

**Aus dem Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften
der Universität Würzburg**

Sprecherin: Professor Dr. Charlotte Förster

**Die Bedeutung von LIN9 für die Regulation der
Genexpression, die genomische Stabilität und
die Tumorsuppression**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Wurster, M. Sc.

aus Würzburg

Würzburg, Januar 2014



Referent: Prof. Dr. Stefan Gaubatz
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Roland Houben
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2015

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Tumorerkrankungen und ihre molekularen Ursachen	1
1.1.1 Karzinogenese – ein Überblick	1
1.2 Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen und seine Regulation	3
1.2.1 Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen	3
1.2.1.1 Die Interphase	3
1.2.1.2 Mitose und Zytokinese	4
1.2.2 Die Regulation des Zellzyklus	6
1.2.2.1 Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (<i>Cyclin-dependent kinases</i> , CDKs) ...	6
1.2.2.2 <i>Pocket-Proteine</i> und E2F	7
1.3 <i>Pocket-Protein</i> / E2F-haltige Multiproteinkomplexe	10
1.3.1 <i>Pocket-Protein</i> / E2F-Komplexe bei Modellorganismen	10
1.3.2 Der humane LIN-Komplex (LINC)	13
1.4 LIN9 als Bestandteil des DREAM-Kernkomplexes	16
1.4.1 LIN9	16
1.4.2 Mausmodelle zur Untersuchung der LIN9-Funktion	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
1.5.1 Phänotypische Charakterisierung von (homozygot) Lin9-depletierten MEFs ...	21
1.5.2 Die Bedeutung von Lin9 bei der Genregulation	21
1.5.3 Charakterisierung immortalisierter Lin9-defizienter MEFs	21
1.5.4 Charakterisierung Lin9-heterozygoter MEFs	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien und Puffer	23
2.1.1.1 Allgemeine Puffer	23
2.1.1.2 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz-Färbungen	23
2.1.1.3 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie	24
2.1.1.4 Lösungen für die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung	24
2.1.1.5 Puffer und Lösungen für die Extraktion von gDNA aus Zellkulturen	25
2.1.1.6 Puffer für die DNA-Minipräparation	25
2.1.1.7 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese	26

2.1.1.8 Puffer für die Chromatin-Immunpräzipitation	26
2.1.1.9 Enzym-Puffer	27
2.1.2 Enzyme, Kits, PCR, DNA-Marker	28
2.1.3 Plasmide	28
2.1.4 Oligonukleotide	29
2.1.4.1 Oligonukleotide für die konventionelle PCR	29
2.1.4.2 Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR	29
2.1.4.3 Oligonukleotide für die Chromatin-Immunpräzipitation	30
2.1.5 Antikörper	31
2.1.5.1 Primärantikörper CHIP	31
2.1.5.2 Primärantikörper Immunfluoreszenz und FACS	31
2.1.5.3 Sekundärantikörper Immunfluoreszenz	31
2.1.6 Zellkultur	32
2.1.6.1 Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur	32
2.1.6.2 Antibiotika	32
2.1.6.3 Zelllinien	32
2.1.6.4 Bakterienstämme	32
2.1.6.5 Kulturmedien für Bakterien	33
2.1.6.6 Lösungen für die Transfektion mit Ca-Phosphat-Präzipitations-Methode ...	33
2.1.7 Technisches Equipment	33
2.1.7.1 Durchflusszytometer	33
2.1.7.2 Molekularbiologisches Equipment	33
2.1.7.3 Zellkultur	34
2.1.7.4 Mikroskopisches Equipment und Kameras	34
2.1.8 Software	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Zellbiologische Methoden	35
2.2.1.1 Gewinnung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	35
2.2.1.2 Kultivierung und Passagieren von MEFs	35
2.2.1.3 Einfrieren von Zellen	36
2.2.1.4 Auftauen von Zellen	36
2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl	36
2.2.1.6 Erstellung einer Wachstumskurve	36
2.2.1.7 Zellzyklus-Synchronisation durch Serum-Entzug	37
2.2.1.8 Induktion von cre durch Hydroxytamoxifen	37

2.2.1.9	Markierung von S-Phase-Zellen mit Bromuridin (BrdU)	38
2.2.1.10	Produktion rekombinanter Retroviren in PlatE-Zellen	38
2.2.1.11	Infektion von MEFs mit Retroviren	39
2.2.1.12	Immortalisierung von MEFs	39
2.2.1.13	Nachweis transformierter Zellen im Weichagar (<i>Soft-Agar-Assay</i>)	39
2.2.2	Zellfärbungen, Durchflusszytometrie und Mikroskopie	41
2.2.2.1	Zellzyklusanalyse mit BrdU-/Phospho-H3-Immunfluoreszenzfärbungen	41
2.2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von α - und γ -Tubulin	42
2.2.2.3	Kernfärbung mit Bisbenzimid	43
2.2.2.4	<i>Time lapse</i> -Mikroskopie	44
2.2.2.5	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklus-Verteilung	45
2.2.2.6	Detektion apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC-FACS	46
2.2.2.7	Phospho-H3-FACS	46
2.2.2.8	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung	47
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	47
2.2.3.1	Phenol-Chloroform-Extraktion von genomischer DNA aus Zellkulturen	47
2.2.3.2	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen mit TRIzol TM -Reagenz	48
2.2.3.3	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen mit dem RNeasy TM Mini Kit	48
2.2.3.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	49
2.2.3.5	DNA-Gelelektrophorese	49
2.2.3.6	Standard-Klonierungs-Verfahren	49
2.2.3.7	Hitzeschock-Transformation von Bakterien	51
2.2.3.8	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	52
2.2.3.9	Reverse Transkription zur cDNA-Synthese	52
2.2.3.10	Semiquantitative genomische PCR zum Nachweis des Lin9 Δ fl-Allels	53
2.2.3.11	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR	54
2.2.4	Biochemische Methoden	55
2.2.4.1	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	55
3	ERGEBNISSE	59
3.1	Phänotypische Charakterisierung von Lin9-defizienten MEFs	59
3.1.1	Lin9-Defizienz führt zu einer Zunahme von binukleären Zellen und von Zellen mit abnormaler Kernmorphologie	59
3.1.2	Die DNA-Synthese (S-Phase) läuft auch in Lin9-defizienten Zellen mit abnormer Kernmorphologie weiterhin ab	63

3.1.3 Lin9-defiziente MEFs treten verzögert in die Mitose ein	65
3.1.4 Lin9-defiziente MEFs zeigen multiple mitotische und zytokinetische Defekte ...	68
3.1.5 Charakterisierung der SubG ₁ -Fraktion bei Lin9-defizienten MEFs	73
3.2 Die Bedeutung von Lin9 bei der Genregulation.....	76
3.2.1 Die Depletion von Lin9 führt zur verminderten Expression von G ₂ /M-Genen ...	76
3.2.2 Lin9 bindet an die Promotoren mitotischer Zielgene und nimmt Einfluss auf posttranslationale Histon-Modifikationen	80
3.3 Charakterisierung immortalisierter Lin9-defizienter MEFs	83
3.3.1 Auch in Gegenwart von Onkogenen ist Lin9 essentiell für das Zellwachstum ..	83
3.3.2 Depletion von Lin9 bei immortalisierten Zellen führt zu chromosomaler Instabilität und zu onkogener Transformation	85
3.3.3 Expression der Lin9-Zielgene in immortalisierten MEFs	88
3.4 Charakterisierung Lin9-heterozygoter MEFs	90
3.4.1 Lin9-Heterozygotizität führt nicht zu einem Wachstumsdefizit	90
3.4.2 Lin9-heterozygote MEFs zeigen kein verändertes Zellzyklusprofil	91
3.4.3 Der Einfluss der Lin9-Heterozygotizität auf die Genexpression	93
3.4.4 Der heterozygote Lin9-Verlust führt zur Schwächung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes	95
3.4.5 Der heterozygote Verlust von Lin9 trägt zur onkogenen Transformation bei ...	97
 4 DISKUSSION	 102
4.1 Die Rolle von Lin9 bei der Genexpression	103
4.1.1 Lin9 ist essentiell für die Aktivierung der Expression von G ₂ /M-Genen	103
4.1.2 Über welche Mechanismen aktiviert Lin9 die Expression von G ₂ /M-Genen? ..	106
4.1.3 Spielt Lin9 eine Rolle bei der Genrepression?	109
4.2 Die verminderte Expression von G₂/M-Genen bei Lin9-defizienten Zellen geht mit mitotischen und zytokinetischen Defekten einher	111
4.2.1 G ₂ /M-Progressionsverzögerung	111
4.2.2 Binukleärer Phänotyp, An- und Polyploidie	112
4.2.3 Aberrationen bei der Mitose und Zytokinese	113
4.3 Der Verlust von Lin9 führt zur zellulären Seneszenz und trägt zur onkogenen Transformation bei	119
4.3.1 Die Depletion von Lin9 führt zur zellulären Seneszenz	119
4.3.2 Immortalisierte MEFs können sich an den Verlust von Lin9 adaptieren, neigen dann jedoch zur onkogenen Transformation	122

4.3.3 Die Expression von G ₂ /M-Zielgenen erfolgt in Zellen, die sich an den Verlust von Lin9 adaptiert haben, Lin9-unabhängig	124
4.3.3.1 Wie kann es zur Lin9-unabhängigen Restitution der Zielgen-Expression kommen?	124
4.3.3.2 Warum zeigen die aus den einzelnen Kolonien expandierten Zelllinien eine hochgradige Poly- und Aneuploidie, obwohl die Expression der G ₂ /M-Zielgene weitgehend restituiert ist?	126
4.4 Der heterozygote Verlust von Lin9 führt zu einer Schwächung des mitotischen Spindelkontrollpunktes und trägt zur onkogenen Transformation bei	126
4.5 LIN9 – ein essentieller Faktor für Zellproliferation und Tumorsuppression	129
5 ZUSAMMENFASSUNG	133
5.1 Deutsche Zusammenfassung	133
5.2 English Summary	135
6 LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	137
6.1 Literaturverzeichnis	137
6.2 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	152
ANHANG	
Abkürzungen	
Danksagung	
Lebenslauf	

1 EINLEITUNG

1.1 Tumorerkrankungen und ihre molekularen Ursachen

Bösartige Neubildungen stellen in den Industrienationen nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweitgrößte Todesursachengruppe dar. In der Bundesrepublik Deutschland sind Malignome inzwischen jährlich für etwa 228.000 Todesfälle (26%) verantwortlich. Während der Anteil der kardiovaskulären Erkrankungen an den Todesursachen in den letzten 30 Jahren rückläufig war, ist im gleichen Zeitraum eine deutliche Zunahme des Anteils der durch Malignome verursachten Todesfälle zu verzeichnen (STATISTISCHES BUNDESAMT). Prävalenz und Inzidenz von Tumorerkrankungen sind in den letzten Jahren ebenfalls stetig steigend. War zur Jahrtausendwende in Deutschland jährlich bei etwa 400.000 Menschen eine maligne Neoplasie neu diagnostiziert worden, so lagen die Schätzungen für das Jahr 2012 bei mehr als 480.000 Erstdiagnosen (ROBERT-KOCH-INSTITUT). In Anbetracht der prognostizierten demografischen Entwicklung unserer Gesellschaft wird erwartet, dass sich die Krankheitslast durch maligne Neoplasien in den kommenden Jahren weiterhin aggraviert (DKFZ KREBSINFORMATIONSDIENST).

Vor dem Hintergrund dieser Zahlen wird deutlich, dass es von stetig wachsender Bedeutung sein wird, weitere Erkenntnisse über die molekularen Grundlagen von Tumorerkrankungen zu gewinnen um hierdurch die diagnostischen Algorithmen und die Therapiestrategien weiter optimieren zu können.

1.1.1 Karzinogenese – ein Überblick

Die heute überwiegend vertretene Hypothese zur Karzinogenese beschreibt diese als mehrstufigen Mikroevolutionsprozess (ALBERTS et al., 2002), bei welchem Tumorzellen und die hieraus bestehenden Tumorgewebe durch eine Abfolge genetischer und epigenetischer Veränderungen charakteristische Eigenschaften erwerben. Diese von HANAHAN & WEINBERG (2000) als *Hallmarks of Cancer* beschriebenen Eigenschaften umfassen die Entkopplung des Zellwachstums von externen Stimulatoren, die Insensitivität gegenüber Wachstums-inhibierenden Faktoren, ein unlimitiertes replikatives Potential, die Apoptose-Evasion sowie die Induktion von Angiogenese, Gewebeinvasion und Metastasierung. Während einige der Charakteristika wie die

Insensitivität gegenüber inhibitorischen Einflüssen auch bei benignen Neoplasien auftreten können, sind insbesondere die letztgenannten Aspekte definierend für ein Malignom. Neuere Betrachtungen inkludieren metabolische Veränderungen, inflammatorische Prozesse, genomische Instabilität bzw. chromosomale Aberrationen und Immunevasions-Mechanismen als zusätzliche Charakteristika (LAZEBNIK, 2010; HANAHAH & WEINBERG, 2011).

Ausgangspunkt für die Erlangung dieser Eigenschaften sind Mutationen des genetischen Materials. Auch ohne Einwirkung von exogenen Mutagenen ereignen sich täglich im Durchschnitt 10.000 bis 40.000 genetische Veränderungen in jeder einzelnen Körperzelle (SWENBERG et al., 2011). Hinzu treten exogene Einflüsse wie die im Zigarettenrauch, in bestimmten Nahrungsmitteln oder in beruflichen Noxen enthaltenen Karzinogene. Auch das mutagene Potential von UV- und radioaktiver Strahlung oder von Infektionserregern kann zur Entstehung von DNA-Schäden beitragen (AMES et al., 1995).

Dieser Last an Mutationen stehen verschiedene DNA-Reparatursysteme entgegen. Hierzu zählen neben der Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur sowie der *Mismatch*-Reparatur zur Beseitigung von Basenfehlpaarungen auch die Rekombinationsreparatursysteme zur Korrektur von Doppelstrangbrüchen. Die Summe dieser Reparaturmaßnahmen ist in der Lage, den Großteil der entstandenen DNA-Veränderungen zu beseitigen, sodass es zu keinen dauerhaften Mutationen kommt. Trotz der Existenz dieser Korrektursysteme geht man jedoch davon aus, dass statistisch betrachtet bei jeder Zellteilung eine Mutationsrate von 10^{-6} Mutationen pro Gen bzw. 10^{-10} Mutationen pro bp verbleibt (BAER et al., 2007). Aggraviert wird diese Situation ggf. durch hereditäre Defekte der Reparatursysteme. Dieser Zusammenhang ist inzwischen für zahlreiche Tumorentitäten gezeigt worden (THOMPSON et al., 2002; BELLIZZI & FRANKEL, 2009).

Werden entstandene DNA-Schäden nicht effektiv repariert oder die betroffenen Zellen durch Apoptose eliminiert, persistieren und akkumulieren diese Mutationen. Von besonderer Bedeutung bei der Karzinogenese sind aktivierende Veränderungen (*Gain-of-Function*-Mutationen) der so genannten Protoonkogene. Zu diesen Genen, die in jeder Zelle vorkommen und deren Genprodukte eine essentielle Rolle bei der Kontrolle von Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Zellwachstum spielen, zählen u. a. Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden, Transkriptionsfaktoren oder Zykline. Auf der anderen Seite stehen mit Funktionsbeeinträchtigung oder Funktionsverlust einhergehende Mutationen von

Tumorsuppressoren, deren Genprodukte für die Repression von Zellzyklus-promovierenden Genen, die Überwachung der genomischen Integrität, die Koordination der DNA-Reparatur und die Apoptose-Induktion verantwortlich sind. Sind diese Gene und die resultierenden Produkte defekt, wird das Auftreten weiterer Mutationsereignisse in folgenden Zellgenerationen gefördert, deren Effekte sich entsprechend potenzieren.

1.2 Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen und seine Regulation

1.2.1 Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen

Für die strukturelle und funktionelle Integrität von Geweben ist ein präzise regulierter Zellumsatz, die so genannte Zellhomöostase, von entscheidender Bedeutung. Störungen des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und dem Absterben von Zellen durch Apoptose oder Nekrose sind Grundlage der Entstehungen von Tumoren. Den zyklischen Ablauf von Mechanismen zur Koordination von Zellwachstum, Protein- und DNA-Synthese sowie Kern- und Zellteilung bezeichnet man als Zellzyklus. Dieser kann in die vier Hauptphasen G_1 (*gap*-Phase 1), S (Synthese-Phase), G_2 (*gap*-Phase 2) und M (Mitose und Zytokinese) untergliedert werden, wobei die *gap*-Phasen und die Synthesephase häufig als Interphase zusammengefasst werden. Die Einteilung und Bezeichnung dieser Phasen wurde im Jahre 1953 durch HOWARD und PELC beschrieben.

1.2.1.1 Die Interphase

Die G_1 -Phase, die sich an die vorangegangene Mitose und Zytokinese anschließt, stellt den ersten Abschnitt der Interphase dar. Sie dient der Vorbereitung der Zelle auf den folgenden Teilungszyklus und ist daher geprägt von Zellwachstum und hoher Stoffwechselaktivität (MASSAGUE, 2004). Von besonderer Relevanz ist dabei die Proteinsynthese zur Bereitstellung der nötigen Enzyme für die nachfolgende Replikation und der Strukturproteine zur Verpackung der DNA. Da die Zellen zu diesem Zeitpunkt die DNA-Replikation noch nicht durchlaufen haben, besitzen die Chromosomen jeweils nur ein Chromatid. Die G_1 -Phase kann abhängig vom Zelltyp und den Umgebungsbedingungen in ihrer Dauer erheblich variieren.

In der G_1 -Phase befindet sich auch der Restriktionspunkt, der zentrale Kontrollpunkt des Zellzyklus, an dem das weitere Schicksal der Zelle maßgeblich determiniert wird

(Kap. 1.2.2.1). Hier entscheidet sich, ob die Zelle im Zyklus verbleibt und in die S-Phase übertritt oder den Zellzyklus reversibel verlässt um in ein G₀-Stadium einzutreten. Dieser Prozess kann einen Schritt der Zelldifferenzierung darstellen. So können ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsaktive Zellen unter Umständen mehrere Monate in der G₀-Phase verbleiben und dabei ihre gewebespezifische Leistung verrichten. In wenig regenerativen Geweben wie z. B. neuronalen Geweben befindet sich häufig ein großer Anteil der Zellen in der G₀-Phase (ZETTERBERG & LARSSON, 1991).

In der S-Phase erfolgt die Replikation, die identische Verdopplung der DNA. Am Ende dieser Phase besteht jedes Chromosom aus zwei Chromatiden. An diese Synthesephase schließt sich die meist 3 bis 5 Stunden dauernde zweite *gap*-Phase (G₂) an, in der sich die Zelle durch weiteres Zellwachstum und intensive Proteinsynthese auf die bevorstehende Mitose vorbereitet. Weiterhin finden in dieser Phase verschiedene Kontrollprozesse statt, die sicherstellen sollen, dass die DNA korrekt repliziert wurde und keine Schäden am Chromatin vorliegen, ehe die Zelle in die Mitose eintritt (CUDDIHY & O'CONNELL, 2003).

1.2.1.2 Mitose und Zytokinese

Die Mitose bezeichnet den Vorgang der Kernteilung einer eukaryontischen Zelle. Sie wird gefolgt von der Zytokinese, der Teilung des Zellsomas in zwei Tochterzellen. Mitose und Zytokinese werden als M-Phase zusammengefasst und dauern spezie- und zelltypabhängig zwischen einigen Minuten und wenigen Stunden. Im Vergleich zur Interphase ist diese Phase damit verhältnismäßig kurz (COOPER, 2000).

Die Kernteilung kann in fünf charakteristische Subphasen untergliedert werden. In der zunächst ablaufenden Prophase teilt sich das bereits zu Beginn der S-Phase duplizierte Zentrosom. Die entstehenden Tochterzentrosomen wandern in Richtung der Zellpole, wo sie in der Folge als Mikrotubuli-organisierende Zentren (*MOTC*) das Spindelssystem bilden. Neben astralen Mikrotubuli, welche die Spindelpole sternförmig umgeben und der Verankerung im Zellkortex dienen, bilden sich die Kinetochor-Spindelfasern, die später für die Verteilung der Chromatiden auf die Tochterkerne entscheidend sind und die Polfasern, welche die zentrale Mitosespindel stabilisieren (VARMARK, 2004). Im Nukleus beginnt die Chromosomenkondensation, sodass das Chromatin nun lichtmikroskopisch als distinkte Chromosomen erkennbar wird.

In der anschließenden Prometaphase kommt es zum Zerfall der Kernhülle. Hierdurch erhalten die Mikrotubuli des Spindelsystems Zugang zu den Chromosomen. Sie

adhärieren an den Kinetochoren – Proteinkomplexen an den Centromeren der Chromosomen – und befördern die Chromosomen in Richtung der Zellmitte (Äquatorialebene).

In der Metaphase sind die Chromosomen maximal kondensiert und in der Äquatorialebene angeordnet. An dieser Stelle wird die korrekte Anordnung der Chromosomen und die Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore überprüft (M-Phase-Kontrollpunkt). Ist dies der Fall, so wird durch den *Cdc20-Anaphase-promoting-Complex* (APC^{Cdc20}) mittels Ubiquitinierung die proteasomale Degradation von Zyklin B und Securin induziert (SUDAKIN et al., 1995; CLUTE & PINES, 1999; HAGTING et al., 2002; YU, 2002). Durch Wegfall der Securin-vermittelten Inhibition kommt es zu einer Aktivierung der Separase, welche die beiden Schwesterchromatiden trennt, die bis zu diesem Zeitpunkt am Centromer durch Cohesine verbunden sind (UHLMANN et al., 1999). Hierdurch wird die Segregation der Chromatiden eingeleitet, was den Beginn der Anaphase markiert. Unvollständig oder inkorrekt angeheftete Kinetochore führen zu einer Verzögerung der weiteren Mitose-Vorgänge (RIEDER et al., 1994; RIEDER et al., 1995). Dieser Kontrollmechanismus wird durch den *mitotic checkpoint complex* vermittelt, welcher aus BubR1, Bub3 und Mad2 besteht und Cdc20 inaktiviert (SUDAKIN et al., 2001).

Die folgende Anaphase ist geprägt von der räumlichen Trennung der Schwesterchromatiden. Hierzu tragen im Wesentlichen zwei Mechanismen bei. In der frühen Anaphase kommt es durch Depolymerisation der Mikrotubuli zu einer Verkürzung der Spindelfasern und damit zu einem Distanzgewinn zwischen den Ein-Chromatid-Chromosomen. In der späten Anaphase wird dieser Vorgang durch ein Auseinanderweichen der Spindelpole unterstützt (MILLER, 2000).

Die Telophase stellt den letzten Abschnitt der Kernteilung dar. In dieser Phase beginnt die Dekondensation des Chromatins und die Neuformierung der Kernhülle und Kernlamina. Diese Vorgänge werden induziert durch den nach Degradation von Zyklin B resultierenden Abfall der CDK1-Aktivität (PINES & HUNTER, 1992).

Zugleich beginnt mit dem Aufbau eines kontraktilen Rings in Höhe der ehemaligen Metaphasenplatte die Zytokinese. Der aus Aktin- und Myosin-Filamenten bestehende Ring lagert sich am Zellkortex an und bewirkt eine zunehmende Ingression der Teilungsfurche, die zur Fusion der Zellmembranen und letztlich zur Trennung der Tochterzellen führt. Die endgültige Abszission der entstandenen Zellen wird vermittelt durch den *midbody*, der aus den zentralen Polfasern des Spindelapparates und einer Reihe von regulatorischen Proteinen besteht (GLOTZER, 2005; GLOTZER 2009).

1.2.2 Die Regulation des Zellzyklus

1.2.2.1 Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (*Cyclin-dependent kinases*, CDKs)

Die korrekte Verdopplung des Chromosomensatzes und identische Verteilung des Chromatins auf die entstehenden Tochterzellen sind essentiell für die Erhaltung der genomischen Stabilität und müssen daher exakt reguliert werden. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei das Zyklin-CDK-System ein (SHERR, 1993; SHERR, 1996; MORGAN, 1997; EKHOLM & REED, 2000; PINES & RIEDER, 2001).

Zyklin-abhängige Kinasen stellen eine Gruppe von Serin-Threonin-Kinasen dar, die nach Komplexbildung mit den entsprechenden Zyklinen aktiviert werden und daraufhin die Phosphorylierung nachgeordneter Regulatoren und Transkriptionsfaktoren katalysieren. Die Abhängigkeit der CDKs von der Bindung der entsprechenden Zykline ermöglicht eine zeitliche Regulation der Kinaseaktivität, da die Zykline Zellzyklus-abhängig exprimiert werden. Nach dem proteasomalen Abbau der Zykline und damit der Inaktivierung der zugehörigen CDKs werden die reversibel phosphorylierten Zielproteine von Proteinphosphatasen dephosphoryliert. Die Zykline selbst besitzen keine enzymatische Aktivität.

Die zentralen Zykline der G₁-Phase sind die D-Zykline (Zyklin D1, D2 und D3), welche abhängig von mitogener Stimulation exprimiert werden und Heterodimere mit CDK4 und CDK6 bilden. Diese Komplexbildung führt zur partiellen Aktivierung der CDKs. Nach Übertritt der Zyklin D-CDK4/6-Komplexe in den Zellkern werden sie von einer CDK-aktivierenden Kinase (CAK) phosphoryliert und hierdurch vollständig aktiviert. Das wichtigste Zielprotein von CDK4 und CDK6 ist das Retinoblastom-Protein (pRB), das durch diese CDKs hyperphosphoryliert wird. Im dephosphorylierten Zustand bindet und inaktiviert pRB Transkriptions-Aktivatoren aus der E2F-Familie (E2F1, E2F2 und E2F3) und rekrutiert des Weiteren Histon-Deacetylasen an das Chromatin, wodurch die Expression einer Vielzahl von Zielgenen herabreguliert wird. Die Phosphorylierung von pRB bewirkt folglich eine Aktivierung der Synthese der für die Fortführung des Zellzyklus und vor allem für den Eintritt in die S-Phase entscheidenden Proteine wie Cdc6, die DNA-Polymerase α , die Dehydrofolat-Reduktase oder die Thymidin-Kinase. Dieser Mechanismus wird als Restriktionspunkt des Zellzyklus bezeichnet (FARNHAM, 1996; PLANAS-SILVA & WEINBERG, 1997).

Zu den nach diesem Restriktionspunkt verstärkt transkribierten Genen gehören auch die E-Zykline (E1 & E2). Diese werden vor allem in der späten G₁-Phase exprimiert und interagieren mit CDK2. Zyklin E-CDK2-Komplexe halten die Hyperphosphorylierung

von pRB aufrecht und phosphorylieren zudem Substrate, die für die Einleitung der S-Phase (*pre-replication complex*) entscheidend sind.

Mit dem Eintritt in die S-Phase übernehmen die A-Zykline (v. a. Zyklin A2) die führende Rolle. Sie interagieren ebenfalls mit CDK2 und führen zur Phosphorylierung von Proteinen, die in die DNA-Replikation involviert sind. Unter dem Einfluss von Zyklin A-CDK2-Heterodimeren wird Cdc6, das für die Rekrutierung eines hexameren Mcm-Komplexes mit Helikaseaktivität an die Replikationsursprünge (*origins of replication*) verantwortlich ist, phosphoryliert und damit die Replikation initiiert (PETERSEN et al., 1999; COVERLEY et al., 2000).

In der späten S-Phase und G₂-Phase assoziieren sowohl die A-Zykline als auch Zyklin B1 mit CDK1, wobei der Zyklin A2-CDK2-Komplex eine Verlängerung der Halbwertszeit der durch Zyklin B1 aktivierten Zyklin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) bewirkt. Der Zyklin B1-CDK1-Komplex spielt eine zentrale Rolle bei der Einleitung der mitotischen Prophase (*M-Phase promoting factor*). Die von ihm phosphorylierten Zielproteine sind u. a. involviert bei der Chromatin-Kondensation oder der Organisation des mitotischen Spindelapparates. Durch die Inaktivierung des Zyklin B1-CDK1-Komplexes wird die Telophase der Mitose eingeleitet (DRAETTA et al., 1989; PAGANO et al., 1992).

Die Zyklin-CDK-Komplexe werden durch CDK-inhibitorische Einheiten (*CDK inhibitory subunits*) in ihrer Aktivität feinreguliert. Diese können in die Cip/Kip-Familie, bestehend aus p21, p27 und p57 und in die INK4-Familie, bestehend aus p15, p16, p18 und p19, unterteilt werden. Die INK4-Familie besitzt eine hohe Spezifität für Zyklin D-CDK4/6-Komplexe und kann daher den Zellzyklus in der G₁-Phase arretieren. Daneben wurden weitere Funktionen dieser Proteine bei der Regulation der DNA-Reparatur, Seneszenz und Apoptose beschrieben (HIRAI et al., 1995; ROUSSEL, 1999; SHERR & ROBERTS, 1999; EKHOLM & REED, 2000). Die Cip/Kip-Proteine zeigen ein breiteres Substratspektrum und interagieren sowohl mit CDK4/6 als auch mit CDK2. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Feinregulation des G₁-S-Übertritts. Auch für die Mitglieder der Cip/Kip-Familie sind inzwischen zahlreiche weitere Funktionen, z. B. bei der Apoptose-Induktion oder der Tumorigenese, charakterisiert worden (LEVKAU et al., 1998; OYA & SCHULZ, 2000; LEE & YANG, 2001).

1.2.2.2 Pocket-Proteine und E2F

Neben dem Zyklin-CDK-System zählen auch die *Pocket*-Proteine zu den Schlüsselregulatoren des Zellzyklus. Die Bezeichnung entstammt der Tatsache, dass diese Proteine zwei hochkonservierte Domänen besitzen, die gemeinsam eine

taschenförmige Struktur bilden. Diese Tasche interagiert mit Histon-Deacetylasen und Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie (LIPINSKI & JACKS, 1999; GIACINTI & GIORDANO, 2006). Zu den *Pocket*-Proteinen zählen das auf Chromosom 13q kodierte Retinoblastom-Protein (pRB) sowie die pRB-ähnlichen Proteine p107 und p130. Das Retinoblastom-Protein ist ein zentraler Tumorsuppressor, der in einer Vielzahl humaner Malignome mutiert ist. pRB wurde im Jahre 1986 durch FRIEND et al. als erster Tumorsuppressor beschrieben, was einen wichtigen Meilenstein in der Zellzyklusforschung markierte. Die Bezeichnung des Proteins geht auf den Nachweis von pRB-Mutationen bei hereditären und sporadischen Retinoblastomen zurück (FRIEND et al., 1986; LEE et al., 1987; SHERR, 1996).

Die Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren besteht aus neun Mitgliedern, welche eine konservierte *Helix-Loop-Helix*-Domäne aufweisen. Entsprechend ihrer Rolle bei der Transkriptionsregulation und ihrer Interaktion mit *Pocket*-Proteinen können sie in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. Die erste dieser Hauptgruppen bilden die Transkriptions-Aktivatoren E2F1, E2F2 und E2F3a. Sie interagieren mit pRB, nicht jedoch mit p107 und p130. Die Freisetzung von E2F1-3 wird durch CDK4/6-abhängige Phosphorylierung von pRB vermittelt. Hiernach aktivieren diese E2Fs eine Vielzahl von Zielgenen, die vor allem für die Zellproliferation eine Rolle spielen. Des Weiteren rekrutieren sie Histonacetylasen, die durch Acetylierung von Histon 3 und Histon 4 die transkriptionelle Aktivität weiter verstärken. Die Mitglieder dieser E2F-Subgruppe werden in der späten G₁- und frühen S-Phase verstärkt exprimiert und besitzen eine Schlüsselrolle am Restriktionspunkt des Zellzyklus (Kapitel 1.2.2.1; LEONE et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass E2F1-3 für das Proliferationspotential von MEFs essentiell sind und deren Verlust zu einer Arretierung des Zellzyklus führt (WU et al., 2000). Neben der Kernfunktion dieser Gruppe bei Proliferationsvorgängen konnte eine Beteiligung bei weiteren biologischen Funktionen nachgewiesen werden. So wurde z. B. für E2F1 eine entscheidende Beteiligung bei der Apoptoseinduktion beschrieben (DEGREGORI et al., 1997; HALLSTROM & NEVINS, 2003; LAZZERINI & HELIN, 2005).

E2F4 und E2F5 können aufgrund ihrer transkriptionell reprimierenden Funktion auf die E2F-Zielgene und die Zellzyklusprogression als zweite E2F-Subfamilie zusammengefasst werden. Diese Transkriptionsfaktoren interagieren vor allem mit p107 und p130, wobei der Hauptassoziationspartner abhängig vom Proliferationsstatus der Zelle und der Zellzyklusphase ist (BEIJERSBERGEN et al., 1994; GINSBERG et al. 1994; HIJMANS et al., 1995; VAIRO et al., 1995; MOBERG et al., 1996; GAUBATZ et al., 2000). Analog zu den transkriptionell aktivierenden E2Fs erfolgt die Freisetzung durch

Hyperphosphorylierung des entsprechenden *Pocket*-Proteins. Nach der Dissoziation vom *Pocket*-Protein translozieren E2F4 und E2F5 vermittelt durch ein NES (*nuclear export signal*) aus dem Kern in das Zytoplasma (GAUBATZ et al., 2001). Aufgrund eines fehlenden NLS (*nuclear localization signal*) können diese E2Fs im Gegensatz zu E2F1-3 nur im Komplex mit hypophosphorylierten *Pocket*-Proteinen wieder in den Kern gelangen. Dort rekrutieren die *Pocket*-Protein-E2F4/5-Komplexe Histon-Deacetylasen und reprimieren die Synthese Zellzyklus-promovierender Proteine wie B-MYB, E2F1, Zyklin A und CDK1 (ARROYO & RAYCHAUDHURI, 1992; MUDRAK et al., 1994; LEONE et al., 1999). Hierdurch wird der Austritt der Zelle aus dem Zellzyklus in die G₀-Phase und die terminale Zelldifferenzierung gefördert. Beim Wiedereintritt aus der G₀-Phase in den Zellzyklus wird p130 CDK-abhängig phosphoryliert und dadurch E2F4 freigesetzt. Gleichzeitig kommt es durch CDK4/6 zur pRB-Phosphorylierung und hierdurch zur Freisetzung aktivierender E2Fs. Es konnte im murinen Modell gezeigt werden, dass die simultane Depletion von E2F4 und E2F5 mit embryonaler Letalität einhergeht, was die Bedeutung dieser Proteine bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen unterstreicht (GAUBATZ et al., 2000).

Von mehreren Autoren wird inzwischen auch das mit pRB interagierende E2F3b, das im Vergleich zu E2F3a einen verkürzten N-terminalen Bereich besitzt, dieser Subfamilie zugerechnet. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit von E2F3b mit E2F1-3a zeigt sich eine funktionelle Überschneidung mit E2F4 und E2F5 bei der transkriptionellen Repression (LEONE et al., 2000; TRIMARCHI & LEES, 2002).

E2F6, E2F7 und E2F8 stellen die dritte Subgruppe der E2F-Familie dar. Sie besitzen keine Transaktivierungs- und Bindedomäne und interagieren folglich nicht mit *Pocket*-Proteinen. E2F6 weist eine reprimierende Domäne auf und kann damit die Transkription der E2F-Zielgene inhibieren (MORKEL et al., 1997; CARTWRIGHT et al., 1998; GAUBATZ et al., 1998). Studien an E2F6-defizienten Mäusen zeigten, dass das Protein eine Rolle bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen spielt (STORRE et al., 2002). E2F7 und E2F8 besitzen zwei DNA-Bindungsdomänen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine für die embryonale Entwicklung und das Überleben von Zellen essentiell sind. Auch wurde eine Beteiligung bei der DNA-Schadensantwort beschrieben (ZALMAS et al., 2008).

Die Aktivität der E2F-Transkriptionsfaktoren wird durch vielfältige Mechanismen reguliert. Neben der Steuerung der Synthese, der Ubiquitin-abhängigen Degradation und der Komplexbildung mit *Pocket*-Proteinen existieren weitere Möglichkeiten einer Feinregulation. Ein Mechanismus hierbei besteht in der Bildung von Heterodimeren

aus E2F und den ebenfalls zur E2F-Familie zählenden Dimerisierungspartnern (DP/DPTF). In Abhängigkeit vom jeweiligen DP kann die DNA-Bindungsaffinität der E2F erhöht (DP1, DP2) oder vermindert (DP4) werden und Einfluss auf die Transaktivierung anderer E2F genommen werden (BANDARA et al., 1993; KREK et al., 1993; ZHANG & CHELLAPPAN, 1995; MILTON et al., 2006). E2F7 und E2F8 weisen keine Dimerisierungsdomäne auf und interagieren folglich nicht mit DP. Ein weiterer Regulationsmechanismus beruht auf der Phosphorylierung von DP1 durch den Zyklin A-CDK2-Komplex, wodurch die DNA-Bindungsaffinität von E2F1-3/DP-Dimeren reduziert und damit die Zielgenaktivierung beeinträchtigt wird (KREK et al., 1994; XU et al., 1994; KITAGAWA et al., 1995).

1.3 Pocket-Protein / E2F-haltige Multiproteinkomplexe

1.3.1 Pocket-Protein / E2F-Komplexe bei Modellorganismen

Die *Pocket*-Protein-vermittelte transkriptionelle Regulation von E2F-Zielgenen kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden. Einerseits können hypophosphorylierte *Pocket*-Proteine E2F-Transkriptionsfaktoren innerhalb deren Transaktivierungsdomäne binden, was zur E2F-Inhibition führt. Auf der anderen Seite können *Pocket*-Protein- und E2F-haltige Komplexe an das Chromatin binden und Zielgene direkt durch Rekrutierung von chromatin-modifizierenden Enzymen regulieren (FROLOV & DYSON, 2004; VAN DEN HEUVEL & DYSON, 2008). Die Identifikation und Charakterisierung solcher Komplexe und deren Funktionen bei der transkriptionellen Regulation war in den vergangenen Jahren Gegenstand zahlreicher Studien. Aufgrund der Komplexität und Redundanz vieler Signalwege bei höheren Vertebraten wurden die ersten Arbeiten zu dieser Thematik an den Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* durchgeführt.

Erkenntnisse über die Bedeutung von *Pocket*-Proteinen und E2F sowie das Vorliegen eines *Pocket*-Protein- und E2F-haltigen Komplexes beim Nematoden *C. elegans* ergaben sich aus genetischen Studien zur Vulva-Entwicklung. Die Differenzierung der entsprechenden ektodermalen Vorläufer-Zellen (*Vulva precursor cells*) zu Vulva-Zellen wird durch ein EGF-ähnliches Signal (LIN-3) reguliert, wobei die Signaltransduktion über einen RAS/MAPK-Signalweg erfolgt. Mutationen in diesem Signalweg können mit Defekten der Vulva-Entwicklung einhergehen. Eine charakteristische Aberration stellt

die *synthetic multivulva*-Variante (SynMuv) dar. Neben den eigentlichen Vulva-Vorläufer-Zellen existiert ein zweiter Typ von Vorläuferzellen, die sich im Regelfall zu hypodermalen Zellen entwickeln, jedoch ebenfalls das Potential zur Differenzierung in Vulva-Zellen besitzen. Diese Differenzierung und damit die Entstehung multipler Vulven wird induziert, wenn die Aktivität des RAS/MAPK-Signalwegs ein bestimmtes Niveau überschreitet. Der RAS/MAPK-Signalweg wird normalerweise durch Produkte der SynMuv-Gene inhibiert. Diese werden in drei Gruppen eingeteilt, die mit A, B und C bezeichnet sind und für teilweise redundante Produkte kodieren (FERGUSON & HORVITZ, 1989; CEOL & HORVITZ, 2004). Tritt ein Funktionsverlust von zwei dieser Gruppen ein, kann es zur Manifestierung des *synthetic multivulva*-Phänotyps kommen (FAY & HAN, 2000; VAN DEN HEUVEL & DYSON, 2008).

Ein Teil der SynMuv B-Gene kodiert für homologe Proteine zum humanen pRB/E2F-System. So wurden u. a. Homologe zu pRB (LIN-35), DP (DPL-1) und E2F (EFL-1) beschrieben (LU & HORVITZ, 1998; CEOL & HORVITZ, 2001; CEOL & HORVITZ, 2004). Die bislang beschriebenen Funktionen der SynMuvB-Gene umfassen die Beteiligung bei der Geschlechtsdetermination, der Entwicklung der Keimbahnzellen und männlichen Gonaden, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose-Regulation (GROTE & CONRADT, 2006; REDDIEN et al., 2007; SCHERTEL & CONRADT, 2007).

Aus biochemischen Untersuchungen ist bekannt, dass diese Proteine mit anderen Produkten der SynMuv B-Gene einen als DRM (DP, RB & MuvB) bezeichneten Komplex bilden (Tabelle 1.1), der distinkt ist von einem ebenfalls LIN-53-haltigen NuRD (*Nucleosome Remodelling & Deacetylase*)-ähnlichen Komplex (HARRISON et al., 2006). Für den DRM-Komplex, der über DPL-1/EFL-1-Heterodimere oder LIN-54 an die DNA binden kann (DEPLANCKE et al., 2006), wird eine Hauptfunktion als transkriptioneller Repressor bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen angenommen, wobei Hinweise darauf vorliegen, dass der DRM-Komplex und der NuRD-ähnliche Komplex synergistische Effekte bei der Etablierung und Aufrechterhaltung repressiver Chromatinstrukturen ausüben (CUI et al., 2006; ANDERSEN et al., 2007; VAN DEN HEUVEL & DYSON, 2008). Die genauen Funktionen der beiden Komplexe und deren Interaktion sind jedoch noch weitgehend unverstanden.

