlich ihrer Expression nach LIN-9 Depletion untersucht (Daten nicht gezeigt). In einigen Experimenten nahm die Expression dieser Gene nach Depletion von LIN-9 wie erwartet zu. In anderen Versuchsansätzen hingegen hatte der Verlust von LIN-9 keine Veränderung der Expression oder eine Expressionsabnahme zur Folge. Auf Grund der starken Varianz zwischen den einzelnen Experimenten ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Genen um falsch positive Zielgene handelt.

Bei der Auswertung des cDNA-Microarrays wurden solche Gene als differentiell exprimiert betrachtet, welche einen M-Wert $\geq \pm 0,5$, einen A-Wert von ≥ 7 und einen q-Wert $\geq 5\%$ aufweisen (für eine detaillierte Erklärung der statistischen Auswertung wird an dieser Stelle auf Abschnitt 4.1.2. auf Seite 62 verwiesen). Betrachtet man sich das Genexpressionsprofil LIN-9 depletierter Zellen im MA-Plot genauer (siehe Abb. 4.4. auf Seite 63), erkennt man, dass viele der verstärkt exprimierten Gene zwar die M-Wert und A-Wert Kriterien erfüllen, jedoch auf Grund eines q-Wertes $> 5\%$ als nicht signifikant erachtet werden können. Innerhalb der nach LIN-9 Depletion verstärkt exprimierten Gene, findet sich demnach ein starker Hintergrund an falsch positiven Genen.

Unklar ist, wodurch diese starke Streuung zustande kommt. Die durch den cDNA-Microarray erhaltene Genliste ist das Ergebnis aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Neben diesen biologischen Replika wurden in jedem der 3 Microarray-Experimente *Sandwich*-Hybridisierungen und *Flip colour*-Experimente zur Qualitätskontrolle und zur Minimierung der Fehler durch technische Mängel durchgeführt (zum Vergleich siehe Abb. 4.3. auf Seite 61). Zur Auswertung des cDNA-Microarrays konnten daher insgesamt 12 Hybridisierungen herangezogen werden, wobei jede cDNA pro Experiment viermal mit der gleichen Probe hybridisiert wurde. War das Verhältnis zwischen der Cy3-Signalintensität und der Cy5-Signalintensität für eine cDNA nicht reproduzierbar, wurde diese cDNA aus der Auswertung ausgeschlossen. Es ist daher unwahrscheinlich aber nicht vollständig auszuschließen, dass technische oder qualitative Mängel bei der Durchführung der einzelnen Microarray-Analysen als Ursache für den beobachteten Hintergrund in Frage kommen. Ein weiteres Set an Microarrays könnte hier zur Klarheit verhelfen.

Technische oder qualitative Mängel erklären jedoch nicht, weshalb der Hintergrund nur für die nach LIN-9 Depletion verstärkt exprimierten Gene zu beobachten ist. Hier müssen auch biologische Ursachen in Betracht gezogen werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die Selektion der infizierten Zellen mit Blasticidin, eine stressbedingte Hochregulation von Genen zur Folge haben könnte.

Bei der zur Gesamtauswertung der cDNA-Microarrays angewandten SAM-Statistik handelt es sich um ein weniger konservatives statistisches Verfahren (Tusher et al., 2001). Daher ist nicht auszuschließen, dass sich noch weitere Gene als Artefakte herausstellen. Hier würde z.B. das Festlegen eines geringeren q-Wertes die Stringenz der Auswertung erhöhen. Ein Risiko dabei ist, dass dadurch tatsächlich positive Gene in der Auswertung verloren gehen könnten.

Die hier dargestellte Problematik macht deutlich, dass derartige Genexpressionsanalysen zunächst unter Vorbehalt betrachtet werden sollten und eine sorgfältige Validierung durch alternative Versuchsansätze erfordern.

5.5. Das humane LIN-9: Onkogen und Tumorsuppressor?

Innerhalb des pRB-Signalweges besitzt LIN-9 eine nachweisbare Funktion als Tumorsuppressor (Gagrica et al., 2004). Es ist daher zu vermuten, dass der Verlust oder die Inaktivierung von LIN-9 entscheidend zur Entstehung von Tumoren beitragen könnte. Auch die Lokalisation des LIN-9 Genes auf Chromosom 1q42 lässt auf tumorsuppressive Eigenschaften von LIN-9 schließen. Literatur- und Datenbankrecherchen zeigen eine häufig auftretende Deletion dieser Chromosomenregion in Mamma- und Adenokarzinomen sowie beim Non-Hodgkin-Lymphom (Pandis et al., 1995)(<http://www.cgap.nci.nih.gov>). Aufgrund der nachgewiesenen tumorsuppressiven Eigenschaften von LIN-9 überrascht es, dass LIN-9 eine entscheidende Rolle in der Proliferation und Aktivierung von Zellzyklusgenen spielt. Diese Funktion lässt vermuten, dass die deregulierte Expression von LIN-9 eine positive Rolle in der Tumorgenese spielen könnte. Es wäre zu überprüfen, ob die Überexpression von LIN-9 die Proliferation der Zellen beschleunigt.

Eine plausible Erklärung für die mögliche Ambivalenz der LIN-9 Eigenschaften wäre, dass LIN-9, wie z.B. E2F1, KLF4 und TGF β , zu einer Gruppe von Proteinen gehört, welche in Abhängigkeit vom genetischen und zellulären Kontext sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Eigenschaften besitzen (Rowland and Peeper, 2006).

Interessant ist, dass einige der von LIN-9 aktivierten G2/M-Gene für Proteine codieren, welche bedeutend für die Aufrechterhaltung der Euploidie und chromosomalen Stabilität sind. So fördert z.B. PLK1 nicht nur den Übergang von der G2-Phase in die Mitose, indem es die Aktivität von Cyclin B/CDC2 reguliert, sondern ist zudem wichtig für den korrekten Zusammenbau der bipolaren mitotischen Spindel, für die ordnungsgemäße Segregation der Schwesterchromatiden und für den Ablauf der Zytokinese (Lane and Nigg, 1996; Takai et al., 2005; van Vugt and Medema, 2005). Survivin (BIRC5), CENP-E, Aurora A und BUB1 sind Bestandteile des mitotischen Spindel-Checkpoints. Dieser 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).

Da der Verlust von LIN-9 u.a. zu einer Expressionsabnahme von Survivin, CENP-E, PLK1, BUB1 und Aurora A führt, könnte dies einen Defekt des Spindel-Checkpoints zur Folge haben. Dies könnte in einer fehlerhaften Segregation der Chromosomen resultieren und würde zu einer Fehlverteilung der Chromosomen und damit zur Aneuploidie der Tochterzellen führen. Gezielte Untersuchungen, ob LIN-9 für den Erhalt der Euploidie wichtig ist, wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. In einzelnen Versuchsansätzen waren jedoch schwache

Anzeichen für das Auftreten von Aneuploidie nach Verlust von LIN-9 zu erkennen (Daten nicht gezeigt). So ließ sich z.B. in FACS-Analysen beobachten, dass die Depletion von LIN-9 zu einem geringfügigen Anstieg an Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 4n$ führte. Zudem ließen sich in Fluoreszenzfärbungen mit Hoechst-Reagenz, in LIN-9 defizienten BJ-ET Zellen, vereinzelt so genannte Anaphasebrücken erkennen. Anaphasebrücken können entstehen, wenn ein Chromosom zwei oder mehrere Zentrosomen besitzt (Lengauer, 2001). In einem solchen Fall kann es vorkommen, dass das Chromosom während der Anaphase, gleichzeitig an die beiden entgegengesetzten Pole gezogen wird. Dadurch bildet das betroffene Chromosom eine Art Brücke zwischen den beiden Polen. Normalerweise werden solche Chromosomen auf keine der beiden Tochterzellen übertragen, was in einer unnormalen Chromosomenanzahl dieser Zellen resultiert.

Die geschilderten Beobachtungen sind noch kein eindeutiger Beweis dafür, dass der Verlust von LIN-9 tatsächlich zur Aneuploidie der Zellen führen kann. Weiterführende Untersuchungen, zur Bestimmung der Chromosomenzahl und der Überprüfung der Funktionalität des mitotischen Checkpoints in LIN-9 Depletierten Zellen, erscheinen daher sinnvoll.

Die Frage, ob der Verlust von LIN-9 tatsächlich zur Aneuploidie beiträgt ist deshalb interessant, da das Vorkommen von Aneuploidie ein verbreitetes Phänomen in Tumorzellen ist. Aneuploidie kann zur Anhäufung von Neumutationen und zur chromosomalen Instabilität führen, was wiederum die Tumorgenese fördert (Kops et al., 2005; Rajagopalan and Lengauer, 2004; Weaver et al., 2007). Es wäre daher denkbar, dass es eine Anhäufung von zusätzlichen Mutationen nach LIN-9 Verlust den Zellen ermöglicht, dem beobachteten Wachstumsdefekt zu entkommen und verankerungsunabhängig zu wachsen. Demzufolge würde die Funktion von LIN-9 in der Regulation der G2/M-Gene nicht nur eine Rolle als Onkogen befürworten, sondern könnte auch die tumorsuppressiven Eigenschaften von LIN-9 erklären (siehe Abb. 5.1.). Um diese Hypothese zu überprüfen wäre es hilfreich, die Expression der G2/M-Gene nach LIN-9 Depletion in dem BJ-ET Zellsystem (Depletion von LIN-9 und p53, bei gleichzeitiger Überexpression von SV40 small t und RASV12) zu untersuchen, indem der Tumorsuppressor-Phänotyp von LIN-9 zu erkennen ist. In diesem Zusammenhang lässt sich darüber spekulieren, ob die von Gargica und Kollegen im BJ-Zellsystem beobachteten tumorsuppressiven Eigenschaften von LIN-9 tatsächlich auf die Interaktion mit pRB zurückzuführen oder (teilweise) davon unabhängig sind.

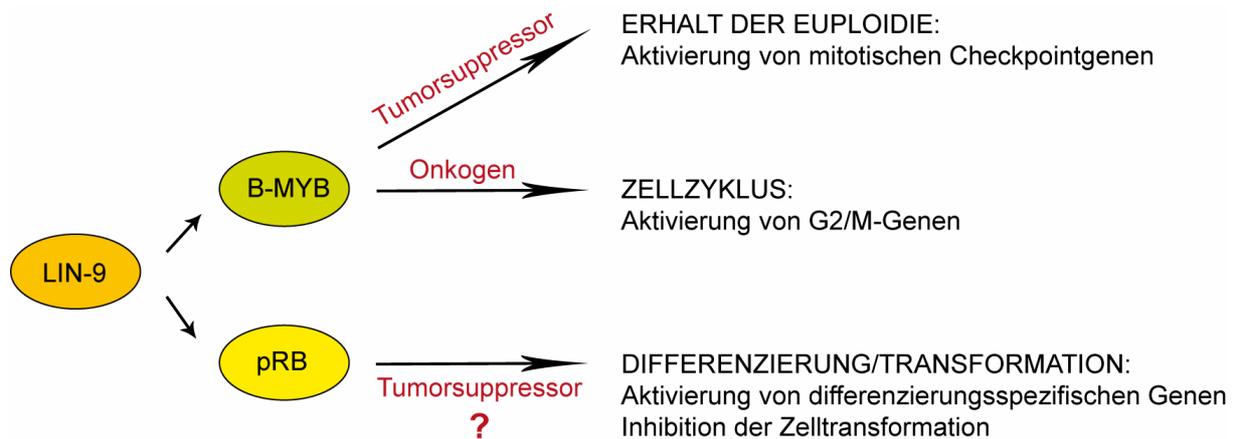


Abb. 5.1.: Modell für die Rolle von LIN-9 als Tumorsuppressor und Onkogen. Durch die Interaktion mit B-MYB besitzt LIN-9 sowohl tumorsuppressive, als auch onkogene Eigenschaften. Onkogen: LIN-9 aktiviert zusammen mit B-MYB die Expression G2/M-spezifischer Gene und fördert dadurch die Zellproliferation. Tumorsuppressor: LIN-9 aktiviert die Expression mitotischer Checkpointgene und fördert dadurch den Erhalt der Euploidie und chromosomalen Stabilität. Unabhängig von diesen Funktionen, interagiert LIN-9 mit pRB und kooperiert mit diesem in der Aktivierung differenzierungsspezifischer Gene und in der Inhibition der Zelltransformation. Es wäre jedoch möglich, dass der in BJ-ET Zellen beobachtete Tumorsuppressor-Phänotyp unabhängig von der Interaktion mit pRB ist und auf der Aktivierung der mitotischen Checkpointgene beruht (Details siehe Text).

Um zu klären, ob und welche Rolle LIN-9 in der Tumorgenese spielt, erscheint es sinnvoll, die Expression von LIN-9 in verschiedenen humanen Tumoren zu untersuchen. Es gibt erste Hinweise die zeigen, dass in 40 – 50 % der Fälle LIN-9 in Ovar- und Uterustumoren überexprimiert ist, was die Rolle von LIN-9 als Onkogen unterstreicht (durchgeführt von Prof. Dr. Stefan Gaubatz). Ein besser geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der biologischen Funktion von LIN-9 in der Tumorgenese, aber auch in Hinblick auf seine Rolle in der Differenzierung und Entwicklung stellen Untersuchungen an Tiermodellen dar. Die weitere Erforschung der biologischen und molekularbiologischen Funktionen von LIN-9 könnte neue interessante Erkenntnisse über die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse offenbaren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

6.1. Deutsche Zusammenfassung

Das humane LIN-9 wurde zuerst als pRB-interagierendes Protein beschrieben und spielt eine Rolle als Tumorsuppressor im Kontext des pRB-Signalweges. Über die molekulare Funktion von LIN-9 ist jedoch wenig bekannt. Die Homologe von LIN-9 in *D. melanogaster* und in *C. elegans*, sind an der transkriptionellen Regulation verschiedener Genen beteiligt. Dies und die Tatsache, dass LIN-9 mit pRB in der Aktivierung differenzierungsspezifischer Gene kooperiert, ließ vermuten, dass humanes LIN-9 einen bedeutenden Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Genen haben könnte. Primäres Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung LIN-9 regulierter Gene. Dazu sollte mit Hilfe von cDNA-Microarray Analysen, das Genexpressionsprofil LIN-9 depletierter primärer humaner Fibroblasten (BJ-ET Zellen) im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht werden. Hierfür wurde zunächst ein RNAi-basierendes System etabliert, um die posttranskriptionelle Expression von LIN-9 in BJ-ET Zellen effizient zu reprimieren. Auf dem Ergebnis der cDNA-Microarray Analysen aufbauende Untersuchungen sollten Aufschluss über die molekularbiologische Funktion von LIN-9 geben.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Verlust von LIN-9 zu einer verminderten Expression einer Gruppe G2/M-spezifischer Gene führt, deren Produkte für den Eintritt in die Mitose benötigt werden. Bekannt war, dass ein Teil dieser Gene durch den Transkriptionsfaktor B-MYB koreguliert wird. Zudem konnten Untersuchungen in unserem Labor eine Interaktion von LIN-9 und B-MYB auf Proteinebene, sowie die Bindung beider Proteine an die Promotoren der LIN-9 regulierten G2/M-Gene nachweisen. Dies lässt vermuten, dass LIN-9 und B-MYB gemeinsam die Expression der G2/M-Gene kontrollieren.

Die verminderte Expression von G2/M-Genen in LIN-9 bzw. B-MYB depletierten Zellen geht mit einer Reihe phänotypischer Veränderungen einher, wie einer deutlich verlangsamten Proliferation und einer Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers erstellte Zellzykluskinetiken ergaben, dass die Progression LIN-9 bzw. B-MYB depletierter Fibroblasten 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 die Aktivierung der LIN-9 abhängigen G2/M-Gene vermitteln.