Im Jahre 2004 wurden unabhängig voneinander durch KORENJAK et al. und LEWIS et al. dRBF/dE2F-haltige Komplexe aus Embryonen von *D. melanogaster* aufgereinigt und charakterisiert. Diese Komplexe wurden als dREAM (*Drosophila RBF, E2F and Myb-interacting Proteins*; KORENJAK et al., 2004) bzw. Myb-MuvB (LEWIS et al., 2004) bezeichnet und enthalten 7 zu den DRM-Bestandteilen bei *C. elegans* homologe

Proteine (Tabelle 1.1). Im Gegensatz zum DRM-Komplex wurden bei *D. melanogaster* zwei E2F-Homologe (dE2F1 und dE2F2) detektiert, die mit dDP Heterodimere bilden und Sequenz-spezifisch DNA-bindende Komplexe formen. Während dE2F1/dDP-Heterodimere die Transkription von G₁/S-Phase-Genen induzieren und aktivierend auf die Replikation und die Zellproliferation wirken, fungieren dE2F2/dDP-Komplexe als transkriptionelle Repressoren. Weiterhin fanden sich zwei unterschiedliche pRB-Homologe, die als RBF1 und RBF2 bezeichnet werden (OHTANI & NEVINS, 1994; SAWADO et al., 1998; STEVAUX et al., 2002).

Bei der Aufreinigung des Myb-MuvB-Komplexes wurden gegenüber dem dREAM-Komplex drei zusätzliche Komponenten detektiert. Dabei handelt es sich um dLIN52, den Tumorsuppressor L(3)MBT und die Histon-Deacetylase RPD3. Es wird angenommen, dass die unterschiedliche Zusammensetzung auf unterschiedlich stringente Aufreinigungsverfahren zurückzuführen sind. RNA-Interferenz-basierte Experimente zeigen, dass dLIN52 und L(3)MBT bei der Repression von dE2F2-Zielgenen beteiligt sind (LEWIS et al., 2004; LU et al., 2007).

Sowohl für den Myb-MuvB-Komplex als auch für dREAM wurde beschrieben, dass sie an die Promotoren von dE2F-Zielgenen binden und diese reprimieren. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass eine zentrale Funktion der Komplexe in der Repression von Genen mit geschlechts- und differenzierungsspezifischer Expression liegt (KORENJAK et al. 2004; LEWIS et al., 2004). Durch gezielte Depletion der einzelnen Untereinheiten von dREAM bzw. Myb-MuvB wurde gezeigt, dass hierfür alle Bestandteile des Komplexes mit Ausnahme von dMYB essentiell sind. Basierend auf Untersuchungen zur Amplifikation von Chorion-Gen-*Clustern* postulierten BEALL et al. ein duales Modell, nach dem der Komplex dMYB-unabhängig repressiv auf die Zielgen-Transkription und -replikation wirkt, aber temporär und entwicklungsabhängig durch dMYB aktiviert werden kann, wodurch es zur Genamplifikation und Steigerung der transkriptionellen Aktivität kommt (BEALL et al. 2002; BEALL et al. 2004).

Umfassendere Erkenntnisse über die Funktionen von dREAM und Myb-MuvB ergaben sich bei genom-weiten Untersuchungen von GEORLETTE et al. (2007). Durch diese Studien wurde bestätigt, dass der Myb-MuvB-Komplex an die Promotoren einer Vielzahl von Entwicklungs- und Differenzierungs-assoziierten Genen bindet und diese reprimiert. Insgesamt wurde der Komplex an den Promotoren von 32% der Drosophila-Gene nachgewiesen. Zusätzlich wurde in dieser Studie gezeigt, dass Myb-MuvB für eine andere Subpopulation von Genen als transkriptioneller Aktivator fungiert. Hierbei handelte es sich insbesondere um Gene, deren Produkte eine bekannte mitotische

Funktion besitzen sowie Gene, deren Produkte spezifische Differenzierungsschritte vermitteln (GEORLETTE et al., 2007).

Neben dem dREAM / Myb-MuvB-Komplex wurde bei *D. melanogaster* ein zusätzlicher testis-spezifischer Multiprotein-Komplex nachgewiesen. Der als tMAC (*testis meiotic arrest complex*) bezeichnete Komplex enthält die dREAM / Myb-MuvB-Subeinheiten MIP40 und p55/CAF1 sowie Organ-spezifische Homologe zu LIN9 und LIN54 (*Always Early* und *Tombola*) und zwei weitere Proteine (*Cookie Monster* und *Matotopetli*). Die Depletion von Bestandteilen dieses Komplexes führt zu einem meiotischen Arrest der Spermatozyten und zu einer damit einhergehenden Sterilität oder herabgesetzten Fertilität (BEALL et al., 2007).

1.3.2 Der humane LIN-Komplex (LINC)

Im Jahre 2007 wurde durch SCHMIT et al. in unserem Labor ein humaner LIN-Komplex (LINC), der Homologe zu den im DRM, dREAM und Myb-MuvB-Komplex identifizierten Proteinen aufweist, massenspektrometrisch charakterisiert. Im Gegensatz zu den bei *C. elegans* und *D. melanogaster* beschriebenen Multiproteinkomplexen wurde beobachtet, dass sich die Zusammensetzung des LINC abhängig von der Zellzyklusphase verändert. Der Kernkomplex, bestehend aus den vier LIN-Proteinen LIN9, LIN37, LIN52 und LIN54 sowie dem Retinoblastom-Bindeprotein RbAp48 interagiert in der G₀-Phase mit p130 und E2F4. In der S-Phase kann diese Assoziation nicht mehr nachgewiesen werden. Stattdessen bindet der Kernkomplex in dieser Phase an p107 und B-MYB.

Mit Chromatin-Immünpräzipitations-Experimenten wurde gezeigt, dass LINC in der G₀-Phase an E2F-Zielgen-Promotoren bindet. Trotz dieser nachgewiesenen Bindung geben die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe keinen Anhalt dafür, dass LINC für die Repression von E2F-Zielgenen in quieszenten Zellen benötigt wird. Mit einem RNA-Interferenz-Ansatz konnte stattdessen in humanen Fibroblasten gezeigt werden, dass die Depletion von LIN9, LIN 37, LIN52 oder LIN54 keine signifikanten Effekte auf die Expression von G₁/S-Genen wie Cdc6 oder B-Myb hervorruft (SCHMIT et al., 2007).

Nach dem Wiedereintritt aus der G₀-Phase in den Zellzyklus verlässt der LIN-Komplex die Promotoren von G₁/S-Genen, verbleibt aber an den Promotoren von Genen, die in der G₂- bzw. M-Phase exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Depletion von LIN9, LIN52, LIN54 oder B-MYB zu einer signifikanten Abnahme der Expression von Genen, die für den Eintritt in die Mitose benötigt werden (Zyklusin A2,

Zyklin B1, CDK1), führt. Des Weiteren fand sich eine deutliche Herabregulation der Expression von Genen, deren Produkte beim mitotischen Spindel-Kontrollpunkt (Plk1, Aurora-Kinase A, Survivin), der Chromosomensegregation (Cenpe) oder der Degradation mitotischer Zykline am Ende der Mitose (UbcH10) involviert sind. Phänotypisch zeigte sich eine deutlich verlangsamte Proliferation der Zellen mit einem verzögerten Durchlaufen der G₂- und M-Phase. Hinweise für einen Arrest in der Mitose oder eine Verzögerung in der S-Phase ergaben sich bei Zellzyklusanalysen nicht. Anhand dieser Daten wurde postuliert, dass eine zentrale Funktion des humanen LINC in der Regulation von G₂/M-Genen liegt (OSTERLOH et al., 2007; SCHMIT et al., 2007). Parallel zu den Studien unserer Arbeitsgruppe haben LITOVCHICK et al. ebenfalls im Jahre 2007 einen ähnlichen Multiproteinkomplex beschrieben. Dieser als humaner DREAM-Komplex (*DP, RB-like, E2F4 & MuvB*) deklarierte Proteinkomplex beinhaltet in quieszenten Zellen (G₀-Phase) p130, E2F4 oder E2F5, DP1 oder DP2, LIN9, LIN37, LIN52, LIN54 und RbAP48. Es wurde mit ChIP-Analysen gezeigt, dass der Komplex in dieser Zusammensetzung, die weitgehend konsistent ist zu der von SCHMIT et al. für diese Zellzyklusphase charakterisierten Komposition von LINC, an die Promotoren von E2F-Zielgenen bindet und diese reprimiert. Der Kernkomplex (*MuvB core*) dissoziiert in der S-Phase von E2F4/5 und p130 und assoziiert mit B-MYB (Myb-MuvB-Komplex). In dieser Zusammensetzung bindet der Myb-MuvB-Komplex nicht an die Promotoren von E2F-Zielgenen (LITOVCHICK et al., 2007). In der Gesamtheit dokumentiert diese Studie ebenso wie eine spätere Publikation dieser Gruppe (LITOVCHICK et al., 2011) eine Hauptfunktion von DREAM bei der Repression von E2F-Zielgenen in der G₀-Phase. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit anderer Autoren aus der selben Arbeitsgruppe wurde eine zusätzliche Funktion des Myb-MuvB-Komplexes bei der Rekrutierung von aktivierenden Transkriptionsfaktoren an die Promotoren von G₂/M-Genen beschrieben (SADASIVAM et al., 2012; siehe Kapitel 4.1.2).

Diese Studien dokumentieren in der Gesamtschau vielschichtige Aufgaben des humanen DREAM-Komplexes / LINC bei der Regulation der Genexpression, die abhängig vom zellulären Kontext und vor allem von der Zellzyklusphase sowohl transkriptionell aktivierende als auch reprimierende Funktionen beinhalten.

<i>D. melanogaster</i>		<i>C. elegans</i>	<i>Homo sapiens</i>	
LEWIS et al., 2004 (Myb-MuvB)	KORENJAK et al., 2004 (dREAM)	HARRISON et al., 2006 (DRM)	SCHMIT et al., 2007 (LINC) LITOVCHICK et al., 2007 (DREAM)	
			G ₀ -Phase	S-Phase
RBF1/2	RBF1/2	LIN-35	p130	p107
dE2F2	dE2F2	EFL-1	E2F4	
dDP	dDP	DPL-1	DP	DP
MIP130	MIP130	LIN-9	LIN9	LIN9
MIP40	MIP40	LIN-37	LIN37	LIN37
dLIN52		LIN-52	LIN52	LIN52
MIP120	MIP120	LIN-54	LIN54	LIN54
p55/CAF1	p55/CAF1	LIN-53	RbAp48	RbAp48
dMYB	dMYB			B-MYB
RPD3				
L(3)MBT				

Tabelle 1.1 → Zusammensetzung von pRB/E2F-Komplexen bei verschiedenen Spezies

p107 wurde von SCHMIT et al. (2007) als Bestandteil des humanen LINC in der S-Phase beschrieben, nicht jedoch von LITOVCHICK et al. (2007) als Bestandteil von DREAM identifiziert (modifiziert nach SCHMIT et al., 2007 und VAN DEN HEUVEL & DYSON, 2008).

Eine andere Studie unserer Arbeitsgruppe zur Funktion des humanen LINC fokussierte sich auf dessen Beteiligung bei der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden und bei der Apoptose-Induktion. MANNEFELD et al. (2009) zeigten, dass der LINC-Kernkomplex nach Induktion von DNA-Schäden durch das Chemotherapeutikum Doxorubicin in MCF-7-Zellen von B-MYB dissoziiert und stattdessen p130 bindet. Während des Wechsels der LINC-Assoziation von B-MYB zu p130 und E2F4 wurde bei Immunpräzipitations-Experimenten keine LINC-Zusammensetzung beobachtet, die sowohl p130 als auch B-MYB enthält. Es wurde weiterhin gezeigt, dass es nach Doxorubicin-Behandlung zu einer p21-abhängigen Dephosphorylierung von p130 kommt, was dessen Bindung an den LINC-Kernkomplex ermöglicht. Auch bei Induktion von p53 durch Nutlin kam es zu einer Bindung von p130 und E2F4 an LINC, welche in p53-defizienten Zellen ausblieb. In Abwesenheit von p53 assoziiert der LINC-Kernkomplex weiterhin mit B-MYB und bindet an die Promotoren von G₂/M-Genen. Dort bewirkt er eine verstärkte Expression dieser Gene, was zu einem vorzeitigen Überwinden des G₂-Arrests und verfrühten Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus führt und somit zur genomischen Instabilität dieser Zellen beitragen kann. Diese Ergebnisse weisen auf eine bedeutende Rolle des LINC im p53-Signalweg bei der Reaktion auf DNA-Schäden hin und stellen einen mechanistischen Erklärungsansatz für den geschwächten G₂-Kontrollpunkt in p53-defizienten Zellen dar (MANNEFELD et al., 2009).

Um die klinische Bedeutung dieses Mechanismus zu untersuchen, wurden von MANNEFELD et al. Korrelationsanalysen zwischen dem p53-Status und der B-MYB-Expression anhand von *Microarray*-Daten aus Mammakarzinom-Präparaten durchgeführt. Bereits zuvor war bekannt, dass B-MYB in Mammakarzinomen häufig verstärkt exprimiert wird und dass hohe Expressionslevel von B-MYB mit einer erhöhten Rezidivgefahr assoziiert sind (SORLIE et al., 2001; BERTUCCI et al., 2002; SOTIRIOU et al., 2003; AMATSCHEK et al., 2004). MANNEFELD et al. zeigten, dass die Mutation von p53 mit signifikant höherer B-MYB-Expression einhergeht und dass der B-MYB-Spiegel wiederum mit der Cdc2- und Zyklin B1-Expression sowie mit dem histologischen Grading der Tumoren korreliert (MANNEFELD et al., 2009).

1.4 LIN9 als Bestandteil des DREAM-Kernkomplexes

1.4.1 LIN9

LIN9 ist das bislang am besten charakterisierte Protein des humanen LINC-Kernkomplexes. Es wurde im Jahre 2004 durch GAGRICA et al. als nukleär lokalisiertes und chromatinassoziiertes Protein beschrieben, das ein Molekulargewicht von 62 kDa aufweist und zwei konservierte Sequenzabschnitte (als Box 1 und 2 bzw. Box A und B bezeichnet) besitzt. Es wurde durch Co-Immünpräzipitation gezeigt, dass LIN9 physisch mit pRB interagiert, wobei der Amino-terminale Abschnitt von LIN9 mit der enthaltenen Box 1 / Box A für diese Interaktion essentiell ist und an mindestens zwei Stellen an die *Pocket*-Domäne von pRB bindet. Durch GAGRICA et al. wurde beobachtet, dass LIN9 die pRB-vermittelte Induktion eines Seneszenz-ähnlichen Zustandes („*flat cells*“) in Saos-2-Zellen verstärken kann, jedoch nicht in den pRB-induzierten Zellzyklusarrest involviert ist. Es wurde des Weiteren gezeigt, dass LIN9 mit dem pRB-Protein bei der Aktivierung von Differenzierungs-assoziierten Genen und bei der Antagonisierung der durch Überexpression von Onkogenen wie RasV12 verursachten onkogenen Transformation in NIH-3T3-Zellen kooperiert (GAGRICA et al., 2004).

OSTERLOH et al. (2007) beschrieben eine zusätzliche zentrale Funktion des humanen LIN9 bei der Aktivierung von G₂/M-Phase-spezifischen Genen und damit eine essentielle Funktion von LIN9 für die Zellproliferation. Mittels *Microarray*-Analysen wurden 36 Gene identifiziert, die nach Lin9-Depletion signifikant herabreguliert waren.

Hierunter befanden sich auch Zyklin A2 und B1. Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass LIN9 mit dem C-terminalen Abschnitt von B-MYB interagiert und die gemeinsame Depletion durch RNA-Interferenz die Herabregulation der Zyklin A2- und Zyklin B1-Expression, welche sowohl durch isolierte LIN9- oder B-MYB-Depletion verursacht wird, verstärkt. Eine signifikante Veränderung der B-MYB-Expression nach Lin9-Depletion konnte nicht gezeigt werden (OSTERLOH et al., 2007). In einer anderen Studie wurde dargelegt, dass LIN9 die Expression von B-MYB in MEFs posttranskriptionell reguliert und für die Stabilisierung von B-MYB verantwortlich ist, wobei der genaue Mechanismus nicht abschließend geklärt werden konnte (PILKINTON et al., 2007).

Um die Funktion von LIN9 bei der Entwicklung von Vertebraten zu charakterisieren, führten KLEINSCHMIDT et al. (2009) Untersuchungen an Zebrafisch-Embryonen durch. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass LIN9 ebenso wie B-MYB und LIN54 während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert wird. Die Morpholino-basierte Depletion von Lin9 führte zu ausgeprägten Aberrationen. So zeigten diese Embryonen einen kleinen Kopf, kleine Augen, kardiale Ödeme und einen gekrümmten Rumpf. Auch zeigte sich bei Zellzyklusprofilen dieser Embryonen eine Akkumulation von Zellen in der G₂M-Phase sowie eine deutliche Zunahme von Zellen mit einem DNA-Gehalt < 2n (SubG₁), als Hinweis auf einen mit dem Verlust von Lin9 assoziierten embryonalen Zelltod. Untermauert wurden diese Erkenntnisse durch einen vermehrten Nachweis apoptotischer Zellen im Gehirn dieser Embryonen. Durch *Microarray*-Analysen konnte dargelegt werden, dass nach Lin9-Depletion in Zebrafischembryonen über 100 Gene signifikant herabreguliert sind. Während Gene, die für den G₁/S-Übergang benötigt werden, kaum betroffen waren, fand sich eine beträchtliche Anzahl herabregulierter Gene, die eine bekannte Funktion bei der Regulation des Eintritts in die Mitose, beim Spindelaufbau, der Zentrosomen-Formation, am Metaphase-Anaphase-Übergang oder bei der Zytokinese besitzen. In dieser Studie wurde somit erstmals in einem *in vivo*-Modell die Bedeutung von LIN9 für Entwicklungsvorgänge und bei der Mitose-Regulation dokumentiert (KLEINSCHMIDT et al., 2009).

Parallel zu dieser Studie untersuchten REICHERT et al. (2010) die Expression von Lin9 während der murinen Embryonalentwicklung und in adulten Mäusen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Lin9 ebenso wie andere Homologe zu den Untereinheiten des humanen LINC in den Organen adulter Mäuse ubiquitär exprimiert wird. Die höchste mRNA-Konzentration wurde im Thymus-, Milz- und Hodengewebe beobachtet. Während der Embryonalentwicklung wurde Lin9-mRNA in den Epithelzellen des

embryonalen Ekto- und Mesoderms und in geringeren Mengen auch im viszeralem Entoderm und den umgebenden extraembryonalen Geweben detektiert. Ab dem 10. Entwicklungstag konnte Lin9-mRNA im gesamten Embryo nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung zeigte sich, dass die Lin9-Expression mit der Proliferation und Restrukturierungs-Aktivität der verschiedenen Organsysteme korreliert (REICHERT et al., 2010).

1.4.2 Mausmodelle zur Untersuchung der LIN9-Funktion

Um ein genaueres Bild über die physiologische Funktion von LIN9 und dessen Bedeutung bei der Embryonalentwicklung höherer Vertebraten zu gewinnen, wurden verschiedene Lin9-defiziente Mausmodelle generiert. Zunächst wurde durch SANDOVAL et al. (2006) ein Mausmodell mit einer Deletion von 84 Aminosäuren am N-terminalen Abschnitt des LIN9-Proteins etabliert. Mit Ausnahme einer geringen Zunahme der Körpergröße zeigten diese Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp. Es wird angenommen, dass die verhältnismäßig kleine Deletion keinen vollständigen Funktionsverlust von LIN9 induziert hat. Dennoch konnte diese Studie zeigen, dass die $\Delta 84$ -Mutation von LIN9 den durch Depletion von CDK4 verursachten Wachstums- und Proliferations-Defekt sowie die mit dem Verlust von CDK4 assoziierte Infertilität aufheben oder zumindest abschwächen kann (SANDOVAL et al., 2006).

In unserer Arbeitsgruppe wurde durch REICHERT et al. ein Lin9 *gene trap* (GT)-Mausmodell etabliert, bei welchem die evolutionär konservierte B-Box unvollständig ausgebildet wird. Das Protein-Konstrukt konnte, allerdings äußerst schwach exprimiert, in Lin9-heterozygoten Mäusen (GT/+) nachgewiesen werden. Diese Tiere entwickelten sich regelhaft, waren gesundheitlich unauffällig und zeigten nach 18 Monaten keine erhöhte Tumorzinzidenz im Vergleich zu wildtypischen Mäusen. Die Fertilität von GT/+ Mäusen war ebenfalls unbeeinträchtigt. Bei Kreuzung zweier Lin9-heterozygoter Mäuse wurden jedoch keine homozygot Lin9-defizienten Mäuse geboren. Während deren Anteil nach 3,5 Entwicklungstagen (im Blastozystenstadium) noch bei genau 25% lag und damit den zu erwartenden Wert erreichte, waren bereits nach 7,5 Entwicklungstagen keine homozygot Lin9-defizienten Tiere mehr nachweisbar. Histologische Schnitte der Embryonen zeigten, dass die homozygote Lin9-Depletion zum Verlust der inneren Zellmasse und damit zum Fehlen der drei Keimblätter sowie der Allantois, des Chorions und des Amnions führt. Auch bei *in vitro*-Untersuchungen an Blastozysten wurde beobachtet, dass LIN9 für die korrekte Ausbildung und das

Überleben der inneren Zellmasse benötigt wird. Zusammen genommen zeigen diese Ergebnisse, dass Lin9 für die murine Embryonalentwicklung essentiell ist und bei homozygoter Lin9-Depletion eine embryonale Letalität kurz nach der Implantationsphase resultiert (REICHERT et al., 2010).

Da mit diesem Modell folglich keine Beobachtungen zu den pathophysiologischen Konsequenzen des homozygoten Lin9-Verlustes in adulten Tieren erhoben werden konnten, wurde durch REICHERT et al. in einem weiteren Ansatz eine konditionelle *Knockout*-Strategie verfolgt. Dieses auf der cre-loxP-Technologie basierende Mausmodell ermöglicht es, das Lin9-Gen zu einem späteren Zeitpunkt zielgerichtet *in vivo* und *in vitro* zu depletieren. Hierzu wurde unter Verwendung der in Abbildung 1.1A-D skizzierten Strategie eine Mauslinie etabliert, bei welcher Exon 7 des Lin9-Gens von loxP-Stellen flankiert ist (fl-Allel). Durch Kreuzung mit Mäusen, die eine cre-Rekombinase tragen, wird die Deletion der zwischen den loxP-Stellen gelegenen Genomabschnitten induziert (Abb. 1.1E).

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mausmodell konnte die cre-Rekombinase aufgrund einer Kopplung an die Ligandenbindungsdomäne eines mutierten Östrogenrezeptors durch (Hydroxy-)Tamoxifen induziert werden. Aus der Kreuzung mit Mäusen, die dieses als creER^{T2} bezeichnete Rekombinase-Konstrukt tragen, mit Lin9 fl/fl-Mäusen können ab der F₂-Generation Lin9 fl/fl creER^{T2}-Mäuse generiert werden. Bei diesen Tieren und den aus ihnen gewonnenen Zellen transloziert das zunächst hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierte creER^{T2}-Konstrukt durch Zugabe von Tamoxifen (*in vivo*) bzw. 4-Hydroxytamoxifen (*in vitro*) in den Zellkern, wo die cre-Rekombinase die Rekombination der beiden loxP-Stellen katalysiert und hierdurch Exon 7 des Lin9-Gens exzidiert (UTOMO et al., 1999; REICHERT et al., 2010). Durch diese Deletion kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters mit einem konsekutiven Terminations-Codon in Exon 8, was zu einem C-terminal erheblich verkürzten LIN9-Protein führt. Die Tatsache, dass die homozygote Deletion von Lin9 auch bei diesem Modell mit einer frühen embryonalen Letalität einhergeht, unterstreicht den mit der Deletion assoziierten Funktionsverlust des LIN9-Proteins. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass sich Tiere, welche das *gefloxte* Allel tragen, normal entwickeln, sodass eine Funktionsbeeinträchtigung von LIN9 durch die im Lin9-Gen vorhandenen loxP-Stellen nicht anzunehmen ist.

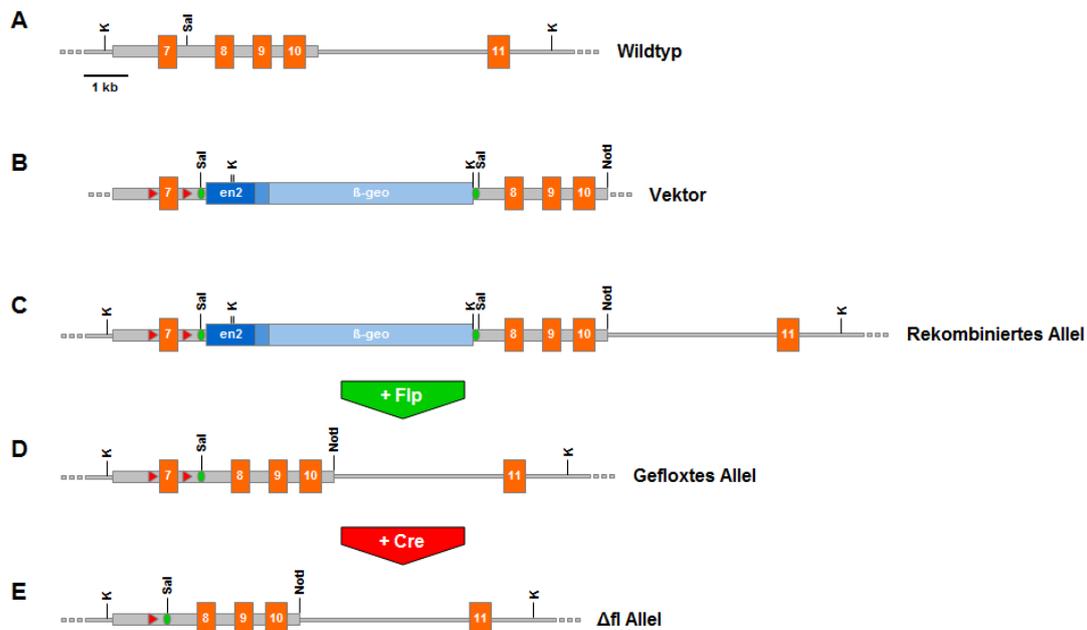


Abbildung 1.1 → Konditionelles Lin9-Knockout-Mausmodell (cre-loxP-Technologie)

A) Ausschnitt aus dem wildtypischen Lin9-Allel. Die orange kolorierten Boxen zeigen die einzelnen Exons, die grauen Abschnitte dazwischen kennzeichnen intronische Sequenzen. B) Dargestellt ist der Vektor, der die modifizierte Sequenz des entsprechenden Ausschnitts aus dem Lin9-Gen trägt. Enthalten ist die von FRT-Stellen (gekennzeichnet durch grüne Ovale) umgebene Selektionskassette (FRT IRES β -Geo), die stromaufwärts von dem durch loxP-Stellen (gekennzeichnet durch rote Pfeile) flankierten Exon 7 des Lin9-Gens und stromabwärts von Exon 8 bis 10 des Lin9-Gens mit den dazwischen liegenden intronischen Sequenzen umgeben ist. C) Rekombiniertes Allel mit der nun im Lin9-Gen enthaltenen Selektionskassette und dem loxP-flankierten Exon 7. D) *Gefloxtes* Lin9-Allel nach der Entfernung der Selektionskassette *in vivo* durch Kreuzung mit einer Mauslinie, welche die FLPe-Rekombinase trägt. E) Gezeigt ist das nach Kreuzung mit einer creER^{T2}-haltigen Mauslinie und cre-Induktion mittels (Hydroxy-)Tamoxifen verbleibende Δfl Allel. K = KpnI-Schnittstelle. Abbildung modifiziert nach REICHERT et al., 2010.

Bei der Analyse von MEFs, die aus diesem Modell gewonnen wurden, fand sich ein deutlicher Wachstumsdefekt, während sowohl 4-OHT-behandelte wildtypische MEFs als auch unbehandelte Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs im Vergleich zu unbehandelten wildtypischen MEFs keine signifikante Differenz der Wachstumsgeschwindigkeit zeigten. Eine cre- oder 4-OHT-bedingte Toxizität wurde somit als Ursache für den Wachstumsdefekt ausgeschlossen. Bei durchflusszytometrischen Zellzyklusprofilen (Propidiumjodid-FACS) an asynchron wachsenden Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurde eine deutliche Zunahme von Zellen mit einem SubG₁-DNA-Gehalt sowie von polyploiden Zellen nach 4-OHT-induzierter Lin9-Depletion beobachtet (REICHERT et al., 2010).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mit der Etablierung eines cre-loxP-basierten konditionellen Lin9-Knockout-Mausmodells wurde durch REICHERT et al. (2010) ein wertvoller Modellorganismus generiert, welcher es ermöglicht, ein für die Funktion des humanen LIN-Komplexes (LINC) essentielles Protein *in vitro* und *in vivo* zuverlässig zu einem beliebigen Zeitpunkt zu depletieren und damit neue Erkenntnisse über die Funktion von LIN9 im Zellzyklus, bei der Genregulation und der Tumorigenese zu gewinnen. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen des homozygoten und heterozygoten Lin9-Verlustes in embryonalen Fibroblasten dieser Mäuse (Lin9 fl/fl creER^{T2} MEFs).

1.5.1 Phänotypische Charakterisierung von (homozygot) Lin9-depletierten MEFs

Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit war die phänotypische Charakterisierung homozygot Lin9-depletierter MEFs. Insbesondere sollte geklärt werden, wie die von REICHERT et al. beobachtete Zunahme polyploider Zellen zu Stande kommt und mit welchen Folgen diese für die Zellen einhergeht. Hierzu wurden neben Zellzyklus- und Tubulin-spezifischen Immunfluoreszenz-Färbungen *Biomarker* für Seneszenz und Apoptose analysiert. Mittels fluoreszenz-gestützter *Time lapse*-Mikroskopie wurde die Chromatinverteilung beim Durchlaufen des Zellzyklus und insbesondere in der Mitose und Zytokinese auf Einzelzellebene beobachtet.

1.5.2 Die Bedeutung von Lin9 bei der Genregulation

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die anhand von *Microarray*-Analysen bei Lin9-depletierten MEFs (REICHERT et al., 2010) detektierten Gene mit signifikant differenter Expression durch quantitative *Real Time*-PCR-Analysen verifiziert und deren Expressionskinetik beim Durchlaufen des Zellzyklus untersucht werden. Durch ChIP-Experimente sollten weiterhin die Mechanismen der transkriptionellen Regulation ausgewählter Lin9-Zielgene näher analysiert werden.

1.5.3 Charakterisierung immortalisierter Lin9-defizienter MEFs

Um das Zusammenwirken von onkogenem Stress und den Verlust von LIN9 zu untersuchen, wurden im dritten Teilprojekt dieser Arbeit mit dem SV40 Large T-Antigen

immortalisierte Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs phänotypisch analysiert und die Expression der Lin9-Zielgene in diesen Zellen untersucht. Zur Klärung der Fragestellung, ob der homozygote Verlust von Lin9 zur onkogenen Transformation von MEFs beiträgt, wurden Transformations-Assays mit diesen Zellen im Weichagar durchgeführt.

1.5.4 Charakterisierung Lin9-heterozygoter MEFs

Während der homozygote Verlust von Lin9 mit einer frühen embryonalen Letalität assoziiert ist und bei adulten Mäusen mit gravierenden Organ-Dysfunktionen einhergeht, sind Lin9-heterozygote Mäuse phänotypisch unauffällig. Gegenstand des vierten Abschnitts der Arbeit war die phänotypische Analyse von MEFs nach heterozygoter Lin9-Depletion. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Auswirkungen der heterozygote Verlust von Lin9 auf die Expression der Lin9-Zielgene besitzt und ob die Lin9-Heterozygotizität in Verbindung mit Large T *in vitro* zur onkogenen Transformation von MEFs beiträgt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Puffer

Die Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Roth, Merck und Sigma bezogen. Im Regelfall wurde die Qualitätsstufe „zur Analyse“ verwendet. Sofern nicht anders angegeben, fand ddH₂O als Lösungsmittel für Puffer Verwendung.

2.1.1.1 Allgemeine Puffer

10 x PBS	130 mM NaCl 3 mM KCl 64 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄ pH-Einstellung auf 7,4 mit HCl Autoklavieren
----------	---

10 x TE-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA
----------------	---------------------------------------

2.1.1.2 Puffer und Lösungen für Immunfluoreszenz-Färbungen

Paraformaldehyd-Sucrose-Fixans	3% w/v Paraformaldehyd 2% w/v Sucrose (Saccharose) in 1x PBS Aliquotieren, Lagerung bei – 20 °C
--------------------------------	--

80% Ethanol-Fixierlösung	80% v/v Ethanol 20% v/v ddH ₂ O
--------------------------	---

MeS-Methanol-Fixans	10 mM MeS, pH 6,9 in 90% Methanol 0,1 mM EGTA 0,1 mM MgCl ₂
---------------------	--

Bisbenzimid-Lösung	1 µg/ml Bisbenzimid 33258 (Hoechst 33258) in ddH ₂ O
BSA-Lösung	1% BSA (Fraktion V) in 1x PBS
Magnesiumsulfat-Lösung	5 mM MgSO ₄ in 1x PBS
PBST	0,1% v/v Triton X-100 in 1x PBS

2.1.1.3 Puffer und Lösungen für die Durchflusszytometrie

Annexin-FITC (Becton Dickinson)	5 µl je Ansatz
Bindepuffer für Annexin V-FACS	10 mM HEPES pH 7,4 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂
Inkubationspuffer für PH3-FACS	0,5% w/v BSA in 1x PBS
Natriumcitrat-Lösung für PI-FACS	38 mM Natriumcitrat in ddH ₂ O
Paraformaldehyd-Fixans	2% w/v Paraformaldehyd in 1x PBS
Propidiumjodid (PI)-Lösung	1 mg/ml Propidiumjodid in ddH ₂ O

2.1.1.4 Lösungen für die Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Färbung

Magnesiumchlorid-Lösung	1 mM MgCl ₂ in 1x PBS
Glutaraldehyd-Lösung	5% Glutaraldehyd in 1x PBS
X-Gal-Ausgangslösung	20 mg/ml X-Gal in DMF

X-Gal-Färbelösung	5% v/v X-Gal-Ausgangslösung in ddH ₂ O 0,12 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 0,12 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 1 mM MgCl ₂ pH-Einstellung auf 6,0
-------------------	---

2.1.1.5 Puffer und Lösungen für die Extraktion von gDNA aus Zellkulturen

Zellysepuffer	150 mM NaCl 20 mM Tris, pH 7,5 5 mM EDTA 0,5% SDS 250 mg/ml Proteinase K (frisch zugeben)
---------------	---

Phenol-Chloroform-Lösung	50% v/v Phenol 50% v/v Chloroform
--------------------------	--------------------------------------

0,5 M EDTA	0,5 M EDTA in ddH ₂ O pH-Einstellung auf 8,0 mit NaOH
------------	---

3 M Natriumacetat	3 M Natriumacetat in ddH ₂ O pH-Einstellung auf 5,2 mit Essigsäure
-------------------	--

2.1.1.6 Puffer für die DNA-Minipräparation

Miniprep-Lösung I (S1)	50 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A bei 4 °C lagern
------------------------	--

Miniprep-Lösung II (S2)	200 mM NaOH 1% SDS
-------------------------	-----------------------

Miniprep-Lösung III (S3)	3,1 M Kaliumacetat pH-Einstellung auf 8,0 mit Essigsäure
--------------------------	---

2.1.1.7 Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 250 mM Essigsäure 50 mM EDTA, pH 8,0
Agarose-Lösung	0,8% - 2,0% w/v Agarose in 1 x TAE In der Mikrowelle aufkochen
DNA-Ladepuffer	15% Ficoll 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylencyanol 0,05 M EDTA in 1 x TAE
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H ₂ O

2.1.1.8 Puffer für die Chromatin-Immunpräzipitation

1 M Glycin	1 M Glycin in 1x PBS
Lyse-Puffer	5 mM PIPES, pH 8,0 85 mM KCl 0,5% NP-40
Kernlyse-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,1 10 mM EDTA 1% SDS
IP-Verdünnungspuffer	16,7 mM Tris-HCl, pH 8,2 1,2 mM EDTA 167 mM NaCl 1,1% Triton X-100 0,01% SDS

Elutions-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 1% SDS
LiCl-Waschpuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 0,25 M LiCl 0,5% NP-40 0,5% DOC
<i>Blocking</i> -Puffer	3 ml IP-Verdünnungspuffer + 5% v/v BSA [20 mg/ml] + 1% v/v ssDNA [10 mg/ml]
Protein A-/Protein G-Sepharose (Pierce)	ImmunoPure Immobilisiertes Protein A ImmunoPure Immobilisiertes Protein G
PMSF-Lösung	10 mg/ml PMSF in Isopropanol
Protease-Inhibitor-Mix	0,1 mg/ml Aprotinin 10 mg/ml AEBSF 0,5 mg/ml Bestatin 0,5 mg/ml E64 1 mg/ml Leupeptin 0,1 mg/ml Pepstatin
2.1.1.9 Enzym-Puffer	
Puffer für Proteinase K	50 mM Tris-HCl 1 mM CaCl ₂ pH 8,0
Puffer für RNase A	10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,4

2.1.2 Enzyme, Kits, PCR, DNA-Marker

<u>Reagenz / Kit</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Konzentration</u>
Absolute QPCR SYBR Green Mix	Thermo Fisher	
DNase I, RNase-frei	Roche	
dNTPs	Promega	2 mM dATP 2 mM dCTP 2 mM dGTP 2 mM dTTP
HisTaq 5 Polymerase	AG Gessler	
JETSTAR Plasmid Midi-/Maxi-prep Kit	Genomed	
MassRuler DNA Ladder, Mix	Fermentas	
M-MLV-RT Transkriptase	Invitrogen	100 U/μl
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes	2 U/μl
Proteinase K	AppliChem	10 mg/ml
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	
Random-Primer	Roche	
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs (NEB) Fermentas	
RiboLock (RNase-Inhibitor)	Fermentas	40 U/μl
RNase A	Sigma	10 mg/ml
RQ-DNase I-Kit	Qiagen	
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen	
TRIzol™-Reagenz	Invitrogen	

2.1.3 Plasmide

<u>Interne Nr.</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Verwendung</u>
#174	pEGFP-N1	GFP-Überexpression in MEFs
#212	pcDNA3-HA	Kontrollplasmid
#372	pcDNA3-HA + Lin9	Lin9-Überexpression in MEFs
#746	pBabe-H2B-GFP	Retrovirale Infektion mit Histon 2B-GFP
#923	pBabe-neo-LT	Retrovirale Infektion mit Large T
#1086	pBabe-neo-LT Δ89-97	Retrovirale Infektion mit Δ89-97 Large T

2.1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen metabion und MWG-Biotech bezogen.