Die Tatsache, dass LIN-9 sowohl als Tumorsuppressor, als auch als positiver Regulator des Zellzyklus fungiert, lässt vermuten, dass LIN-9 zu einer stetig größer werdenden Gruppe von Proteinen gehört, welche in Abhängigkeit vom zellulären und genetischen Kontext sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Funktionen besitzen.

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

6.2. 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. But the molecular function of LIN-9 is poorly understood. The homologs of LIN-9 in *D. melanogaster* and *C. elegans* are required for the transcriptional regulation of different genes. This and the fact, that LIN-9 cooperates with pRB in the activation of differentiation specific genes let to the hypothesis, that human LIN-9 could play an important role in the transcriptional regulation of genes. Thus, the primary goal of this thesis was to identify genes which are regulated by LIN-9. For that purpose, the geneexpression profiles of LIN-9 depleted primary human fibroblasts (BJ-ET cells) in comparison to control cells should be analyzed by a cDNA-microarray approach. Therefor an RNAi-based system was established, that efficiently represses the posttranscriptional expression of LIN-9 in BJ-ET cells. Based on the outcome of the cDNA-microarray analysis, further studies should provide more informations about the molecular function of LIN-9.

It was possible to show, that the loss of LIN-9 leads to a reduced expression of a cluster of G2/M-specific genes, whose products are required for timely entry into mitosis. It was known, that some of these genes are coregulated by the transcriptionfactor B-MYB. Moreover, studies in our lab account for the interaction of LIN-9 and B-MYB on protein level and the binding of both proteins to the promoters of LIN-9 regulated G2/M-genes.

The reduced expression of these genes is accompanied by phenotypically changes, such as strongly impaired proliferation and an accumulation of these cells in the G2/M-Phase. 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. 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 is most likely due to a defect in the late G2-phase, which results in a delayed entry into mitosis.

The homologs 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. This let to the suggestion, that LIN-9 and B-MYB are also components of a similar complex in humans and thereby mediate the activation of LIN-9 regulated G2/M-genes.

Because LIN-9 acts as a tumorsuppressor in the pRB-pathway as well as an positive regulator of the cell cycle, it seems that LIN-9 belongs to an increasing group of proteins, which function as context dependent tumorsuppressors and oncogenes.

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

7 ANHANG

Tabelle A1: Liste der nach LIN-9 Depletion vermindert exprimierten Gene. Angegeben sind alle Gene, die nach Verlust von LIN-9 im Vergleich zu Kontrollzellen um mindestens das 1,41-fache herunterreguliert waren (X-fache Änderung der Expression in LIN-9 depletierten BJ-ET Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen). E2F bzw. B-MYB Zielgene und B-MYB regulierte Gene im Zebrafisch sind als solche gekennzeichnet.

Symbol	Unigene ID	X-fache Änderung	Genname	Funktion	E2F Zielgen	B-MYB Zielgen	Zebrafisch B-MYB Zielgen
UBE2C	Hs.93002	-2,09	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	Mitose	Ja 1) 2)		
BIRC5	Hs.514527	-1,99	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	Mitotischer Checkpoint	Ja 3) 4)		Ja 5)
FLOT1	Hs.179986	-1,93	Flotilin 1	Differenzierung			
CDC2	Hs.334562	-1,93	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	Mitose	Ja 3) 6) 7) 8) 9)	Ja 9)	Ja 5)
Cep55	Hs.14559	-1,88	Centrosomal protein, 55 kDa	Zytokinese			Ja 5)
CCNA2	Hs.58974	-1,74	Cyclin A2	S/G2	Ja 3) 8) 9)	Ja 9)	
CCNB1	Hs.23960	-1,72	Cyclin B1	Eintritt in die Mitose	Ja 3) 6) 7) 9)	Ja 9)	Ja 5)
HMMR	Hs.72550	-1,66	Hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	Extrazelluläre Matrix			
CCT4	Hs.421509	-1,66	Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	Stress/Protein Faltung			
DPYD	Hs.335034	-1,63	Dihydropyrimidine dehydrogenase	Nukleotidmetabolismus			
H2AFX	Hs.477879	-1,60	H2A histone family, member X	DNA-Schaden			
KIAA0101	Hs.81892	-1,57	KIAA0101	unbekannt			
LAP2	Hs.11355	-1,56	Lamin associated polypeptide 2	Mitose	Ja 10)		
TRIM59	Hs.212957	-1,55	Tripartite motif-containing 59	Unbekannt			
CENPE	Hs.75573	-1,55	Centromere protein E, 312 kDa	Mitose	Ja 1) 3)		
SSX2IP	Hs.22587	-1,54	Synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	Unbekannt			
GNA11	Hs.73797	-1,53	Guanine nucleotide binding protein alpha 11	Entwicklung			
MPO	Hs.458272	-1,52	Myeloperoxidase	Differenzierung			
EBPL	Hs.433278	-1,50	Emopamil binding protein-like	Unbekannt			
RPL22L1	Hs.380933	-1,50	Ribosomal protein L22-like1	Unbekannt			
EST	Hs.597712	-1,50	Transcribed locus	Unbekannt			
BUB1	Hs.469649	-1,49	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	Mitotischer Checkpoint	Ja 3) 6)		Ja 5)
EST	Hs.45091	-1,49	Transcribed locus	unbekannt			
DLG7	Hs.77695	-1,49	Discs, large homolog 7 (Drosophila)	unbekannt			Ja 5)
IGFBP6	Hs.274313	-1,49	Insulin-like growth factor binding protein 6	Wachstum/Proliferation			
RAP2C	Hs.119889	-1,49	RAP2C, member of RAS oncogene family	Signaltransduktion			
TMSB4XX	Hs.522584	-1,48	Thymosin, beta4, X-linked	Differenzierung			
AURKA	Hs.250822	-1,47	Serin/Threonin kinase 6/Aurora A	Mitose			
PLK1	Hs.592049	-1,47	Polo-like kinase 1 (Drosophila)	Eintritt in die Mitose	Ja 1) 11)		
ARPC3	Hs.524741	-1,46	Actin related protein2/3 complex, subunit 3, 31 kDa	Zellorganisation			
FBN2	Hs.519294	-1,45	Fibrillin 2	Differenzierung			
TMSB4Y	Hs.159201	-1,44	Thymosin, beta4, X-linked	Differenzierung			
FEZ2	Hs.258563	-1,44	Fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)	Differenzierung			
EST	Hs.597480	-1,42	Transcribed locus	Unbekannt			
EST	Hs.597144	-1,42	Transcribed locus	Unbekannt			
cDNA	Hs.3353	-1,42	cDNA clone CS0DL005YA15	Unbekannt			

Literatur:

- 1) 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.

- 2) Weinmann, A.S., Yan, P.S., Oberley, M.J., Huang, T.H. and Farnham, P.J. (2002) Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev*, **16**, 235-244.
- 3) Cam, H., Balciunaite, E., Blais, A., Spektor, A., Scarpulla, R.C., Young, R., Kluger, Y. and Dynlacht, B.D. (2004) A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell*, **16**, 399-411.
- 4) Jiang, Y., Saavedra, H.I., Holloway, M.P., Leone, G. and Altura, R.A. (2004) Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *J Biol Chem*, **279**, 40511-40520.
- 5) 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., Neuberg, 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 U S A*, **102**, 13194-13199.
- 6) 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.
- 7) Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 267-285.
- 8) 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.
- 9) Zhu, W., Giangrande, P.H. and Nevins, J.R. (2004) E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *Embo J*, **23**, 4615-4626.
- 10) Parise, P., Finocchiaro, G., Masciadri, B., Quarto, M., Francois, S., Mancuso, F. and Muller, H. (2006) Lap2alpha expression is controlled by E2F and deregulated in various human tumors. *Cell Cycle*, **5**, 1331-1341.
- 11) Gunawardena, R.W., Siddiqui, H., Solomon, D.A., Mayhew, C.N., Held, J., Angus, S.P. and Knudsen, E.S. (2004) Hierarchical requirement of SWI/SNF in retinoblastoma tumor suppressor-mediated repression of Plk1. *J Biol Chem*, **279**, 29278-29285.