2.1.4.1 Oligonukleotide für die konventionelle PCR

<u>Interne Nr.</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5' – 3')</u>
SG722	<i>Δfl rev</i>	GCAAAAGCTGCAAGTCCTCT
SG893	<i>Δfl fw</i>	CCTGGCTGCCTAGCATTAC

2.1.4.2 Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR

<u>Interne Nr.</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5' – 3')</u>
SG783	<i>Hprt1 fw</i>	TCCTCCTCAGACCGCTTTT
SG784	<i>Hprt1 rev</i>	CCTGGTTCATCATCGCTAATC
SG785	<i>LIN 9 fw</i>	TTGGGACTCACACCATTCT
SG786	<i>LIN 9 rev</i>	GAAGGCCGCTGTTTTTGTC
SG820	<i>B-Myb fw</i>	TTAAATGGACCCACGAGGAG
SG821	<i>B-Myb rev</i>	TTCCAGTCTTGCTGTCCAAA
SG1009	<i>Aurka fw</i>	GGGACATGGCTGTTGAGG
SG1010	<i>Aurka rev</i>	GTTTTCTTTACATCTGTCCATGTCA
SG1015	<i>p21 fw</i>	AACATCTCAGGGCCGAAA
SG1016	<i>p21 rev</i>	TGCGCTTGGAGTGATAGAAA
SG1026	<i>Aspm fw</i>	GATGGAGGCCGAGAGAGG
SG1027	<i>Aspm rev</i>	CAGCTTCCACTTTGGATAAGTATTTTC
SG1028	<i>Plk1 fw</i>	TTGTAGTTTTGGAGCTCTGTCCG
SG1029	<i>Plk1 rev</i>	AGTGCCTTCCTCCTCTTGTC
SG1030	<i>Nusap1 fw</i>	TCTAAACTTGGGAACAATAAAAGGA
SG1031	<i>Nusap1 rev</i>	TGGATTCCATTTTCTTAAAACGA
SG1038	<i>Cenpf fw</i>	AGCAAGTCAAGCATTGTCAC
SG1039	<i>Cenpf rev</i>	GCTGCTTCACTGATGTGACC
SG1056	<i>C9orf140 fw</i>	GCCTCGAGATGTTTCGCACCGGCCGATGAGC
SG1057	<i>C9orf140 rev</i>	GCCTCGAGCAACTAGATGAAAGTGGAGTCCAGAGG
SG1058	<i>Gas2L3 fw</i>	GCTGTCGGCATGAAGAGC
SG1059	<i>Gas2L3 rev</i>	AATCGATGAGAACAACAACAAGGA
SG1118	<i>Fancg fw</i>	CCTGCTAGCAAGTCGATGC
SG1119	<i>Fancg rev</i>	AGGTCCAGGTAATGCTCTGC

Interne Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
SG1120	Rad18 <i>fw</i>	AAGGAAATTGAGGAAGTTCACAGT
SG1121	Rad18 <i>rev</i>	CATCGCTGCAGCTTGTGA
SG1122	Rad51 <i>fw</i>	CGAGGGTTCAACACAGACC
SG1123	Rad51 <i>rev</i>	AGGGCAGTAGCACTGTCTACAA
SG1124	Fancb <i>fw</i>	GAAAATTATTATTTGGTGCTTCCAG
SG1125	Fancb <i>rev</i>	GAGATATGCTGCTGGATTTTGT
SG1178	Mcm8 <i>fw</i>	TGGAAAATACACCCTTCCTACAA
SG1179	Mcm8 <i>rev</i>	GCAGTGGAGCAAATGACCTC
SG1186	Fanci <i>fw</i>	CTTTCTAAAATGACAAACCAGCAC
SG1187	Fanci <i>rev</i>	TGTCTGATCATCTCGTGGATTT
SG1190	Eme1 <i>fw</i>	ATACCTCGAAGCATCACTTGG
SG1191	Eme1 <i>rev</i>	CCATCCAGTCATCTCCATCC
SG1194	Ercc6l <i>fw</i>	AAGATATGGAGGAAAGGCTTGA
SG1195	Ercc6l <i>rev</i>	TCTGAAAGCCCTGGCTCA
SG1198	Cenpe <i>fw</i>	TCTTTACCGTCTGAGGTGGAA
SG1199	Cenpe <i>rev</i>	GGAGCTCTTCAGATTTCTCATACA
SG1200	Kif20a <i>fw</i>	AAGGACCTGTTGTCAGACTGC
SG1201	Kif20a <i>rev</i>	TGAGGTGTCCTCCAGTAGAGC
SG1202	Hmmr <i>fw</i>	TCACGGAGTCTAAGGGAAAAAT
SG1203	Hmmr <i>rev</i>	TTCATCGATCTTTTCTTTCTCTATTG

2.1.4.3 Oligonukleotide für die Chromatin-Immunpräzipitation

Interne Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
SG976	Gapdh	ATTTCCCCTGTTCTCCCATT
SG977	Gapdh	GACATCCAGGACCCAGAGAC
SG1044	Nusap	GTTTTGAGCCGCTCTGTTTT
SG1045	Nusap	CATCGCGTTCTGCAATCTC
SG1050	Aspm	GCTGTAGCGAGGAGGTTCC
SG1051	Aspm	TTTTGCTCGGTTCAAATATCG
SG1126	Fancg	AAACCTGGACTGCCGTTG
SG1127	Fancg	AGTGGGTCTTGGCACCAGT
SG1128	Rad51	CGAAATCACTCGGCTTCAA
SG1129	Rad51	GACCCGCCTCATACCTACTTC

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper CHIP

<u>Interne Nr.</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Menge / IP</u>
#104	anti-IgG	Sigma	3 µg
#113	anti-H4Ac	Millipore	5 µg
#136	anti-Lin9	Eigene Produktion	4 µg
#164	anti-H3K4-me3	Abcam	4 µg

2.1.5.2 Primärantikörper Immunfluoreszenz und FACS

<u>Interne Nr.</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
#57	anti-Phospho-H3	Millipore	1:100
#103	anti-BrdU	Pharmingen	1:10
#112	anti-γ-Tubulin (<i>rabbit</i>), T3599	Sigma	1:500
#158	anti-α-Tubulin (<i>mouse</i>), T6074	Sigma	1:500
#206	anti-Phospho-H3 Alexa Fluor 488	Cell Signaling	1:100

2.1.5.3 Sekundärantikörper Immunfluoreszenz

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Alexa Fluor 594 <i>goat-anti-rabbit</i> , A11037	Invitrogen	1:500 - 1:700
Alexa Fluor 488 <i>goat-anti-mouse</i> , A11029	Invitrogen	1:500 - 1:700

2.1.6 Zellkultur

2.1.6.1 Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur

<u>Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Konzentration</u>
BrdU	Sigma	32,5 mM in PBS
DMEM (4,5 g Glucose/L-Glutamin)	Invitrogen	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco / Invitrogen	
4-Hydroxytamoxifen	Sigma	10 mg/ml in PBS
Metafectene Pro Transfection Reagent	Biontex	
Penicillin/Streptomycin	Cambrex	10 U/µl
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma	4 mg/ml in H ₂ O
Trypsin (EDTA)	Gibco / Invitrogen	0,25%

2.1.6.2 Antibiotika

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Ausgangskonzentr.</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin	Roth	100 mg/ml in H ₂ O	1:500 in LB-Medium
Neomycin (G418)	Invivogen	200 mg/ml in H ₂ O	1 mg/ml in DMEM

2.1.6.3 Zelllinien

Lin9 fl/fl creER ^{T2} -MEFs	embryonale Maus-Fibroblasten mit induzierbarem Lin9- <i>Knockout</i> (cre-loxP-System)
Large T-Lin9 fl/fl creER ^{T2} -MEFs	Large T-immortalisierte embryonale murine Fibroblasten mit induzierbarem Lin9- <i>Knockout</i>
PlatE	Platinum E-Zellen; auf HEK-923-Zellen basierende Zelllinie zur potenten Verpackung von Retroviren

2.1.6.4 Bakterienstämme

DH5α	Chemisch kompetente <i>E. coli</i> (HANAHAN, 1983)
------	--

2.1.6.5 Kulturmedien für Bakterien

LB-Agar 40 g LB-Agar-Pulver in 1 l H₂O
Autoklavieren

LB-Medium 25 g LB-Medium-Pulver in 1 l H₂O
Autoklavieren

2.1.6.6 Lösungen für die Transfektion mit Ca-Phosphat-Präzipitations-Methode

2 x HBS 280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄
50 mM HEPES
pH-Einstellung auf Zielwert 7,1 mit KOH

Calciumchloridlösung 2,5 M CaCl₂ in ddH₂O

2.1.7 Technisches Equipment

2.1.7.1 Durchflusszytometer

Cytomics FC 500 CXP Beckman Coulter

2.1.7.2 Molekularbiologisches Equipment

Feinwaage KERN ABJ	Kern & Sohn GmbH
Gelelektrophorese-Kammern	peqlab Biotechnologie
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies Inc.
<i>Real Time</i> -PCR-Gerät Mx3000P	Stratagene
<i>Sonifier</i> W250D	Branson
T1 Thermocycler	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Ultraspec 2100 pro Photometer	Amersham Biosciences
UV-Transilluminator Gene Flash	Syngene
Vortex Gene 2	Scientific Industries

2.1.7.3 Zellkultur

Inkubator Galaxy S	Nunc
Inkubator HERAcell	Thermo Electron Corporation
Sterilwerkbank LaminAir HB2448S	Heraeus
Sterilwerkbank Clean Air CA/RE 4	Thermo Electron Corporation
Inkubations-Wasserbad	GFL

2.1.7.4 Mikroskopisches Equipment und Kameras

Axio Cam Color HRc	Zeiss
Axiovert 100	Zeiss
DFC350 FX	Leica
Inverses Fluoreszenzmikroskop DMI 6000B	Leica
Mikroskop CK30	Olympus
SMZ1500 (HR Plan APO 1x)	Nikon

2.1.8 Software

Adobe Acrobat Pro
Adobe Illustrator CS4
ImageJ 1.44p
Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) 1.5.1
Microsoft Office 2003
Photoshop CS4

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Gewinnung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Murine embryonale Fibroblasten wurden 13,5 Tage nach gezielter Verpaarung der entsprechenden Mäuse mit anschließender Plaque-Kontrolle gewonnen. Hierzu wurden die schwangeren Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, mit 70% Ethanol desinfiziert, der Uterus entnommen und in eine Petrischale mit PBS verbracht. Die einzelnen Embryonen wurden unter der Sterilwerkbank aus dem Uterus ausgelöst und kontinuierlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Dottersack, Plazenta, Kopf und Leber entfernt und der verbleibende Körper der Embryonen mit Rasierklingen in einer 10 cm Petrischale, welche 2 ml 0,25% Trypsin enthielt, zerkleinert. Nach zehnminütiger Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ wurden 2 ml frisches Trypsin (0,25%) zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach einem weiteren zehnminütigen Inkubationsschritt bei 37 °C wurden 6 ml Zellkulturmedium (DMEM / 10% FCS) zugegeben, die Zellen erneut resuspendiert und in ein 15 ml-Falcon-Gefäß transferiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in einer 10 cm Gewebekulturschale ausplattiert (Passage 0). Am Folgetag wurden die Zellen nach Entfernung des Zellkulturmediums und einem PBS-Waschschritt trypsiniert und im Verhältnis 1:4 passagiert (Passage 1). Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 bis 100% wurden die Zellen erneut trypsiniert und in DMEM / 10% FCS / 10% DMSO bei -80 °C eingefroren (Passage 2).

2.2.1.2 Kultivierung und Passagieren von MEFs

MEFs wurden in Adhäsionskultur auf 10 cm Gewebekulturschalen bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Vollmedium wurde DMEM (4,5 g Glucose / L-Glutamin) mit 10% FCS und 1% Penicillin / Streptomycin verwendet. Zur Verhinderung von Kontaktinhibition und zur Optimierung der Nährstoffversorgung wurden die MEFs bei Erreichen einer Konfluenz von über 90% passagiert. Nach dem Absaugen des Kulturmediums und einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen hierzu mit 1 ml 0,25% Trypsin bedeckt und anschließend für einige Minuten bei 37 °C inkubiert. Die trypsinierten Zellen wurden in frischem Vollmedium aufgenommen, durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in entsprechender Verdünnung in neuen 10

cm-Gewebekulturschalen ausplattiert. In der Regel wurden MEFs im Abstand von 2 Tagen im Verhältnis von 1:4 passagiert. Der Verdünnungsgrad wurde gegebenenfalls der Konfluenz und dem Ablauf des entsprechenden Experimentes angepasst.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst wie unter 2.2.1.2 beschrieben trypsinisiert und in 5 bis 10 ml frischem Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm in einem 15 ml-Falcon-Gefäß zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (DMEM / 10% FCS / 10% DMSO) resuspendiert und in Einfrier-Röhrchen (*Cryotubes*) transferiert. Die Zellen wurden bei -80 °C für kurze Zeit oder in flüssigem Stickstoff zur Langzeit-Lagerung eingefroren.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden nach der Entnahme aus flüssigem Stickstoff bzw. aus dem -80 °C-Gefrierschrank umgehend bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 10 ml frischem Vollmedium verdünnt. Zur Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer 10 cm Gewebekulturschale ausplattiert und bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe einer modifizierten NEUBAUER-Zählkammer. Hierzu wurden mehrere Großquadrate gezählt und die Zellzahl pro ml der Suspension mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl / ml} = (\text{Anzahl der Zellen} / \text{Anzahl der gezählten Großquadrate}) \times 10^4$$

2.2.1.6 Erstellung einer Wachstumskurve

Zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit von Zellen in einer Kultur wurden jeweils 1×10^4 und $0,5 \times 10^4$ Zellen in Vollmedium in Triplikaten auf 24-Well-Platten ausplattiert. Im Abstand von 24 Stunden wurde jeweils eine der Platten fixiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 3,7% Formaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend luftgetrocknet. Nach der Sammlung der fixierten Platten über mehrere Tage hinweg wurden die Zellen mit Kristallviolett (gelöst in 20% Ethanol) für 30 min bei RT angefärbt. Zur Entfernung der überschüssigen

Kristallviolett-Lösung wurden die Platten unter fließendem Wasser gespült. Der Farbstoff wurde anschließend mit 0,5 ml (pro *Well*) 10% Essigsäure aus den gefärbten Zellen extrahiert. Jeweils 100 µl des Extraktes wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und die Absorption in einem *Elisa-Reader* bei 590 nm photometrisch ermittelt. Die Mittelwerte der Absorption für die jeweiligen Triplikate wurden in einem Diagramm gegen die Zeit (in Tagen) aufgetragen. Des Weiteren wurde die Standardabweichung für jedes Triplikat ermittelt.

2.2.1.7 Zellzyklus-Synchronisation durch Serum-Entzug

Für Untersuchungen zur Zellzyklus-Kinetik ergab sich die Notwendigkeit, die Zellen in einer Kultur bezüglich des Durchlaufens des Zellzyklus zu synchronisieren. Hierzu wurden die MEFs wie unter 2.2.1.2 beschrieben auf 10 cm Gewebekulturschalen passagiert und am Folgetag nach 2 PBS-Waschschritten mit DMEM / 0,1% FCS-Mangelmedium versehen. Durch die erhebliche Reduktion der Konzentration an fötalem Kälber-Serum und der darin enthaltenen Mitogene und Wachstumsfaktoren wurden die Zellen in der G₀-Phase arretiert. Nach 72 h wurden die Zellen durch Zugabe von DMEM / 20% FCS in den Zellzyklus entlassen, wonach die weitere Proliferation weitgehend synchron erfolgte. Die Arretierung in der G₀-Phase und die Synchronität des Durchlaufens der Zellzyklusphasen wurden durch PI-FACS-Analysen verifiziert.

2.2.1.8 Induktion von cre durch Hydroxytamoxifen

Zur Deletion des mit loxP-Stellen flankierten Lin9-Allels wurden MEFs aus Mauslinien verwendet, die zusätzlich ein Expressionskonstrukt für eine cre-Rekombinase tragen, welche mit der mutierten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors fusioniert ist (creER^{T2}). Die Ligandenbindungsdomäne ist dahin gehend modifiziert, dass sie anstatt der körpereigenen Östrogene den selektiven Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen bindet. Das zur Induktion der cre-Rekombinase verwendete 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) ist ein potenter Metabolit von Tamoxifen, der an den modifizierten Östrogenrezeptor mit höherer Affinität bindet als Tamoxifen.

Die Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurden in Passage 3 in einer Zelldichte von 6,5 x 10⁵ Zellen pro 10 cm Gewebekulturschale ausplattiert und in Vollmedium inkubiert. 24 Stunden später wurde 4-OHT in einer Konzentration von 1 µM zum Kulturmedium zugegeben. Nach 48-stündiger Inkubation wurde das 4-OHT durch zwei PBS-Waschschritte und Zugabe von frischem Vollmedium entfernt.

2.2.1.9 Markierung von S-Phase-Zellen mit Bromuridin (BrdU)

Um die Zellfraktion einer Population, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befindet, mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen oder durchflusszytometrischen Verfahren quantifizieren zu können, wurden die MEFs mit Bromuridin (BrdU) markiert. Hierzu wurde eine Stunde vor der Fixierung BrdU in einer Konzentration von 10 µM zum Kulturmedium zugegeben und die Zellen anschließend bei 37 °C inkubiert. Während dieser einstündigen Inkubationsphase wurde das BrdU bei S-Phase-Zellen in die sich replizierende DNA eingebaut und konnte später durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

2.2.1.10 Produktion rekombinanter Retroviren in PlatE-Zellen

Rekombinante Retroviren können zum Transfer von Fremdgenen in das Genom von Zellen verwendet werden. Zur Produktion von rekombinanten Retroviren wurden PlatE-Zellen verwendet, welche nach Transfektion mit einem entsprechenden Plasmid die eingeschleuste DNA in Viruspartikel verpacken und die ecotropen Viren in das Zellkulturmedium freisetzen (MORITA et al., 2000).

Die PlatE-Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^6 pro 10 cm-Gewebe-
kulturschale ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit der Calcium-Phosphat-
Präzipitations-Methode transfiziert. Hierzu wurden zunächst 20 – 30 µg des
gewünschten Plasmid-DNA-Vektors mit 50 µl 2,5 M Calciumchlorid (CaCl₂) und ddH₂O
ad 500 µl Gesamtvolumen vermischt. Anschließend wurde die DNA-Calciumchlorid-
Mischung tropfenweise zu 500 µl 2x HBS hinzu gegeben, während gleichzeitig
kontinuierlich Luft mit Hilfe einer Pasteur-Pipette in das vorgelegte 2x HBS eingeblasen
wurde. Hierdurch kam es zu einer optimierten Vermischung der beiden Lösungen und
zum Ausfallen von DNA-Calcium-Phosphat-Kristallen. Die Lösung wurde tropfenweise
in das Kulturmedium der PlatE-Zellen pipettiert. Während einer 16-stündigen
Inkubation bei 37 °C / 5% CO₂ wurden die Präzipitate von den PlatE-Zellen
endozytotisch aufgenommen.

Zur Entfernung der Präzipitate wurden die PlatE-Zellen am nächsten Vormittag zwei
Mal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 10 ml frischem Vollmedium weiter
kultiviert. Einige Stunden später wurde das Medium am Nachmittag erneut gewechselt
und durch 6 ml frisches Vollmedium ersetzt. Am Folgetag wurde nach
fluoreszenzmikroskopischer Überprüfung der Transfektionseffizienz anhand einer
separaten Kontrollschale mit einem GFP-Konstrukt das Medium mit den enthaltenen
Viren aus den PlatE-Schalen abgenommen und mittels Passage durch einen 0,45 µm-

Filter von eventuellen Zellresten befreit. Der gewonnene Virus-Überstand wurde entweder direkt zur Infektion von MEFs verwendet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

2.2.1.11 Infektion von MEFs mit Retroviren

Zur retroviralen Infektion wurden die MEFs am Vortag der geplanten Infektion in einer Zelldichte von $6,5 \times 10^5$ pro 10 cm Gewebekulturschale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den wie in Kapitel 2.2.1.10 beschriebenen gewonnenen rekombinanten Retroviren, welche das gewünschte Plasmid tragen, infiziert. Bei Verwendung von gefrorenem Virus-haltigem Medium wurde dieses hierzu bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Für jede zu infizierende Platte wurden 3 ml Virus-haltiges Medium mit 3 ml frischem Vollmedium vermischt und 10 µg/ml Polybren zugegeben. Diese Mixtur wurde anschließend nach Entfernung des vorherigen Kulturmediums zu jeweils einer 10 cm-Schale der kultivierten MEFs hinzu gegeben. Am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel (10 ml frisches Vollmedium). 48 Stunden nach der Infektion wurde die Selektion der infizierten MEFs durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums eingeleitet. Während der Selektion wurde das Medium im Abstand von 2 bis 3 Tagen gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von > 80-90% wurden die MEFs passagiert.

2.2.1.12 Immortalisierung von MEFs

Für die Immortalisierung von MEFs wurde das Large T-Onkogen des Simian Virus 40 verwendet. Large T bindet an multiple zelluläre Zellzyklus- und Transkriptions-Regulatoren und inaktiviert insbesondere das Retinoblastom-Protein (pRB) sowie das p53-Tumorsuppressor-Protein. Die MEFs wurden wie in Kapitel 2.2.1.11 beschrieben mit einem rekombinanten Retrovirus infiziert, welches das Gen für Large T (interne Nummer #923) oder eine $\Delta 89-97$ -Variante (interne Nummer #1086) von Large T beinhaltet. 48 Stunden später wurde eine zehntägige Selektionierung mit 400 µg/ml Neomycin begonnen.

2.2.1.13 Nachweis transformierter Zellen im Weichagar (Soft-Agar-Assay)

Ein *in vitro*-Charakteristikum von maligne transformierten Zellen stellt die Koloniebildung im Weichagar dar. Grundlage hierfür ist die Fähigkeit transformierter Zellen zum Wachstum in einer Gelmatrix ohne direkten Kontakt zum Boden des Kulturgefäßes (*anchorage-independent growth*), während nicht transformierte Zellen in

der Regel diese Fähigkeit nicht besitzen und dem zur Folge keine oder nur kleinvolumige Kolonien im Weichagar bilden (HAMBURGER & SALMON, 1977).

Vorbereitung

Die für die Basisschicht und die Gelmatrix benötigten *Low Melt*-Agarose-Lösungen wurden in den Konzentrationen 0,7% und 1,4% w/v angesetzt, in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend autoklaviert. Kurz vor der Verwendung wurde die Agarose dann erneut in der Mikrowelle aufgeköcht und bei 55 °C im Wasserbad aufbewahrt um ein vorzeitiges Erstarren zu verhindern. Weiterhin wurde 2 x DMEM frisch angesetzt und sterilfiltriert. Für jeweils 70 ml 2x DMEM wurde die folgende Zusammensetzung verwendet:

10x DMEM	14,0 ml
Natriumbicarbonat (1 M)	2,6 ml
FCS	14,0 ml
Glutamat (20 mM)	7,0 ml
D-Glucose	630 mg
Penicillin / Streptomycin	0,7 ml
ddH ₂ O	31,7 ml

Ausplattieren der Zellen

Zunächst wurden die für den Weichagar-Assay zu verwendenden 6 *Well*-Kulturplatten mit einer Basis-Gelschicht versehen. Hierzu wurden 2x DMEM und 1,4% *Low Melt*-Agarose-Lösung zu gleichen Anteilen vermischt und jeweils 2 ml dieser Mischung luftblasenfrei in jedes *Well* pipettiert. Zur Beschleunigung der Erstarrung der Basisschicht und zur Vermeidung einer späteren Durchmischung bei Zugabe der Gel-Zell-Suspension wurden die Platten bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gekühlt. Im Anschluss daran wurden die zu analysierenden Zellen mit PBS gewaschen, mit Hilfe von Trypsin von der Kulturplatte abgelöst und in 10 ml frischem DMEM aufgenommen. Danach wurde die Zellzahl wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben bestimmt und für jedes Triplikat 3×10^5 Zellen in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min und Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen in 6 ml eines unmittelbar zuvor angesetzten Gemisches aus gleichen Anteilen 2x DMEM und 0,7% w/v *Low Melt*-Agarose-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 2 ml der Weichagar-Zellsuspension in jedes *Well* auf die erstarrte

Basisschicht transferiert. Die Platten wurden für 10 bis 14 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Dokumentation der entstandenen Kolonien erfolgte fotografisch am Stereomikroskop.

2.2.2 Zellfärbungen, Durchflusszytometrie und Mikroskopie

2.2.2.1 Zellzyklusanalyse mit BrdU-/Phospho-H3-Immunfluoreszenzfärbungen

Zellkultur und Fixierung

Jeweils $1,0 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creERT²-MEFs wurden auf abgeflamten Deckgläschen in 6-Well-Schalen ausplattiert und entsprechend für das jeweilige Experiment zur Cre-Induktion mit 4-OHT behandelt und / oder durch Serum-Mangel synchronisiert. Zu jedem Fixierungszeitpunkt wurde jeweils ein Deckgläschen mit 4-OHT-behandelten Zellen und Kontrollzellen entnommen. Zuvor erfolgte eine (mindestens) einstündige Behandlung mit 50 µM Bromuridin (BrdU), welches während der Replikation (S-Phase) in die DNA-Tochterstränge eingebaut wird.

Zur Fixierung wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums und zwei PBS-Waschschritten für 10 min mit PSP (3% Paraformaldehyd / 2% Sucrose in PBS) überschichtet, anschließend erneut mit PBS gewaschen und bis zur Ansammlung der Platten aller Fixierungszeitpunkte bei 4 °C in PBS gelagert.

Immunfluoreszenz-Färbung

Zunächst wurden die Zellen für fünf Minuten mit PBS / 0,2% Triton permeabilisiert. Für diesen sowie alle weiteren Schritte wurde 4 °C kaltes PBS verwendet. Nach einem Waschschritt mit PBST wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von PBS / 5% Ziegen-Serum blockiert. Daraufhin wurden die Zellen drei Mal für jeweils 5 min in einer PBS / 5 mM MgSO₄-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation in der Primärantikörperlösung in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer. Dabei wurde der anti-BrdU-Antikörper im Verhältnis 1:10 und der anti-Phospho-Histon H3-Antikörper im Verhältnis 1:100 in PBS / 5 mM MgSO₄ eingesetzt. Um das bei der Replikation in die DNA eingebaute Bromuridin für den Primärantikörper zugänglich zu machen, wurde der Primärantikörperlösung Desoxyribonuklease (DNase) im einem Verhältnis von 1:1000 beigemischt. Die aus der MgSO₄-Lösung freigesetzten Magnesium-Ionen werden als Kofaktor für die DNase-Reaktion benötigt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zur Entfernung von ungebundenem Primärantikörper dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30

min in der Sekundärantikörperlösung, welche die jeweils im Verhältnis 1:500 in PBST eingesetzten fluoreszenz-gekoppelten Antikörper Alexa Flour 488 *goat-anti-mouse* IgG (Invitrogen A11029) und Alexa Flour 594 *goat-anti-rabbit* IgG (Invitrogen A11037) enthielt, in einer feuchten und lichtgeschützten Kammer inkubiert. Hiernach wurden zur Entfernung von ungebundenem Sekundärantikörper erneut drei PBST-Waschschritte vorgenommen. Die Zellkerne wurden daraufhin durch fünfminütige Inkubation in 1 µg/ml Bisbenzimid-Lösung (Hoechst 33258) gefärbt. Nach drei abschließenden PBS-Waschschritten wurde das Deckgläschen mit Einbettmedium (IMMU-Mount, Shandon) auf einem Objektträger fixiert. Zur Optimierung der Haltbarkeit wurden die Kanten des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch fotografische Dokumentation mehrerer repräsentativer Ausschnitte am inversen Fluoreszenz-Mikroskop mit Hilfe der Leica Application Suite-Software. Die Bestimmung der Anteile Phospho-Histon 3- und Bromuridin-positiver Zellen erfolgte durch manuelle Auszählung und Berechnung des Verhältnisses der Anzahl der mit dem jeweiligen Antikörper positiv dargestellten Zellkerne zu der Gesamtzellkernzahl im ausgewerteten Bildausschnitt, welche durch Auszählung der mit Bisbenzimid gefärbten Kerne ermittelt wurde.

2.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von α - und γ -Tubulin

Zellkultur und Fixierung

Jeweils $1,0 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurden auf sterilen Deckgläschen in 6-Well-Schalen ausplattiert. Synchronisierung und Hydroxytamoxifen-Behandlung erfolgten gemäß des entsprechenden Zeitplans für das jeweilige Experiment. Zur Fixierung wurden die Deckgläschen nach Entfernung des Kulturmediums zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit -20 °C kalter Methanol-Fixierlösung (90% Methanol, 10% MeS-Puffer) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Fixans durch wiederholtes Waschen mit PBS entfernt. An dieser Stelle konnten die fixierten Deckgläschen mit PBS überschichtet und bei 4 °C gelagert werden.

Immunfluoreszenz-Färbung

Zunächst erfolgten drei PBS-Waschschritte bei RT. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 30-minütige Inkubation mit 1% BSA / PBS bei 37 °C blockiert und die Deckgläschen danach erneut drei Mal bei RT mit PBS gewaschen. Die anschließende

Inkubation in der Primärantikörperlösung, die anti- γ -Tubulin (Sigma T3599) und anti- α -Tubulin (Sigma T6074) jeweils im Verhältnis 1:500 in 1% BSA / PBS enthielt, erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer lichtgeschützten und befeuchteten Kammer. Am folgenden Vormittag wurden die Deckgläschen zur Entfernung von ungebundenem Primärantikörper drei Mal für jeweils 3 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation in der Sekundärantikörperlösung, welche die jeweils im Verhältnis 1:700 in PBS gelösten Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper Alexa Flour 488 *goat-anti-mouse* IgG (Invitrogen A11029) und Alexa-Flour 594 *goat-anti-rabbit* IgG (Invitrogen A11037) enthielt. Dieser Schritt wurde bei RT in einer abgedunkelten und befeuchteten Kammer vollzogen. Zur Entfernung von ungebundenem Sekundärantikörper wurden die Deckgläschen drei Mal für jeweils 3 min mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden durch fünfminütige Inkubation in 1 μ g/ml Bisbenzimid-Lösung (Hoechst 33258) gefärbt. Nach drei abschließenden PBS-Waschschritten wurde das Deckgläschen mit IMMU-Mount (Shandon) auf einem Objektträger eingebettet. Zur langfristigen Lagerung wurden die Kanten des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte durch fotografische Dokumentation mehrerer repräsentativer Bildausschnitte am inversen Fluoreszenz-Mikroskop unter Verwendung der Leica Application Suite-Software.

2.2.2.3 Kernfärbung mit Bisbenzimid

Die Kernfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33258) wurde entweder als Vitalfärbung durch Zugabe von Bisbenzimid-Lösung in das Zellkulturmedium (im Verhältnis 1:100) durchgeführt oder erfolgte nach Kultur und PSP-Fixierung von Zellen auf Deckgläschen wie im Kapitel 2.2.2.1 beschrieben. Hierzu wurden die Zellen nach der Fixierung drei Mal für jeweils 3 min mit PBS gewaschen und für 5 min in 1 μ g/ml Bisbenzimid-Lösung (Hoechst 33258) gefärbt. Nach drei abschließenden PBS-Waschschritten wurde das Deckgläschen mit IMMU-Mount (Shandon) auf einem Objektträger eingebettet und mit Nagellack versiegelt.

2.2.2.4 Time lapse-Mikroskopie

Zellkultur

Jeweils $6,5 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurden in 10 cm Kulturschalen ausplattiert und am Folgetag wie in Kapitel 2.2.1.11 beschrieben mit einem Retrovirus infiziert, welches die genetische Information für ein Histon 2B-GFP-Fusionsprotein trägt. Auf diese Weise kann bei der späteren Mikroskopie das Chromatin durch Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoreszierend dargestellt werden. Am Tag nach der Infektion wurden die Zellen vormittags gewachsen und mit 10 ml frischem Vollmedium versehen. Am späten Abend wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturplatte abgelöst und in frischem Vollmedium resuspendiert. Danach wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt und die Konzentration der Suspension durch Verdünnung mit frischem Vollmedium auf 9×10^4 Zellen / ml adjustiert. Anschließend wurden die Zellen auf 35 mm μ -Dishes (Ibidi) mit 9 x 9 mm Kultur-Einsatz (*Culture Insert*, Ibidi) passagiert. Für jedes der beiden Areale des Kultur-Einsatzes (jeweils 0,22 cm²) wurden 30 μ l und für den verbleibenden äußeren Ring (2,69 cm²) 350 μ l der Zellsuspension verwendet, sodass die Zelldichte in allen Arealen vergleichbar war. Am folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei dem Medium für den äußeren Ring 400 nM 4-Hydroxytamoxifen beigemischt wurde, während das Medium für die Areale im Kultureinsatz kein 4-OHT enthielt (unbehandelte Kontrollzellen). Die Zellen wurden erst unmittelbar vor Beginn der mikroskopischen Beobachtung aus dem Inkubator entnommen und nach Zugabe von 50 mMol HEPES zur Pufferung des Kulturmediums unverzüglich in die Inkubator-Kammer auf dem Objektisch verbracht.

Mikroskopie

Die *Time lapse*-Aufzeichnung erfolgte am inversen Fluoreszenzmikroskop DMI 6000B (Leica). Die Temperaturhomöostase wurde gewährleistet durch die Verwendung eines beheizbaren Objektisches (*Heating Insert P*) mit einer aufgesetzten Inkubator-Kammer (*Incubator S-2*, Leica Microsystems). Die Temperatur wurde auf 37 °C eingestellt. Durch die Verwendung von HEPES konnten pH-stabile Kulturbedingungen auch ohne CO₂-Begasung für etwa 8 bis 12 Stunden gewährleistet werden.

Mit Hilfe des motorisierten Objektisches und der Leica Application Suite-Software wurden die zu Beginn der Aufzeichnung selektierten Areale der Kulturschale über einen Zeitraum von 6 bis 8 Stunden zyklisch im Abstand von 5 min angesteuert und jeweils eine Phasenkontrast-Aufnahme und eine GFP-Fluoreszenz-Aufnahme angefertigt. Nach 8 bis 14 Stunden wurden neue Zellen verwendet. Bei den Zellen, die mehr

als 48 h nach Zugabe des 4-OHT mikroskopiert wurden, erfolgte zuvor ein Mediumwechsel um das 4-OHT zu entfernen.

Die aufgezeichneten Bilder wurden unter Verwendung der Leica Application Suite und der ImageJ-Software zu *Time lapse*-Filmsequenzen zusammengestellt. Diese Filmsequenzen wurden anschließend hinsichtlich des Vorhandenseins von abnormen Mitose-Konfigurationen, Unregelmäßigkeiten bei der Zytokinese sowie Entstehung bi- bzw. polynukleärer Zellen inspiziert. Repräsentative Beispiele wurden anhand der aufgenommenen Einzelbilder dokumentiert.

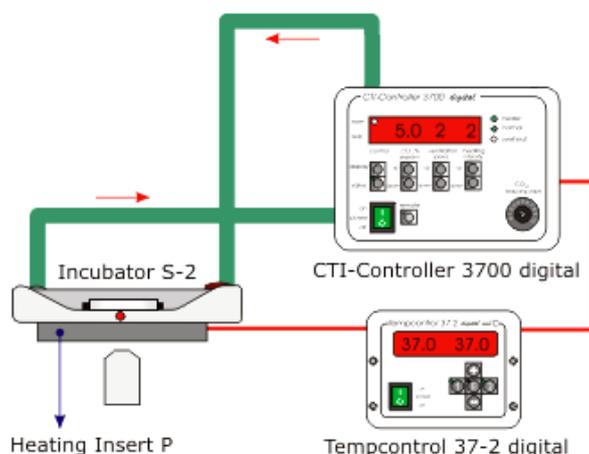


Abbildung 2.1 → Schematische Darstellung des Inkubator-Aufbaus zur *Time lapse*-Mikroskopie

Das Schema zeigt den Aufbau der Steuergeräte und des Inkubatorsystems für die *Time lapse*-Mikroskopie. Die roten Linien entsprechen Kabelverbindungen, die grünen Linien stellen Schlauchverbindungen für die angewärmte Luft dar. Die Abbildung wurde modifiziert übernommen von der Firma Pecon.

2.2.2.5 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklus-Verteilung

Die Bestimmung der Zellzyklus-Verteilung der Zellen in einer Kultur erfolgte mit Hilfe der Propidiumjodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS). Propidiumjodid ist ein DNA-Interkalations-Farbstoff, der bei einer Wellenlänge von 617 nm fluoresziert. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert dabei mit dem DNA-Gehalt der analysierten Zellen. Zur Fixierung für die Durchflusszytometrie wurden die MEFs mit PBS gewaschen, mit 0,25% Trypsin von den Kulturschalen abgelöst und in 10 ml frischem Vollmedium für 3 bis 5 min bei 1200 rpm in der Kühlzentrifuge (4 °C) pelletiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde 1 ml eiskalter 80% Ethanol unter gleichzeitigem *Vortexen* tropfenweise zugegeben. Die Zellen wurden anschließend zum Abschluss der Fixierung über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Zellen nach 5-minütiger Pelletierung in der Kühlzentrifuge (1200 rpm, 4 °C) einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Absaugen des PBS in 500 µl 38 mM Natriumcitrat + 25 µl RNase A (100 µg/ml) resuspendiert und für eine bis zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 15 min mit 30 µl Propidiumjodid gefärbt und in die entsprechenden Proben-Röhrchen transferiert. Die Messung erfolgte am Cytomics FC 500 CXP Durchflusszytometer (Beckman Coulter).

2.2.2.6 Detektion apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC-FACS

Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das bei apoptotischen Zellen von der Innenseite auf die Außenseite der Zytoplasmamembran transloziert wird und bei nekrotischen Zellen durch eine gestörte Membranintegrität frei liegt (KOOPMAN et al., 1994; VERMES et al., 1995). Durch Propidiumjodid kann die Membranintegrität beurteilt werden und eine Unterscheidung von nekrotischen und apoptotischen Zellen vorgenommen werden, da es nur bei durchlässiger Zytoplasmamembran in die Zelle aufgenommen wird.

Zur Durchführung einer Doppelfärbung mit Annexin V-FITC und PI wurden die MEFs nach entsprechender Vorbehandlung gemäß des jeweiligen Versuchsprotokolls durch Trypsinierung geerntet und zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils $1,0 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Bindepuffer (10 mM HEPES pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension ($1,0 \times 10^5$ Zellen) wurden mit 5 µl Annexin V-FITC (BD #556420) sowie 10 µl PI (Ausgangslösung 50 µg/ml) vermischt. Nach vorsichtigem *Vortexen* wurden die Zellen für 15 min bei Dunkelheit inkubiert. Danach wurden 400 µl Bindepuffer hinzu gegeben und die Zellen innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.7 Phospho-H3-FACS

Zur durchflusszytometrischen Detektion von Zellen in der G₂-Phase und der frühen M-Phase wurde ein Phospho-H3-spezifischer Antikörper verwendet. Nach der Ernte durch Trypsinierung wurden die MEFs mit PBS gewaschen und mit 2% PFA / PBS für 10 min bei 37 °C fixiert. Nach einer Minute auf Eis wurden die Zellen durch Zugabe von eiskaltem 90% Methanol für 30 min bei 4 °C permeabilisiert und anschließend über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden 5×10^5 Zellen in 3 ml Inkubationspuffer gewaschen, in 90 µl Inkubationspuffer resuspendiert und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 10 µl Anti-

Phospho-H3 zugegeben und die Zellen für 2 h im Dunkeln bei RT gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift mit Inkubationspuffer wurden 50 µg/ml PI und 0,7 mg/ml RNase A zugegeben und die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.8 Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung

Nach einer endlichen Anzahl von Zellteilungen treten Zellen normalerweise in einen Zustand der replikativen Seneszenz ein. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass in seneszenten Zellen eine bestimmte β -Galaktosidase verstärkt exprimiert wird und eine höhere Aktivität aufweist. Dieses Enzym eignet sich daher zur zytochemischen Detektion von seneszenten Zellen (DIMRI et al., 1995; ITAHANA et al., 2007). Der in der vorliegenden Arbeit hierzu verwendete Ansatz basiert auf der Spaltung des chromogenen Substrats X-Gal durch die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase, wodurch sich das Zytoplasma seneszenten Zellen blau anfärbt.

Zunächst wurden die in 10 cm-Gewebekulturschalen kultivierten MEFs einmal mit PBS gewaschen und danach für 10 min mit 5% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit PBS / 1 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) gewaschen und für 1 bis 3 Tage mit jeweils 8 ml (pro 10 cm-Schale) frisch angesetzter und auf pH 6,0 eingestellter X-Gal-Färbelösung gefärbt, bis sich ein blauer Farbniederschlag abzeichnete. Die Auswertung erfolgte durch fotografische Dokumentation am Stereomikroskop.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion von genomischer DNA aus Zellkulturen

Zunächst wurden die in 6 cm-Gewebekulturschalen oder 6-Well-Platten kultivierten Zellen nach Absaugen des Kulturmediums einmal mit PBS gewaschen und in 500 µl Lyse-Puffer + 250 µg/ml Proteinase K für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Zelllysate in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit der äquivalenten Menge Phenol-Chloroform-Lösung durch mehrmaliges vorsichtiges Invertieren des Reaktionsgefäßes vermischt. Anschließend wurde das Gemisch für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die DNA-haltige (obere) wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform und vorsichtigem Invertieren erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für 3 min. Danach wurde wiederum die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und zur Ausfällung der DNA mit 50 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,8) und 500 µl Isopropanol vermischt und für mindestens 20 min (optimalerweise über Nacht) bei -20 °C gelagert. Im Anschluss daran wurde die ausgefällte DNA bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge (4 °C) für 30 min pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Ethanol vorsichtig abgesaugt und das Pellet an der Luft getrocknet. Die Rehydrierung erfolgte durch zehnmünütige Inkubation bei 65 °C in 50 µl TE-Puffer.

2.2.3.2 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen mit TRIzol™-Reagenz

Zur Isolation der RNA wurden die Zellen nach Entfernung des Kulturmediums mit 1 ml TRIzol™-Reagenz (Invitrogen) lysiert, mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT konnten die Proben bei -80 °C gelagert oder unmittelbar weiter aufgereinigt werden. Dazu wurden 200 µl kaltes Chloroform zugegeben und die Proben nach 15-sekündigem Vortexen für 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben zur Phasentrennung für 10 min bei 4 °C und 11400 rpm zentrifugiert. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol sowie zehnmünütiger Inkubation bei RT zur Ausfällung der RNA für 10 min bei 4 °C und 11400 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet mit 500 µl 75% Ethanol (angesetzt mit RNase-freiem DEPC-Wasser) gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4 °C und 9000 rpm wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet nach Lufttrocknung bei RT in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Lagerung der aufgereinigten RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.3.3 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen mit dem RNeasy™ Mini Kit

Für bestimmte Anwendungen wie z. B. *cDNA-Microarrays* wurde aufgereinigte RNA von besonders hoher Qualität und Reinheit benötigt. In diesem Fall erfolgte die Isolation und Aufreinigung der RNA unter Verwendung des RNeasy™ Mini Kits (Qiagen) gemäß der Angaben im Herstellerprotokoll. Zur Vermeidung einer Kontamination durch DNA wurde eine zusätzliche DNase-Behandlung der Proben mit dem RQ-DNase-Kit (Qiagen) vorgenommen. Dieser Schritt erfolgte ebenfalls gemäß der Angaben im Herstellerprotokoll.

2.2.3.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung des DNA- oder RNA-Gehaltes einer Lösung erfolgte unter Verwendung des NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific). Dazu wurde 1 µl der Probenlösung gegen das entsprechende Lösungsmittel als Leerwert bei 260 nm Wellenlänge gemessen. 1 A_{260} entspricht hierbei 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssDNA oder RNA. Des Weiteren wurde durch Messung des Verhältnisses von A_{260} (dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) zu A_{280} (dem Absorptionsmaximum von Proteinen) der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung ermittelt. Reine DNA-Lösungen sollten ein Verhältnis von 1,8, reine RNA-Lösungen ein Verhältnis von 2,0 aufweisen. Eine Verminderung dieser Werte deutet auf eine Verunreinigung der Lösung mit Proteinen hin.