Tabelle A2: Liste der nach LIN-9 Depletion verstärkt exprimierten Gene. Angegeben sind alle Gene, die nach Verlust von LIN-9 im Vergleich zu Kontrollzellen um mindestens das 1,41-fache hochreguliert waren (X-fache Änderung der Expression in LIN-9 depletierten BJ-ET Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen).

Symbol	Unigene ID	Fold change	Genname	Funktion
ADFP	Hs.3416	2,59	Adipose differentiation-related protein	Differenzierung
PIK3R4	Hs.149032	2,05	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4, p150	Untereinheit des PI3K Komplex; Membrantransport
CDK6	Hs.119882	2,04	Cyclin-dependent kinase 6	Zellzyklus
IGFBP3	Hs.450230	1,99	Insulin-like growth factor binding protein 3	Wachstum/Proliferation
PPP3CC	Hs.583906	1,91	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform	Differenzierung
SLC3A2	Hs.502769	1,90	Solute carrier family 3, member 2	T-Zell Aktivierung
GREM1	Hs.40098	1,87	Gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	Entwicklung
CDKN1A	Hs.370771	1,86	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Zellzyklus
ANGPTL4	Hs.9613	1,83	Angiotensin-like 4	Angiogenese
INSIG1	Hs.520819	1,78	Insulin induced gene 1	Cholesteroll-Stoffwechsel
EIF4A1	Hs.129673	1,77	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	Translation
PAPPA	Hs.494928	1,77	Pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	Proliferation/Wundheilung/Knochenumbau
GTF3C4	Hs.22302	1,73	General transcriptionfactor IIIC, polypeptide 4	Transkription
TEX264	Hs.517864	1,69	Testis expressed sequence 264	Unbekannt
SCD	Hs.558396	1,67	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	Fettsäure-Stoffwechsel
YIF1A	Hs.446445	1,67	Yip1 interacting factor homolog A (S. cerevisiae)	Unbekannt
SLC38A2	Hs.221847	1,65	Solute carrier family 38, member 2	Aminosäure Transport
CYP1B1	Hs.154654	1,60	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	Stoffwechsel/Entwicklung
MFAP2	Hs.519702	1,60	Microfibrillar-associated protein 2	Extrazelluläre Matrix
CYFIP2	Hs.519702	1,59	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	Unbekannt
FBXO32	Hs.403933	1,57	F-box protein 32	Degradation während Skelettmuskel Atrophie
ATP2B4	Hs.343522	1,57	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4	Ca ⁺⁺ Transport
TDG	Hs.584809	1,57	Thymine-DNA glycosylase	DNA-Reparatur
FAF1	Hs.530402	1,56	Fas (TNFRSF6) associated factor 1	Transkription
COL3A1	Hs.443625	1,56	Collagen, type III, alpha 1	Extrazelluläre Matrix/Cardiovasculäre Entwicklung
CITED2	Hs.82071	1,55	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Transkriptionsfaktor/Hypoxie/Entwicklung
IER3	Hs.591785	1,55	Immediate early response 3	Antiapoptotisch/Cardiovasculäre Entwicklung
JOSD3	Hs.355750	1,54	Josephin domain containing 3	Unbekannt
FAS	Hs.244139	1,53	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	Signalweg
FDPS	Hs.335918	1,52	Farnesyl diphosphate synthase	Stoffwechsel
SEPT4	Hs.287518	1,51	Septin 4	Strukturprotein/Signalweg
ERP29	Hs.75841	1,51	Endoplasmic reticulum protein 29	Stress/Transport
LRRC56	Hs.567655	1,51	Leucine rich repeat containing 56	Unbekannt
SERPINA5	Hs.510334	1,50	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 5	Unbekannt
RCC2	Hs.380857	1,50	Regulator of chromosome condensation 2	Mitose/Zytokinese
SERPINE2	Hs.38449	1,49	Serpine peptidase inhibitor, clade E	Entwicklung
IFRD1	Hs.7879	1,49	Interferon-related developmental regulator 1	Muskelentwicklung/Differenzierung
CUL5	Hs.440320	1,49	Cullin 5	Zellzyklus, G1/S-Übergang
PPM2C	Hs.22265	1,49	Proteinphosphatase 2C, magnesium dependent, catalytic subunit	Stoffwechsel
C8orf4	Hs.591849	1,49	Chromosome 8 open reading frame 4	Differenzierung/Wachstum
PSPC1	Hs.213198	1,48	Paraspeckle component 1	Unbekannt
TBX3	Hs.129895	1,46	T-Box 3	Transkription/Entwicklung
BHLHB3	Hs.177841	1,46	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3	Differenzierung/Hypoxie
WDR81	Hs.234572	1,46	WD repeat domain 81	Unbekannt
TROVE2	Hs.288178	1,46	TROVE domain family, member 2	RNA Stabilisierung
ERVWE1	Hs.567490	1,45	Endogenous retroviral family W, env(C7), member 1 (syncytin)	Embryogenese
WNT5A	Hs.561260	1,45	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	Entwicklung
ZNF532	Hs.529023	1,45	Zinc finger protein 532	Transkription
unbekannt	Hs.597273	1,45	Transcribed locus	Unbekannt
COX6A1	Hs.497118	1,45	Cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1	Elektronentransport
cDNA	Hs.28792	1,45	CDNA FLJ11041 fis, clone PLACE1004405	Unbekannt
BTG1	Hs.255935	1,44	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	Proliferation
RXRB	Hs.388034	1,44	Retinoid X receptor, beta	Transkription
DDB2	Hs.446564	1,44	Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa	DNA-Reparatur
FAM46A	Hs.10784	1,44	Family with sequence similarity 46, member A	Unbekannt
MKLN1	Hs.44693	1,44	Muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs	Cell spreading
STOM	Hs.253903	1,44	Stomatin	Strukturprotein
EST	Hs.634275	1,44	Transcribed locus	Unbekannt
EST	Hs.596676	1,43	Transcribed locus	Unbekannt
ACADSB	Hs.81934	1,43	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	Fettsäure/Aminosäure-Stoffwechsel
MRPS18B	Hs.274417	1,43	Mitochondrial ribosomal protein S18B	Translation
ZFR	Hs.591749	1,43	Zinc finger RNA binding protein	Unbekannt
HBEGF	Hs.799	1,43	Heparin-binding EGF-like growth factor	Proliferation/Entwicklung
NDST2	Hs.65135	1,42	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 2	Unbekannt
PRO0149	Hs.221497	1,42	PRO0149 protein	Unbekannt
ZNF205	Hs.592088	1,42	Zinc finger protein 205	Transkription
DYRK3	Hs.164267	1,42	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	Wachstum/Entwicklung