2.2.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken oder zur präparativen Aufreinigung erfolgte durch Gelelektrophorese. Zur Anfertigung der Agarose-Gele wurde die entsprechende Agarose-Menge (0,8 – 2,0% w/v), welche sich nach der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente richtete, in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach dem Abkühlen auf etwa 55 °C in einen horizontalen Gelschlitten mit einem geeigneten Kamm eingefüllt. Um die DNA-Fragmente nach der Auftrennung detektieren zu können, wurde der Agarose-Lösung Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1 µg / 100 ml TAE beigemischt. Nach dem Erstarren des Gels bei RT wurde der Gelschlitten in eine mit 1x TAE gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und das Gel beladen. Hierzu wurde die DNA mit einem Bromphenolblau- und Xylencyanol-haltigen Ladepuffer vermischt und in die durch den Kamm vorgeformten Taschen des Gels eingefüllt. Zur späteren Bestimmung der Fragmentgrößen wurde des Weiteren ein Längenstandard (1 kb DNA *Ladder*, Fermentas) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 Volt für 20 – 40 min, wobei der Fortschritt der Auftrennung durch die Farbstoffbanden des Ladepuffers beobachtet wurde. Die Dokumentation wurde fotografisch am UV-Transilluminator vorgenommen.

2.2.3.6 Standard-Klonierungs-Verfahren

Spezifische Plasmid-Konstrukte werden unter anderem zur Expression von rekombinanten Proteinen in Fremdzellen oder zur zielgerichteten Abschaltung von Genen durch die RNA-Interferenz-Methode (FIRE et al., 1998) verwendet. Die

Generation solcher Konstrukte erfolgte nach der im Folgenden beschriebenen Klonierungs-Methode.

PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Klonierung in ein Plasmidkonstrukt wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierfür wurde die Phusion™ *High Fidelity* Polymerase (Finnzymes) verwendet, welche über eine Korrekturlesefunktion (*Proof Reading*) verfügt.

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend des Herstellerprotokolls in 50 µl Gesamtvolumen folgendermaßen angelegt:

Phusion™ <i>High Fidelity</i> Polymerase	0,5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Oligonukleotid 1 (<i>Forward primer</i> , 10 µM)	2,5 µl
Oligonukleotid 2 (<i>Reverse primer</i> , 10 µM)	2,5 µl
5x Phusion-Puffer	10 µl
DNA-Matrize (z. B. cDNA)	4 µl
dH ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

Der Polymerisationsschritt erfolgte bei 72 °C. Das PCR-Produkt wurde wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde am Transilluminator mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des JetStar *Gel Extraction* Kit (Genomed) gemäß der Angaben im Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Restriktionsverdau von DNA

Die gezielte Eröffnung der Ringstruktur von Plasmidvektoren zum Einbringen eines DNA-*Inserts*, die Zurichtung der Enden von amplifizierten DNA-Molekülen oder der analytische Verdau von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Die zu verdauende DNA wurde hierzu mit den entsprechenden Endonukleasen und dem vom Hersteller empfohlenen Restriktionspuffer, ggf. unter Zugabe von bovinem Serumalbumin (BSA), für etwa 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Hierbei wurden folgende Standard-Ansätze gewählt:

	Analytischer Verdau	Präparativer Verdau
DNA	0,5 – 1 µg	1 – 5 µg
10x Puffer	2 µl	5 µl
Restriktionsenzym	0,2 µl	1 µl
dH ₂ O	ad 20 µl	ad 50 µl

Ligation von DNA

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs). Das molare Verhältnis des Vektors zum *Insert* sollte hierbei 1:3 bis 1:5 betragen. Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

T4-DNA-Ligase	0,5 µl
10x Ligase-Puffer	1 µl
Vektor-DNA	20 - 50 ng
<i>Insert</i> -DNA	3- bis 5-facher molarer Überschuss
dH ₂ O	ad 10 µl

Der Ligationsansatz wurde für mindestens 2 Stunden bei RT oder über Nacht inkubiert. Die Ligase konnte durch zehnmündige Erhitzung auf 65 °C inaktiviert werden.

2.2.3.7 Hitzeschock-Transformation von Bakterien

Zur Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen wurde der chemisch kompetente Stamm *Escherichia coli DH5α* verwendet. Die Gewinnung kompetenter *DH5α*-Bakterien erfolgte nach dem Protokoll von HANAHAN (1983). Zur Hitzeschocktransformation wurden jeweils 50 µl kompetente *E. coli DH5α* mit 1 µl des zu transformierenden Plasmids oder 5 bis 10 µl des Ligationsansatzes vermischt und für 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 2-minütigen Hitzeschock-Schritt bei 42 °C wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika hinzugefügt und die Zellen im Schüttler bei 37 °C für 45 min inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension für 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl frischem LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.8 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Mini-Präparation

Jeweils 3 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium (Ampicillin 1:500) wurden in Bakterien-Kulturröhrchen gegeben, mit der entsprechenden Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Vormittag wurden jeweils 1,5 ml des Kulturmediums entnommen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge für eine Minute pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 150 µl S1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl S2-Puffer erfolgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Danach wurden 150 µl S3-Puffer zugegeben und die Reaktionsgefäße zur Durchmischung fünf Mal invertiert. Anschließend wurden die Proben für weitere 5 min auf Eis inkubiert und danach für 10 – 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zur Ausfällung der DNA mit dem doppelten Volumen (800 – 900 µl) 100% Ethanol versetzt und für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Ethanol vorsichtig abgenommen und das Pellet in 30 - 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Maxi-Präparation

Zunächst wurden Vorkulturen angelegt, wozu jeweils 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit der entsprechenden Kolonie angeimpft wurden. Nach einer mindestens 6 bis 8-stündigen Inkubation im Schüttler bei 37 °C wurde die Vorkultur in 200 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium überführt und über Nacht erneut im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Vormittag erfolgte die Aufreinigung der Plasmid-DNA mit dem PureLink HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit (Invitrogen) gemäß der Angaben im Hersteller-Protokoll.

2.2.3.9 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription von RNA in cDNA wurde die MLV-M-Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Für jede Reaktion wurden 1,0 – 2,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt, 1 µl *Random Primer* zugegeben und der Reaktionsansatz mit DEPC-Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert.

Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde zu jedem Reaktionsansatz folgendes Gemisch hinzu gegeben:

M-MLV 5x Reaktions-Puffer	5,0 µl
dNTPs [2 mM]	5,0 µl
RiboLock RNase Inhibitor [40 U/µl]	0,5 µl
M-MLV-RT [100 U]	0,5 µl

Die cDNA-Synthese erfolgte für 50 min bei 37 °C. Im Anschluss daran wurde das Enzym durch 15-minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde zur kurzfristigen Verwendung bei 4 °C gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.10 Semiquantitative genomische PCR zum Nachweis des Lin9 Δ fl-Allels

Zum Nachweis der erfolgreichen Exzision des *gefloxten* Lin9-Allels nach der Behandlung von MEFs mit 4-OHT wurde die genomische DNA wie in Kapitel 2.2.3.1 beschrieben extrahiert und die entsprechende Region des Genoms durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Hierzu wurde für jede Probe der folgende 25 µl-PCR-Ansatz angelegt:

HisTaq 5 Polymerase (15 U/µl)	0,2 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
<i>Primer</i> #SG 893 (10 µM)	1,0 µl
<i>Primer</i> #SG 722 (10 µM)	1,0 µl
10x ReproFast-Puffer	2,5 µl
DNA-Matrize	1,0 µl
dH ₂ O	16,8 µl

Zur Amplifikation wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

1.)	94 °C	2 min	
2.)	94 °C	30 sec	
3.)	58 °C	1 min	
4.)	72 °C	1 min	→ Wiederholung ab Schritt 2, 30 Zyklen
5.)	72 °C	4 min	
6.)	10 °C	Pause	

Die PCR-Produkte wurden mit 2 µl Ladepuffer vermischt, wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben auf einem 1% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und am UV-Transilluminator ausgewertet. Die erwarteten Banden liegen für das Wildtyp-Allel bei 541 bp, für das gefloخته Allel (fl) bei 770 bp und für das exzidierte Allel (Δ fl) bei 289 bp.

2.2.3.11 Quantitative *Real Time*-PCR

Die Bestimmung der Menge an cDNA oder immunpräzipitiertem Chromatin für ein bestimmtes Gen bzw. einen bestimmten Promoter-Bereich erfolgte mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (*Real Time-PCR*). Hierzu wurde für jede zu analysierende Probe der folgende Reaktionsansatz jeweils in Triplikaten angelegt:

Primer-Mix (beide <i>Primer</i> jeweils 10 µM)	1,0 µl
2 x qPCR SYBR Green Mix (Thermo Fisher)	12,5 µl
cDNA oder immunpräzipitiertes Chromatin	1,0 – 2,0 µl
dH ₂ O	ad 25,0 µl

Die Durchführung des PCR-Laufes erfolgte im *Mx3000 PCR-Cycler* (Stratagene). Hierzu wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

- | | | |
|-----------|--------|--|
| 1.) 95 °C | 10 min | |
| 2.) 95 °C | 30 sec | |
| 3.) 60 °C | 1 min | → Wiederholung ab Schritt 2, 40 Zyklen |

Die relative Expression eines zu analysierenden Gens (repräsentiert durch die im Ansatz vorhandene cDNA-Menge) im Verhältnis zu einem Standard-Gen (*Housekeeping-Gen*) wurde durch einen relativen Vergleich der Ct-Werte unter Verwendung der $\Delta\Delta$ Ct-Methode berechnet.

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\text{mit } \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Referenz}} \text{ und } \Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{zu analysierendes Gen}} - \text{Ct}_{\text{Standard-Gen}}$$

Die Standardabweichung der $\Delta\Delta$ Ct-Werte wurde berechnet mit $s = \sqrt{(s_1^2 + s_2^2)}$, wobei s_1 die Standardabweichung für das zu analysierende Gen und s_2 die Standardabweichung für das Standard-Gen (Hprt1 oder Gapdh) darstellt.

Für die Funktion $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wurde anschließend der Fehlerbereich $2^{-\Delta\Delta Ct \pm s}$ berechnet. Der Fehler wurde durch Fehlerbalken angegeben, deren Höhe sich nach folgender Formel errechnete:

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

Bei der Auswertung von Chromatin-Immunpräzipitations-Experimenten wurde die Bindung von Proteinen an DNA in der Regel in % des *Inputs* angegeben:

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

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Mit der Chromatin-Immunpräzipitation kann die Assoziation von Proteinen an spezifische Bereiche des endogenen Chromatins *in vivo* nachgewiesen werden. Dazu werden die an die DNA gebundenen Proteine und Proteinkomplexe zunächst mit Hilfe von Formaldehyd reversibel mit der DNA kreuzvernetzt. Nach der Lyse der Zellen und der Isolation des Chromatins wird dieses mechanisch durch Ultraschallbehandlung (Sonikation) fragmentiert. Durch Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper werden die zu analysierenden Proteine (z. B. Transkriptionsfaktoren) und die daran gebundene DNA isoliert. Nach dem Auflösen der Kreuzvernetzungen zwischen DNA und den gebundenen Proteinen sowie der Aufreinigung der DNA können die isolierten DNA-Fragmente mit Hilfe der quantitativen *Real Time*-PCR unter Verwendung spezifischer *Primer* nachgewiesen werden.

Kreuzvernetzung (*Crosslink*)

Die zu analysierenden Zellen wurden auf 15 cm Gewebekulturschalen in 20 ml DMEM + 10% FCS kultiviert und entsprechend des jeweiligen Versuchsprotokolls vorbehandelt. Zur reversiblen Kreuzvernetzung der DNA und der daran gebundenen Proteine wurden 540 µl Formaldehyd in das Kulturmedium gegeben, woran sich eine 10-minütige Inkubation bei RT unter langsamer Durchmischung auf dem Taumler anschloss. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml 1 M Glycin

abgestoppt und die Zellen für weitere 5 min bei RT unter langsamer Durchmischung inkubiert. Anschließend wurden die Platten auf Eis verbracht und nach Entfernung des Formaldehyd- und Glycin-haltigen Kulturmediums zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst und in 6 ml PBS (+ PMSF 1:200, + PI 1:100) pro 15 cm Schale aufgenommen. Die Zellsuspension wurde so in 50 ml Falcon-Gefäße aufgeteilt, dass jeweils $1,7 \times 10^7$ MEFs enthalten waren. Die Zellen wurden dann bei 1200 rpm und 4 °C für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets konnten entweder direkt für ein ChIP-Experiment verwendet werden oder wurden an dieser Stelle in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Jedes der Zellpellets war ausreichend für vier Immunpräzipitations-Ansätze.

Chromatin-Isolation und Sonikation

Zur Chromatin-Isolation wurden die Zellpellets im 10-fachen Volumen Lyse-Puffer (+ PMSF 1:200, + PI 1:100) resuspendiert bzw. bei Verwendung gefrorener Zellen in Lyse-Puffer aufgetaut und für 10 min auf Eis inkubiert. Die erhaltene Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellkerne für 5 min bei 2800 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Kerne in 800 µl Kernlyse-Puffer (+ PMSF 1:200, + PI 1:100) aufgenommen, in ein 15 ml Polystyrol-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min auf Eis inkubiert.

Die Sonikation zur Fragmentierung des Chromatins erfolgte unter Verwendung des *Sonifier* 250D (Branson), wobei das Reaktionsgefäß in Eiswasser gekühlt wurde. Die nachfolgend dargestellten Sonikationsbedingungen wurden durch ein Vorexperiment mit Bestimmung der Chromatin-Größen nach verschiedenen Impulszahlen für den verwendeten Zelltyp (MEFs) empirisch ermittelt:

Amplitude:	10%
Pulsdauer:	10 Sekunden
Anzahl der Pulse:	10
Pause zwischen den Pulsen:	45 Sekunden

Die Lösung mit dem enthaltenen fragmentierten Chromatin wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 15 ml-Falcon-Gefäß überführt und mit 7,2 ml IP-Dilutionspuffer (+ PMSF 1:200, + PI 1:100) verdünnt. Die Lösung wurde anschließend

auf vier 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt (ein Reaktionsgefäß für jeweils eine Immunpräzipitationsreaktion).

Chromatin-Größenkontrolle

Um die Größe der erhaltenen Chromatin-Fragmente zu kontrollieren, wurden 50 µl der Chromatin-Lösung vor der Zugabe des Dilutionspuffers entnommen. Diese wurde nach Zugabe von 2 µl 5 M NaCl und 1 µl RNase A über Nacht bei 65 °C unter konstanter Durchmischung auf dem Schüttler inkubiert um die Kreuzvernetzung von DNA und Proteinen rückgängig zu machen. Die Lösung wurde hierbei zur Vermeidung von Kondensationsverlusten mit Mineralöl überschichtet. Am nächsten Vormittag wurden 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und die Probe für mindestens 3 h bei 55 °C inkubiert. Die Kontrolle der Fragmentgrößen erfolgte im Anschluss daran (nach Zugabe von Ladepuffer) durch Auftrennung auf einem 1,2% Agarose-Gel wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben. Es wurde eine Chromatin-Größe zwischen 500 und 1500 bp angestrebt.

Herstellung abgesättigter Sepharose-Beads

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen von DNA und Proteinen an die Sepharose-Beads bei der späteren Verwendung für ChIP-Experimente wurde die Sepharose vor dem Gebrauch abgesättigt. Hierzu wurden 125 µg Protein A- oder Protein G-Sepharose mit 5 ml IP-Dilutionspuffer äquilibriert. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 2 min wurde der Überstand abgenommen, die Sepharose in 2,5 ml *Blocking*-Puffer aufgenommen und über Nacht auf dem Rotator inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Sepharose erneut bei 1000 rpm für 2 min abzentrifugiert und in 0,5 ml frischen *Blocking*-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden des Weiteren 10 µl Natriumazid (5%) beigemischt.

Preclear

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungen erfolgte eine Präinkubation (*Preclear*) der verdünnten Chromatin-Lösung mit 40 µl geblockter Protein A- oder Protein G-Sepharose (in Abhängigkeit vom später zu verwendenden Antikörper) für 15 min bei 4 °C auf einem Rotator. Anschließend wurde die Sepharose für 2 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand (Chromatin-Lösung) in ein neues Reaktionsgefäß verbracht.

Immunpräzipitation

Für jeden Immunpräzipitations-Ansatz wurden 2 ml der verdünnten Chromatin-Lösung nach dem *Preclear* mit 3 – 5 µg des entsprechenden Antikörpers (in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper) versetzt und über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Als Ladekontrolle (*Input*) wurden des Weiteren nach dem *Preclear* 20 µl des verdünnten Chromatins abgenommen.

Am folgenden Tag wurden zu jedem Chromatin-Antikörper-Ansatz 40 µl frische geblockte Protein A- oder Protein-G-Sepharose hinzu gegeben, woran sich eine weitere 2-stündige Inkubation bei 4 °C auf dem Rotator anschloss. Bei Verwendung monoklonaler muriner Antikörper sowie für polyklonale humane Antikörper oder Kaninchen-Antikörper wurde hierzu Protein A-Sepharose eingesetzt, bei Verwendung von polyklonalen murinen Antikörpern wurde Protein G-Sepharose eingesetzt. Anschließend wurde die Sepharose für 2 min bei 3000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit dem ungebundenen Chromatin verworfen. Danach wurden die Sepharose-*Beads* sieben Mal mit jeweils 1 ml Lithiumchlorid-Waschpuffer (+ PMSF) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der restliche Waschpuffer mit Hilfe einer HAMILTON-Pipette vollständig abgenommen und die Sepharose-*Beads* mit 130 µl Elutions-Puffer für 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die *Beads* bei 14000 rpm für 1 min vom Eluat separiert und 100 µl des Chromatin-haltigen Elutions-Puffers (Überstand) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde mit 150 µl frischem Elutions-Puffer wiederholt und der Überstand mit dem ersten Eluat zu einem Endvolumen von 250 µl kombiniert.

Reverser Crosslink, Aufreinigung des Chromatins und qPCR

Um die reversiblen Kreuzvernetzungen zwischen der DNA und den daran gebundenen Proteinen aufzulösen, wurden die Eluate sowie das mit Elutionspuffer auf 250 µl aufgefüllte *Input*-Chromatin mit 10 µl 5 M NaCl versetzt und nach Überschichten mit Mineralöl über Nacht bei 65 °C im Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden jeweils 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und die Proben für 3 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde das Eluat mit Hilfe des QIAquick PCR *Purification Kit* (Qiagen) gemäß der Angaben im Hersteller-Protokoll aufgereinigt und in 50 µl des im Kit enthaltenen Elutions-Puffers (Puffer EB) von der Säule eluiert. Der Nachweis der im Eluat enthaltenen DNA erfolgte durch quantitative *Real Time*-PCR wie in Kapitel 2.2.3.11 beschrieben unter Verwendung Promoter-spezifischer *Primer*. Dabei wurden 1,0 µl der Eluate für jede Reaktion eingesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Phänotypische Charakterisierung von Lin9-defizienten MEFs

Ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes konditionelles Lin9-*Knockout*-Mausmodell auf Basis der cre-loxP-Technologie ermöglicht die effektive Depletion von Lin9 *in vivo* (REICHERT et al., 2010). Embryonale Fibroblasten dieser Mäuse (Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs) stellen zugleich ein wertvolles *in vitro*-System zur Untersuchung der Lin9-Funktion dar. Durch Behandlung dieser MEFs mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) kann zu einem beliebigen Zeitpunkt die cre-Rekombinase induziert und damit Lin9 depletiert werden.

Gegenstand des ersten Abschnitts der vorliegenden Arbeit war die phänotypische Charakterisierung homozygot Lin9-defizienter Zellen. Bei Propidiumjodid-FACS-Analysen von Lin9-depletierten MEFs zeigte sich eine Verschiebung der Zellzyklusverteilung mit einer Zunahme von polyploiden Zellen und SubG₁-Zellen (REICHERT et al., 2010). Deren Schicksal sollte nun genauer untersucht werden. Hierzu wurden Kernfärbungen und immunhistochemische Analysen von Zellzyklusmarkern (Phospho-Histon 3 und Bromuridin) und des Spindelapparates (α - und γ -Tubulin) durchgeführt. Zur direkten Beobachtung des Verlaufs der Mitose und Zytokinese in Lin9-defizienten MEFs wurden außerdem *Time Lapse*-mikroskopische Untersuchungen vorgenommen. Die weitere Charakterisierung der SubG₁-Fraktion erfolgte durch Annexin V-FACS und die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung.

3.1.1 Lin9-Defizienz führt zu einer Zunahme von binukleären Zellen und von Zellen mit abnormaler Kernmorphologie

Um einen Überblick über die Morphologie der Zellkerne zu gewinnen, wurden an Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs Bisbenzimid-Färbungen nach einer 48-stündigen Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) zur cre-Induktion durchgeführt. Hierzu wurden $1,0 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs in 6-Well-Gewebekulturschalen ausplattiert. Am Folgetag wurde in die Hälfte der Wells 0,4 μ M 4-OHT zugegeben, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. 48 Stunden nach Beginn der 4-OHT-Behandlung wurden die Zellen gewaschen und für 24, 48 und 72 Stunden in frischem Vollmedium weiter kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PSP fixiert und mit Bisbenzimid gefärbt. Die

Kernmorphologie wurde am inversen Fluoreszenzmikroskop analysiert und abnorm geformte Kerne anhand von repräsentativen Beispielen fotografisch dokumentiert (Abbildung 3.1B). Weiterhin wurde für jeden Zeitpunkt durch Auszählung von jeweils mindestens 700 4-OHT-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen der Prozentsatz der binukleären Zellen ermittelt (Abbildung 3.1C).

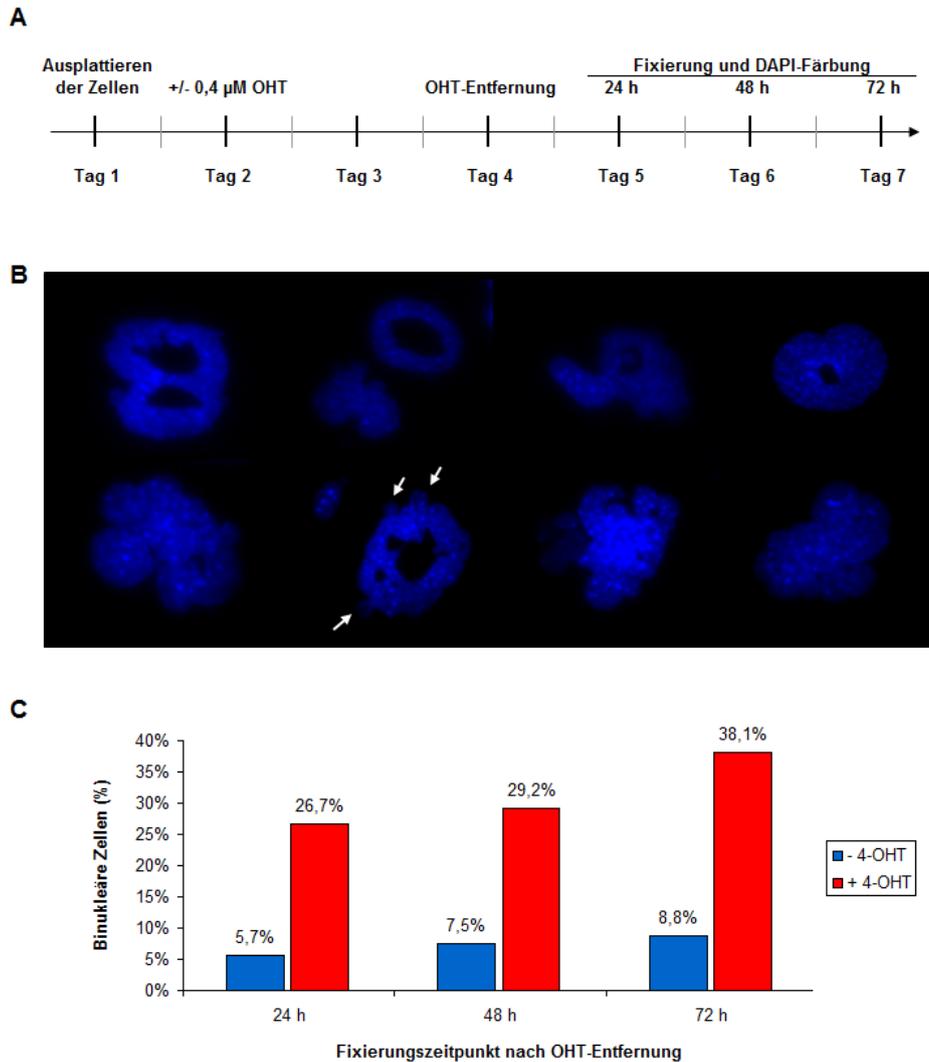


Abbildung 3.1 → Die Depletion von Lin9 führt zu vermehrtem Auftreten von Zellen mit abnormaler Kernmorphologie und zu binukleären Zellen

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Repräsentative Beispiele 4-OHT-behandelter Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs mit abnormaler Kernmorphologie 72 h nach Entfernung des 4-OHT. Die weißen Pfeile zeigen Abschnürungen der Kernmembran (*Blebbing*). C) Prozentualer Anteil der binukleären Zellen bei 4-OHT-behandelten MEFs und unbehandelten Kontrollzellen 24, 48 und 72 Stunden nach dem Auswaschen des Hydroxytamoxifens.

Es zeigten sich bei den 4-OHT-behandelten und demnach Lin9-defizienten Zellen überproportional viele Zellen mit abnormer Kernmorphologie. Insbesondere wurden Kerne mit irregulärer Berandung, Ausstülpungen der Kernmembran (*Blebbing*), gefalteter Morphologie oder Lochbildung (*Donut-Form*) beobachtet. Auch war der Anteil an binukleären Zellen in der Lin9-defizienten Zellpopulation bereits 24 Stunden nach dem Ende der OHT-Behandlung mit 26,7% erheblich höher als bei den unbehandelten Kontrollzellen (5,7%). Bei den späteren Fixierungszeitpunkten blieb das Verhältnis nahezu identisch, wobei die absoluten Prozentsätze bis zum 72 Stunden-Zeitpunkt auf 8,8% bei den unbehandelten Kontrollzellen und 38,1% bei den 4-OHT-behandelten Zellen anstiegen.

Zur Abklärung, ob dieser Phänotyp direkt mit der Lin9-Depletion assoziiert ist, oder ob sekundäre genetische Effekte bzw. cre-bedingte Toxizität hierfür verantwortlich sind, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob durch die Überexpression von Lin9 der binukleäre Phänotyp kompensiert werden kann. Hierzu wurden wiederum $1,0 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs in 6-Well-Gewebekulturschalen ausplattiert und am Folgetag mit einem pcDNA3-HA-Lin9-Plasmid (1 µg) sowie einem H2B-GFP-Konstrukt (ebenfalls 1 µg) zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und zur späteren Identifizierung transfizierter Zellen unter Verwendung von 5 µl Metafectene kotransfiziert. Als Kontrollvektor wurde das leere pcDNA3-HA-Plasmid verwendet. Etwa 6 Stunden später wurde die Hälfte der Wells mit 400 nM 4-OHT zur cre-Induktion behandelt. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel um das Transfektionsreagenz auszuwaschen. Hierbei wurde bei den mit 4-OHT behandelten Zellen erneut Hydroxytamoxifen (400 nM) zum Kulturmedium zugegeben. 48 Stunden nach Beginn der 4-OHT-Behandlung wurde das 4-OHT durch einen PBS-Waschschriff und Zugabe von frischem Vollmedium entfernt. Weitere 24 Stunden später erfolgte die Auszählung binukleärer Zellen am Mikroskop, wobei aufgrund der H2B-GFP-Kotransfektion keine Bisbenzimid-Färbung nötig war. Abbildung 3.2B zeigt die Gesamtauswertung aus drei unabhängigen Experimenten, wobei jeweils 100 bis 300 GFP-positive Zellkerne pro Well analysiert wurden.

Es fanden sich bei den mit dem Kontrollvektor transfizierten und 4-OHT-behandelten MEFs 21,7% binukleäre Zellen, während nach Überexpression von Lin9 deren Anteil auf ca. 11,4% sank. Bei den nicht mit 4-OHT behandelten MEFs waren die Prozentsätze mit 6,9% für die mit dem Kontrollvektor transfizierten und 8,2% für die mit dem pcDNA3-HA-Lin9-Plasmid transfizierten Zellen nicht signifikant different. Sowohl für den Vergleich zwischen den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen mit und

ohne 4-OHT-Behandlung als auch für den Vergleich zwischen den 4-OHT-behandelten Zellen mit und ohne Lin9-Überexpression ergab ein zweiseitiger heteroskedastischer t-Test einen mit $p < 0,05$ signifikanten Unterschied. Auch wenn die Transfektions-effizienz trotz im Rahmen von Vorexperimenten optimierter Transfektionsbedingungen mit 40 bis 60% bei allen drei Experimenten nicht optimal war, zeigen diese Daten, dass der binukleäre Phänotyp nach Lin9-Depletion durch Überexpression von Lin9 nahezu vollständig ausgeglichen werden kann.

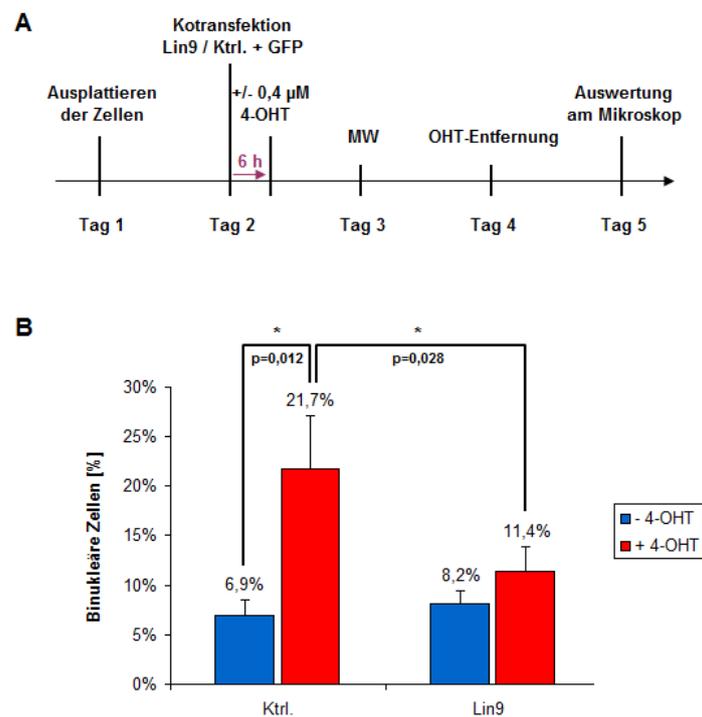


Abbildung 3.2 → Der binukleäre Phänotyp Lin9-depletierter Zellen kann durch Lin9-Überexpression weitgehend kompensiert werden

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Prozentualer Anteil der binukleären Zellen bei 4-OHT-behandelten Lin9 fl/fl creERT²-MEFs und unbehandelten Kontrollzellen nach Kotransfektion mit pcDNA3-HA-Lin9 bzw. leerem pcDNA3-HA-Kontrollvektor und H2B-GFP. Die Auswertung erfolgte 24 Stunden nach der Entfernung des 4-OHT aus dem Kulturmedium und somit 72 Stunden nach Beginn der 4-OHT-Behandlung. Der teststatistische Vergleich unter Verwendung eines zweiseitigen heteroskedastischen t-Tests ergab sowohl zwischen den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen mit und ohne 4-OHT-Behandlung als auch zwischen den 4-OHT-behandelten Zellen mit und ohne Lin9-Überexpression einen signifikanten Unterschied mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

3.1.2 Die DNA-Synthese (S-Phase) läuft auch in Lin9-defizienten Zellen mit abnormer Kernmorphologie weiterhin ab

Um die Fragestellung klären zu können, ob auch in Lin9-defizienten Zellen und insbesondere solchen mit abnormer Kernmorphologie die DNA-Synthese weiterhin abläuft, wurden Bromuridin (BrdU)-Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. BrdU ist ein synthetisches Thymidin-Analogon, das während der Replikation anstelle von Thymidin in die neu synthetisierten DNA-Tochterstränge inkorporiert wird und daher als Zellzyklus-Marker für die S-Phase verwendet werden kann.

Es wurden 50 µM BrdU in das Kulturmedium von 4-OHT-behandelten Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs sowie unbehandelten Kontrollzellen zugegeben und die Zellen 5 h später wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben fixiert und die Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU durchgeführt. Zur Darstellung der Zellkerne wurden diese mit Bisbenzimid gefärbt, sodass anschließend am Fluoreszenzmikroskop durch Auszählung von jeweils mindestens 300 Zellkernen der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellkerne an allen (Bisbenzimid-positiven) Zellkernen bestimmt werden konnte. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Abbildung 3.3B dargestellt.

24 h nach der Entfernung des 4-OHT und somit 72 h nach Beginn der 4-OHT-Behandlung inkorporierten 18,4% der Zellkerne Bromuridin und durchliefen demnach während der 5-stündigen BrdU-Behandlung die Replikationsphase. Auch 48 Stunden später fanden sich noch 10,4% BrdU-positiv Zellkerne. Bei den unbehandelten Kontrollzellen nahm der Anteil der BrdU-positiven Kerne im gleichen Zeitraum, vermutlich durch die zunehmende Kontaktinhibition in dem zu diesem Zeitpunkt nahezu konfluenten Zellrasen, von initial 26,3% auf 17,4% ab. Es konnte demnach gezeigt werden, dass die 4-OHT-behandelte, Lin9-defiziente Zellpopulation weiterhin die S-Phase durchläuft. Die bei den Lin9-defizienten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation bei allen untersuchten Zeitpunkten beobachtete Reduktion der BrdU-positiven Zellkerne lässt allerdings auf eine geringere Proliferationsrate schließen und ist demnach gut vereinbar mit der deutlich flacheren Wachstumskurve der Lin9-depletierten Zellen (REICHERT et al., 2010).

Weiterhin war bei allen untersuchten Zeitpunkten ersichtlich, dass auch bei den binukleären Zellen und bei Zellkernen mit atypischer Morphologie der Anteil BrdU-positiver Zellen approximativ vergleichbar war mit dem der gesamten Zellpopulation. Aufgrund des verhältnismäßig geringen Auftretens von Kernen mit abnormer Morphologie bei den nicht mit 4-OHT behandelten Zellen und der damit

unzuverlässigen statistischen Aussagefähigkeit einer derartigen Auswertung, wurde auf eine genaue Auszählung des Prozentsatzes BrdU-positiver Zellen unter allen Kernen mit atypischer Morphologie verzichtet und stattdessen eine entsprechende fotografische Dokumentation vorgenommen. Repräsentative Beispiele von Kernen mit atypischer Morphologie, die Bromuridin inkorporiert haben, sind in Abbildung 3.3C dargestellt.

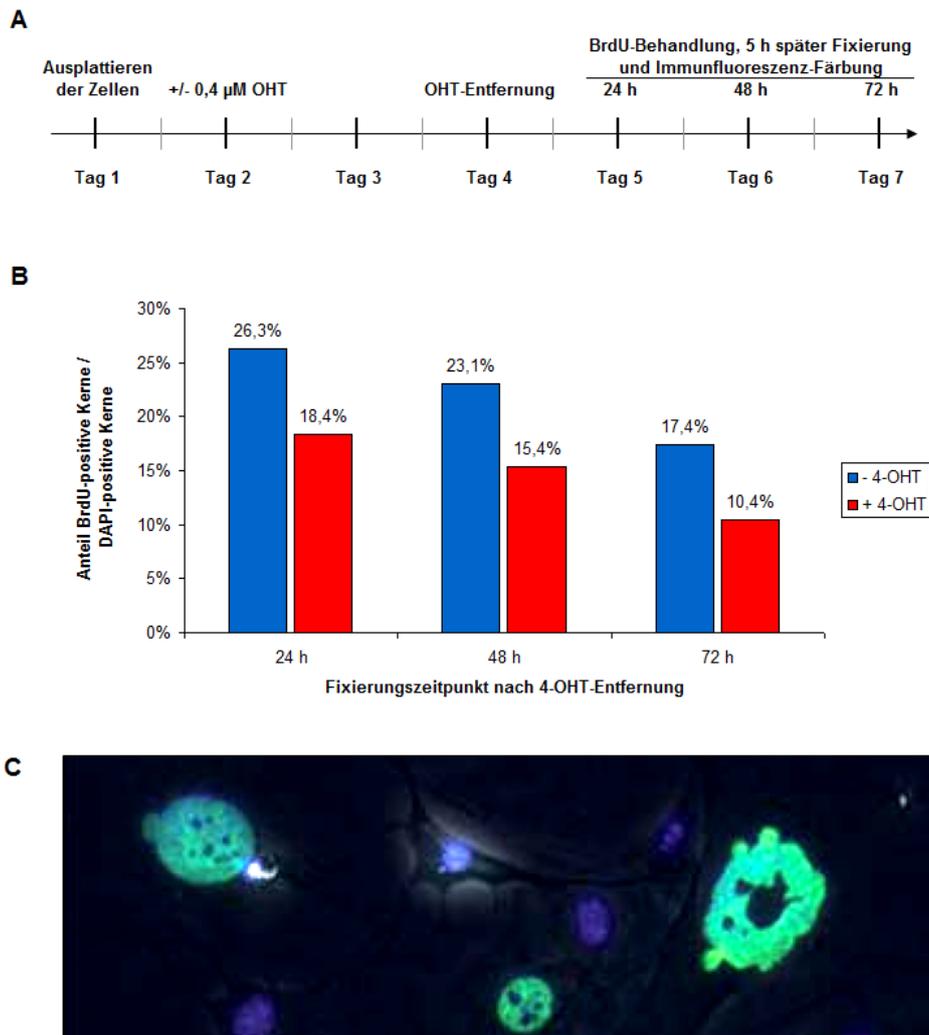


Abbildung 3.3 → Die DNA-Synthese läuft auch in Lin9-defizienten Zellen mit abnormer Kernmorphologie weiterhin ab

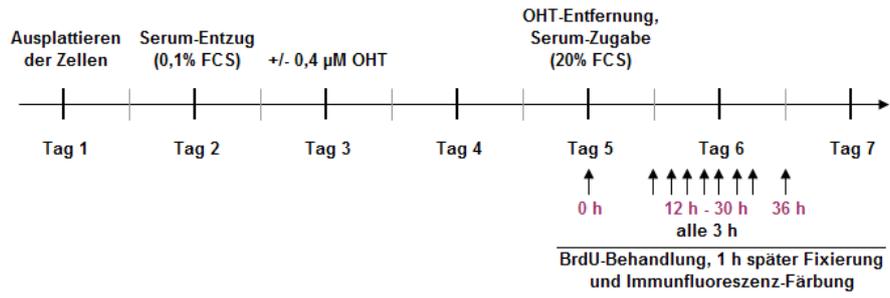
A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Darstellung des prozentualen Anteils BrdU-positiver Zellkerne an allen Zellkernen bei Lin9-defizienten Zellen (+ 4-OHT) und unbehandelten Kontrollzellen (- 4-OHT) für die verschiedenen Fixierungszeitpunkte 24, 48 und 72 Stunden nach Entfernung des 4-OHT aus dem Kulturmedium. C) Repräsentative Beispiele von BrdU-positiven Zellkernen mit abnormer Kernmorphologie bei Lin9-defizienten MEFs 72 h nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung. BrdU-positive Zellkerne sind grün, BrdU-negative blau dargestellt.

3.1.3 Lin9-defiziente MEFs treten verzögert in die Mitose ein

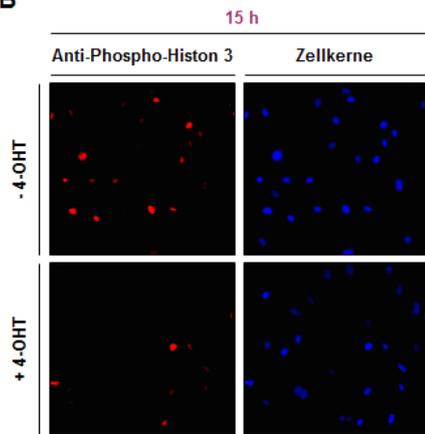
Zur näheren Charakterisierung der bei den Propidiumjodid-FACS-Analysen (REICHERT et al., 2010) und den kernmorphologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Anomalien Lin9-defizienter MEFs wurde der Wiedereintritt quieszenter MEFs in den Zellzyklus sowie dessen anschließendes Durchlaufen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen analysiert. Die Detektion mitotischer Zellen erfolgte dabei mit einem Antikörper, der spezifisch Histon 3 in einem an Serin 10 phosphorylierten Zustand bindet. Die Phosphorylierung von Histon 3 an Serin 10 beginnt in der späten G₂-Phase und ist in den meisten Zelllinien vor der Formierung der Prophase-Chromosomen komplettiert. Die Dephosphorylierung beginnt am Anfang der Anaphase und ist vor der Dekondensation der Chromosomen in der Telophase abgeschlossen (HENDZEL & BAZETT-JONES, 1997). Zur Detektion von S-Phase-Zellen wurde zusätzlich ein Antikörper gegen Bromuridin verwendet.

Jeweils $1,0 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurden in 6-Well-Platten auf Deckgläschen ausplattiert und am Folgetag durch Serum-Entzug in die G₀-Phase versetzt. Weitere 24 Stunden später wurde bei der Hälfte der Ansätze eine 48-stündige Behandlung mit 0,4 µM 4-OHT eingeleitet, während die andere Hälfte als Kontrollzellen unbehandelt blieb. Zeitgleich mit dem Ende der 4-OHT-Behandlung wurden die Zellen durch Zugabe von 20% FCS aus der G₀-Phase in den Zellzyklus entlassen. Nach 0 h, 12 h und danach dreistündlich wurde jeweils nach vorheriger einstündiger Behandlung mit 50 µM Bromuridin ein Deckgläschen mit 4-OHT-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen fixiert, die Immunfluoreszenz-Färbung wie im Kapitel 2.2.2.1 beschrieben durchgeführt und der prozentuale Anteil Anti-BrdU- und Anti-Phospho-Histon 3-positiver Zellkerne ermittelt. Hierzu wurden in drei unabhängigen Experimenten für jeden Zeitpunkt jeweils 300 bis 1200 4-OHT-behandelte und unbehandelte Kontrollzellen analysiert. In den Abbildungen 3.4D und E ist die Auswertung eines repräsentativen Experimentes dargestellt.

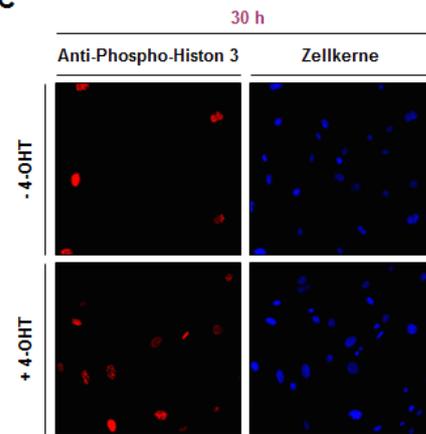
A



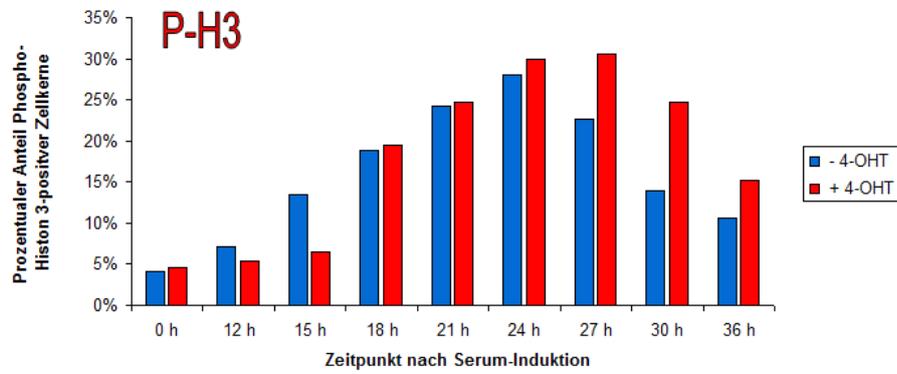
B



C



D



E

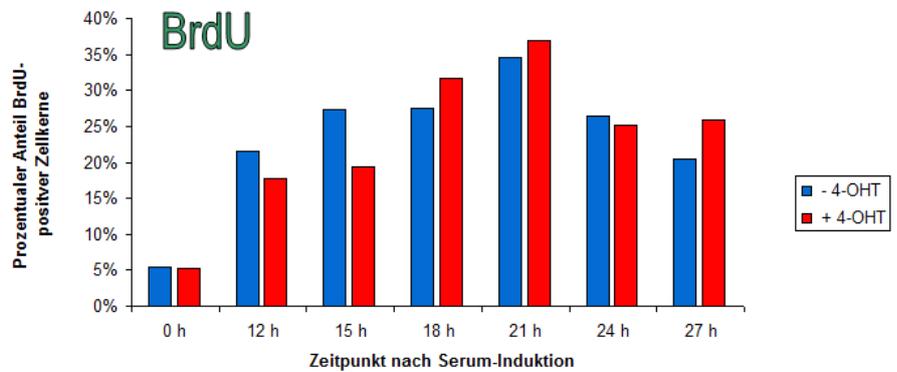


Abbildung 3.4 → Lin9-defiziente Zellen treten nach Synchronisation in der G₀-Phase verzögert in die Mitose ein

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) und C) Fotografische Dokumentation jeweils eines repräsentativen Bildausschnitts bei 4-OHT-behandelten MEFs und unbehandelten Kontrollzellen 15 h (B) bzw. 30 h (C) nach der Serum-Induktion. Im linken Bild sind die Anti-Phospho-Histon 3-positiven Zellkerne rot dargestellt. Im rechten Bild ist die Gesamtheit der Zellkerne durch Bisbenzimid blau angefärbt. D) Darstellung des prozentualen Anteils Anti-Phospho-H3-positiver Zellkerne an allen (Bisbenzimid-positiven) Zellkernen bei Lin9-defizienten Zellen (+ 4-OHT) und unbehandelten Kontrollzellen (- 4-OHT) im Zeitverlauf. Angegeben ist jeweils der Fixierungszeitpunkt in Stunden nach der Serum-Induktion. E) Darstellung des prozentualen Anteils Anti-BrdU-positiver Zellkerne an allen (Bisbenzimid-positiven) Zellkernen bei Lin9-defizienten Zellen (+ 4-OHT) und unbehandelten Kontrollzellen (- 4-OHT) im Zeitverlauf. Angegeben ist jeweils der Fixierungszeitpunkt in Stunden nach der Serum-Induktion.

Bei der Analyse der Zellen ohne Serum-Induktion (0 h-Werte) fanden sich jeweils nur etwa 4 bis 5% Anti-BrdU- und Anti-Phospho-H3-positiv Zellkerne, sodass von einer nahezu vollständigen Synchronisation der Zellen in der G₀-Phase ausgegangen werden kann. Nach 15 h waren bei den unbehandelten Kontrollzellen bereits 13,5% der untersuchten Kerne Anti-Phospho-H3-positiv, während bei den 4-OHT-behandelten Zellen zu diesem Zeitpunkt nur 6,4% der Kerne positiv für diesen *Marker* waren (Abbildung 3.4B). Nach 18 h waren die Werte mit 18,8% für die 4-OHT-behandelten und 19,5% für die unbehandelten Zellen wieder nahezu identisch. Nach 27 h nahm der Anteil der Anti-Phospho-H3-positiven Zellen bei den unbehandelten Kontrollzellen bereits wieder ab (22,7%), während er bei den 4-OHT-behandelten Zellen mit 30,5% das Maximum erreichte. Auch nach 30 (Abbildung 3.4C) und 36 Stunden lag der Anteil der Anti-Phospho-H3-positiven Zellen bei den 4-OHT-behandelten, Lin9-defizienten Zellen höher als bei den unbehandelten Kontrollzellen.

Beim Vergleich der 4-OHT-behandelten MEFs und der unbehandelten Zellen bei der Anti-BrdU-Immunfluoreszenz fanden sich für alle untersuchten Zeitpunkte weitgehend identische Prozentsätze. Insbesondere ergaben sich keine Anhaltspunkte für ein verzögertes Durchlaufen der S-Phase (Abbildung 3.4E).

Zusammengenommen deuten diese Studien auf eine Verzögerung in der G₂-Phase um etwa 3 Stunden bei Lin9-defizienten MEFs hin, während die G₁-Phase und die S-Phase im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen in etwa identischer Geschwindigkeit durchlaufen werden.

3.1.4 Lin9-defiziente MEFs zeigen multiple mitotische und zytokinetische Defekte

Nachdem die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Depletion von Lin9 in MEFs zu einer erheblichen Zunahme an binukleären Zellen und Zellen mit abnormer Kernmorphologie führt, sollte im Folgenden analysiert werden, ob Lin9-defiziente MEFs spezifische Unregelmäßigkeiten bei der Mitose oder der Zytokinese aufweisen. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen α -Tubulin und γ -Tubulin vorgenommen. γ -Tubulin ist ein ubiquitäres, hoch konserviertes Protein, das im *Microtubule organizing centre* (MTOC) an der Keimung neuer Mikrotubuli beteiligt ist und von entscheidender Bedeutung ist bei der Mediation der Verbindung zwischen Mikrotubuli und dem Zentrosom. Daher kann es bei der Analyse mitotischer Zellen als typisches *Markerprotein* zur Detektion des Zentrosoms verwendet werden. α -Tubulin ist als charakteristischer Bestandteil der Mikrotubuli unter anderem im Zytoskelett, aber auch im mitotischen Spindelapparat anzutreffen (DUTCHER, 2001). Durch die gleichzeitige Immunfluoreszenz-Darstellung von α -Tubulin und γ -Tubulin unter Verwendung von Zweitantikörpern mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Spektren ist es möglich, die Zentrosomen und den Spindelapparat gemeinsam zu betrachten.

Hierzu wurden jeweils $1,0 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs in 6-Well-Platten auf Deckgläschen ausplattiert und am Folgetag durch Serum-Entzug in der G₀-Phase arretiert. Weitere 24 Stunden später erfolgte bei der Hälfte der Ansätze eine 48-stündige Behandlung mit 0,4 μ M 4-OHT, während die andere Hälfte als Kontrollzellen unbehandelt blieb. Zeitgleich mit dem Ende der 4-OHT-Behandlung wurden die Zellen durch Zugabe von 20% FCS aus der G₀-Phase in den Zellzyklus entlassen. Nach 18, 24, 30 und 72 Stunden wurde jeweils ein Deckgläschen mit 4-OHT-behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen mit MeS-Methanol fixiert und die Immunfluoreszenzfärbung wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben vorgenommen. Zur Darstellung des Chromatins erfolgte eine Kernfärbung mit Bisbenzimid.

Bei der Analyse der Zellen am Fluoreszenz-Mikroskop fanden sich in der 4-OHT-behandelten Zellpopulation bereits zum 24 h-Zeitpunkt und somit schon bei der ersten Mitose nach der Lin9-Depletion und Serum-Induktion Zellen mit überzähligen (meist vier) Zentrosomen (Abbildung 3.5B, links). Nach 72 h zeigten sich zahlreiche Zellen mit abnormer Zentrosomenzahl und demnach multipolarem Spindelapparat in der Fraktion der Lin9-depletierten Zellen (Abbildung 3.5B, Mitte), während in der unbehandelten Kontrollpopulation derartige Veränderungen kaum beobachtet wurden. Weiterhin

fanden sich bei der Analyse von Zellen in der späten Mitose und Zytokinese in der 4-OHT-behandelten Fraktion diverse neu entstandene binukleäre Zellen oder Zellen mit Chromatin-Fragmenten zwischen den neu entstandenen Tochterzellen (Abbildung 3.5B, rechts).

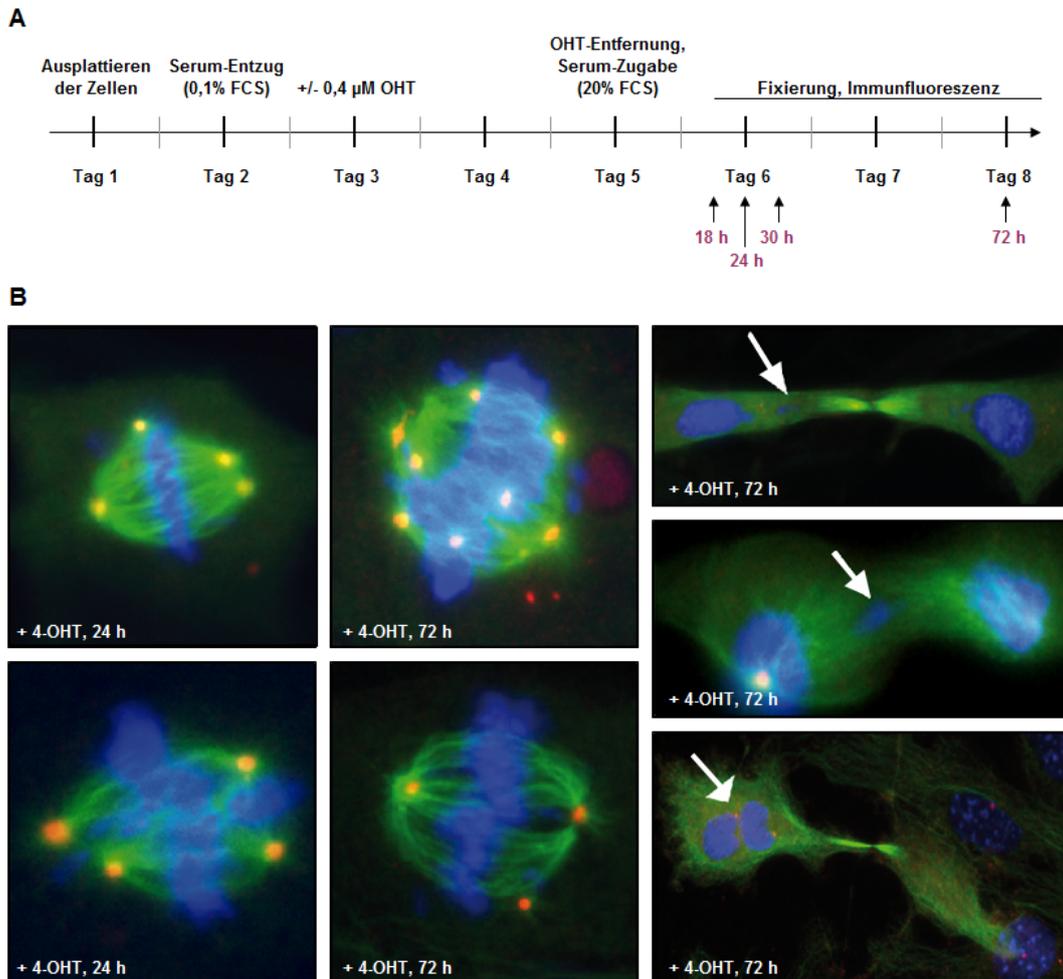


Abbildung 3.5 → Die Depletion von Lin9 führt zu überzähligen Zentrosomen und zu Zytokinese-Fehlern

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Repräsentative exemplarische Dokumentation der beobachteten überzähligen Zentrosomen (links und Mitte) bzw. der Zellen mit Zytokinese-Fehlern (rechts) bei Lin9-defizienten MEFs. Das Chromatin ist durch Bisbenzimid blau dargestellt, die Zentrosomen (γ -Tubulin) sind orange-rot fluoreszierend und der Spindelapparat sowie das Zytoskelett (α -Tubulin) sind grün fluoreszierend angefärbt. Die weißen Pfeile in der rechten Spalte kennzeichnen Chromatin außerhalb der Zellkerne der neu formierten Tochterzellen (oben rechts, Mitte rechts) bzw. eine neu entstandene binukleäre Zelle mit der noch assoziierten kernlosen zweiten Tochterzelle (unten rechts). Der Fixierungszeitpunkt ist angegeben in Stunden nach OHT-Entfernung und Serum-Induktion.

Um die Entstehung dieser mitotischen und zytokinetischen Aberrationen auf Einzelzellebene beobachten zu können, wurden mikroskopische *Time lapse*-Aufnahmen angefertigt. Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Chromatins wurden Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wie in Kapitel 2.2.1.11 beschrieben mit retroviralen Vektoren, die ein Histon 2B-GFP-Fusionsprotein tragen, infiziert. Anschließend wurden die Zellen auf 35 mm μ -Dishes passagiert und unter Verwendung eines Kultur-Einsatzes teilweise für 48 Stunden mit 400 nM 4-OHT behandelt, während ein anderer Teil als Kontrollzellen unbehandelt blieb. Die *Time lapse*-Aufzeichnung erfolgte am inversen Fluoreszenzmikroskop, wobei die Temperatur durch einen beheizbaren Objektisch mit Inkubatorkammer konstant gehalten wurde (siehe Kapitel 2.2.2.4). Im Abstand von 5 min wurden zuvor definierte Positionen mit Hilfe des motorisierten Objektisches angesteuert und GFP-Fluoreszenz- sowie Phasenkontrastaufnahmen generiert. Insgesamt wurde in zwei unabhängigen Durchläufen mit unterschiedlichen Ausgangszelllinien (von unterschiedlichen Embryonen) ein Zeitraum von ca. 54 Stunden, beginnend 24 h nach Zugabe von 4-OHT analysiert, wobei im 8- bis 14-stündigen Abstand neue Zellen verwendet wurden.

In den ersten Stunden des Untersuchungszeitraums fanden sich sowohl bei den unbehandelten Kontrollzellen als auch bei den Lin9-depletierten Zellen regelhafte Mitosen, bei denen nach Erreichen der Metaphasen-Konfiguration innerhalb von 30 min zunächst die Kernteilung und kurz darauf die Zytokinese ablief (Abb. 3.6B). Bei den unbehandelten Kontrollzellen, welche 48 Stunden später untersucht wurden, zeigte sich dasselbe Bild. Anhand der beobachteten Mitosen ergab sich kein Anhalt für eine signifikante Verlängerung der Mitosendauer oder für morphologische Unregelmäßigkeiten bei den Kern- bzw. Zellteilungen (Abb. 3.6C).

Im Gegensatz hierzu fanden sich zu diesem Zeitpunkt bei den 4-OHT-behandelten Zellen bei nahezu allen beobachteten Mitosen Aberrationen, die sich im Wesentlichen in drei Gruppen einteilen lassen. Zum einen wurden Zellen beobachtet, bei denen die eigentliche Kernteilung ohne erkennbare Auffälligkeiten verlief, die Zytokinese jedoch unvollständig blieb, sodass letztlich beide neu entstandenen Kerne in einer einzelnen Zelle verblieben (Abb. 3.6D, obere Zeile). Bei anderen Zellen wurde stattdessen eine fehlerhafte bzw. unregelmäßige Chromosomenverteilung bei der Mitose beobachtet, in Folge derer in einer der Tochterzellen nur wenige Kernfragmente oder einzelne Chromosomen verblieben. Häufig gingen diese Störungen der Segregation der entsprechenden Schwesterchromosomen mit der Beobachtung von Chromatinbrücken in der Anaphase einher (Abb. 3.6D, mittlere Zeile). Als Variante hiervon wurden Zellen

beobachtet, bei denen nach zunächst unauffälliger Meta- und früher Anaphase das gesamte Chromatin wieder aggregierte und keine distinkten Tochterkerne auszumachen waren (Abb. 3.6D, untere Zeile).

Vielfach gingen Veränderungen der zweiten und dritten Gruppe mit dem offensichtlichen anschließenden Absterben der Tochterzellen einher, erkennbar durch Verlust der typischen Zellmorphologie der Fibroblasten sowie Erlöschen der Fluoreszenz. Entstandene binukleäre Zellen hingegen wirkten in der Folge meist morphologisch stabil und behielten ihre Fluoreszenz. Da die Zellen nach 8 bis 14 Stunden ausgetauscht werden mussten, konnte bei keiner Zelle ein zweites Durchlaufen der Mitose beobachtet werden. Die Entstehung polynukleärer Zellen oder eine Mitose einer zuvor bereits binukleären Zellen wurden nicht beobachtet.

In der Gesamtbetrachtung dokumentieren sowohl die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Spindelapparates als auch die *Time lapse*-Aufzeichnungen, dass der Verlust von Lin9 mit einem breiten Spektrum an mitotischen und zytokinetischen Defekten einhergeht.

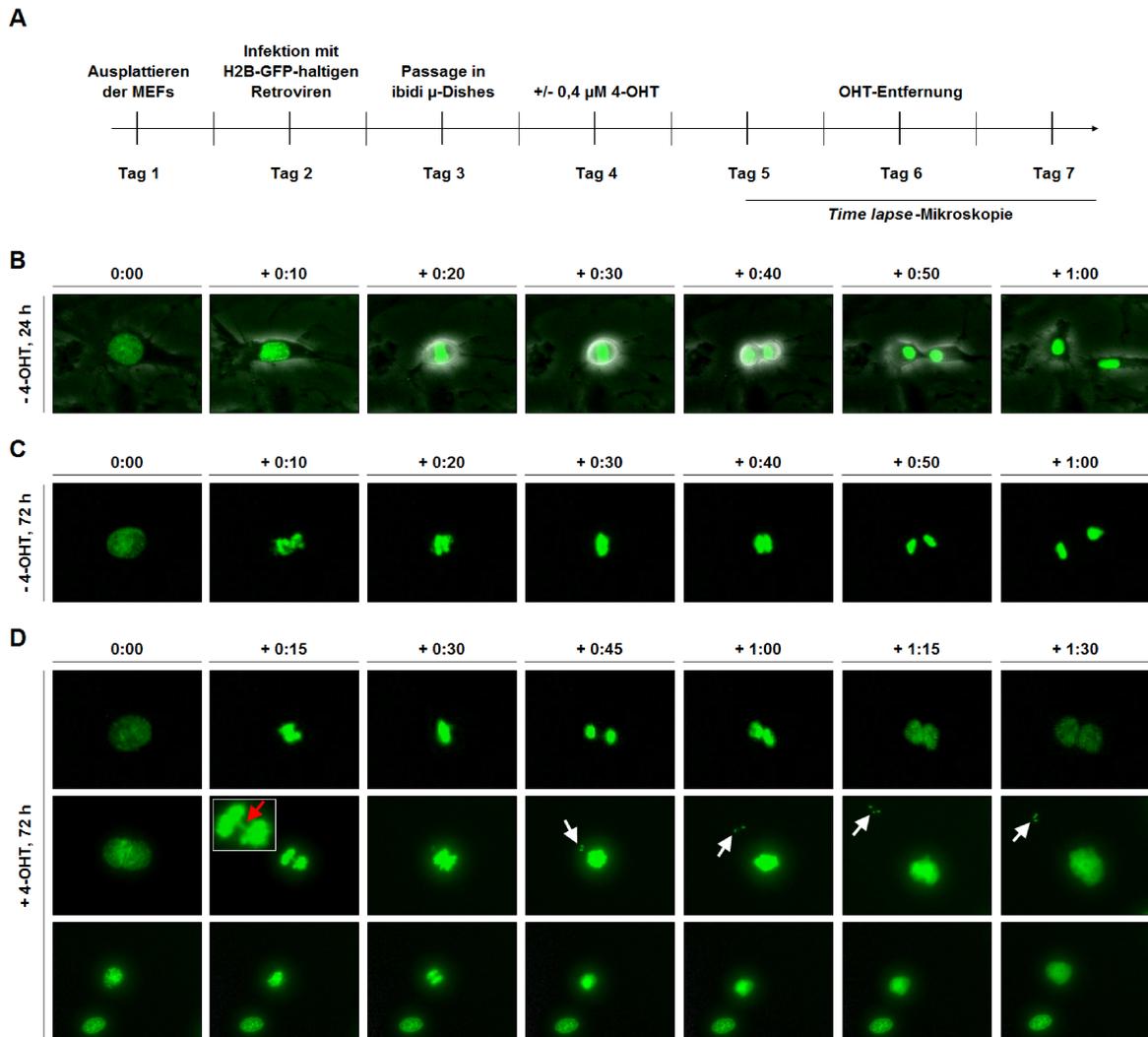


Abbildung 3.6 → Time lapse-Mikroskopie zur Dokumentation mitotischer und zytokinetischer Aberrationen

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Phasenkontrast-GFP-*Overlay*-Bildsequenz einer regelhaften Mitose bei einer unbehandelten Kontrollzelle zu Beginn des Beobachtungszeitraums (24 h nach 4-OHT-Zugabe bei den behandelten Zellen). C) GFP-Bildsequenz einer regelhaften Mitose bei einer unbehandelten Kontrollzelle am Ende des Beobachtungszeitraums (72 h nach 4-OHT-Zugabe bei den behandelten Zellen). D) GFP-Bildsequenzen von Mitosen Lin9-depletierter Zellen 72 h nach Zugabe von 4-OHT. Zur Optimierung der Erkennbarkeit von einzelnen Chromosomen und kleinen Kernfragmenten wurde auf die Überlagerung mit der Phasenkontrastaufnahme verzichtet. Weiße Pfeile in der mittleren Bildzeile kennzeichnen ein Kernfragment bzw. einzelne Chromosomen. Der rote Pfeil im vergrößerten Bildausschnitt markiert eine Chromosomenbrücke in der Anaphase.

3.1.5 Charakterisierung der SubG₁-Fraktion bei Lin9-defizienten MEFs

Bei Propidiumjodid-FACS-Analysen von Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs zeigte sich nach der Behandlung mit 4-OHT neben einer Zunahme von an- und polyploiden Zellen auch eine Zunahme der SubG₁-Fraktion (REICHERT et al., 2010). Um das Schicksal dieser Zellen näher zu untersuchen, wurden einerseits β -Galaktosidase-Färbungen zur Detektion seneszenten Zellen und andererseits durchflusszytometrische Analysen unter Verwendung von Annexin V als *Marker* für apoptotische Zellen durchgeführt.

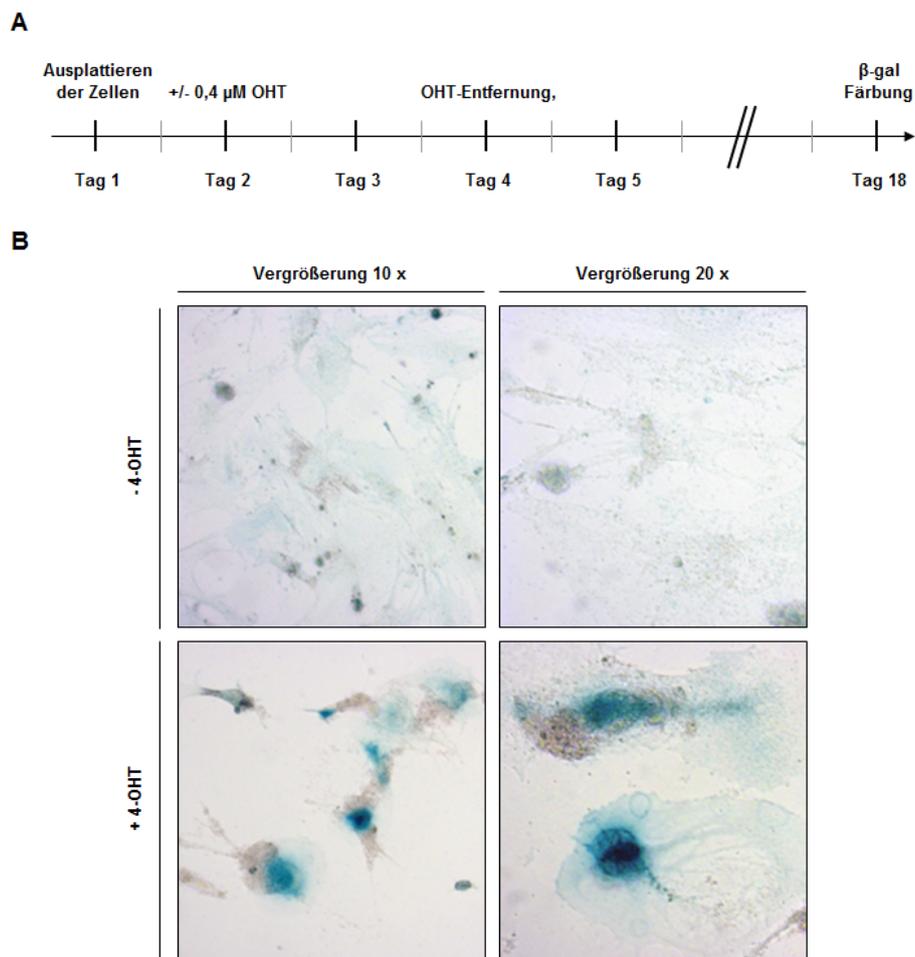


Abbildung 3.7 → Lin9-Defizienz führt zu einer Zunahme seneszenten Zellen

A) Schematische Darstellung des Ablaufes des Experimentes. B) Repräsentative Bildausschnitte in 10- und 20-facher Vergrößerung von unbehandelten Kontrollzellen (oben) und 4-OHT-behandelten MEFs (unten). Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme β -Galaktosidase-positiver Zellen mit breiter und flacher Morphologie (*flat cells*) nach Depletion von Lin9. (Die dargestellten Fotoaufnahmen wurden von N. REICHERT auf Basis eines gemeinsam durchgeführten Experimentes angefertigt).

Für die Darstellung seneszenten Zellen wurden jeweils $1,0 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs in Passage 2 auf 10 cm-Gewebekulturplatten ausplattiert und ab dem Folgetag für 48 Stunden mit $0,4 \mu\text{M}$ 4-OHT behandelt bzw. als Kontrollzellen unbehandelt belassen. In der Folge wurde jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen, ohne die Zellen zu passagieren. 14 Tage nach der Entfernung des 4-OHT wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.2.8 beschrieben zur Detektion der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase gefärbt und am Stereomikroskop bei 10- und 20-facher Vergrößerung fotografisch dokumentiert (Abbildung 3.7B). Dabei zeigte sich eine deutlich erhöhte Fraktion β -Galaktosidase-positiver Zellen mit breiter und flacher Morphologie (*flat cells*) in der Population der 4-OHT-behandelten und somit Lin9-depletierten Zellen, während sich bei den unbehandelten Kontrollzellen nahezu keine seneszenten Zellen fanden.

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde eine zweidimensionale FACS-Analyse unter Verwendung von Annexin V-FITC und Propidiumjodid vorgenommen. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das sich bei vitalen Zellen auf der Innenseite der Zytoplasmamembran befindet und während der Apoptose auf die Membranaußenseite transloziert wird. Durch Annexin V werden allerdings auch nekrotische Zellen dargestellt, da durch Nekrose die Zellplasmamembran durchlässig wird und Annexin V das auf der Innenseite der Membran befindliche Phosphatidylserin binden kann. Eine Differenzierung kann mit Hilfe von Propidiumjodid erfolgen, das nur in Zellen mit durchlässiger Membran (nekrotische Zellen), nicht aber in vitale Zellen oder apoptotische Zellen eindringen kann. Vitale Zellen sind daher Annexin V- und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin V-positiv und PI-positiv, während sich apoptotische Zellen Annexin V-positiv und PI-negativ darstellen.

Für die Untersuchung wurden jeweils $5,0 \times 10^4$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs pro *Well* in 6-*Well*-Gewebekulturplatten ausplattiert und die Hälfte der *Wells* nach 48 h für weitere 48 h mit $0,4 \mu\text{M}$ 4-OHT behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben geerntet, fixiert und mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Zur Bestimmung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen wurden 10000 Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Beim Vergleich der Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ergaben sich sowohl für die Fraktion der Annexin V-positiven Zellen (7,52% bei den 4-OHT-behandelten Zellen und 5,25% bei den unbehandelten Kontrollzellen) als auch für die Fraktion der Annexin V-positiven und PI-negativen Zellen (2,40% bei den 4-OHT-behandelten Zellen und 2,49% bei den unbehandelten Kontrollzellen) keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 3.8B).

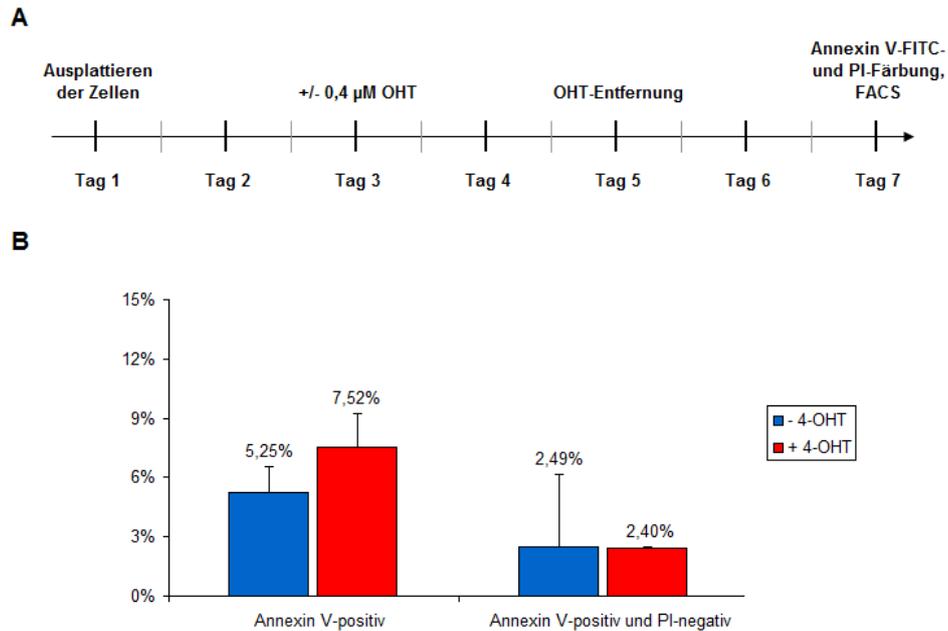


Abbildung 3.8 → Lin9-Defizienz führt nicht zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Das Diagramm zeigt den Prozentsatz der Annexin V-positiven Zellen sowie den Prozentsatz der Annexin V-positiven und PI-negativen (apoptotischen) Zellen bei Lin9-defizienten MEFs und unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (heteroskedastischer zweiseitiger t-Test).

In der Summe zeigen diese Untersuchungen, dass die Entstehung seneszenten Zellen zu der erhöhten SubG₁-Fraktion bei Lin9-defizienten Zellen maßgeblich beiträgt, während hingegen keine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden konnte.

3.2 Die Bedeutung von Lin9 bei der Genregulation

Um potentielle Zielgene des murinen Lin9 zu identifizieren, wurde durch REICHERT et al. (2010) eine *Microarray*-Analyse bei Lin9-defizienten MEFs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen vorgenommen. Dabei fanden sich 117 Gene, die bei Lin9-defizienten Zellen mindestens um Faktor 1,5 schwächer exprimiert waren und 81 Gene, die mindestens um Faktor 1,5 stärker exprimiert waren.

Unter den Genen, die sich nach Lin9-Depletion herabreguliert zeigten, befanden sich 30 Gene, die eine bekannte Funktion in der Mitose oder bei der Zytokinese besitzen. In Zusammenschau mit den zuvor beschriebenen Aberrationen Lin9-depletierter Zellen in Bezug auf die Zellzyklus-Kinetik, die Kernmorphologie, den Spindelapparat und den Ablauf der Zytokinese sollte die transkriptionelle Regulation dieser Gene im Folgenden näher untersucht werden. Dazu wurde die verminderte Expression der im *Array* detektierten potentiellen Lin9-Zielgene mit bekannter mitotischer oder zytokinetischer Funktion mit Hilfe der quantitativen RT-PCR verifiziert. Des Weiteren wurden die Expressionslevel beim Durchlaufen des Zellzyklus analysiert.

Unter den nach Lin9-Depletion stärker exprimierten Genen fanden sich andererseits 14 Gene, die eine bekannte Funktion bei DNA-Reparatur-Prozessen besitzen. Auch deren Expression wurde im Folgenden untersucht. Durch Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente sollten zusätzliche Erkenntnisse über die Mechanismen der transkriptionellen Regulation der Lin9-Zielgene gewonnen werden.

3.2.1 Die Depletion von Lin9 führt zur verminderten Expression von G₂/M-Genen

Zur Verifikation der im *Array* detektierten Zielgene erfolgten Expressionsanalysen mittels qPCR. Hierzu wurden jeweils $6,5 \times 10^5$ Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs auf 10 cm-Gewebekulturschalen ausplattiert. Am Folgetag wurde eine 48-stündige Behandlung mit 0,4 μ M 4-OHT bei der Hälfte der Platten begonnen, während die andere Hälfte als Kontrollzellen unbehandelt blieb. 12 h nach der Entfernung des 4-OHT wurde die RNA der Zellen isoliert, aufgereinigt und revers transkribiert. Die relative Expression einzelner Gene wurde mit der quantitativen *Real Time*-PCR nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ermittelt. Als Standardgen wurde Hprt1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) verwendet.

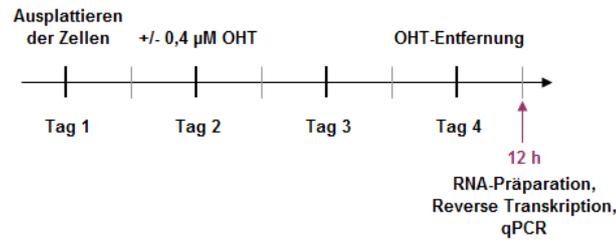
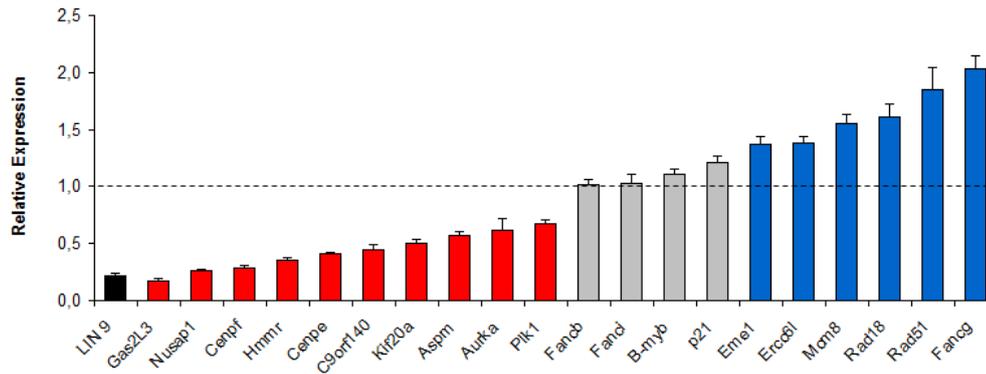
A**B**

Abbildung 3.9 → Die Depletion von Lin9 führt zur verminderten Expression von G₂/M-Genen

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Relative Expression der analysierten Gene in Lin9-depletierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Rote Säulen kennzeichnen eine um mindestens 30% verminderte Expression, blaue Säulen eine um mindestens 30% erhöhte Expression nach Lin9-*Knockout*. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben.

Für alle untersuchten Gene mit bekannter mitotischer oder zytokinetischer Funktion, die im *Array* bei Lin9-defizienten Zellen signifikant herabreguliert waren, konnte bei den qPCR-Experimenten eine deutlich verminderte Expression (relative Expressionslevel 0,17 – 0,67) in 4-OHT-behandelten MEFs verifiziert werden. Auch einige der im *Array* nach Lin9-Depletion heraufregulierten Gene, für die eine Funktion bei der DNA-Reparatur und DNA-Rekombination beschrieben ist, konnten bei den Genexpressionsanalysen verifiziert werden (u. a. Rad18, Mcm8). Für andere Gene wie Fanci oder p21 konnte hingegen keine signifikante Veränderung des Expressionslevels nach Lin9-Depletion gezeigt werden. Die relativen Expressionslevel sind in Abbildung 3.9B zusammengefasst.

Um die Expressionskinetik der identifizierten Lin9-Zielgene näher zu charakterisieren, wurden für ausgewählte Gene Expressionsanalysen im Zellzyklusverlauf nach Synchronisation durch Serum-Entzug durchgeführt. Hierzu wurden jeweils $1,0 \times 10^5$

Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs pro *Well* in 6-*Well*-Gewebekulturplatten ausplattiert und ab dem Folgetag für 72 h mit 0,1% FCS in der G₀-Phase synchronisiert. 24 Stunden nach Beginn der Synchronisation wurde bei der Hälfte der *Wells* eine 48-stündige Behandlung mit 0,4 µM 4-OHT eingeleitet. Anschließend wurden die Zellen mit 20% FCS in den Zellzyklus entlassen. Nach 0, 3, 6, 9, 15, 20, 24 und 30 Stunden wurde von jeweils einem *Well* 4-OHT-behandelter Zellen sowie unbehandelter Kontrollzellen RNA mit Hilfe der TRIzol-Methode (siehe Kapitel 2.2.3.2) aufgereinigt. Die RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die relative Expression für jeden untersuchten Zeitpunkt mit der quantitativen *Real Time*-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10B zusammengefasst.

Es zeigte sich für Lin9 bei allen untersuchten Zeitpunkten eine deutlich verminderte Expression nach 4-OHT-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Bei den Zielgenen mit mitotischer oder zytokinetischer Funktion (*Aspm*, *Nusap*, *Cenpf*, *Plk1* und *Gas2L3*) lagen die Expressionslevel in Lin9-depletierten Zellen und in unbehandelten Kontrollzellen bei den frühen Zeitpunkten (0 h bis 15 h) im Verhältnis zu den bei asynchronen Zellen erhobenen Werten relativ nahe beisammen. Dahingegen war bei den 20 h-, 24 h- und 30 h-Werten für die unbehandelten Kontrollzellen ein signifikanter Anstieg der Expression (Faktor 2,5 bis 4) zu verzeichnen, während der Anstieg bei den 4-OHT-behandelten Zellen deutlich geringer ausfiel. Aus den in Abbildung 3.4D und E dargestellten Analysen zur Zellzykluskinetik ist bekannt, dass zu diesen Zeitpunkten der Hauptanteil der synchronisierten Zellen in die Mitose eintritt bzw. diese durchläuft. Vor diesem Hintergrund deuten die bei den Expressionsanalysen erhobenen Daten darauf hin, dass Lin9 eine essentielle Bedeutung für die Aktivierung bzw. Expression mitotischer Gene in der G₂- bzw. M-Phase besitzt.

Im Gegensatz hierzu fand sich für *Rad51* als Vertreter der nach Lin9-Depletion verstärkt exprimierten Gene mit bekannter Funktion bei der DNA-Reparatur vor allem bei den 15-, 20- und 24-Stunden-Zeitpunkten eine etwas stärkere Expressionszunahme in 4-OHT-behandelten Zellen. Für *Fancg*, das bei asynchronen MEFs nach Lin9-Depletion am stärksten heraufregulierte Gen, zeigte sich nahezu kein Expressionsunterschied zwischen den Lin9-defizienten Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen.