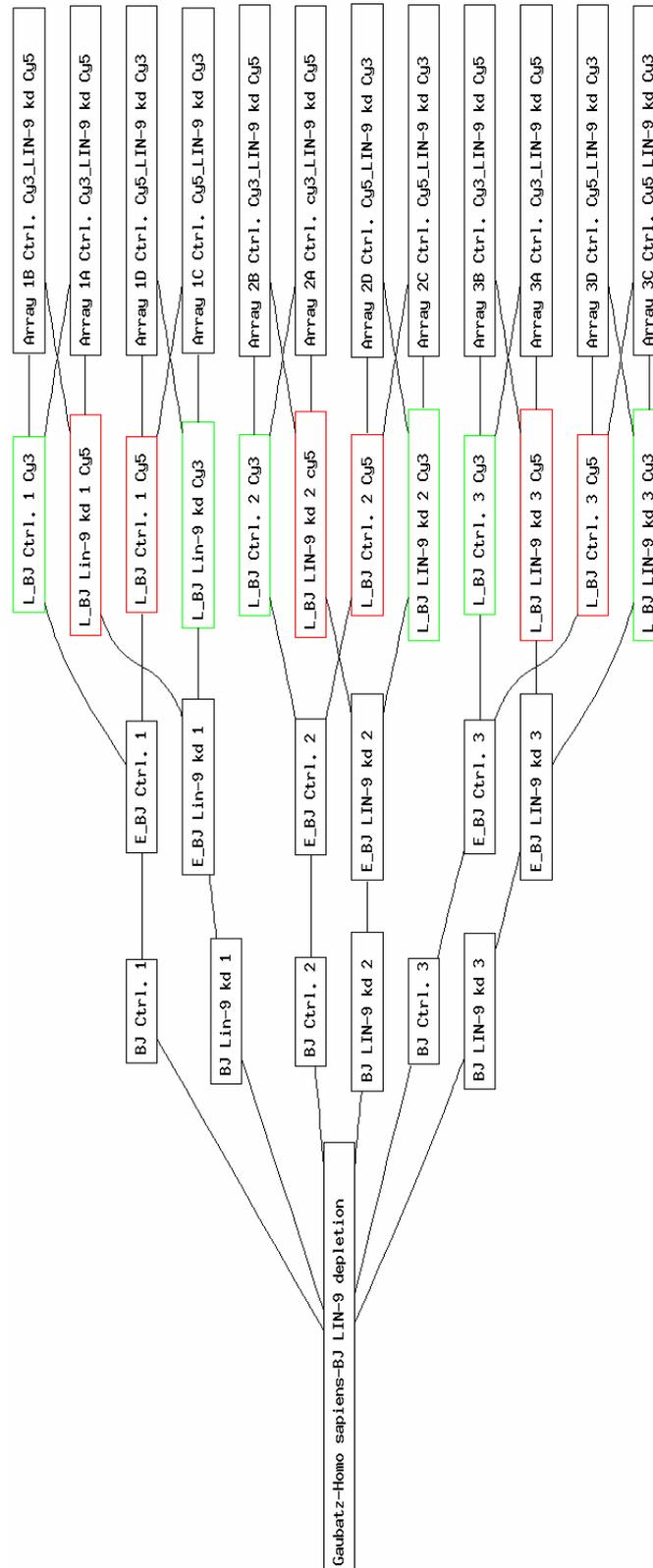


Abb. A1: Schematische Darstellung der in *ArrayExpress* gespeicherten Microarray-Datensätze. Gezeigt sind alle 12 Hybridisierungen aus den 3 unabhängigen cDNA-Microarray-Analysen (Details siehe Kapitel 4.1.2.). Sämtliche Details über Versuchsaufbau, Durchführung und Auswertung, sowie die Rohdaten aller 3 Microarrays sind mit dem Zugangscode „E-MEXP-752“ über die Internetseite <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> abrufbar.

8 ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
μ	mikro
1n	einfacher DNA-Gehalt
2D	zweidimensional
2n	zweifacher DNA-Gehalt
A	Absorption
aadUTP	Aminoallyl Desoxyribouridintriphosphat
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
cDNA	<i>copy</i> DNA
CDK	Cyclin abhängige Kinase
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dubelcco's Modified Easel Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOC	Natrium-Deoxycholat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
Eco	ekotropher Rezeptor
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ESB	Elektrophoreseprobenpuffer
et al.	und andere (<i>et altera</i>)
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FCS	Foetal Bovine Serum
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
g	Gramm
g	Gravitationskonstante
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HRP	<i>Horse radish peroxydase</i>
HU	Hydroxyurea
IP	Immunpräzipitation

k	Kilo
k.d.	<i>knock down</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Ktrl.	Kontrolle
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	milli
M	Molar (mol/l)
MIAME	<i>Minimal Information about a Microarray Experiment</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Proteaseinhibitor Cocktail
pmol	Picomol
PMSF	Phenyl-Methan-Sulphonyl-Fluorid
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative reverse Echtzeit PCR
RM	<i>Relative Movement</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Ser	Serin
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	einzelsträngig
SynMuv	<i>Synthetic Multivulva</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/-Volumenverhältnis
VPCs	<i>Vulva Precursor Cells</i>
WB	Western Blot
w/v	Gewichts/-Volumenverhältnis

9 LITERATUR

- Adams, M.R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G. and Nevins, J.R. (2000) Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol Cell Biol*, **20**, 3633-3639.
- Adams, P.D., Sellers, W.R., Sharma, S.K., Wu, A.D., Nalin, C.M. and Kaelin, W.G., Jr. (1996) Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol*, **16**, 6623-6633.
- 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.
- Allen, K.E., de la Luna, S., Kerkhoven, R.M., Bernards, R. and La Thangue, N.B. (1997) Distinct mechanisms of nuclear accumulation regulate the functional consequence of E2F transcription factors. *J Cell Sci*, **110** (Pt 22), 2819-2831.
- 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.
- 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.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. and Nevins, J.R. (1990) Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell*, **62**, 659-669.
- Bagchi, S., Weinmann, R. and Raychaudhuri, P. (1991) The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell*, **65**, 1063-1072.
- Bandara, L.R., Buck, V.M., Zamanian, M., Johnston, L.H. and La Thangue, N.B. (1993) Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *Embo J*, **12**, 4317-4324.
- Bandara, L.R. and La Thangue, N.B. (1991) Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature*, **351**, 494-497.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1996) The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 805-814.
- Beall, E.L., Bell, M., Georgette, D. and Botchan, M.R. (2004) Dm-myb mutant lethality in *Drosophila* is dependent upon mip130: positive and negative regulation of DNA replication. *Genes Dev*, **18**, 1667-1680.
- Beall, E.L., Lewis, P.W., Bell, M., Rocha, M., Jones, D.L. and Botchan, M.R. (2007) Discovery of tMAC: a *Drosophila* testis-specific meiotic arrest complex paralogous to Myb-Muv B. *Genes Dev*, **21**, 904-919.
- Beall, E.L., Manak, J.R., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J.S. and Botchan, M.R. (2002) Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication. *Nature*, **420**, 833-837.
- Begg, A.C., McNally, N.J., Shrieve, D.C. and Karcher, H. (1985) A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry*, **6**, 620-626.
- Beitel, G.J., Lambie, E.J. and Horvitz, H.R. (2000) The *C. elegans* gene lin-9, which acts in an Rb-related pathway, is required for gonadal sheath cell development and encodes a novel protein. *Gene*, **254**, 253-263.

- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, **57**, 289-300.
- Boxem, M. and van den Heuvel, S. (2002) *C. elegans* class B synthetic multivulva genes act in G(1) regulation. *Curr Biol*, **12**, 906-911.
- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*, **391**, 597-601.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002a) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, **2**, 243-247.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002b) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Cam, H. and Dynlacht, B.D. (2003) Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell*, **3**, 311-316.
- 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. (2001) dpl-1 DP and efl-1 E2F act with lin-35 Rb to antagonize Ras signaling in *C. elegans* vulval development. *Mol Cell*, **7**, 461-473.
- 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 signaling. *Dev Cell*, **6**, 563-576.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**, 1053-1061.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-2752.
- Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y. and Lee, W.H. (1996) Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev*, **10**, 2794-2804.
- Chittenden, T., Livingston, D.M. and Kaelin, W.G., Jr. (1991) The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell*, **65**, 1073-1082.
- Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A. and te Riele, H. (1992) Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature*, **359**, 328-330.
- Classon, M. and Harlow, E. (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 910-917.
- 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., Greenwald, 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.
- Dannenberg, J.H., Schuijff, L., Dekker, M., van der Valk, M. and te Riele, H. (2004) Tissue-specific tumor suppressor activity of retinoblastoma gene homologs p107 and p130. *Genes Dev*, **18**, 2952-2962.
- 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.