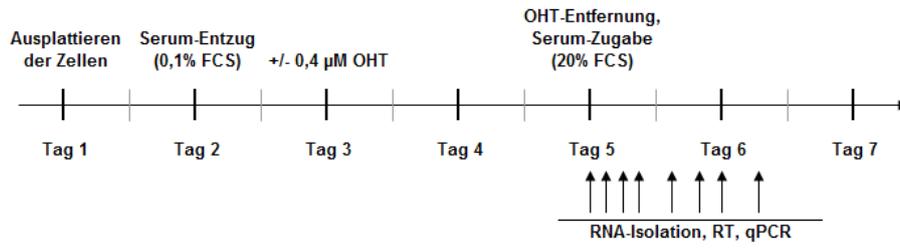
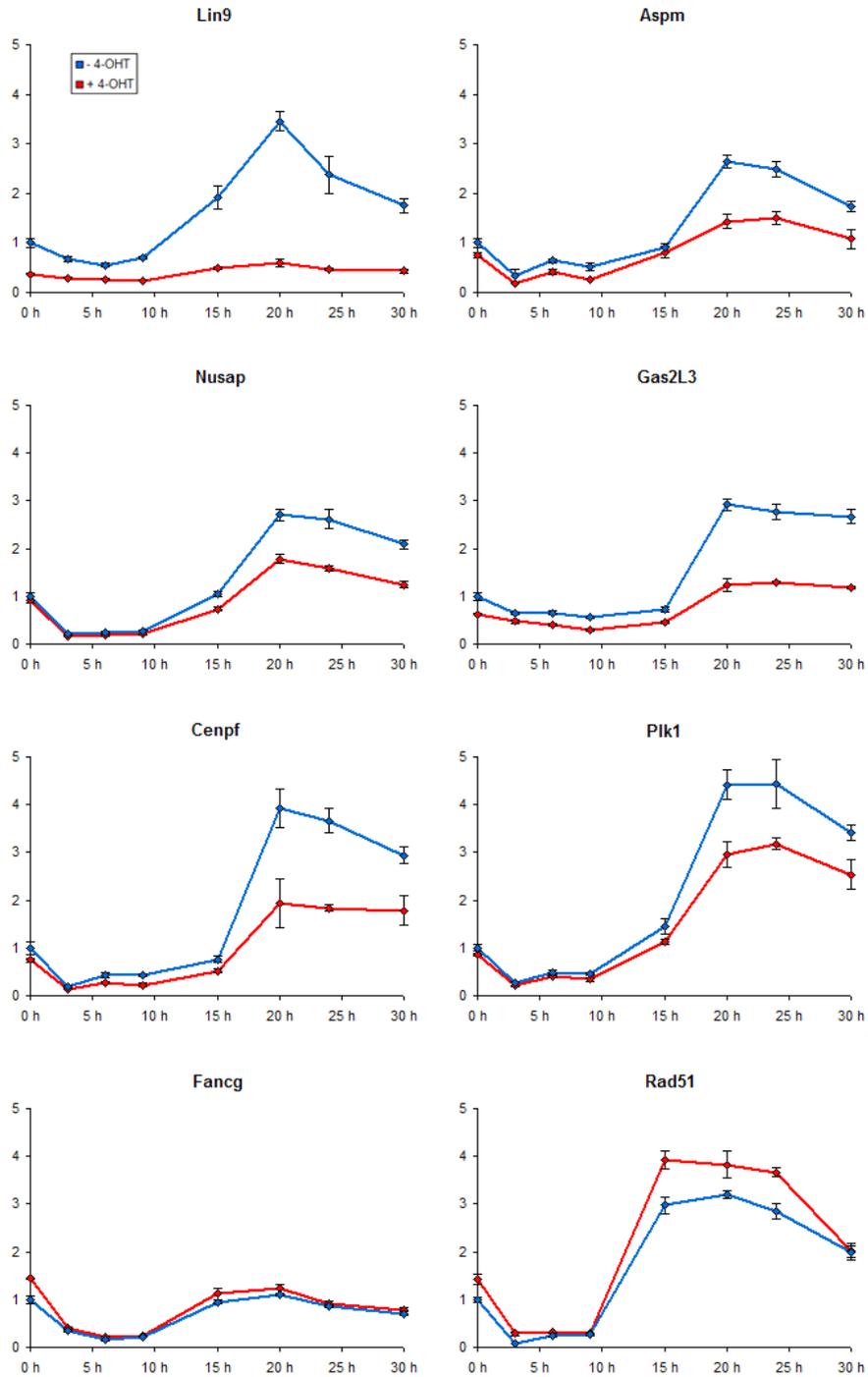
A**B**

Abbildung 3.10 → Expressionsanalysen von Lin9-Zielgenen nach Synchronisation in der G₀-Phase durch Serum-Entzug

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. (B) Darstellung der relativen Genexpression beim Durchlaufen des Zellzyklus nach Synchronisation in der G₀-Phase. Die Stunden-Angaben bezeichnen den Zeitpunkt nach Entlassen der Zellen in den Zellzyklus durch Zugabe von DMEM / 20% FCS. Alle relativen Expressionslevel wurden auf den 0 Stunden-Zeitpunkt bei den unbehandelten Kontrollzellen normiert. Die Analyse erfolgte jeweils in Triplikaten. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben.

3.2.2 Lin9 bindet an die Promotoren mitotischer Zielgene und nimmt Einfluss auf posttranslationale Histon-Modifikationen

Im cDNA-*Microarray* und bei den qPCR-basierten Expressionsanalysen zeigte sich, dass nach Lin9-Depletion zahlreiche Gene mit mitotischer Funktion herabreguliert sind und wiederum eine andere Population von Genen verstärkt exprimiert wird. Um die Frage zu adressieren, ob Lin9 direkt an die Promotoren der identifizierten Zielgene bindet oder ob die Regulation indirekt erfolgt, wurden Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) unter Verwendung eines Lin9-Antikörpers durchgeführt.

Weiterhin wurden spezifische Antikörper zur Detektion von posttranslationalen Chromatin-Modifikationen (Histon 4-Acetylierung, Histon 3-Lysin 4-Trimethylierung) eingesetzt. Das Nukleosom als Grundeinheit des Chromatins besteht neben der DNA aus einem Histon-Oktamer, das jeweils zwei Histonproteine 2A, 2B, 3 und 4 aufweist. Posttranslationale Modifikationen der aus der globulären Grundstruktur der Histone herausragenden Lysin-reichen Seitenketten stellen einen typischen Mechanismus der Regulation der transkriptionellen Aktivität des entsprechenden DNA-Abschnitts dar (KOUZARIDES, 2007). Die Acetylierung an Lysin-Resten der Histone führt dabei zur Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins und demnach zur Verringerung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Lysin des Histons und der DNA. Hierdurch kommt es zu einer Lockerung der Chromatinstruktur, wodurch Transkriptionsfaktoren an die DNA binden können. In der Regel führt eine Acetylierung von Histon 4 in der Promoter-Region daher zu einer gesteigerten Transkription des entsprechenden Gens. Histon-Methylierungen an Lysin- oder Arginin-Resten können in Abhängigkeit von der Lokalisation im jeweiligen Histon die Transkription des entsprechenden Gens sowohl aktivieren als auch reprimieren. Die Trimethylierung an Lysin 4 von Histon 3 ist bei höheren Eukaryonten als transkriptionell aktivierende Histon-Modifikation beschrieben (SCHNEIDER et al., 2004; KOUZARIDES, 2007).

Zur Durchführung der CHIP-Experimente wurde das Chromatin von 48 h mit 0,4 μ M 4-OHT behandelten Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs sowie unbehandelten Kontrollzellen mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern bzw. mit einem unspezifisch bindenden IgG-Antikörper immunpräzipitiert und aufgereinigt. Die gebundenen Chromatin-Fragmente wurden unter Verwendung spezifischer Primer, die im Bereich der Promoter-Region von Nusap, Aspm, Fang, Rad51 sowie Gapdh als Kontrollgen binden, mit der quantitativen *Real Time*-PCR nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 zusammengefasst.

Bei den unbehandelten Kontrollzellen konnte für den Lin9-Antikörper eine im Vergleich zu IgG 11,5- bis 20-fache Erhöhung des Anteils gebundener Chromatin-Fragmente für die Promotoren von Nusap, Aspm und Rad51 gezeigt werden. Bei Fancg war die Anreicherung im Vergleich zu IgG lediglich 2,6-fach. Für die Promotoren aller vier untersuchten Zielgene, nicht jedoch für den Gapdh-Promoter (Negativ-Kontrolle) ergab sich ein Rückgang des Anteils der gebundenen Chromatin-Fragmente um 39 bis 65% nach Depletion von Lin9 durch Behandlung mit 4-OHT.

Beim Nachweis von acetyliertem Histon 4 zeigte sich ein Rückgang der Anreicherung um 31% für den Aspm-Promoter und um 49% für den Nusap-Promoter bei 4-OHT-behandelten MEFs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Für Fancg und Rad51 fand sich hingegen eine Zunahme der Anreicherung um 63% bzw. 78% nach Lin9-Depletion. Für Histon 3 Lysin 4-me3 wurde bei den Promotoren der mitotischen Zielgene Aspm und Nusap nach 4-OHT-Behandlung eine Abnahme der Anreicherung um 39% bzw. 27% beobachtet, während die Unterschiede für Fancg und Rad51 innerhalb der Standardabweichung lagen.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Lin9 direkt an die untersuchten Promotoren bindet und die beobachtete Reduktion des Expressionslevels der mitotischen Lin9-Zielgene zumindest teilweise auf eine Abnahme aktivierender posttranslationaler Histon-Modifikationen zurückzuführen sind, während bei den nach 4-OHT-Behandlung verstärkt exprimierten Zielgenen Fancg und Rad51 in Lin9-defizienten Zellen ein Rückgang der Acetylierung von Histon 4 im Promoter-Bereich beobachtet wurde.

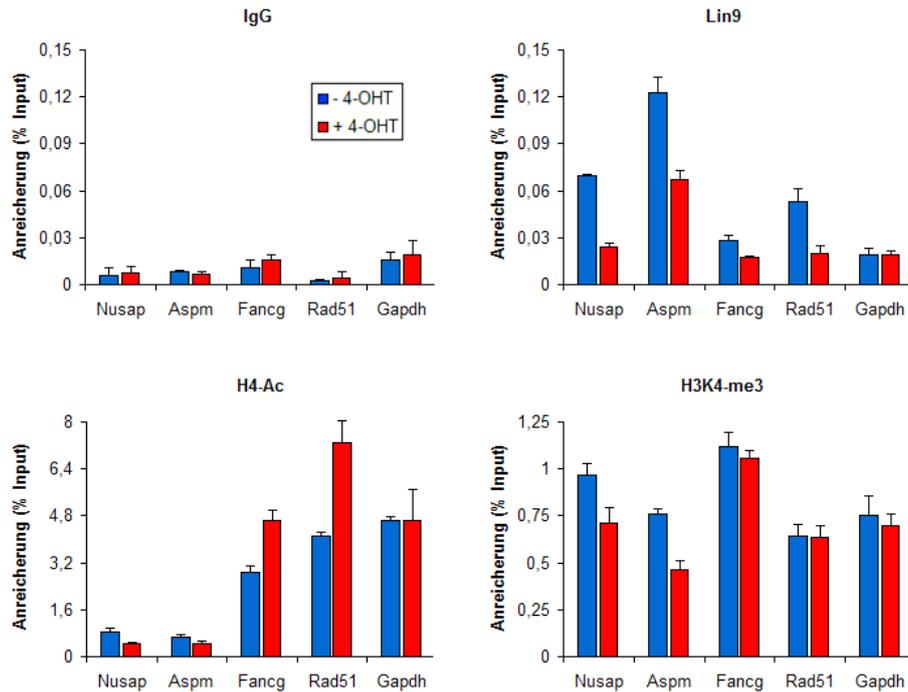


Abbildung 3.11 → Lin9 bindet an die Promotoren mitotischer Zielgene und nimmt Einfluss auf posttranslationale Histon-Modifikationen

Der Nachweis von Promoter-gebundenem Lin9 sowie von acetyliertem Histon 4 oder an Lysin 4 trimethyliertem Histon 3 erfolgte mit der Chromatin-Immunpräzipitations-Methode. Hierzu wurde das Chromatin von 48 h mit 0,4 μM 4-OHT behandelten Lin9 *fl/fl creER^{T2}*-MEFs sowie unbehandelten Kontrollzellen mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern bzw. mit einem unspezifisch bindenden IgG-Antikörper immunpräzipitiert und aufgereinigt. Die gebundenen Chromatin-Fragmente wurden mit der quantitativen *Real Time*-PCR nachgewiesen. Angegeben ist der Anteil der gebundenen Chromatin-Fragmente in % des *Inputs*. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der PCR-Triplikate an. Die ChIP-Analysen wurden für jedes Gen und jeden Antikörper mehrfach durchgeführt, basierend auf Chromatin von unterschiedlichen Ausgangszellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

3.3 Charakterisierung immortalisierter Lin9-defizienter MEFs

Bei der phänotypischen Analyse von 4-OHT-behandelten Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurde im Langzeitverlauf eine Zunahme von seneszenten Zellen beobachtet. Gegenstand der nachfolgend dargestellten Untersuchungen war die Klärung des Schicksals dieser Zellen nach Immortalisierung mit SV40 Large T. Das Large T-Antigen bindet multiple Zellzyklus- und Transkriptions-Regulatoren und inaktiviert insbesondere das Retinoblastom-Protein (pRB) und das p53-Tumorsuppressor-Protein, wodurch die zellulären Seneszenzmechanismen durchbrochen werden.

Zur Charakterisierung immortalisierter 4-OHT-behandelter Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurde das Wachstum der Zellen untersucht, Propidiumjodid-FACS-Profile zur Beurteilung der chromosomalen Stabilität erstellt und der binukleäre Phänotyp analysiert. Weiterhin erfolgten Genexpressionsanalysen. Zur Klärung der Fragestellung, ob der Verlust von Lin9 in Anbetracht der dokumentierten mitotischen Aberrationen und der damit einhergehenden Beeinträchtigung der genomischen Stabilität auch zur onkogenen Transformation beiträgt, wurden Transformations-Assays im Weichagar durchgeführt.

3.3.1 Auch in Gegenwart von Onkogenen ist Lin9 essentiell für das Zellwachstum

Um das Wachstumsverhalten von Lin9-depletierten immortalisierten MEFs im Vergleich zu unbehandelten immortalisierten MEFs untersuchen zu können, wurden durch HAUSER et al. (2011) Wachstumskurven erstellt. Dabei zeigte sich ein deutliches, aber nicht vollständiges Wachstumsdefizit von immortalisierten Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs nach Behandlung mit 4-OHT. Zur weiteren Quantifizierung und zur Klärung der Frage, ob Lin9-defiziente MEFs nach Passage mit hoher Verdünnung zu Kolonien heranwachsen können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Kolonie-Bildungs-Assays durchgeführt. Hierfür wurden zuvor für 48 h mit 4-OHT behandelte, Large T-immortalisierte Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs und unbehandelte immortalisierte Kontrollzellen in einer Verdünnungsreihe auf 10 cm-Gewebekulturschalen ausplattiert und die entstandenen Kolonien nach 14 Tagen mit Kristallviolett angefärbt.

Bei den unbehandelten Kontrollzellen waren nach diesem Zeitraum zahlreiche, große und teilweise konfluente Kolonien nachweisbar, während bei den Lin9-depletierten Zellen nur vereinzelt Kolonien detektiert wurden (Abbildung 3.12B und C). Diese Beobachtungen unterstreichen, dass Lin9 auch in Anwesenheit des Large T-

Onkogens für das Zellwachstums von essentieller Bedeutung ist. Sie zeigen jedoch auch, dass einzelne Zellen trotz des Verlustes von Lin9 die Fähigkeit behalten, zu Kolonien heranzureifen. Dies deutet darauf hin, dass sich diese Zellen an den Verlust von Lin9 adaptieren können.

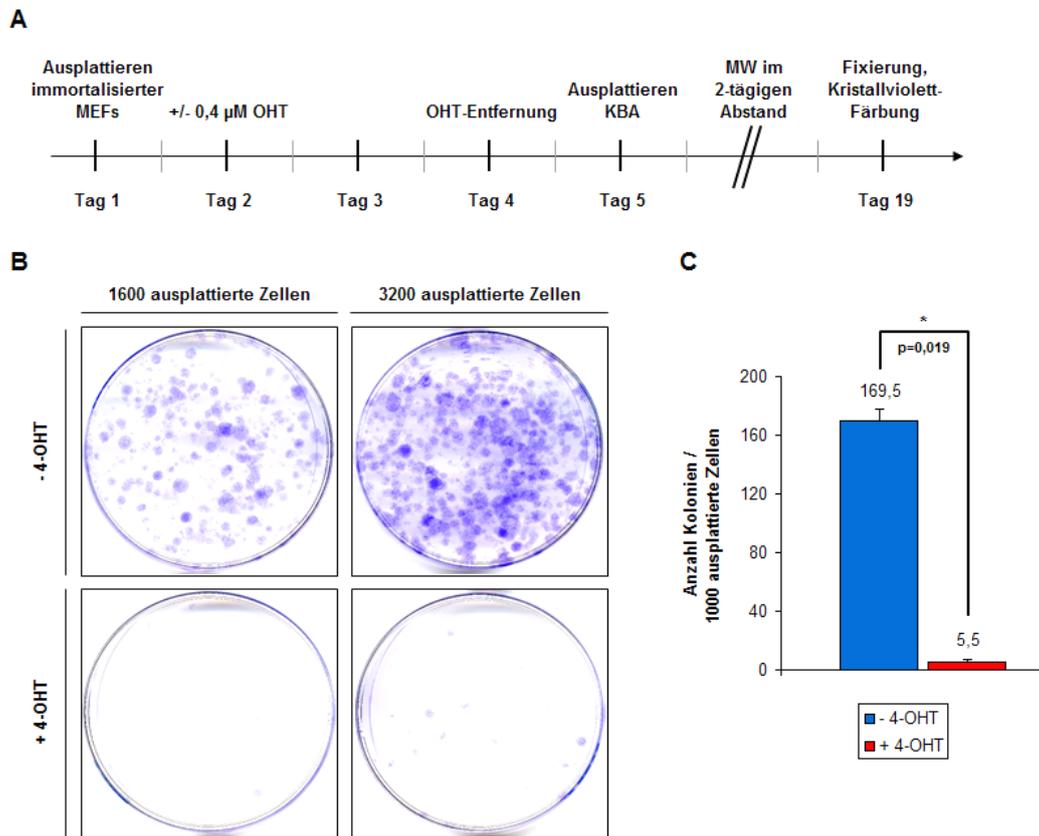


Abbildung 3.12 → Kolonie-Bildungs-Assay von Large T-immortalisierten Lin9 fl/fl creERT²-MEFs

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Fotografische Dokumentation der nach 14 Tagen entstandenen Kolonien auf jeweils einer repräsentativen 10 cm-Schale für 4-OHT-behandelte Zellen und unbehandelte Kontrollzellen unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Ausgangszellzahlen. C) Anhand von Platten mehrerer Verdünnungsstufen wurde die entstandene Anzahl an Kolonien (gewertet ab 2 mm Ø) pro 1000 ausplattierten Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Ein Vergleich der erhobenen Werte mit einem zweiseitigen gepaarten t-Test ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Lin9-defizienten und unbehandelten immortalisierten MEFs ($p = 0,019$).

3.3.2 Depletion von Lin9 bei immortalisierten Zellen führt zu chromosomaler Instabilität und zu onkogener Transformation

Zur näheren Charakterisierung der Auswirkungen der Kombination aus Lin9-Verlust und onkogenem Stress, wurden Zell-Pools Lin9-defizienter immortalisierter MEFs sowie Zelllinien, die aus den beim Kolonie-Bildungs-Assay entstandenen Kolonien expandiert wurden, vergleichend untersucht. Insbesondere sollte analysiert werden, ob die Large T-Immortalisierung neben der partiellen Kompensation des Wachstumsdefizits auch auf andere phänotypische Merkmale des Lin9-Verlustes und insbesondere auf die genomische Stabilität Einfluss nimmt.

Zunächst wurde der binukleäre Phänotyp bei Large T-immortalisierten MEFs untersucht. Hierzu wurden Large T-immortalisierte und 4-OHT-behandelte bzw. unbehandelte Zell-Pools mit Bisbenzimid gefärbt. Dabei fand sich ein Anteil binukleärer Zellen von 24,8% bei den immortalisierten Lin9-depletierten Zellen bzw. 6,0% bei den unbehandelten immortalisierten Kontrollzellen (Abbildung 3.13A). Die Prozentsätze liegen damit ungefähr in der Größenordnung, die auch bei primären MEFs beobachtet wurde.

Um einen genaueren Eindruck von den Auswirkungen der Kombination aus Lin9-Depletion und Large T-Immortalisierung auf die chromosomale Stabilität und Zellzyklusverteilung zu erhalten, wurden PI-FACS-Profile der Zell-Pools 48 h nach Entfernung des 4-OHT erstellt. Es fand sich für die unbehandelten immortalisierten Kontrollzellen ein Zellanteil von 38,0% in der G₁-Phase, 3,1% in der S-Phase und 44,6% in der G₂M-Phase. 12,7% der Lin9-positiven Zellen waren polyploid (> 4n), während sich bei 1,6% der Zellen ein DNA-Gehalt von < 2n (SubG₁) fand. Mit Ausnahme des etwas erhöhten Anteils polyploider Zellen lag somit eine zu den bei primären MEFs beobachteten Werten ähnliche Zellzyklusverteilung vor. Im Gegensatz hierzu waren bei den Lin9-depletierten MEFs nur 13,1% der Zellen der G₁-Phase, 4,8% der S-Phase und 38,8% der G₂M-Phase zuzuordnen, während sich 38% polyploide Zellen fanden und 5,5% Zellen einen SubG₁-DNA-Gehalt aufwiesen.

Vergleichend hierzu wurden die aus dem Kolonie-Bildungs-Assay erhaltenen Kolonien expandiert und ebenfalls PI-FACS-Profile zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung erstellt. Hierbei zeigte sich für die Lin9-defizienten Zelllinien eine noch erheblichere Verschiebung der Zellzyklusverteilung in den polyploiden Bereich, während nahezu keine Zellen mit einem 2n-DNA-Gehalt nachgewiesen wurden (Abbildung 3.13C). Für die unbehandelten, immortalisierten Kontrollzellen zeigte sich eine Zellzyklusverteilung,

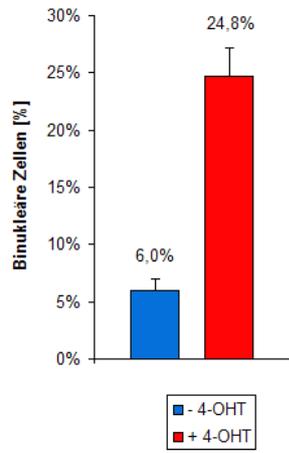
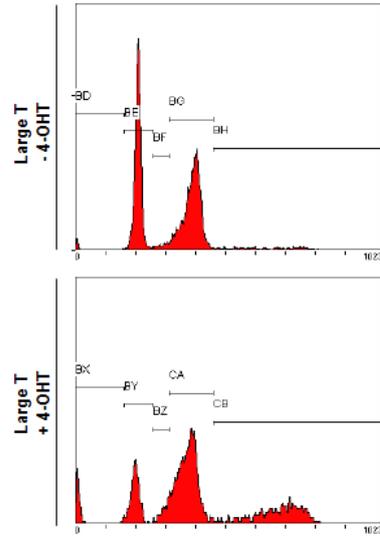
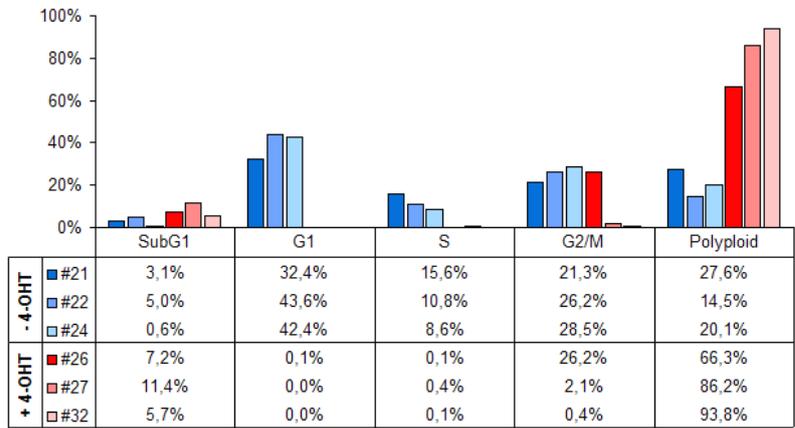
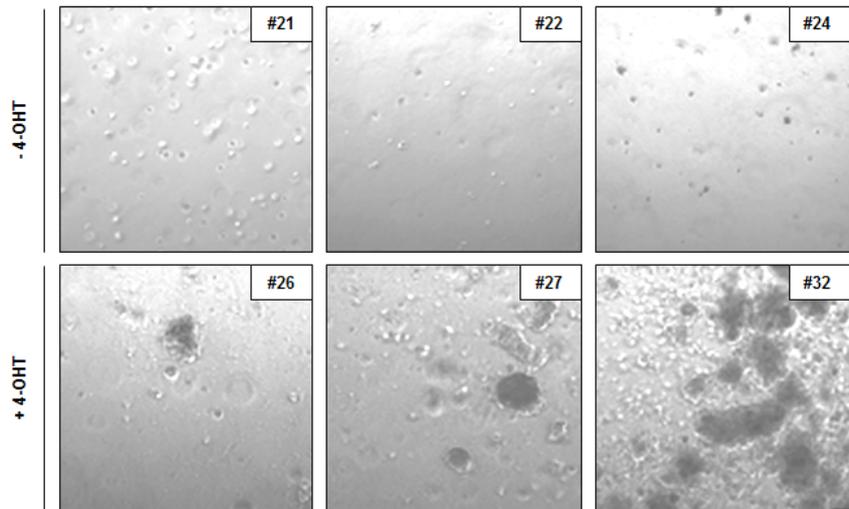
die annähernd derjenigen von primären MEFs entspricht. Diese Ergebnisse dokumentieren, dass Zellen, die sich nach Immortalisierung an den Verlust von Lin9 adaptieren und zu expandierbaren Kolonien heranwachsen können, eine erhebliche Poly- und Aneuploidie aufweisen.

Da die Aneuploidie zu den zentralen Charakteristika von Tumorzellen gehört, sollte im Folgenden die onkogene Transformation von immortalisierten Lin9-positiven und Lin9-defizienten MEFs wie in Kapitel 2.2.1.13 beschrieben mittels Weichagar-Assays untersucht werden. Abbildung 3.13D zeigt eine repräsentative Dokumentation der nach 14 Tagen gebildeten Kolonien. Während bei den Lin9-positiven Zelllinien nur Einzelzellen und wenige kleine Kolonien im Weichagar detektierbar waren, zeigte sich bei den Lin9-depletierten Zellen eine Substrat-unabhängige Bildung großvolumiger Kolonien im Weichagar. Diese Beobachtung gilt als typisches Merkmal onkogen transformierter Zellen (HAMBURGER & SALMON, 1977).

Zusammengenommen konnte bei der Analyse Lin9-defizienter immortalisierter MEFs gezeigt werden, dass das Durchbrechen der durch den Lin9-Verlust induzierten Seneszenzmechanismen durch das Large T-Antigen mit hochgradiger chromosomaler Instabilität, An- und Polyploidie, Entstehung binukleärer Zellen und onkogener Transformation einhergeht.

Abbildung 3.13 → Die Kombination von Lin9-Verlust und onkogenem Stress führt zu chromosomaler Instabilität und zu onkogener Transformation

A) Bestimmung des Anteils binukleärer Zellen bei Lin9-defizienten immortalisierten MEFs und unbehandelten immortalisierten Kontrollzellen auf Basis einer mikroskopischen Auszählung von 500 bis 700 Zellen. Das Experiment wurde zwei Mal mit unabhängigen Zell-Pools von verschiedenen Ausgangszelllinien durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte angegeben und die Standardabweichungen durch Fehlerbalken dargestellt. B) PI-FACS-Profile immortalisierter Lin9-positiver und Lin9-defizienter MEFs 48 h nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung. C) Prozentuale Verteilung der Zellzyklusprofile (PI-FACS) der Zelllinien, die aus den beim Kolonie-Bildungs-Assay erhaltenen Kolonien expandiert wurden. D) Transformations-Assays im Weichagar von den aus den Kolonien expandierten Zelllinien. Gezeigt ist eine repräsentative Dokumentation der nach 14 Tagen entstandenen Kolonien. Die angegebenen Nummern (#21-32) beziehen sich auf die interne Nummerierung der Kolonien bzw. Zelllinien. Die experimentellen Arbeiten für die in Abbildung 3.13D gezeigte Auswertung wurden überwiegend von S. HAUSER durchgeführt.

A**B****C****D**

3.3.3 Expression der Lin9-Zielgene in immortalisierten MEFs

Analog zu den Beobachtungen in primären MEFs fand sich bei Lin9-defizienten Large T-immortalisierten MEFs eine Verschiebung der Zellzyklusverteilung mit starker Zunahme polyploider und binukleärer Zellen einhergehend mit einem signifikanten Wachstumsdefekt. Bei primären MEFs waren diese Veränderungen vor allem auf ein verändertes Genexpressionsprofil nach Depletion von Lin9 mit einer Abnahme der Expression von Genen mit mitotischer oder zytokinetischer Funktion zurückzuführen. Zur Charakterisierung der Genexpression in immortalisierten MEFs wurden einerseits im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Zell-Pools vor dem Ausplattieren der Kolonie-Bildungs-Assays und andererseits durch HAUSER et al. (2011) die einzelnen resultierenden Kolonien hinsichtlich der Expression der Lin9-Zielgene untersucht. Im Vordergrund standen dabei insbesondere die Fragen, ob sich das Expressionsprofil der Lin9-Zielgene nach Lin9-Depletion in immortalisierten MEFs im Vergleich zu primären MEFs unterscheidet und ob sich Erklärungsansätze finden, weshalb es einzelnen Zellen trotz des Verlustes von Lin9 möglich ist zu proliferieren und zu Kolonien heranzureifen.

Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs wurden mit einem Large T-haltigen retroviralen Vektor infiziert und für 10 Tage mit Neomycin selektioniert. Anschließend wurde eine 48-stündige Behandlung mit 0,4 µM 4-OHT bei der Hälfte der erhaltenen Platten vorgenommen, während die andere Hälfte als Kontrollzellen unbehandelt blieb. 12 Stunden nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung – zum selben Untersuchungszeitpunkt wie bei den primären MEFs – wurde die RNA der Zellen aufgereinigt, mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und die relative Expression der Zielgene mit der quantitativen *Real Time*-PCR ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 zusammengefasst.

Es zeigte sich für die bei primären MEFs identifizierten mitotischen und zytokinetischen Lin9-Zielgene bei nahezu identischer Effizienz der Lin9-Depletion eine um 43 bis 59% verminderte Expression nach dem Verlust von Lin9. Die Expressionslevel dieser Gene lagen somit teilweise über den bei den primären MEFs beobachteten Werten (Gas2L3, Nusap1, Cenpf), für andere Gene wiederum war die Expression nach Verlust von Lin9 etwas stärker herabreguliert als bei primären MEFs (Aurka, Plk1). In der Gesamtschau zeigte sich bei Lin9-defizienten immortalisierten MEFs für die mitotischen Zielgene ein zu den Analysen bei primären MEFs ähnliches Expressionsprofil. Das Large T-Antigen ist demnach nicht in der Lage, die durch Lin9-Depletion hervorgerufene verminderte Expression der mitotischen Zielgene zu kompensieren.

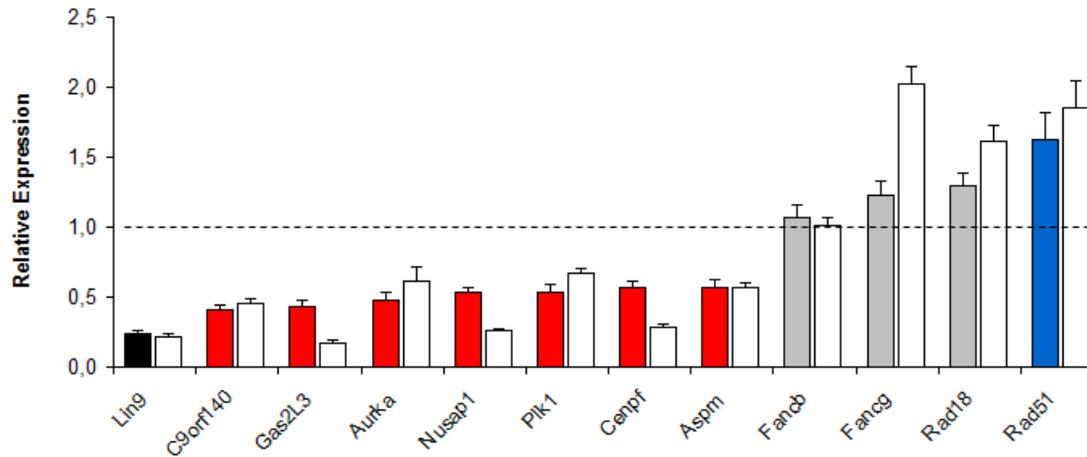


Abbildung 3.14 → Expression der Lin9-Zielgene in immortalisierten MEFs nach Verlust von Lin9

Das Diagramm zeigt die relative Expression ausgewählter Lin9-Zielgene in Lin9-depletierten immortalisierten MEFs im Vergleich zu unbehandelten immortalisierten Kontrollzellen. Rote Säulen kennzeichnen eine um mindestens 30% verminderte Expression, blaue Säulen eine um mindestens 30% verstärkte Expression nach Lin9-Knockout. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben. Die weißen Säulen zeigen zum Vergleich die jeweiligen Werte, die bei primären MEFs ermittelt wurden (Kapitel 3.2.1).

Die nach Lin9-Depletion bei primären MEFs verstärkt exprimierte Gene mit bekannter Funktion bei der DNA-Reparatur und Rekombination waren bei immortalisierten MEFs nach Lin9-Depletion deutlich schwächer heraufreguliert. Lediglich für Rad51 zeigte sich eine relative Expression von 1,63.

In deutlichem Kontrast zu den erhobenen Werten konnte für die nach Lin9-Depletion im Kolonie-Bildungs-Assay entstandenen Kolonien 14 Tage nach dem Beginn der 4-OHT-Behandlung eine nur gering verminderte Expression der mitotischen Zielgene Nusap1, Aspm, Cenpf und Gas2L3 gezeigt werden, während Lin9 immer noch auf 21 bis 35% des ursprünglichen Expressionslevels depletiert ist (HAUSER et al., 2011). In Gesamtschau mit den in Abbildung 3.14 dokumentierten Werten legen diese Daten nahe, dass sich immortalisierte MEFs an den Verlust von Lin9 adaptieren und die Expression der mitotischen Zielgene über andere Mechanismen reorganisieren können.

3.4 Charakterisierung Lin9-heterozygoter MEFs

Der homozygote Verlust von Lin9 ist mit früher embryonaler Letalität assoziiert und geht bei adulten Mäusen mit gravierenden pathophysiologischen Veränderungen z. B. des intestinalen Epithels einher. Im Gegensatz dazu entwickeln sich Lin9-heterozygote Mäuse normal und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp bezüglich Wachstum und Zellzyklusverteilung (REICHERT et al., 2010). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass der heterozygote Verlust von Lin9 in einem Tumorigenese-Mausmodell für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) mit Expression einer konstitutiv aktiven c-raf-1-Kinase unter der Kontrolle des humanen SP-C-Promoters (BXB-raf) zu einer erhöhten Anzahl an Adenomen, einem größeren Gesamt-Tumorvolumen und einer verkürzten Überlebenszeit führt (REICHERT et al., 2010). Im Folgenden sollen die Auswirkungen des heterozygoten Lin9-Verlustes auf die Genexpression und die genomische Integrität anhand der Untersuchung von Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs näher charakterisiert werden.

3.4.1 Lin9-Heterozygotizität führt nicht zu einem Wachstumsdefizit

Um die Frage zu klären, ob der heterozygote Verlust von Lin9 ebenso wie die homozygote Lin9-Defizienz zu einem verminderten Zellwachstum führt, wurde eine Wachstumskurve von 4-OHT-behandelten sowie unbehandelten Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs erstellt. Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung in 24 *Well*-Platten ausplattiert. An jedem der Folgetage wurden jeweils drei *Wells* 4-OHT-behandelter Zellen sowie unbehandelter Kontrollzellen fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die optische Dichte bei 590 nm photometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15B dargestellt. Es zeigte sich sowohl für die unbehandelten Zellen als auch für die Lin9-heterozygoten Zellen ein initial approximativ exponentielles Wachstum, welches nach 7 Tagen durch die bei Konfluenz der Zellen auftretende Kontaktinhibition sistierte. Bezüglich Wachstumsgeschwindigkeit, Verlauf der Wachstumskurve und erreichter maximaler Zelldichte bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Lin9-heterozygoten MEFs und unbehandelten Kontrollzellen. Der heterozygote Verlust von Lin9 ist demnach nicht mit einem Wachstumsdefizit assoziiert.

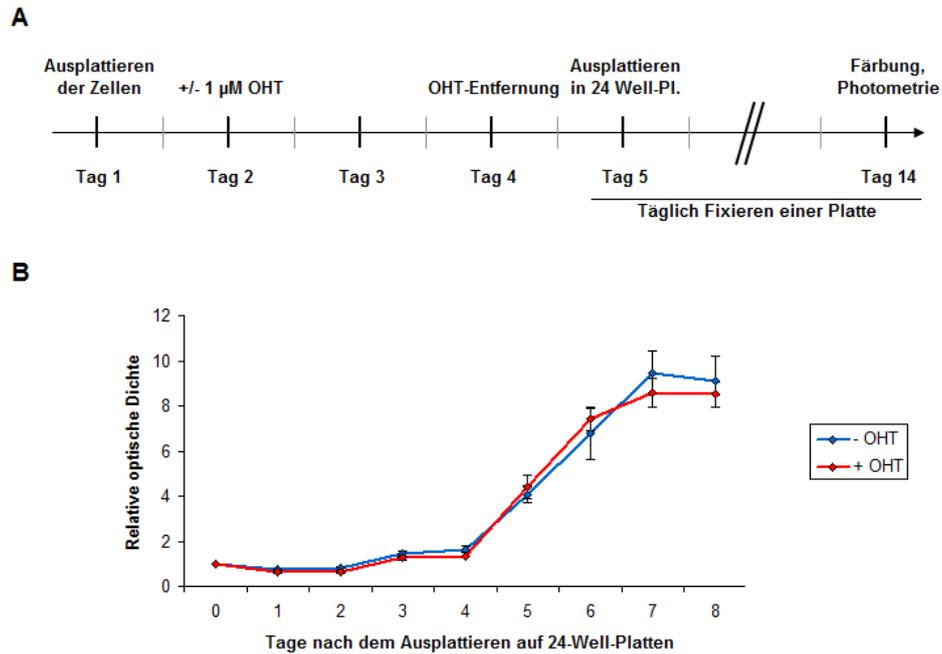


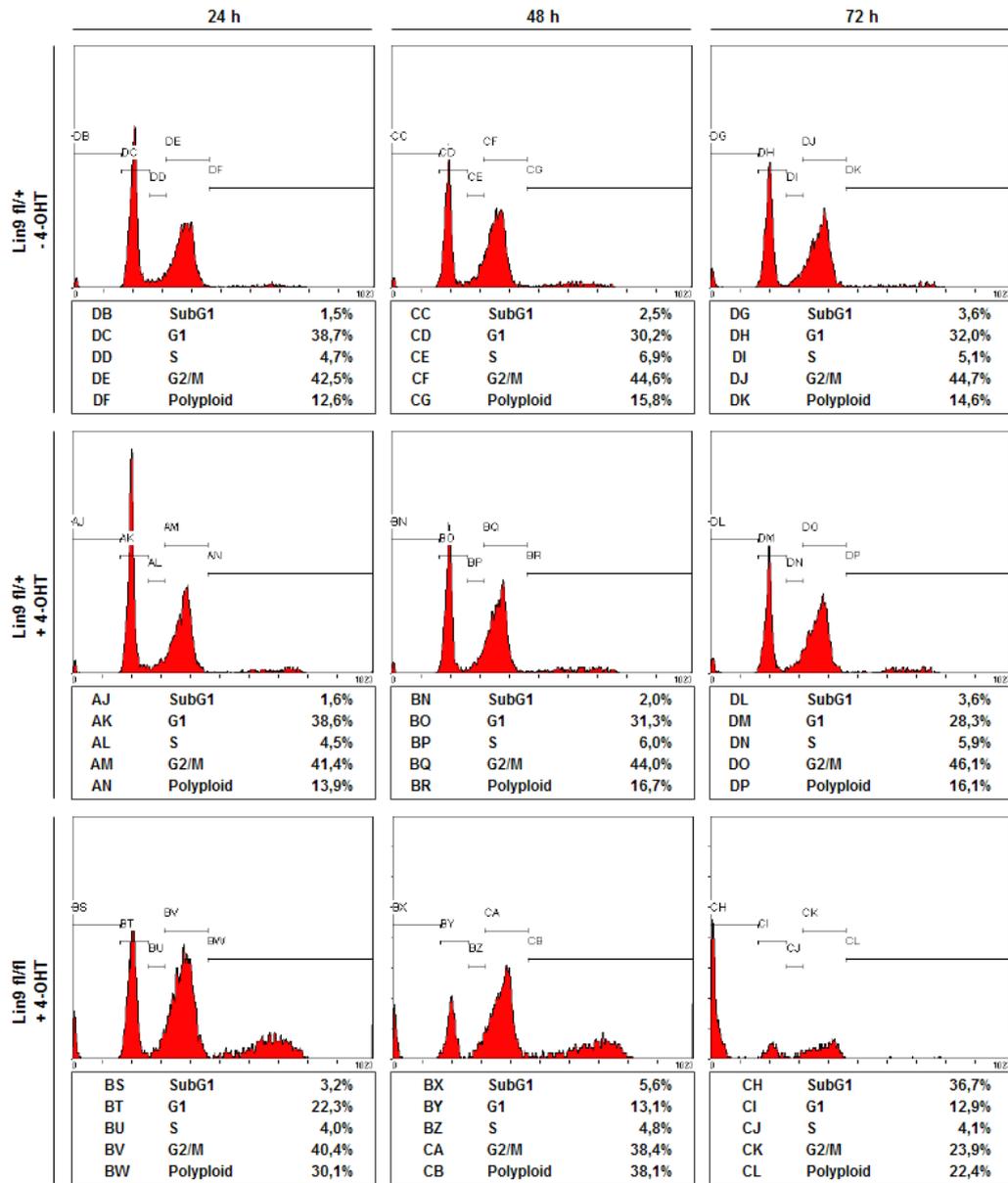
Abbildung 3.15 → Lin9-Heterozygotität führt nicht zu einem Wachstumsdefizit

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Auftragung der Mittelwerte der relativen optischen Dichte (Ausgangswert = 1,0) gegen die Wachstumsdauer. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung der für jeden Zeitpunkt in Triplikaten durchgeführten Messung.

3.4.2 Lin9-heterozygote MEFs zeigen kein verändertes Zellzyklusprofil

Zur Untersuchung des Zellzyklusprofils von Lin9-heterozygoten Zellen wurden Propidiumjodid-FACS-Analysen von Lin9 fl/+ creERT²-MEFs nach 48-stündiger Behandlung mit 1 µM 4-OHT für drei verschiedene Fixierungszeitpunkte (24, 48 und 72 Stunden nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung) erstellt. Vergleichend wurden sowohl Lin9 fl/+ creERT²-MEFs ohne 4-OHT-Behandlung als auch 4-OHT-behandelte und somit homozygot Lin9-depletierte Lin9 fl/fl creERT²-MEFs untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16A zusammengefasst.

A



B

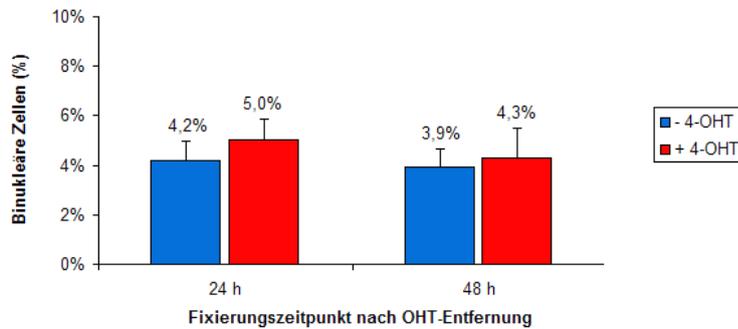


Abbildung 3.16 → Lin9-heterozygote MEFs zeigen kein verändertes Zellzyklusprofil

A) Propidiumjodid-FACS-Profilen von Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs mit und ohne 48-stündige Behandlung mit 1 µM 4-OHT sowie von Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs nach 48-stündiger 4-OHT-Behandlung für drei verschiedene Fixierungszeitpunkte. Angegeben ist der Prozentsatz der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen unter Verwendung der in die Diagramme eingetragenen Gates. B) Bestimmung des Anteils binukleärer Zellen bei mit 1 µM 4-OHT behandelten und unbehandelten Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs 24 und 48 Stunden nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung. Das Experiment wurde zwei Mal mit unabhängigen Zell-Pools von verschiedenen Ausgangszelllinien durchgeführt. Im Diagramm sind die Mittelwerte angegeben und die Standardabweichungen durch Fehlerbalken dargestellt.

Bei den homozygot Lin9-depletierten MEFs fand sich wie von REICHERT et al. (2010) beschrieben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen bereits nach 24 Stunden ein signifikanter Anstieg polyploider Zellen von 12,6 auf 30,1% und 72 Stunden nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung eine starke Zunahme von Zellen mit SubG₁-DNA-Gehalt von 3,6 auf 36,7%. Im Gegensatz hierzu war das Zellzyklusprofil der heterozygot Lin9-depletierten Zellen auch nach 72 Stunden gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen nicht signifikant verändert. Insbesondere zeigte sich keine Zunahme von SubG₁-Zellen und eine nur geringfügige Zunahme polyploider Zellen von 14,6% auf 16,1%.

Auch bei den zusätzlich durchgeführten Kernfärbungen mit Bisbenzimid (Abbildung 3.16B) zeigte sich lediglich eine minimale und statistisch nicht signifikante Zunahme binukleärer Zellen nach heterozygotem Lin9-Verlust gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. Die deutlich höheren Werte bei 4-OHT-behandelten Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs (Abbildung 3.1B) konnten demnach für die Lin9-heterozygoten Zellen nicht beobachtet werden.

3.4.3 Der Einfluss der Lin9-Heterozygotizität auf die Genexpression

Nachdem bei homozygot Lin9-depletierten Zellen eine Reihe von herabregulierten Zielgenen mit vorwiegend bekannter Funktion bei mitotischen Vorgängen oder im Rahmen der Zytokinese identifiziert werden konnte, sollte im Folgenden die Frage geklärt werden, welchen Einfluss die Lin9-Heterozygotizität auf deren Expressionslevel besitzt. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich die Expression der nach homozygoter Lin9-Depletion verstärkt exprimierten Zielgene mit Assoziation zu DNA-Rekombinations- und Reparatur-Vorgängen bei Lin9-heterozygoten Zellen gestaltet.

Hierzu wurde die RNA von Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs 12 Stunden nach dem Ende einer 48-stündigen Behandlung mit 1 µM 4-OHT isoliert, aufgereinigt und revers transkribiert. Die relative Expression einzelner Gene wurde mit Hilfe der quantitativen *Real Time*-PCR ermittelt. Die relativen Expressionslevel im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Vergleichend wurden die nach homozygoter Lin9-Depletion erhobenen Werte (Kapitel 3.2.1) aufgetragen.

Während der Lin9-Expressionslevel bei Lin9-heterozygoten Zellen auf 0,51 sank, konnte lediglich für eines der untersuchten Zielgene (C9orf140) eine um mehr als 30% verminderte Expression gegenüber unbehandelten Kontrollzellen nachgewiesen werden. Für die Gene Hmnr, Cenpf und Cenpe fand sich ein relativer Expressionslevel von 0,77 bis 0,81. Die Expression aller weiteren untersuchten mitotischen Zielgene war von der heterozygoten Lin9-Depletion nicht signifikant betroffen. Auch bei den in homozygot Lin9-defizienten Zellen heraufregulierten Zielgenen wurde lediglich für Fancg eine um 27% erhöhte Expression detektiert, während die Expressionslevel der anderen untersuchten Gene durch den heterozygoten Verlust von Lin9 nicht affektiert waren.

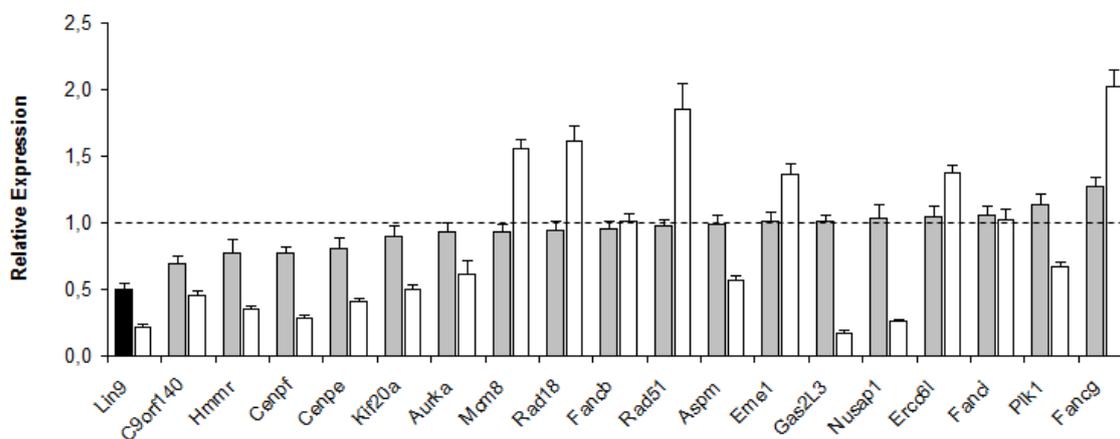


Abbildung 3.17 → Der heterozygote Verlust von Lin9 führt zu einer leichten Herabregulation einiger G₂/M-Gene

Das Diagramm zeigt die relative Expression der analysierten Gene in Lin9-heterozygoten MEFs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen 12 h nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten. Die Standardabweichung ist durch Fehlerbalken angegeben. Die weißen Säulen zeigen zum Vergleich die jeweiligen Werte, die bei primären MEFs ermittelt wurden (Kapitel 3.2.1).

3.4.4 Der heterozygote Lin9-Verlust führt zur Schwächung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes

Um die Auswirkungen der Lin9-Heterozygotizität und der um 19 bis 31% verminderten Expression der mitotischen Regulatoren Hmnr und C9orf140 sowie der Gene der Spindel-assoziierten Proteine Cenpe und Cenpf auf die Integrität des mitotischen Spindelkontrollpunktes zu untersuchen, wurden Zellzyklus-Analysen an Lin9-heterozygoten MEFs nach Behandlung mit Nocodazol vorgenommen. Nocodazol ist ein antimitotisches Agens, das nach Bindung an β -Tubulin die Depolymerisation von Mikrotubuli inhibiert, wodurch die betroffenen Zellen am Spindel-Kontrollpunkt in der M-Phase arretieren.

Jeweils $6,5 \times 10^5$ Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs wurden auf 10 cm Gewebekulturschalen ausplattiert und 24 h später beginnend für 48 Stunden mit 1 μ M 4-OHT behandelt bzw. als Kontrollzellen unbehandelt belassen. Weitere 24 h nach der Entfernung des 4-OHT durch Mediumwechsel wurden 200 ng/ml Nocodazol zum Zellkulturmedium hinzugegeben. Zu diesem Zeitpunkt sowie nach 6-, 14- und 24-stündiger Inkubation der Zellen im Nocodazol-haltigen Medium wurden die Zellen fixiert und nach Immunfluoreszenz-Färbung gegen Phospho-Histon 3 fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Dabei wurde der Anteil PH3-positiver Zellkerne sowie der Anteil von Zellkernen mit kondensierten Prophase-Chromosomen oder Zellkernen mit typischer Metaphasen-Anordnung der Chromosomen an allen Bisbenzimid-positiven Zellkernen quantifiziert. Der Anteil der PH3-positiven Zellen im Zeitverlauf ist in Abbildung 3.18B dargestellt und der Anteil der Pro- und Metaphase-Zellen ist in Abbildung 3.18C zusammengefasst.

Es zeigte sich nach 6- und 14-stündiger Inkubation mit Nocodazol ein signifikant geringerer Anteil PH3-positiver Zellkerne sowie ein ebenfalls geringerer Anteil an Pro- und Metaphasen bei den Lin9-heterozygoten Zellen bei vergleichbaren Ausgangswerten und erneuter Annäherung der Werte nach 24-stündiger Nocodazol-Behandlung. Diese Ergebnisse können als Hinweis auf ein vermindertes Arretieren Lin9-heterozygoter Zellen am Spindel-Kontrollpunkt nach Nocodazol-Behandlung und einen vorzeitigen Wiedereintritt in die Interphase betrachtet werden. Die insgesamt relativ niedrigen Prozentsätze der durch Nocodazol in der M-Phase arretierten Zellen sind auf ein generell schwaches Ansprechen von MEFs auf Nocodazol zurückzuführen (BABU et al., 2003).

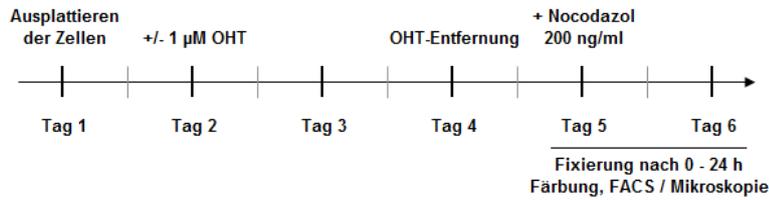
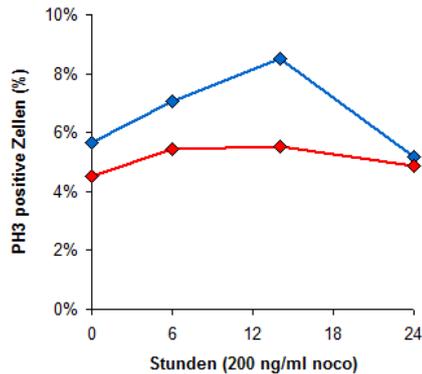
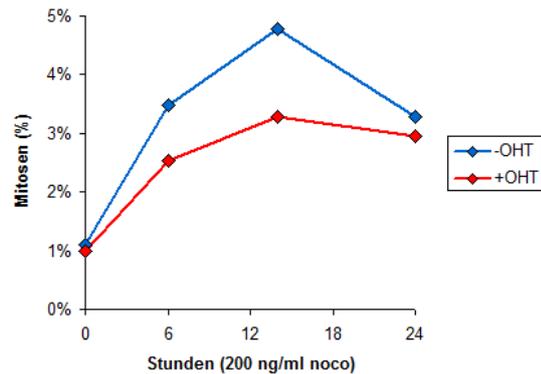
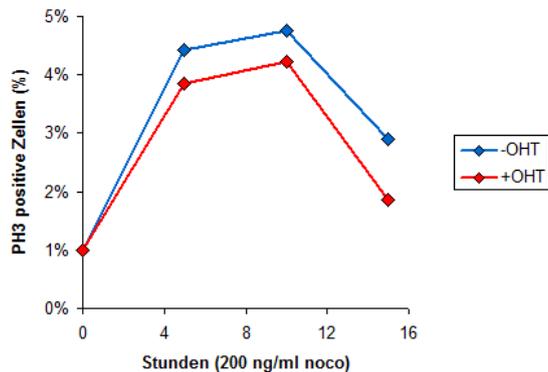
A**B****C****D**

Abbildung 3.18 → Der heterozygote Verlust von Lin9 führt zur Schwächung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des Anteils PH3-positiver Zellkerne an allen Bisbenzimid-positiven Zellkernen nach 0, 6, 14 und 24 Stunden Nocodazol-Behandlung basierend auf einer Auszählung von 900 bis 1100 Zellkernen pro Zeitpunkt und Behandlung. C) Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des Anteils von Zellen mit kondensierten Prophase-Chromosomen oder Zellkernen mit typischer Metaphasen-Anordnung der Chromosomen an allen Bisbenzimid-positiven Zellkernen nach 0, 6, 14 und 24 h Nocodazol-Behandlung basierend auf einer Auszählung von 900 bis 1100 Zellkernen pro Zeitpunkt und Behandlung. D) Durchflusszytometrische Quantifizierung des Anteils Phospho-Histon 3-positiver Zellen mit einem 4n-DNA-Gehalt an allen Zellen 0, 5, 10 und 15 h nach Beginn der Nocodazol-Behandlung basierend auf einer Auswertung von jeweils mindestens 10000 Zellkernen.

Um diesen Effekt anhand einer größeren Zellpopulation exakter quantifizieren und die Auswertung zusätzlich objektivieren zu können, wurde in einem zweiten Ansatz der Anteil PH3-positiver Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4n nach 0-, 5-, 10- und 15-stündiger Behandlung Lin9-positiver sowie Lin9-heterozygoter MEFs mit Nocodazol durchflusszytometrisch analysiert.

Hierbei zeigte sich vergleichbar zu den Ergebnissen der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung ein verminderter Anteil mitotischer Zellen nach 5, 10 und 15 Stunden Nocodazol-Behandlung in der Lin9-heterozygoten Zellpopulation verglichen mit Lin9-positiven Kontrollzellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18D zusammengefasst. Zusammengenommen deuten diese Daten auf ein vermindertes mitotisches Arretieren von MEFs nach heterozygotem Lin9-Verlust und somit auf eine Schwächung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes hin.

3.4.5 Der heterozygote Verlust von Lin9 trägt zur onkogenen Transformation bei

Zur Untersuchung des Zusammenwirkens von heterozygotem Lin9-Verlust mit onkogenem Stress wurde das Wachstumsverhalten von Large T-immortalisierten Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs, deren Zellzyklusprofil sowie die Fähigkeit zur Koloniebildung im Weichagar analysiert. Dabei wurde zur Immortalisierung neben einem SV40 Large T-haltigen retroviralen Vektor auch ein solcher mit einer LT Δ 89-97-Mutante verwendet. Diese Mutante besitzt im Gegensatz zum klassischen Large T-Antigen nicht die Fähigkeit zur Bindung von Bub1 und interferiert somit nicht mit der Integrität des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes, sodass eine Überlagerung der beobachteten Schwächung dieses Kontrollpunktes bei Lin9-Heterozygotität durch Large T-Effekte minimiert oder vermieden wird.

Analog zum Vorgehen bei der Charakterisierung von homozygot Lin9-defizienten immortalisierten MEFs wurden zunächst Kolonie-Bildungs-Assays angelegt um eine Aussage über das Wachstumsverhalten nach Passagierung mit starker Verdünnung zu gewinnen. Repräsentative Platten mit den nach 14 Tagen entstandenen Kolonien sind in Abbildung 3.19B dargestellt. Die quantitative Auswertung ist in Abbildung 3.19C zusammengefasst.

Sowohl hinsichtlich der Anzahl der entstandenen Kolonien als auch bezüglich deren Größe und Morphologie fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Lin9-heterozygoten Zellen und Lin9-positiven Kontrollzellen. Folglich ergab sich im Gegensatz zu den Untersuchungen bei homozygot Lin9-depletierten MEFs kein

Hinweis darauf, dass der heterozygote Verlust von Lin9 die Fähigkeit zur Koloniebildung nach Passagierung mit starker Verdünnung beeinträchtigt.

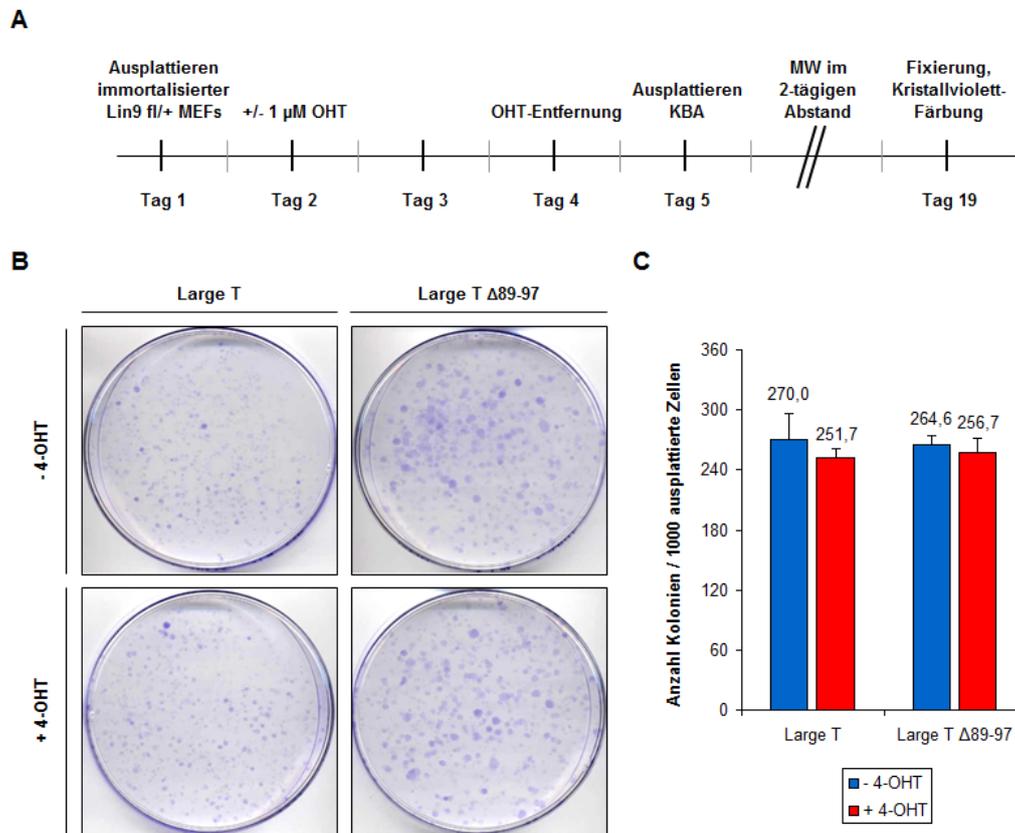


Abbildung 3.19 → Kolonie-Bildungs-Assay Large T-immortalisierter Lin9 fl/+ creER^{T2}-MEFs

A) Schematische Darstellung des Ablaufs des Experimentes. B) Bilddokumentation der entstandenen Kolonien auf jeweils einer repräsentativen 10 cm-Schale für 4-OHT-behandelte sowie unbehandelte fl/+ creER^{T2}-MEFs unter Verwendung von SV40 Large T und der S40 Large T Δ89-97-Mutante. C) Quantitative Auswertung der Kolonie-Bildungs-Assays. Anhand von Platten mehrerer Verdünnungsstufen wurde für 4-OHT-behandelte und unbehandelte MEFs sowie beide verwendeten Plasmide die entstandene Anzahl an Kolonien (gewertet ab 2 mm Durchmesser) pro 1000 ausplattierten Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Im nächsten Schritt sollten die Auswirkungen der Kombination aus heterozygotem Lin9-Verlust und Large T-Immortalisierung auf die Zellzyklusverteilung im längerfristigen Verlauf untersucht werden. Hierzu wurden mit der Large T Δ89-97-Mutante immortalisierte Lin9-heterozygote Zellen sowie unbehandelte Kontrollzellen zwei Mal im Verhältnis von 1:4 passagiert und nach jeder Passage PI-FACS-Profile erstellt (Abbildung 3.20).

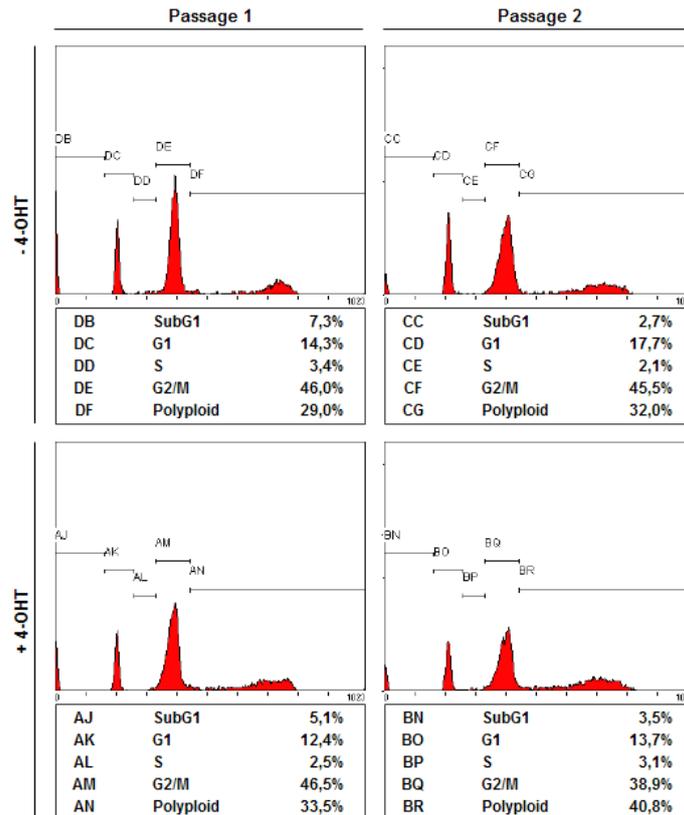


Abbildung 3.20 → Lin9-Heterozygotität führt bei immortalisierten MEFs zu einer leichten Zunahme polyploider Zellen

Propidiumjodid-FACS-Profile von Lin9-positiven und Lin9-heterozygoten immortalisierten MEFs nach einer bzw. zwei Passagen nach der cre-Induktion. Zur Immortalisierung wurde die $\Delta 89-97$ -Mutante von Large T eingesetzt. Angegeben ist der Prozentsatz der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen unter Verwendung der in die Diagramme eingetragenen *Gates*.

Dabei zeigte sich für die Lin9-positiven Zellen ein erhöhter Anteil polyploider Zellen (29,0%) im Vergleich zu primären MEFs (Kapitel 3.4.2) bei ansonsten regelhaft imponierender Zellzyklusverteilung. Bei den heterozygot Lin9-defizienten immortalisierten MEFs war eine leichte Zunahme des polyploiden Zellanteils im Vergleich zu den Lin9-positiven Kontrollzellen zu beobachten (33,5%). Der Effekt verstärkte sich nach einer zusätzlichen Passage (40,8% gegenüber 32,0%).

In der Gesamtschau zeigen diese Daten, dass anders als bei primären MEFs die Lin9-Heterozygotität bei immortalisierten Zellen mit einem erhöhten Anteil polyploider Zellen assoziiert ist, wobei dieser Effekt deutlich geringer ausgeprägt ist als bei homozygotem Lin9-Verlust.

Um analysieren zu können, ob die beobachteten Effekte der Lin9-Heterozygotizität auf den Spindel-Kontrollpunkt sowie die bei Zusammenwirken von heterozygotem Lin9-Verlust und dem Large T-Antigen detektierte Zunahme an polyploiden Zellen zur Transformation von Zellen *in vitro* führen, wurde die Koloniebildung im Weichagar untersucht. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien pro mm² ermittelt, wobei Kolonien erst ab einem Durchmesser von 40 µm als solche gezählt wurden um sie von Einzelzellgruppierungen abzugrenzen. Repräsentative Bildbeispiele sind in Abbildung 3.21A zusammengestellt, die statistische Auswertung ist in Abbildung 3.21B wiedergegeben.

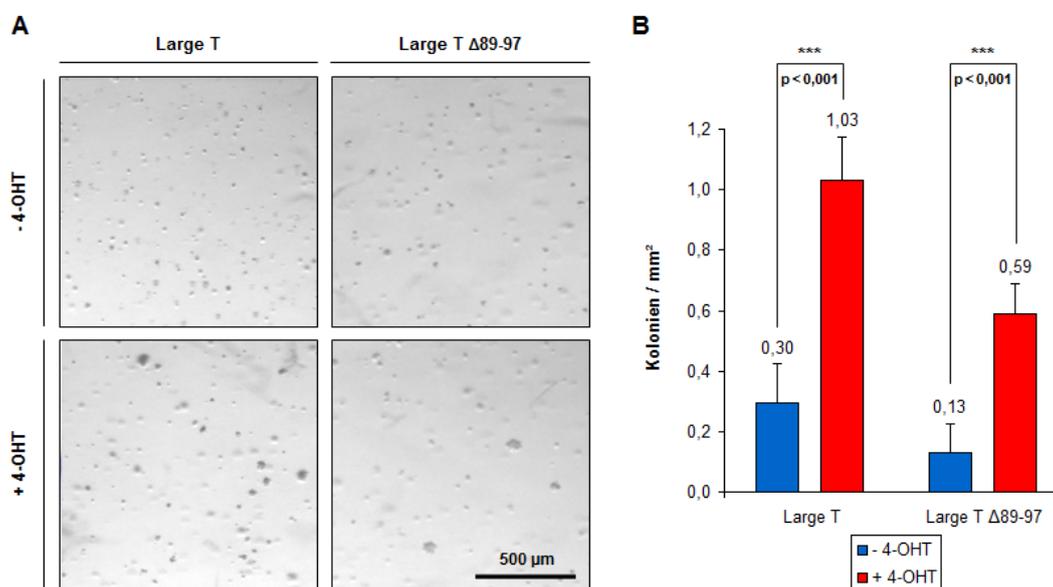


Abbildung 3.21 → Der heterozygote Verlust von Lin9 trägt zur onkogenen Transformation von MEFs bei

A) Repräsentative Bildausschnitte der nach 14 Tagen im Weichagar entstandenen Kolonien bei Lin9-positiven und Lin9-heterozygoten immortalisierten MEFs. B) Statistische Auswertung der entstandenen Kolonien pro mm², wobei Kolonien erst ab einem Durchmesser von 40 µm berücksichtigt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der für die einzelnen *Wells* ermittelten Werte an. Ein zweiseitiger heteroskedastischer t-Test ergab sowohl für die mit SV40 Large T als auch für die mit dessen Δ89-97 Large T-Mutante immortalisierten MEFs einen mit $p < 0,001$ höchst signifikanten Unterschied zwischen den für Lin9-heterozygote MEFs und Lin9-positive Zellen erhobenen Werten.

Es zeigte sich sowohl für die mit Large T als auch für die mit dessen $\Delta 89-97$ -Mutante immortalisierten MEFs eine statistisch höchst signifikante ($p < 0,001$) Zunahme der Anzahl von Substrat-unabhängig im Weichagar entstandenen Kolonien. Bei den Large T-immortalisierten Zellen wurden für Lin9-heterozygote MEFs 1,03 Kolonien pro mm^2 beobachtet, für Lin9-positive MEFs hingegen nur 0,30. Bei Verwendung der $\Delta 89-97$ Large T-Mutante lag die Anzahl der Kolonien pro mm^2 bei 0,59 für Lin9-heterozygote MEFs und bei 0,13 für Lin9-positive MEFs. Diese Daten dokumentieren, dass bereits der heterozygote Verlust von Lin9 – in Verbindung mit den durch Large T hervorgerufenen Effekten – zur onkogenen Transformation von MEFs beiträgt.

4 DISKUSSION

Im Jahre 2007 wurde durch unsere Arbeitsgruppe und durch LITOVCHICK et al. ein zum DRM-Komplex von *C. elegans* und zum Myb-MuvB-/dREAM-Komplex von *D. melanogaster* homologer humaner Multiproteinkomplex identifiziert, der als LINC bzw. humaner DREAM-Komplex bezeichnet wird. Dieser besteht aus einem Kernkomplex, der zellzyklusabhängig mit E2F4 und p130 (in der G₀-Phase) oder B-MYB (in der S-Phase) interagiert. Ein Bestandteil des LINC-Kernkomplexes ist das humane LIN9, das im Jahre 2004 durch GAGRICA et al. als pRB-bindendes Protein mit tumorsuppressiven Eigenschaften beschrieben wurde. Die physiologische Bedeutung dieses Proteins war bislang jedoch kaum charakterisiert. Um die Funktion des LIN9-Proteins bei der Embryonalentwicklung, Zellzyklusregulation und Tumorigenese untersuchen zu können, wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei *Lin9-Knockout*-Mausmodelle generiert (Kapitel 1.4.2; REICHERT et al., 2010). Nachdem sich das klassische, *gene trap*-basierte Modell für die Untersuchung der LIN9-Funktion in adulten Mäusen und MEFs aufgrund der frühen embryonalen Letalität bei homozygotem Verlust von *Lin9* als ungeeignet erwies, konnte diese Problematik mit der Etablierung eines konditionellen *Knockout*-Modells basierend auf der *cre-loxP*-Technologie gelöst werden. Damit stand ein wertvolles Modellsystem zur Verfügung, mit dem es möglich ist, *Lin9* zu einem beliebigen Zeitpunkt *in vivo* oder *in vitro* effizient zu depletieren. Die Untersuchung der Auswirkungen des Verlustes von *Lin9* war in der Folge Gegenstand mehrerer Studien unserer Arbeitsgruppe. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich hierbei auf die Analyse der Bedeutung von *Lin9* in murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) bei der Mitose, bei der Erhaltung der genomischen Stabilität und bei der Genregulation. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es, zu untersuchen, in wie fern der homozygote und heterozygote Verlust des *Lin9*-Gens zur onkogenen Transformation von MEFs beiträgt.

4.1 Die Rolle von Lin9 bei der Genexpression

4.1.1 Lin9 ist essentiell für die Aktivierung der Expression von G₂/M-Genen

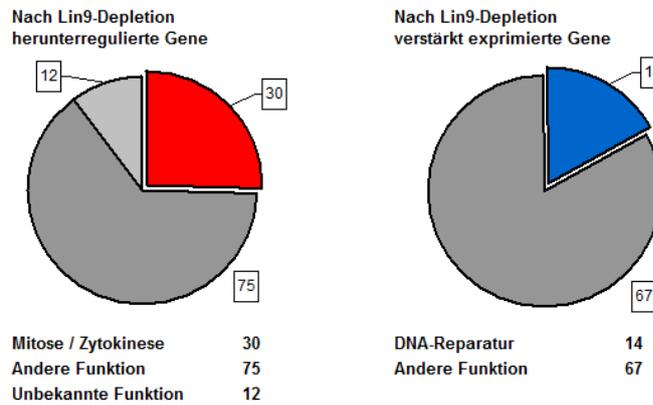
Nachdem durch verschiedene Studien gezeigt worden war, dass der DREAM / LIN-Komplex und insbesondere Lin9 bei der Regulation der Genexpression beteiligt sind (LITOVCHICK et al., 2007; OSTERLOH et al., 2007; KLEINSCHMIDT et al., 2009), wurden durch N. REICHERT mittels cDNA-*Microarray* genomweite Expressionsanalysen bei Lin9-depletierten MEFs durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen an asynchronen Zellen konnten nach Depletion von Lin9 198 different exprimierte Gene identifiziert werden, wovon 117 nach Lin9-Depletion vermindert und 81 verstärkt exprimiert waren. Für 30 der bei Lin9-defizienten MEFs signifikant herabregulierten Genen ist eine Funktion beim Eintritt in die Mitose, deren Regulation, dem Aufbau des Spindelapparates, der Chromosomensegregation oder der Zytokinese beschrieben (Abb. 4.1C). Für einige dieser Gene zeigte sich eine Überschneidung mit den bei Zebrafischembryonen und bei humanen Fibroblasten detektierten Lin9-Zielgenen (Abb. 4.1B).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ausgewählten mitotischen Lin9-Zielgenen mittels qPCR sowohl bei asynchronen Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs (Abb. 3.9) als auch beim Durchlaufen des Zellzyklus nach Synchronisation (Abb. 3.10) analysiert. Dabei konnte in asynchronen Zellen für alle untersuchten mitotischen Zielgene eine mindestens um Faktor 1,49 reduzierte Expression nachgewiesen werden. Bei den Expressionsanalysen im Zellzyklusverlauf wurde für die untersuchten Gene *Aspm*, *Nusap*, *Cenpf* und *Plk1* bei den unbehandelten Kontrollzellen 15 bis 20 Stunden nach dem Entlassen der Zellen aus der G₀-Phase in den Zellzyklus ein deutlicher Expressionsanstieg und weitere 5 Stunden später das Expressionsmaximum beobachtet. Durch Immunfluoreszenz-Analysen von Zellzyklus-*Markern* (Abb. 3.4) ist bekannt, dass in diesem Zeitraum die Mehrzahl der Zellen in die Mitose eintritt. Bei den Lin9-depletierten Zellen fiel der Expressionsanstieg bei allen fünf untersuchten mitotischen Zielgenen signifikant geringer aus (Abb. 3.10). Auch zeigte sich für *Aspm*, *Gas2L3* und *Plk1* eine leichte Verzögerung des Expressionsmaximums, die mit der in Abb. 3.4 dokumentierten Verzögerung des Mitose-Eintritts um 3 bis 6 Stunden korreliert.

In der Gesamtheit unterstreichen diese Daten die bereits durch vorherige Studien unserer Arbeitsgruppe an humanen Fibroblasten (OSTERLOH et al., 2007) und bei

Zebrafischembryonen (KLEINSCHMIDT et al., 2009) erhobene Beobachtung, dass Lin9 für die Expressionsaktivierung von Genen mit einer Funktion bei der G₂/M-Regulation, in der Mitose oder der Zytokinese essentiell ist.

A



B

Gen	Protein	Humane Fibroblasten	Zebrafisch	Murine ES-Zellen
Gas2L3	Growth Arrest-Specific 2-Like 3			✓
Nusap1	Nucleolar and Spindle-Associated Protein 1	✓		✓
C9orf140	Suppressor APC Domain Containing			✓
Aspm	Abnormal Spindle-Like, Microcephaly-Associated	✓		✓
Cenpf	Centromeric Protein F			✓
Mki67	Proliferation-Related Ki-67 Antigen			✓
Plk1	Polo-Like Kinase 1	✓	✓	✓
Cenpe	Centromeric Protein E	✓		✓
Top2a	DNA Topoisomerase II		✓	✓
Kif20a	Kinesin Family Member 20a			✓
Kif23	Kinesin Family Member 23		✓	
Cenpa	Centromeric Protein A			✓
Ccnf	Cyclin F		✓	✓
Casc5	Cancer Susceptibility Candidate 5			
Ccnb1	Cyclin B1	✓		✓
Hmmr	Hyaluronan-Mediated Motility Receptor		✓	✓
G2E3	G2/M Phase-Specific E3 Ubiquitin Ligase			
Lmln	Leishmanolysin-Like			
Hmgb2	High Mobility Group Box 2			
Vcpip1	VCP/p47 Complex-Interacting Protein 1			
Fbxo5	F-Box Only Protein 5			
Cep55	Centrosomal Protein, 55-kD	✓		
Kif2c	Kinesin Family Member 2c			
Cdca2	Cell Division Cycle Associated 2			✓
Myo6	Myosin 6			
Anapc1	Anaphase Promoting Complex Subunit 1			
Cdc211	Cyclin-Dependent Kinase 11B			
Cald1	Caldesmon 1			
Ncapd2	Non-SMC Condensin I Complex, Subunit D2			✓
Aurka	Aurora Kinase A	✓		✓

C

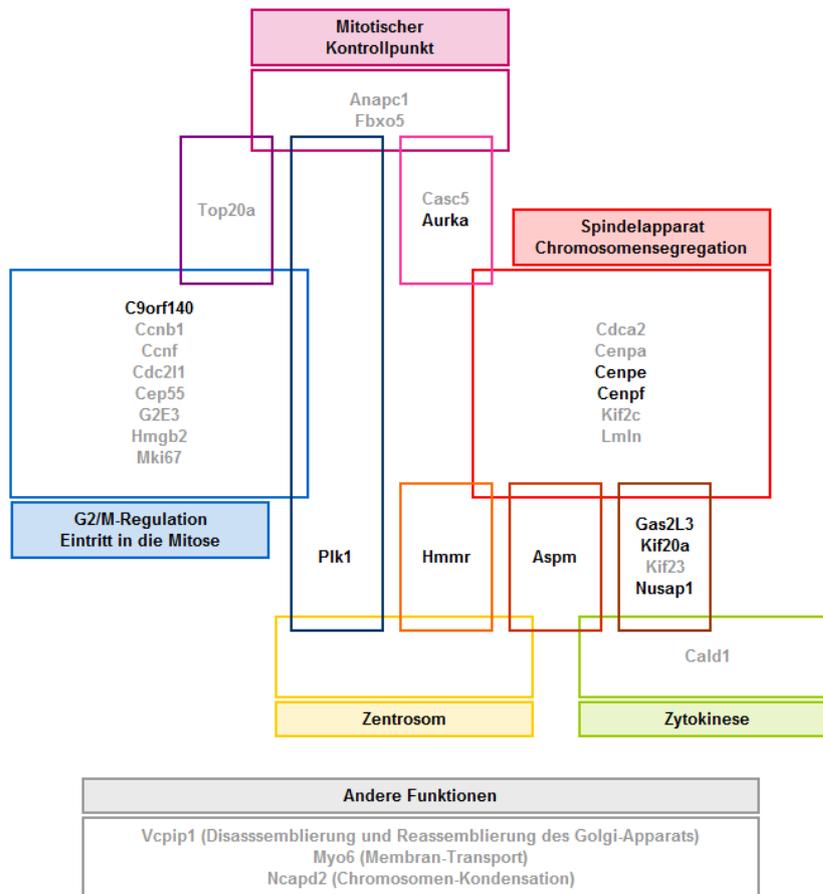


Abbildung 4.1 → Zielgene von LIN9 und ihre Bedeutung für die Mitose und Zytokinese

A) cDNA-Microarray-Analysen bei Lin9-depletierten MEFs. Insgesamt wurden 117 Gene detektiert, die nach Lin9-Depletion mindestens um Faktor 1,5 herabreguliert waren sowie 81 Gene, die in Lin9-defizienten MEFs mindestens um Faktor 1,5 verstärkt exprimiert werden. Von den 117 nach Lin9-Depletion vermindert exprimierten Genen konnte inzwischen für 30 eine Funktion bei der G₂/M-Regulation, Mitose oder Zytokinese gezeigt werden. Andererseits wurde für 14 der 81 verstärkt exprimierten Gene eine Funktion bei der Überwachung der genomischen Integrität, DNA-Reparatur oder DNA-Rekombination beschrieben. Abbildung modifiziert nach REICHERT et al., 2010. B) Auflistung der 30 nach Lin9-Depletion mindestens um Faktor 1,5 herabregulierten Gene mit bekannter mitotischer Funktion. Die Gene, welche nach Lin9-Depletion in humanen Fibroblasten (OSTERLOH et al., 2007), bei Zebrafischembryonen (KLEINSCHMIDT et al., 2009) bzw. in murinen ES-Zellen (ESTERLECHNER et al., 2013) ebenfalls signifikant vermindert exprimiert waren, sind entsprechend mit einem roten Haken gekennzeichnet. Bei den murinen ES-Zellen wurden Gene, bei denen zusätzlich LIN9 am Promoter nachgewiesen wurde, durch einen blauen Haken markiert. C) Übersicht über die Funktionen der nach Lin9-Depletion signifikant herabregulierten Gene bei der G₂/M-Regulation, Mitose und Zytokinese. In schwarzer Schrift dargestellt sind Gene, deren Expression in asynchronen Zellen und / oder im Zellzyklusverlauf nach Synchronisation in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde und eine Lin9-abhängige Expression validiert wurde. Grau dargestellt sind Zielgene, die lediglich in der Microarray-Analyse von REICHERT et al. (2010) detektiert wurden, deren Expression jedoch nicht mit qPCR-Analysen verifiziert wurde.

4.1.2 Über welche Mechanismen aktiviert Lin9 die Expression von G₂/M-Genen?

Um nähere Erkenntnisse über den Mechanismus der Regulation der Zielgenexpression durch das LIN9-Protein zu gewinnen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ChIP-Analysen durchgeführt. Zunächst sollte überprüft werden, ob LIN9 an die Promotoren der identifizierten mitotischen Zielgene bindet. Dies konnte für alle untersuchten Promotoren bestätigt werden. Nach Deletion von Lin9 zeigte sich ein Rückgang der LIN9-Promoterbindung um 39 – 65% (Abb. 3.11). Diese Daten dokumentieren, dass LIN9 als direkter, Chromatin-assoziiertes Aktivator der Expression von G₂/M-Genen fungiert.