- de la Luna, S., Burden, M.J., Lee, C.W. and La Thangue, N.B. (1996) Nuclear accumulation of the E2F heterodimer regulated by subunit composition and alternative splicing of a nuclear localization signal. *J Cell Sci*, **109** (Pt 10), 2443-2452.
- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D.M. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, **54**, 275-283.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L. and Nevins, J.R. (1997) Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7245-7250.
- Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V. and Dyson, N.J. (2003) Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway. *Genes Dev*, **17**, 2308-2320.
- Dotto, G.P. (2000) p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta*, **1471**, M43-56.
- Du, W. and Pogoriler, J. (2006) Retinoblastoma family genes. *Oncogene*, **25**, 5190-5200.
- Dunaief, J.L., Strober, B.E., Guha, S., Khavari, P.A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G.R. and Goff, S.P. (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*, **79**, 119-130.
- Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, **12**, 2245-2262.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, **15**, 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001c) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. *Embo J*, **20**, 6877-6888.
- Ewen, M.E., Xing, Y.G., Lawrence, J.B. and Livingston, D.M. (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*, **66**, 1155-1164.
- Faha, B., Ewen, M.E., Tsai, L.H., Livingston, D.M. and Harlow, E. (1992) Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science*, **255**, 87-90.
- Fay, D.S. and Han, M. (2000) The synthetic multivulval genes of *C. elegans*: functional redundancy, Ras-antagonism, and cell fate determination. *Genesis*, **26**, 279-284.
- Ferguson, E.L. and Horvitz, H.R. (1989) The multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways. *Genetics*, **123**, 109-121.
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A. and Trouche, D. (1998) The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10493-10498.
- 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.
- Flemington, E.K., Speck, S.H. and Kaelin, W.G., Jr. (1993) E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6914-6918.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelji, 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.

- Frolov, M.V. and Dyson, N.J. (2004) Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*, **117**, 2173-2181.
- 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.
- Fung, T.K. and Poon, R.Y. (2005) A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 335-342.
- Gagrica, S., Hauser, S., Kolfschoten, 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.
- Girling, R., Partridge, J.F., Bandara, L.R., Burden, N., Totty, N.F., Hsuan, J.J. and La Thangue, N.B. (1993) A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature*, **362**, 83-87.
- Grana, X., Garriga, J. and Mayol, X. (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*, **17**, 3365-3383.
- Greenwald, I. (1997) Development of the vulva. In Riddle DL, B.T., Meyer BJ, Priess JR (ed.), *C. elegans II*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 519-541.
- Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G.P. and Pelicci, P.G. (1998) High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res*, **58**, 14-19.
- Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. (1993) Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell*, **72**, 309-324.
- Hannon, G.J., Demetrick, D. and Beach, D. (1993) Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev*, **7**, 2378-2391.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*, **98**, 859-869.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16782-16787.
- Helin, K., Harlow, E. and Fattaey, A. (1993a) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 6501-6508.
- Helin, K., Wu, C.L., Fattaey, A.R., Lees, J.A., Dynlacht, B.D., Ngwu, C. and Harlow, E. (1993b) Heterodimerization of the transcription factors 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. and 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**, 348-360.
- Hinds, P.W. and Weinberg, R.A. (1994) Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 135-141.
- Howard, C.M., Claudio, P.P., Gallia, G.L., Gordon, J., Giordano, G.G., Hauck, W.W., Khalili, K. and Giordano, A. (1998) Retinoblastoma-related protein pRb2/p130 and suppression of tumor growth in vivo. *J Natl Cancer Inst*, **90**, 1451-1460.

- Hu, Q., Lu, J.F., Luo, R., Sen, S. and Maity, S.N. (2006) Inhibition of CBF/NF-Y mediated transcription activation arrests cells at G2/M phase and suppresses expression of genes activated at G2/M phase of the cell cycle. *Nucleic Acids Res*, **34**, 6272-6285.
- Humbert, P.O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R.L., Trimarchi, J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R.T. and Lees, J.A. (2000) E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol Cell*, **6**, 281-291.
- Hunter, T., Hunt, T., Jackson, R.J. and 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.
- Hurley, L.H. (2002) DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **2**, 188-200.
- 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.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A. and Weinberg, R.A. (1992) Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*, **359**, 295-300.
- 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.
- 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.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev*, **13**, 2339-2352.
- 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. and Brehm, A. (2005) E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 520-527.
- 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.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 148-151.
- Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J.R. (1986) Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell*, **45**, 219-228.
- Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J.R. (1987) Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2180-2184.
- Krek, W., Livingston, D.M. and Shirodkar, S. (1993) Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science*, **262**, 1557-1560.
- Kurz, E.U., Douglas, P. and Lees-Miller, S.P. (2004) Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem*, **279**, 53272-53281.
- Lacy, S. and Whyte, P. (1997) Identification of a p130 domain mediating interactions with cyclin A/cdk 2 and cyclin E/cdk 2 complexes. *Oncogene*, **14**, 2395-2406.

- Lane, H.A. and Nigg, E.A. (1996) Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol*, **135**, 1701-1713.
- Laoukili, J., Kooistra, M.R., Bras, A., Kauw, J., Kerkhoven, R.M., Morrison, A., Clevers, H. and Medema, R.H. (2005) FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat Cell Biol*, **7**, 126-136.
- Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H. and Bradley, A. (1992) Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature*, **359**, 288-294.
- Lee, E.Y., Hu, N., Yuan, S.S., Cox, L.A., Bradley, A., Lee, W.H. and Herrup, K. (1994) Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation. *Genes Dev*, **8**, 2008-2021.
- Lees, J.A., Buchkovich, K.J., Marshak, D.R., Anderson, C.W. and Harlow, E. (1991) The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *Embo J*, **10**, 4279-4290.
- Lengauer, C. (2001) How do tumors make ends meet? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12331-12333.
- Lengauer, C. and Wang, Z. (2004) From spindle checkpoint to cancer. *Nat Genet*, **36**, 1144-1145.
- 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.
- Lens, S.M., Vader, G. and Medema, R.H. (2006) The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 616-622.
- Lens, S.M., Wolthuis, R.M., Klompmaker, R., Kauw, J., Agami, R., Brummelkamp, T., Kops, G. and Medema, R.H. (2003) Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *Embo J*, **22**, 2934-2947.
- 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, Y., Graham, C., Lacy, S., Duncan, A.M. and Whyte, P. (1993) The adenovirus E1A-associated 130-kD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclins A and E. *Genes Dev*, **7**, 2366-2377.
- Lin, B.T., Gruenwald, S., Morla, A.O., Lee, W.H. and Wang, J.Y. (1991) Retinoblastoma cancer suppressor gene product is a substrate of the cell cycle regulator cdc2 kinase. *Embo J*, **10**, 857-864.
- Lin, T.Y., Viswanathan, S., Wood, C., Wilson, P.G., Wolf, N. and Fuller, M.T. (1996) Coordinate developmental control of the meiotic cell cycle and spermatid differentiation in Drosophila males. *Development*, **122**, 1331-1341.
- Lipinski, M.M. and Jacks, T. (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*, **18**, 7873-7882.
- Loyter, A., Scangos, G.A. and Ruddle, F.H. (1982) Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 422-426.
- Lu, X. and Horvitz, H.R. (1998) lin-35 and lin-53, two genes that antagonize a C. elegans Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48. *Cell*, **95**, 981-991.
- Ludlow, J.W., Shon, J., Pipas, J.M., Livingston, D.M. and DeCaprio, J.A. (1990) The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell*, **60**, 387-396.
- Luo, R.X., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1998) Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell*, **92**, 463-473.

- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J.P., Troalen, F., Trouche, D. and Harel-Bellan, A. (1998) Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature*, **391**, 601-605.
- 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 U S A*, **99**, 7438-7443.
- Mann, D.J. and Jones, N.C. (1996) E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest. *Curr Biol*, **6**, 474-483.
- Mayol, X., Garriga, J. and Grana, X. (1995) Cell cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130. *Oncogene*, **11**, 801-808.
- Mayol, X., Grana, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q. and Giordano, A. (1993) Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene*, **8**, 2561-2566.
- Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E.A. (2004) Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 29-36.
- Meraldi, P. and Sorger, P.K. (2005) A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *Embo J*, **24**, 1621-1633.
- Morrison, A.J., Sardet, C. and Herrera, R.E. (2002) Retinoblastoma protein transcriptional repression through histone deacetylation of a single nucleosome. *Mol Cell Biol*, **22**, 856-865.
- Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 267-285.
- Muller, H. and Helin, K. (2000) The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*, **1470**, M1-12.
- Mulligan, G. and Jacks, T. (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet*, **14**, 223-229.
- Murray, A.W. (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, **116**, 221-234.
- Myers, T.R. and Greenwald, I. (2005) lin-35 Rb acts in the major hypodermis to oppose ras-mediated vulval induction in *C. elegans*. *Dev Cell*, **8**, 117-123.
- Nevins, J.R. (1994) Cell cycle targets of the DNA tumor viruses. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 130-134.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E. and Kouzarides, T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, **412**, 561-565.
- Nigg, E.A. (2001) Cell cycle regulation by protein kinases and phosphatases. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 19-46.
- O'Connell, M.J., Raleigh, J.M., Verkade, H.M. and Nurse, P. (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *Embo J*, **16**, 545-554.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M. and Nakatani, Y. (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*, **296**, 1132-1136.

- Okada, M., Akimaru, H., Hou, D.X., Takahashi, T. and Ishii, S. (2002) Myb controls G(2)/M progression by inducing cyclin B expression in the Drosophila eye imaginal disc. *Embo J*, **21**, 675-684.
- Osterloh, L., von Eyss, B., Schmit, F., Rein, L., Hubner, 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.
- Pandis, N., Teixeira, M.R., Gerdes, A.M., Limon, J., Bardi, G., Andersen, J.A., Idvall, I., Mandahl, N., Mitelman, F. and Heim, S. (1995) Chromosome abnormalities in bilateral breast carcinomas. Cytogenetic evaluation of the clonal origin of multiple primary tumors. *Cancer*, **76**, 250-258.
- Pilkinton, M., Sandoval, R., Song, J., Ness, S.A. and Colamonici, O.R. (2007) Mip/LIN-9 regulates the expression of B-Myb and the induction of cyclin A, cyclin B, and CDK1. *J Biol Chem*, **282**, 168-175.
- Pines, J. (1999) Cell cycle. Checkpoint on the nuclear frontier. *Nature*, **397**, 104-105.
- Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E. and Ginsberg, D. (2002) E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*, **21**, 437-446.
- 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.
- Rempel, R.E., Saenz-Robles, M.T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., Jakoi, L., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Smith, C. and Nevins, J.R. (2000) Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol Cell*, **6**, 293-306.
- 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. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nature Biotechnologie*.
- Robanus-Maandag, E., Dekker, M., van der Valk, M., Carrozza, M.L., Jeanny, J.C., Dannenberg, J.H., Berns, A. and te Riele, H. (1998) p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev*, **12**, 1599-1609.
- Rowland, B.D. and Peeper, D.S. (2006) KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 11-23.
- Saavedra, H.I., Wu, L., de Bruin, A., Timmers, C., Rosol, T.J., Weinstein, M., Robinson, M.L. and Leone, G. (2002) Specificity of E2F1, E2F2, and E2F3 in mediating phenotypes induced by loss of Rb. *Cell Growth Differ*, **13**, 215-225.
- Sala, A. (2005) B-MYB, a transcription factor implicated in regulating cell cycle, apoptosis and cancer. *Eur J Cancer*, **41**, 2479-2484.
- Sanchez, I. and Dynlacht, B.D. (2005) New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 311-321.
- Santilli, G., Schwab, R., Watson, R., Ebert, C., Aronow, B.J. and Sala, A. (2005) Temperature-dependent modification and activation of B-MYB: implications for cell survival. *J Biol Chem*, **280**, 15628-15634.
- Scambia, G., Lovergine, S. and Masciullo, V. (2006) RB family members as predictive and prognostic factors in human cancer. *Oncogene*, **25**, 5302-5308.
- Sellers, W.R. and Kaelin, W.G., Jr. (1997) Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*, **15**, 3301-3312.

- Sellers, W.R., Novitch, B.G., Miyake, S., Heith, A., Otterson, G.A., Kaye, F.J., Lassar, A.B. and Kaelin, W.G., Jr. (1998) Stable binding to E2F is not required for the retinoblastoma protein to activate transcription, promote differentiation, and suppress tumor cell growth. *Genes Dev*, **12**, 95-106.
- Sharp, P.A. (1999) RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev*, **13**, 139-141.
- 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., Neuberger, 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 U S A*, **102**, 13194-13199.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, **9**, 1149-1163.
- Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J.A., Morgan, J., Livingston, D.M. and Chittenden, T. (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell*, **68**, 157-166.
- Singh, P., Coe, J. and Hong, W. (1995) A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *Nature*, **374**, 562-565.
- Solari, F. and Ahringer, J. (2000) NURD-complex genes antagonise Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, **10**, 223-226.
- Sulston, J.E. and Horvitz, H.R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, **56**, 110-156.
- 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.
- Takai, N., Hamanaka, R., Yoshimatsu, J. and Miyakawa, I. (2005) Polo-like kinases (Plks) and cancer. *Oncogene*, **24**, 287-291.
- Tan, P.B., Lackner, M.R. and Kim, S.K. (1998) MAP kinase signaling specificity mediated by the LIN-1 Ets/LIN-31 WH transcription factor complex during *C. elegans* vulval induction. *Cell*, **93**, 569-580.
- 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.
- Thomas, D.M., Carty, S.A., Piscopo, D.M., Lee, J.S., Wang, W.F., Forrester, W.C. and Hinds, P.W. (2001) The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell*, **8**, 303-316.
- Townsley, F.M., Aristarkhov, A., Beck, S., Hershko, A. and Ruderman, J.V. (1997) Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2362-2367.
- Trimarchi, J.M. and Lees, J.A. (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 11-20.
- Trouche, D., Cook, A. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4139-4145.
- Tsai, K.Y., Hu, Y., Macleod, K.F., Crowley, D., Yamasaki, L. and Jacks, T. (1998) Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis and inappropriate S phase entry and extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell*, **2**, 293-304.

- Tusher, V.G., Tibshirani, R. and Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5116-5121.
- van Vugt, M.A. and Medema, R.H. (2005) Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*, **24**, 2844-2859.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. and Trouche, D. (2001) Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol*, **21**, 6484-6494.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Voorhoeve, P.M. and Agami, R. (2003) The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell*, **4**, 311-319.
- Weaver, B.A., Bonday, Z.Q., Putkey, F.R., Kops, G.J., Silk, A.D. and Cleveland, D.W. (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.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Weinberg, R.A. (2007) *The Biology of Cancer*. Garland Science, New York.
- Weinmann, A.S., Bartley, S.M., Zhang, T., Zhang, M.Q. and Farnham, P.J. (2001) Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol Cell Biol*, **21**, 6820-6832.
- Weinmann, A.S., Yan, P.S., Oberley, M.J., Huang, T.H. and Farnham, P.J. (2002) Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev*, **16**, 235-244.
- Weintraub, S.J., Prater, C.A. and Dean, D.C. (1992) Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature*, **358**, 259-261.
- Wells, J., Boyd, K.E., Fry, C.J., Bartley, S.M. and Farnham, P.J. (2000) Target gene specificity of E2F and pocket protein family members in living cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 5797-5807.
- Wheatley, S.P. and McNeish, I.A. (2005) Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol*, **247**, 35-88.
- White-Cooper, H., Leroy, D., MacQueen, A. and 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.
- White-Cooper, H., Schafer, M.A., Alphey, L.S. and Fuller, M.T. (1998) Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development*, **125**, 125-134.
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A. and Harlow, E. (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, **334**, 124-129.
- Wigler, M., Sweet, R., Sim, G.K., Wold, B., Pellicer, A., Lacy, E., Maniatis, T., Silverstein, S. and Axel, R. (1979) Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell*, **16**, 777-785.
- Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*, **27**, 711-720.

- Wu, C.L., Zukerberg, L.R., Ngwu, C., Harlow, E. and Lees, J.A. (1995) In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol*, **15**, 2536-2546.
- Xie, S., Xie, B., Lee, M.Y. and Dai, W. (2005) Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases. *Oncogene*, **24**, 277-286.
- 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.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J. and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*, **30**, e15.
- Yen, T.J., Compton, D.A., Wise, D., Zinkowski, R.P., Brinkley, B.R., Earnshaw, W.C. and Cleveland, D.W. (1991) CENP-E, a novel human centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. *Embo J*, **10**, 1245-1254.
- Young, A.P., Nagarajan, R. and Longmore, G.D. (2003) Mechanisms of transcriptional regulation by Rb-E2F segregate by biological pathway. *Oncogene*, **22**, 7209-7217.
- Yuan. (2004) siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server *Nucl. Acids. Res.*, **32**, W130-W134.
- 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, L., Harlow, E. and Dynlacht, B.D. (1995) p107 uses a p21CIP1-related domain to bind cyclin/cdk2 and regulate interactions with E2F. *Genes Dev*, **9**, 1740-1752.
- Zhu, L., van den Heuvel, S., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N. and Harlow, E. (1993) Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev*, **7**, 1111-1125.
- Zhu, W., Giangrande, 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., Reza, T., Caron, A. and Lees, J.A. (2001) E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev*, **15**, 386-391.

10 INTERNETQUELLEN

- | | |
|---|---|
| http://www.roche-applied-biosystems.com | Online Werkzeug zum Primer-Design |
| http://www.r-project.org | Normalisierung von Microarray-Datensätzen |
| http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/ | Datenbank für Microarrays |
| http://www.cgap.nci.nih.gov | „The Cancer Genome Anatomy Project“ |

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.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Stefan Gaubatz, unter dessen Anleitung ich diese interessante und spannende Arbeit anfertigen durfte und für all seine Bemühungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke ihm für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die kontinuierliche Unterstützung, für viele wertvolle Ratschläge und Tricks, für seine Geduld und für die mitreißende Begeisterung und Motivation, mit der er meine Arbeit stets begleitet und vorangetrieben hat. Vor allem möchte ich ihm auch für die Gelegenheit danken, dass ich meine Arbeit an der Universität Würzburg fortsetzen konnte. Der Wechsel der Arbeitsgruppe nach Würzburg war für mich eine positive Erfahrung, die ich sehr zu schätzen weiß und nicht missen möchte.

Ich danke vielmals Prof. Dr. Georg Krohne für die kurzfristige, spontane und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein herzlichster Dank gilt meinen gegenwärtigen und ehemaligen Kollegen der AG Gaubatz auf die ich mich stets verlassen konnte. Vor allem Fabienne, Nina, Mirijam, Susi, Sladjana, Björn, Denise, Sarah, Kathrin, Jörg, Steffi und Martina. Ich danke Euch für eine tolle und unvergessliche Zeit auch jenseits der Labortür. Für Eure Unterstützung und Begleitung, für das Mitfiebern, für die vielen aufbauenden, motivierenden und manchmal auch tröstenden Worte, viele Diskussionen, eine Menge Spaß und Humor, jede Menge gemeinsame Tassen Kaffee (und manchmal auch Sekt) und vor allem für Eure Freundschaft. Mein besonderer Dank gilt Fabienne, Björn und Denise, deren Unterstützung und praktische Hilfe entscheidend zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Eilers und AG Bauer, die mich während meiner Zeit am IMT in Marburg wissenschaftlich unterstützt und begleitet haben. Insbesondere möchte ich Birgit Samans und Dr. Michael Krause für die großartige Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Microarrays danken.

Besonderer Dank auch an die Mitglieder der AG Scharl und AG Gessler der Physiologischen Chemie I, für ihre Hilfsbereitschaft und für den herzlichen Empfang in Würzburg. Mein spezieller Dank geht an Dr. Kathrin Lampert für die Zeit des Zusammenschreibens. Vielen Dank für die Hilfe bei der Suche nach den richtigen Worten, die ab und zu nötige Ablenkung, für Diskussionen über „Fusselfische“ und für viele motivierende Worte.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden für ihr Verständnis und für die manchmal notwendige Ablenkung. Tausend Dank an Pamela Walter, die mir seit unserem gemeinsamen Studium eine treue Freundin ist und immer für mich da war.

Mein innigster und tiefster Dank gilt meiner großartigen Familie. Ich danke Euch für Eure bedingungslose Unterstützung und für das Interesse und die Begeisterung, mit der Ihr meine Arbeit stets verfolgt habt. Danke dafür, dass Ihr mich immer umsorgt, motiviert und an mich geglaubt habt. Unendlicher Dank gebührt meinen Eltern Sonja und Günter Osterloh. Danke dafür, dass Ihr mir all das ermöglicht habt, indem Ihr mir stets den Rücken freigehalten habt und immer für mich da seid. Insbesondere möchte ich auch meiner Tante Ingrid Hönigschmied danken, dass sie in kritischen Situationen sofort zur Stelle war und ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte.

Dieses Projekt wurde gefördert durch den Transregio 17 der DFG, die Volkswagenstiftung und die Forschergruppe „Chromatin Mediated Biological Decisions“ der Universität Marburg und Gießen (an Prof. Dr. Stefan Gaubatz).

Publikationen

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.

Gagrica, S., Hauser, S., Kolfshoten, 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.

Jager, A., Braatsch, S., Haberzettl, K., Metz, S., Osterloh, L., Han, Y. and Klug, G. (2007) The AppA and PpsR proteins from *Rhodobacter sphaeroides* can establish a redox-dependent signal chain but fail to transmit blue-light signals in other bacteria. *J Bacteriol*, **189**, 2274-2282.

Happ, H.N., Braatsch, S., Broschek, V., Osterloh, L. and Klug, G. (2005) Light-dependent regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is coordinately controlled by photosynthetic electron transport via the PrrBA two-component system and the photoreceptor AppA. *Mol Microbiol*, **58**, 903-914.

Han, Y., Braatsch, S., Osterloh, L. and Klug, G. (2004) A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12306-12311.

Konferenzbeiträge

Lisa Osterloh, Fabienne Schmit, Sladjana Gagrica, Björn von Eyß and Stefan Gaubatz (2005): Evidence for a human E2F/RB-complex containing synMuv-like proteins. *Genes & Cancer, 22nd Meeting, Cancer Research UK, University of Warwick* (Poster E7)

Lisa Osterloh, Björn von Eyß, Fabienne Schmit, Stefanie Hauser, Lena Rein and Stefan Gaubatz (2006): LIN-9 regulates G2/M transition through association with B-MYB. *Genes & Cancer, 23rd Meeting, Cancer Research UK, University of Warwick* (Poster E3)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lisa Osterloh
Geburtsdatum: 3. April 1979
Geburtsort: Wetzlar
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1985 – 1989 Schlossschule Braunfels
1989 – 1995 Gesamtschule Braunfels, Abschluss: Mittlere Reife
1995 – 1998 Goethe Schule Wetzlar (gymnasiale Oberstufe des Lahn-Dill-Kreises in Wetzlar), Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung:

1998 – 2003 Studium der Biologie (Diplom) an der Justus-Liebig-Universität Gießen,
Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Genetik, Tierphysiologie
2002 – 2003 Diplomarbeit am Institut für Mirko- und Molekularbiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gabriele Klug,
Thema der Arbeit: *Regulation von Photosynthesegenen durch Licht in Rhodobacter*
Seit August 2003 Dissertation am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Stefan Gaubatz.
April 2006 Wechsel der Arbeitsgruppe an den Lehrstuhl für Physiologische Chemie I der Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Thema der Arbeit: *Identifizierung und Charakterisierung LIN-9 regulierter Gene im humanen System – Die Rolle von LIN-9 in der Regulation des Zellzyklus*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und dabei keine anderen, als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 21. Mai 2007

Lisa Osterloh