Eine später durchgeführte, umfassende Untersuchung von ESTERLECHNER et al. (2013) zur Genregulation durch LIN9 im murinen System bestätigte diese LIN9-Schlüsselfunktion ebenfalls. In dieser Studie wurde Lin9 RNAi-basiert in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) depletiert und *Microarray*- sowie *ChIP-on-Chip*-Analysen durchgeführt. Mit einer *Gene Ontology*-Analyse wurde gezeigt, dass Gene, die mit der Zellzyklusregulation, Mitose und Chromosomen-Segregation assoziiert sind, unter den nach Lin9-Verlust herabregulierten Genen besonders stark überrepräsentiert sind. Mittels *ChIP-on-Chip*-Ansatz wurde eine Bindung von LIN9 an etwa 7% der untersuchten Promotoren nachgewiesen. Die größte Gruppe unter den zugehörigen Genen stellen solche mit einer bekannten Funktion bei der Mitose, Zellzyklusregulation und der Transkriptionsregulation dar. Interessanterweise fand sich eine LIN9-Promoter-Bindung nur bei wenigen der signifikant different exprimierten Gene. Von den insgesamt 30 bei Lin9-defizienten ES-Zellen herabregulierten Genen mit einer mitotischen Funktion wurde jedoch bei 15 eine LIN9-Bindung am Promoter nachgewiesen, was eine direkte Regulation der G₂/M-Zielgene unterstreicht (ESTERLECHNER et al., 2013).

Obwohl LIN9 in mehreren vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe (OSTERLOH et al., 2007; SCHMIT et al., 2007) und der vorliegenden Arbeit an den Promotoren mitotischer Zielgene nachgewiesen wurde, sollte Erwähnung finden, dass bislang keine DNA-Bindungsdomänen von LIN9 bekannt sind, sodass offensichtlich andere LINC-Bestandteile und Kofaktoren die LIN9-abhängige Genaktivierung mechanistisch vermitteln. Sowohl für B-MYB als auch für LIN54 ist bekannt, dass diese Proteine an die DNA binden und somit die Rekrutierung von LINC an das Chromatin ermöglichen können (SCHMIT et al., 2007; SCHMIT et al., 2009).

SADASIVAM et al. (2012) zeigten durch *ChIP-on-Chip*-Untersuchungen an humanen Zellen, dass B-MYB und LIN9 gemeinsam an die Promotoren zahlreicher Gene binden und bestätigten damit die Beobachtungen von OSTERLOH et al. (2007). Die Zuordnung der Gene mit B-MYB- und LIN9-Promoterbindung zu funktionellen Gruppen und zu den zellulären Kompartimenten dokumentiert eine deutliche Überrepräsentation von Genen, deren Produkte für die M-Phase oder die Zytoskelett-Organisation benötigt werden sowie von Genen, deren Produkte am Spindelapparat oder chromosomal lokalisiert sind. Weiterhin wurde durch SADASIVAM et al. (2012) gezeigt, dass sowohl der LINC-Kernkomplex als auch B-MYB für die Bindung von LINC an die Promotoren von G₂/M-Genen essentiell sind. Dabei wurde für die B-MYB-Bindung an den PLK- und Zyklin B1-Promoter ein Maximum zum Zeitpunkt der S-Phase und ein anschließender Verlust der Promoter-Bindung detektiert, während LIN54 und LIN9 als Vertreter des Kernkomplexes weiterhin am Promoter nachzuweisen sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Fox-M1 in der späten S-Phase und G₂/M-Phase LINC-abhängig an die Promotoren der mitotischen Zielgene bindet und an deren transkriptionellen Aktivierung beteiligt ist. Nach dem aus diesen beiden Erkenntnissen abgeleiteten Modell sind B-MYB und der LINC-Kernkomplex für die Rekrutierung von Fox-M1 an die Promotoren essentiell, wonach B-MYB nicht länger für die G₂/M-Genaktivierung benötigt wird, sondern phosphoryliert und degradiert wird. Auch die typischen DNA-Bindungsmotive für andere Transkriptionsfaktoren wie NF-Y oder AP-1 wurden durch ChIP-Seq in LIN9- und B-MYB-gebundenen Promoter-Abschnitten detektiert (SADASIVAM et al., 2012).

Zusätzlich zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren wie Fox-M1 existieren möglicherweise noch andere Mechanismen, die zur LIN9-abhängigen G₂/M-Genaktivierung beitragen können. Ein weiterer plausibler Erklärungsansatz wäre die Rekrutierung Chromatin-modifizierender Enzyme durch das LIN9-Protein bzw. LINC. Dass LIN9 an der Vermittlung eines solchen Mechanismus beteiligt sein könnte, legen Untersuchungen über die Funktion des Testis-spezifischen LIN9-homologen Proteins ALY bei *D. melanogaster* nahe. LIN et al. (1996) zeigten, dass eine *Loss-of-Function*-Mutation von ALY mit einer partiellen Kondensation von Chromosomen in primären Spermatozyten einhergeht. Da bekannt ist, dass ALY für die transkriptionelle Aktivierung von Zellzyklus- und Meioseregulatoren sowie entwicklungspezifischer Gene essentiell ist (WHITE-COOPER et al., 2000), lag der Schluss nahe, dass ALY Modifikationen der Chromatinstruktur vermittelt, die in einer gesteigerten Expression dieser Zielgene resultieren. Diese Annahme wurde durch die Arbeiten von CHEN et al.

(2011) untermauert. Sie zeigten, dass der tMAC (*testis meiotic arrest complex*), an dem ALY beteiligt ist, für die Rekrutierung von testis-spezifischen TBP-assoziierten Faktoren (tTAF) an die Promotoren von Entwicklungs-assoziierten Genen verantwortlich ist.

Vor diesem Hintergrund fokussierten sich die ChIP-Analysen in der vorliegenden Arbeit auf den Nachweis von Chromatin-Modifikationen. Es wurden Immunpräzipitationen gegen acetyliertes Histon 4 und trimethyliertes Histon 3 durchgeführt. Beide untersuchten Histon-Modifikationen sind bei höheren Eukaryonten in der Regel als transkriptionell aktivierend beschrieben (KOUZARIDES, 2007). Für acetyliertes Histon 4 fand sich sowohl am *Aspm*- als auch am *Nusap*-Promoter eine Abnahme der Anreicherung nach *Lin9*-Depletion, während diese Modifikation am *Fancg*- und *Rad51*-Promoter in *Lin9*-defizienten Zellen verstärkt nachgewiesen wurde (Abb. 3.11). Auch für Histon3 Lysin4-me3 wurde an den Promotoren der mitotischen *Lin9*-Zielgene nach Depletion von *Lin9* ein signifikanter Rückgang der Anreicherung beobachtet, während sich am *Fancg*- und *Rad51*-Promoter keine Unterschiede zwischen 4-OHT-behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen ergaben.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass Veränderungen der Chromatinstruktur zur LINC-abhängigen transkriptionellen Aktivierung von mitotischen Zielgenen in murinen Zellen beitragen können. Weiterhin legt die Abnahme der H3K4-Trimethylierung nach *Lin9*-Depletion nahe, dass LIN9 an der Vermittlung dieser Chromatin-Modifikation an den Promotoren der durch LINC aktivierten G_2/M -Gene beteiligt ist. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wären u. a. proteinbiochemische Analysen anzustreben, die eine Bindung von Methyltransferasen der *Mixed-Lineage/Leukemia*-Familie, der *SET-Domain Containing*-Familie oder von *ASH1*, für die eine Trimethylierung von H3K4 beschrieben wurde (KOUZARIDES, 2007), an LINC-Bestandteile untersuchen und ggf. überprüfen, ob LIN9 für die Bindung dieser Enzyme an LINC verantwortlich ist. Weiterhin wären Untersuchungen zur Promoterbindung dieser chromatin-modifizierenden Enzyme bei den identifizierten *Lin9*-Zielgenen nötig.

Bei der Histon 4-Acetylierung scheint es sich hingegen eher um einen sekundären Effekt zu handeln, da bei den nach *Lin9*-Depletion verstärkt exprimierten Genen eine Zunahme dieser Chromatin-Modifikation beobachtet wurde. Andererseits wäre es natürlich auch denkbar, dass das LIN9-Protein bzw. LINC sowohl Acetylasen als auch Deacetylasen an das Chromatin rekrutieren können und hierdurch die transkriptionelle

Aktivität der entsprechenden Chromatinregion reguliert wird. Für eine solche Annahme existiert jedoch bislang keinerlei Evidenz.

4.1.3 Spielt Lin9 eine Rolle bei der Genrepression?

Bei allen *Microarray*-Analysen unserer Arbeitsgruppe an Lin9-depletierten Zellen (OSTERLOH et al., 2007; KLEINSCHMIDT et al., 2009; REICHERT et al., 2010; ESTERLECHNER et al., 2013) wurde auch eine Population nach Lin9-Depletion verstärkt exprimierter Gene detektiert. Bei den Untersuchungen an konditionell Lin9-depletierten MEFs stellen Gene, die mit DNA-Rekombination, DNA-Reparatur und Transkriptionsregulation assoziiert sind, die größte funktionelle Gruppe in dieser Population dar (REICHERT et al., 2010). Bei den qPCR-Analysen konnte in asynchronen MEFs 12 h nach Beendigung der 48-stündigen cre-Induktion durch 4-OHT jedoch nur für vier Zielgene aus dieser Gruppe eine um mindestens Faktor 1,5 verstärkte Expression detektiert werden (Abb. 3.9). Bei den Expressionsanalysen im Zellzyklusverlauf wurde lediglich für Rad51 eine signifikant differente Expressionskinetik beobachtet, während für Fancg, das bei den qPCR-Untersuchungen an asynchronen MEFs nach Lin9-Verlust am stärksten heraufregulierte Gen, nahezu kein Unterschied in der Expressionskinetik bestand (Abb. 3.10). Neben der Tatsache, dass nur wenige der im *Microarray* detektierten Zielgene auch tatsächlich validiert werden konnten, zeigte sich bei verschiedenen Experimenten eine relativ ausgeprägte Variation der Expressionslevel für die einzelnen Gene (Daten nicht gezeigt), was insgesamt dafür spricht, dass es sich um falsch positive Zielgene oder indirekte Effekte handelt. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass die Expressionssteigerung zumindest bei manchen der untersuchten Gene durch sekundäre Effekte zu erklären sein könnte. In der vorliegenden Arbeit und der Studie von HAUSER et al. (2011) wurde dargelegt, dass der Verlust von Lin9 zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Zellzyklusverteilung und der genomischen Stabilität führt, was die indirekte Aktivierung von Genen, die mit DNA-Rekombination, DNA-Reparatur und der Transkriptionsregulation assoziiert sind, plausibel erscheinen lässt.

Bei den Untersuchungen von ESTERLECHNER et al. (2013) fanden sich unter den nach Lin9-Depletion verstärkt exprimierten Genen vor allem solche, die mit Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen assoziiert sind. Es zeigte sich keinerlei Überschneidung mit den Genen, die bei Lin9-defizienten MEFs verstärkt exprimiert werden. Auch konnten die 26 in ES-Zellen herauf regulierten Gene mit

nachgewiesener LIN9-Promoter-Bindung keinem distinkten biologischen Prozess zugeordnet werden. Insbesondere für die entwicklungs- und differenzierungsassoziierten Gene konnte keine LIN9-Promoterbindung bestätigt werden, was ebenfalls nahe legt, dass deren Expressionssteigerung einen indirekten Effekt des LIN9-Verlustes darstellt, z. B. als Folge einer Verschiebung der Zellzyklusverteilung oder einer Beeinträchtigung der genomischen Stabilität.

Im Gegensatz zu der bei allen Genexpressionsstudien unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung verschiedener Organismen, Zelltypen und Methoden zur Depletion von Lin9 beschriebenen Bedeutung von Lin9 für die Transkriptionsaktivierung von G₂/M-Genen mit einer signifikanten Überschneidung der detektierten Zielgene (Abb. 4.1B), fanden sich kaum Gemeinsamkeiten bei den nach Lin9-Verlust heraufregulierten Genen, was nachdrücklich gegen eine konservierte direkte LIN9-Funktion bei der Repression einer bestimmten funktionellen Gruppe von Genen spricht. Während für die Regulation der G₂/M-Zielgene durch LIN9 bzw. LINC inzwischen erste mechanistische Details bekannt sind (siehe Kap. 4.1.2), bleiben die Prozesse, welche eine Heraufregulation von Genen in Lin9-defizienten Zellen vermitteln könnten, weitgehend unverstanden.

In der Gesamtschau ist für die eindeutige Feststellung einer Funktion von LIN9 bei der direkten Repression von Zielgenen bei asynchronen Zellen keine hinreichende Evidenz gegeben. Es bedarf demnach weiterer experimenteller Ansätze zur Klärung einer solchen Funktion und deren biologischer Relevanz. Da die bisherigen Expressionsanalysen und Chromatin-Immunpräzipitationsdaten an asynchronen Zellen erhoben wurden, zugleich jedoch eine Funktion von LINC bei der Genrepression in der G₀-Phase beschrieben wurde (LITOVCHICK et al., 2007, 2011), wäre die Durchführung genomweiter Expressionsanalysen bei Lin9-positiven und Lin9-depletierten quieszenten Zellen sowie die Untersuchung der Lin9-Promoter-Bindung mittels *ChIP-on-Chip* in der Quieszenz zu erwägen. Noch aussagefähiger, jedoch mit einem erheblichen experimentellen Aufwand verbunden, wäre die Durchführung von genomweiten Expressions- und ChIP-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklusverlauf während und nach Synchronisation der Zellen in der G₀-Phase.

4.2 Die verminderte Expression von G₂/M-Genen bei Lin9-defizienten Zellen geht mit mitotischen und zytokinetischen Defekten einher

4.2.1 G₂/M-Progressionsverzögerung

Bei der Untersuchung der Zellzykluskinetik nach Arretierung von MEFs in der G₀-Phase durch Serum-Entzug zeigte sich, dass LIN9 für den zeitgerechten Eintritt in die S-Phase und das Durchlaufen dieser nicht essentiell ist. Anschließend fand sich jedoch eine Verzögerung beim Eintritt in die G₂/M-Phase um 3 bis 6 Stunden (Abb. 3.4). Diese Ergebnisse deuten auf eine verzögerte Zellzyklusprogression in der G₂-Phase hin. Ähnliche Phänomene wurden von OSTERLOH et al. (2007) nach Lin9-Depletion mittels RNAi bei humanen Fibroblasten sowie von KLEINSCHMIDT et al. (2009) nach Morpholino-basierter Lin9-Depletion bei Zebrafischembryonen beobachtet. Bei beiden Studien wurde ein breites Spektrum LIN9-abhängig exprimierter Zielgene, die für das zeitgerechte und korrekte Durchlaufen der G₂- und M-Phase benötigt werden, detektiert.

Als wesentlicher Faktor für die G₂-Progressionsverzögerung bei humanen Lin9-defizienten Zellen wurde stets die verminderte Expression von G₂/M-Zyklinen (Zyklin B1 und Zyklin A2) und CDK1 angenommen. Die *Microarray*-Daten bei humanen BJ-Zellen weisen sowohl das *Ccnb1*-Gen (Zyklin B1), das Zyklin A2, welches u. a. für die Stabilisierung des Zyklin B-CDK1 Komplexes benötigt wird, als auch die CDK1 (*Cdc2*-Gen) unter den sieben nach Lin9-Verlust am stärksten herabregulierten Genen aus (OSTERLOH et al., 2007). Auch die *Microarray*-Daten bei Zebrafisch-Embryonen zeigen eine signifikante Herabregulation von *Cdc2* nach Morpholino-vermittelter Lin9-Depletion, während sich für Zyklin B1 nur eine minimale Expressionsminderung fand und eine Überexpression von Zyklin B1-mRNA die G₂/M-Akkumulation nicht kompensieren konnte (KLEINSCHMIDT et al., 2009). Diese Unterschiede verdeutlichen, dass man den Einfluss von LIN9 auf die Zyklin-Expressionskinetik bei verschiedenen Vertebraten art-, zelltyp- und entwicklungs-spezifisch betrachten muss.

Auch im murinen System wurde die LIN9-abhängige Expression der Zykline durch N. REICHERT untersucht. Während bei der *Microarray*-Analyse eine signifikante Herabregulation von Zyklin B1 sowie des Orphan-Zyklins F, für das ebenfalls eine Rolle bei der G₂/M-Transition beschrieben ist (FUNG & POON, 2005), nach Lin9-Depletion in asynchronen MEFs dokumentiert wurde, waren die Ergebnisse bei anderen, qPCR-basierten Experimenten uneinheitlich. Bei der Mehrzahl der

Versuchsreihen ergab sich nur eine moderat verminderte Zyklin B1-Expression. Für Zyklin A2 und Cdc2 zeigte sich keine signifikant differente Expression (N. REICHERT, unveröffentlichte Daten).

Ein weiteres in dieser Hinsicht relevantes Produkt eines Lin9-Zielgens, das in dieser Arbeit sowie bei den Untersuchungen von OSTERLOH et al. (2007) identifiziert wurde, ist die Polo-Like-Kinase 1 (PLK1). Für diese Serin-Threonin-Kinase konnte in verschiedenen Studien die Förderung des Eintritts in die Mitose mittels Aktivierung zahlreicher Interaktionspartner gezeigt werden. Insbesondere die Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25, welche wiederum für die Aktivierung von Zyklin B1-CDK1 benötigt wird, leistet einen entscheidenden mechanistischen Beitrag zur G₂/M-Transition (ABRIEU et al., 1998; QIAN et al., 1998; KARAISSKOU et al., 1999). Sowohl in den *Microarray*-Daten als auch bei den in dieser Arbeit dargestellten qPCR-Experimenten zeigte sich eine signifikante Herabregulation des Plk1-Gens nach Verlust von Lin9. Auch bei den Expressionsanalysen im Zellzyklusverlauf nach vorheriger Synchronisation der MEFs in der G₀-Phase fand sich 20-24 Stunden nach dem Wiedereintritt eine um Faktor 1,3 – 1,5 verminderte Plk1-Expression. Es ist daher davon auszugehen, dass das Zusammenspiel aus verminderter Expression mitotischer Zykline und Plk1 in Lin9-defizienten MEFs in Verbindung mit der reduzierten transkriptionellen Aktivität anderer G₂/M-Gene für die beschriebene G₂-Progressionsverzögerung verantwortlich ist.

4.2.2 Binukleärer Phänotyp, An- und Polyploidie

Aus durchflusszytometrischen Experimenten von N. REICHERT ist bekannt, dass 48 Stunden nach dem Beginn der cre-Induktion durch 4-OHT bei Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs vermehrt polyploide Kerne sowie SubG₁-Zellen auftreten und sich diese Entwicklung während der folgenden 72 Stunden weiter aggraviert (REICHERT et al., 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Lin9 zu einem starken Anstieg des Anteils binukleärer Zellen sowie von Zellen mit irregulären Kernformen führt (Abb. 3.1). Der binukleäre Phänotyp war bereits 24 h nach dem Ende der 4-OHT-Behandlung ausgeprägt nachweisbar (26,7% der Zellen) und nahm auch während der nächsten 48 h erheblich zu. Diese Beobachtungen gehen einher mit dem Anstieg des 4n-*Peaks* und der polyploiden Zellen bei durchflusszytometrischen Untersuchungen im Zeitverlauf (Abb. 3.16A; REICHERT et al., 2010). Zudem konnte beobachtet werden, dass Zellen mit aberranten Kernformen oder bereits binukleärem Phänotyp weiterhin

BrdU inkorporieren. Dies deutet darauf hin, dass diese Zellen weiterhin in der Lage sind, die S-Phase zu durchlaufen und die DNA-Synthese durchzuführen (Abb. 3.3C), was die weitere Aggravierung der An- und Polyploidie erklärt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass der binukleäre Phänotyp durch transiente Transfektion mit einem Lin9-haltigen Plasmid nahezu vollständig kompensierbar ist. Dies dokumentiert, dass der binukleäre Phänotyp keine Folge sekundärer Effekte, der 4-OHT-Behandlung oder einer mit cre assoziierten Toxizität ist. Basierend auf diesem Erkenntnis wurde untersucht, in wie fern sich der binukleäre Phänotyp durch retrovirale Überexpression oder durch transiente Transfektion ausgewählter Lin9-Zielgene mit bekannter Funktion in der Mitose kompensieren lässt. Während sich auch bei diesen Studien der binukleäre Phänotyp sowohl durch transiente Transfektion als auch durch retrovirale Überexpression von Lin9 kompensieren ließ, war durch Überexpression von Gas2L3, Nusap oder Cenpf nur ein geringer bzw. kein Effekt auf den Prozentsatz binukleärer Zellen zu beobachten (L. PROBST, nicht publiziert). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Lin9-Depletion zur Abnahme der Expression einer Vielzahl von Genen führt, die an verschiedenen Ansatzpunkten wie der Mikrotubuli-Assemblierung, der Chromosomensegregation oder der zytokinetischen Abszission für die mitotische und zytokinetische Integrität verantwortlich sind.

4.2.3 Aberrationen bei der Mitose und Zytokinese

Eine wesentliche Ursache der Entstehung von an- und polyploiden Zellen sind Unregelmäßigkeiten beim Aufbau des mitotischen Spindelapparats, der Chromosomensegregation und der Zytokinese (RAJAGOPALAN & LENGAUER, 2004). In dieser Arbeit konnte sowohl durch Tubulin-spezifische Immunfluoreszenz-Färbungen als auch durch *Time Lapse*-mikroskopische Untersuchungen eine Bandbreite von Defekten und Aberrationen der Mitose und Zytokinese bei Lin9-defizienten MEFs detektiert werden. Das Spektrum der Unregelmäßigkeiten umfasste überzählige Zentrosomen mit einem multipolar aufgebauten Spindelapparat, unregelmäßig verteilte Chromosomen, Chromatinbrücken in der Anaphase sowie Chromatin-Fragmente zwischen den neu entstandenen Tochterzellen (Abb. 3.5 und Abb. 3.6).

Vergleichbare Phänotypen wurden für den Verlust von mehreren bei Lin9-depletierten MEFs herabregulierten mitotischen Zielgenen beschrieben. Auf eine Auswahl dieser Gene, deren Funktion und die mit deren Verlust assoziierten Phänotypen soll im Folgenden näher eingegangen werden um die Frage zu adressieren, in wie fern sich

die beobachteten Defekte durch die Expressionsminderung dieser Gene erklären lassen.

Das anhand der *Microarray*-Daten nach Lin9-Verlust mit einer Herabregulation um Faktor 3,19 am stärksten reprimierte Gen ist Gas2L3. Auch bei den qPCR-Experimenten bei asynchronen Zellen und im Zellzyklusverlauf nach Synchronisation zeigte sich eine ausgeprägte Herabregulation dieses Gens bei Lin9-defizienten Zellen. Die Lokalisation und Funktion von GAS2L3 wurde kürzlich in unserer Arbeitsgruppe durch WOLTER et al. (2012) charakterisiert. Aus dieser Studie ist bekannt, dass GAS2L3 im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der GAS2-Familie sein Expressionsmaximum in der G₂/M-Phase aufweist. Es wurde in humanen HeLa-Zellen gezeigt, dass neben der Lin9-Defizienz auch die RNAi-basierte Depletion von Lin54, einem anderen Bestandteil des LINC-Kernkomplexes, zu einer signifikanten Repression der Gas2L3-Expression führt, was eine LINC-abhängige Regulation des Gens unterstreicht. Durch transiente Überexpression von EGFP-Gas2L3, welches fluoreszenzmikroskopisch detektierbar ist, wurde nachgewiesen, dass GAS2L3 während der Zytokinese am *Midbody* beidseits an der interzellulären Brücke lokalisiert ist. In der Interphase wurde das Protein zytoplasmatisch detektiert, wo es an Mikrotubuli bindet. Während der Mitose wurde GAS2L3 an der mitotischen Spindel nachgewiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass GAS2L3 Mikrotubuli gegen Nocodazol-induzierte Depolymerisation stabilisiert und dass das Protein gleichzeitig Mikrotubuli und Aktin-Filamente binden kann, was möglicherweise eine Funktion bei der Verknüpfung von Mikrotubuli und dem Aktinomyosin-Ring an der Teilungsfurche nahe legt (WOLTER et al., 2012; PE'ER et al., 2013).

Nach Depletion von Gas2L3 mittels RNAi fand sich ein hoher Anteil multilobulärer Kerne sowie binukleärer Zellen. Durch *Time lapse*-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass nach Gas2L3-Depletion die Meta- und Anaphase ohne erkennbare Defekte durchlaufen werden, in der Telophase jedoch bei etwa 17% der Kerne eine kurzzeitige Oszillation der Spindel und der Chromosomen zwischen den entstehenden Tochterzellen eintritt, wonach die Chromosomen wiederum zu einer Kernmasse verschmelzen. Eine ähnliche Aberration wurde bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *Time lapse*-mikroskopischen Untersuchungen Lin9-defizienter MEFs ebenfalls detektiert (Abb. 3.6D, untere Zeile).

Weiterhin wurden in humanen BJ-Zellen die Auswirkungen des Gas2L3-Verlustes auf die genomische Stabilität untersucht, wobei sich herausstellte, dass nach Kultivierung über 26 Generationen etwa 20% der Gas2L3-depletierten Zellen aneuploid oder

polyploid waren (WOLTER et al., 2012). Auch wenn diese Zahl nicht an die für den Verlust von LIN9 beobachteten Werte heranreicht, wo sich durchflusszytometrisch bereits nach zwei bis drei Generationen (48 bzw. 72 h) bis zu 38% polyploide Zellen fanden, dokumentiert diese Studie eine nicht unerhebliche phänotypische Überschneidung des Verlustes von Gas2L3 und Lin9. In der Gesamtheit legen diese Studien nahe, dass der Verlust der LINC-abhängigen Expression von Gas2L3 entscheidend zu den zytokinetischen Defekten, die nach Lin9-Depletion auftreten, beiträgt.

Auch für Nusap, das ebenfalls zu den in Lin9-defizienten MEFs am stärksten reprimierten Genen zählt, existieren Daten zur Funktion in der Mitose und zu den phänotypischen Auswirkungen einer RNA-Interferenz-basierten Depletion. Das 52 kDa-Protein bindet mit seinem C-terminalen Abschnitt *in vitro* und *in vivo* an Mikrotubuli und ist während der M-Phase an den zentralen Spindelfasern lokalisiert. Die Depletion von Nusap führte zu einer Akkumulation von Zellen in der G₂/M-Phase und zu einem breiten Spektrum an mitotischen Defekten. So wurden u. a. abnorme Formationen von Mikrotubuli in der Prometaphase, multipolare Spindeln, desorganisierte zentrale Spindelfasern in der Metaphase, Aberrationen der Chromosomenkondensation, Störungen der Chromosomen-Anheftung an die Mikrotubuli und Störungen der Chromosomensegregation beobachtet. Des Weiteren wurden zytokinetische Defekte nach Nusap-Depletion dokumentiert, die dazu führten, dass beide Chromosomensätze in eine Tochterzelle gelangten, einhergehend mit einem Anstieg des Anteils binukleärer Zellen von 4% auf 12% im Vergleich zu Kontrollzellen. Zusätzlich wurden auch charakteristische Formvarianten bei Interphase-Kernen beschrieben. Insbesondere wurden eingestülpte und gefaltete Kerne detektiert (RAEMAEEKERS et al., 2003). In der Gesamtheit bilden diese Defekte einen Großteil des Spektrums ab, das sich auch bei Lin9-depletierten Zellen fand.

ASPM (*Abnormal spindle-like, microcephaly associated*) ist das humane Homolog zum *abnormal spindle*-Protein von *D. melanogaster*. Für das humane ASPM wurde eine Bindung an die Zentrosomen, die Spindelpole sowie den Midbody in der Zytokinese beschrieben (KOUPRINA et al., 2005; ZHONG et al., 2005; PARAMASIVAM et al., 2007). Durch RNAi-basierte Studien in murinen neuroepithelialen Zellen wurde gezeigt, dass ASPM für die regelmäßige Orientierung der Teilungsfurche essentiell ist und bei Aspm-Verlust vermehrt asymmetrische Zellteilungen auftreten (FISH et al., 2006). In einer anderen Studie wurde eine vermehrte Expression von Aspm in humanen Glioblastomen beobachtet und gezeigt, dass dessen RNAi-vermittelte Depletion die

Wachstumsgeschwindigkeit von Tumorzellen und neuronalen Stammzellen erheblich reduzieren kann, wodurch das Protein ein potentielles Angriffsziel für *Targeted Therapy*-Ansätze darstellt (HORVATH et al., 2006). Auch in hepatozellulären Karzinomen wurde eine Assoziation der Aspm-Expression mit einer erhöhten Metastasierungstendenz und verstärkter Gefäßinvasion beobachtet (LIN et al., 2008). Anhand von zwei *gene trap*-Mausmodellen, die zu C-terminal unterschiedlich stark verkürzten ASPM-Mutanten führen, wurde gezeigt, dass die Aspm-Mutation mit einer reduzierten Gehirnmasse und schweren Defekten bei der Keimbahnentwicklung einhergeht, jedoch interessanterweise trotz des Verlustes der Bindung des mutierten ASPM an den *Midbody* keine offensichtlichen Veränderungen der Kernmorphologie oder mitotische Defekte auftreten. Auch ergab sich kein Hinweis für eine G₂/M-Akkumulation (PULVERS et al., 2010). Im Gegensatz hierzu konnte in einer anderen Arbeit durch eine Morpholino-vermittelte Depletion von Aspm in murinen Oozyten gezeigt werden, dass der Verlust von Aspm mit einem desorganisierten meiotischen Spindelaufbau und einem Arrest in der ersten meiotischen Reifeteilung einhergeht (XU et al., 2012). Auch bei *D. melanogaster* und *C. elegans* wurde beschrieben, dass der Verlust bzw. Mutationen der ASPM-homologen Proteine zu Aberrationen beim Spindelaufbau sowie bei der Zytokinese führen (DO CARMO AVIDES & GLOVER, 1999; WAKEFIELD et al., 2001; VAN DER VOET et al., 2009). Auch wenn die Auswirkungen des Aspm-Verlustes in Säugetierzellen noch nicht abschließend geklärt sind, erscheint es vor diesem Hintergrund nicht unwahrscheinlich, dass auch die Herabregulation von Aspm nach Verlust von Lin9 zur verminderten Zellproliferation und zum desorganisierten Spindelssystem beiträgt.

Hinsichtlich der mitotischen Funktion von RHAMM, dem Produkt des Lin9-Zielgens *Hmmr* (*Hyaluronan-mediated motility receptor*) ist bekannt, dass das Protein mit Mikrotubuli interagiert und am Aufbau der Zentrosomen beteiligt ist (ASSMANN et al., 1999; MAXWELL et al., 2003; PUJANA et al., 2007). Durch Immunblockade des Proteins in HeLa-Zellen kam es zu einer Zunahme von tri- und tetrapolaren Spindeln, wobei der Aufbau des Spindelapparates bei den meisten Zellen jedoch nicht beeinträchtigt war, was wahrscheinlich durch eine partielle Kompensation der Funktion durch andere Proteine erklärt wird (MAXWELL et al., 2003). Ferner wurde für das Protein eine BRCA1/BARD1-abhängige Regulation der Zentrosomenzahl und eine Beteiligung bei der Organisation der mitotischen Mikrotubuli in Mamma-Epithel-Zelllinien und Mamma-Ca-Zelllinien gezeigt (JOUKOV et al., 2006; PUJANA et al., 2007). *Splice*-Varianten und

Überexpression von Hmnr wurden bei verschiedenen hämatologischen und soliden Neoplasien beschrieben (CRAINIE et al., 1999; LI et al., 2000).

Unter den nach Lin9-Depletion am stärksten herabregulierten Genen fanden sich auch die Centromer-Proteine CENPA, CENPE und CENPF. YEN et al. (1992) beschrieben CENPE als Kinesin-ähnliches Motorprotein, das in der G₂-Phase des Zellzyklus akkumuliert. Es bindet während der Chromosomen-Kongression an die Kinetochoren und ist während der Anaphase an den zentralen Spindelfasern lokalisiert (YEN et al., 1992). YAO et al. (2000) zeigten, dass CENPE für die regelgerechte Anheftung der Chromosomen an die Mikrotubuli sowie die Stabilisierung der Spindelpole benötigt wird. Weiterhin wurde dargelegt, dass CENPE mit BubR1 interagiert und bei der Regulation der Aktivität des APC bzw. des Cyclosoms involviert ist (CHAN et al., 1999; YAO et al., 2000). PUTKEY et al. (2002) demonstrierten, dass der Cenpe-Verlust bei Mäusen mit früher embryonaler Letalität einhergeht. Anhand eines cre-loxP-basierten konditionellen Cenpe-Knockout-Mausmodells wurde die Funktion von CENPE näher analysiert. Es wurde gezeigt, dass der Verlust von Cenpe mit verschiedenen Aberrationen der Chromosomenverteilung in der Meta- und Anaphase einhergeht. Insbesondere wurde gezeigt, dass die Anzahl der an die einzelnen Kinetochoren angehefteten Kinetochor-Spindelfasern vermindert ist. Auch im Lebergewebe von Cenpe-depletierten Mäusen zeigte sich nach toxischer Induktion eines Regenerationsvorgangs durch CCl₄ eine Zunahme von Zellen, bei denen sich bereits zu Beginn der Anaphase Chromosomen an den Spindelpolen befanden, sowie eine Zunahme von inkorrekt angeordneten Chromosomen in der Metaphase (PUTKEY et al., 2002).

Für CENPF (Mitosin), ein zwischen der späten G₂-Phase und der Anaphase an der äußeren Kinetochorplatte lokalisiertes Protein (LIAO et al., 1996), wurde beschrieben, dass seine Depletion mittels RNAi zu einer Progressionsverzögerung in der mitotischen Metaphase und zu einer Zunahme apoptotischer Zellen führt. Weiterhin wurden in dieser Studie in Abwesenheit von CENPF vermehrt fehlerhaft oder nicht an die Spindelfasern angeheftete Chromosomen, Aberrationen bei der Chromosomen-Kongression und der mitotischen Chromosomen-Bewegung sowie eine verminderte Distanz der Schwester-Kinetochoren in der Metaphase beobachtet. Auch wurde gezeigt, dass CENPF für die CENPE-Kinetochor-Assoziation essentiell ist, was die nicht unerhebliche Überschneidung der Phänotypen bei Verlust von Cenpf bzw. Cenpe erklärt (YANG et al., 2005).

Ein weiteres Lin9-Zielgen, für dessen Produkt diverse Funktionen bei der Regulation und Kontrolle mitotischer Vorgänge beschrieben sind, ist die Aurora-Kinase A. AURKA gehört zu einer hoch konservierten Familie von Serin-Threonin-Kinasen (GIET et al., 2005). Die Expression des Aurka-Gens ist zellzyklusabhängig reguliert und erreicht ihr Maximum in der G₂/M-Phase (BISCHOFF et al., 1998; ZHOU et al., 1998). Während der G₁- und S-Phase ist das Protein vor allem an den Zentrosomen lokalisiert, von der Prophase bis zu Anaphase an den Spindelpolen und in der Telophase und während der Zytokinese im Bereich der *Midzone* (GIET et al., 2005). Bei der Ausbildung des Spindelapparates ist AURKA essentiell für die Reifung der Zentrosomen, die Bildung von γ -Tubulin und die Organisation der astralen Spindel (HANNAK et al., 2001). Des Weiteren ist die Kinase beteiligt beim *Alignment* der Metaphase-Chromosomen und bei der Zytokinese (MARUMOTO et al., 2003). Auch ist eine Mitwirkung beim Abbau der Kernmembran zu Beginn der Mitose beschrieben (PORTIER et al., 2007).

Die Depletion von Aurka1 durch RNAi und Antikörper-Injektion in HeLa-Zellen führt zu multiplen mitotischen Defekten wie einer fehlerhaften Anheftung der Chromosomen an die Spindelfasern, einem multipolaren Spindelaufbau, einer gestörten Chromosomensegregation sowie multinukleären Zellen. Damit einhergehend fand sich eine Progressionsverzögerung in der G₂-Phase und frühen M-Phase, während die späten Mitosestadien ohne Verzögerung durchlaufen werden (MARUMOTO et al., 2003).

In der Gesamtschau sind für den Verlust vieler der in dieser Arbeit detektierten und auch in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe identifizierten Lin9-Zielgene zu dem bei Lin9-defizienten MEFs beobachteten Phänotyp ähnliche Aberrationen dokumentiert worden. Es ist daher davon auszugehen, dass die verminderte Synthese von GAS2L3, NuSAP, ASPM, RHAMM, der Centromer-Proteine E und F und AURKA entscheidend zu den in dieser Arbeit beschriebenen mitotischen und zytokinetischen Defekten beiträgt. Auch für zahlreiche weitere Lin9-Zielgenen sind essentielle Funktionen für den wohl regulierten und orchestrierten Ablauf der Kern- und Zellteilung beschrieben (Abb. 4.1C). Die signifikant reduzierte Expression von Genen, deren Produkte bei der G₂/M-Regulation, beim Spindelaufbau, der Chromosomensegregation oder der Zytokinese fungieren, ist daher als zentrale Ursache der beschriebenen mitotischen und zytokinetischen Defekte Lin9-defizienter MEFs anzunehmen.

Durch Untersuchungen von T. ULLRICH an adulten Mäusen ist bekannt, dass die Assoziation zwischen der verminderten Expression von G₂/M-Zielgenen in Lin9-depletierten Zellen und mitotischen Aberrationen auch *in vivo* beobachtet werden kann. Drei Tage nach intraperitonealer Tamoxifen-Injektion zur cre-Induktion in Lin9 fl/fl

creER^{T2}-Mäusen fand sich eine signifikante Herabregulation von mitotischen Lin9-Zielgenen, einhergehend mit einer erheblich reduzierten Proliferation von Zellen des intestinalen Epithels und morphologischen Auffälligkeiten deren Zellkerne. Dieser Proliferationsdefekt führte zu einer massiven Störung der Architektur und Funktion des Dünndarmepithels, wo sich 6 Tage nach Verlust von Lin9 eine Atrophie von mehr als 80% des Villusepithels fand. Zu diesem Zeitpunkt waren alle untersuchten Lin9 fl/fl creER^{T2}-Mäuse, bei denen cre induziert wurde, verstorben (REICHERT et al., 2010). Diese Untersuchungen dokumentieren die Relevanz der durch Lin9 regulierten Expression von Zellzyklusgenen für die strukturelle und funktionelle Integrität von Geweben.

4.3 Der Verlust von Lin9 führt zur zellulären Seneszenz und trägt zur onkogenen Transformation bei

4.3.1 Die Depletion von Lin9 führt zur zellulären Seneszenz

Für den homozygoten Verlust von Lin9 in MEFs wurde ein massiver Proliferationsverlust und Wachstumsarrest gezeigt. Zudem wurde bei mehreren durchflusszytometrischen Untersuchungen Lin9-depletierter MEFs (Propidiumjodid-FACS) im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie durch N. REICHERT neben der Zunahme von an- und polyploiden Zellen auch ein Anstieg der SubG₁-Fraktion beobachtet (Abb. 3.16A; REICHERT et al., 2010). Zur Abklärung des langfristigen Schicksals Lin9-defizienter Zellen und zur Differenzierung der Mechanismen, die zu einer Zunahme von Zellen mit einem DNA-Gehalt von < 2n beitragen können, wurden Annexin V-FACS-Analysen und β -Galaktosidase-Färbungen vorgenommen.

Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde keine signifikante Zunahme Annexin V-positiver Zellen nach Lin9-Depletion detektiert, sodass nicht von einer deutlich erhöhten Rate apoptotischer Zellen auszugehen ist. Auf der anderen Seite zeigte sich nach Depletion von Lin9 eine Zunahme von β -Galaktosidase-positiven Zellen und von Zellen mit einer typischen *flat cell*-Morphologie (Abb. 3.7). Diese beiden Beobachtungen stellen Charakteristika seneszenten Zellen dar.

Die zelluläre Seneszenz fungiert als typischer Schutzmechanismus gegenüber onkogener Transformation und Tumorbildung. Sie kann u. a. durch oxidativen oder onkogenen Stress sowie durch DNA-Schäden induziert werden (ADAMS, 2009). Auch

Störungen des Ablaufs der Mitose durch den Verlust von wichtigen mitotischen Regulatoren oder von Centromer-Proteinen sind mit der Entstehung seneszenten Zellen assoziiert (BAKER et al., 2004; SCHLIEKELMAN et al., 2009; MAEHARA et al., 2010). Vor diesem Hintergrund ist die Induktion zellulärer Seneszenz beim Verlust von Lin9 gut vereinbar mit den zuvor dokumentierten, durch den Lin9-Verlust verursachten, mitotischen Defekten und der zentralen Rolle von LIN9 bei der G₂/M-Genexpression.

In späteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (HAUSER et al., 2011) wurde das Phänomen der zellulären Seneszenz beim Verlust von LIN9 und anderen LINC-Bestandteilen an humanen BJ-Fibroblasten näher untersucht. Dabei konnte sowohl für die Depletion von LIN9 als auch für die Depletion von LIN54 und B-MYB eine Zunahme seneszenten Zellen beobachtet werden. Diese Beobachtung dokumentiert, dass die Induktion zellulärer Seneszenz nicht spezifisch für den Verlust von Lin9 ist.

Des Weiteren konnte sowohl an BJ-Zellen als auch an konditionell Lin9-depletierten MEFs eine Induktion der Zellzyklussuppressoren p21^{Waf1} und p16^{INK4} gezeigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Seneszenz-Induktion bei Lin9-Verlust sowohl über den p53-p21^{Waf1}-Signalweg als auch über die p16^{INK4}-abhängige Inhibition von CDK4/6 und damit über den pRB/E2F-Signalweg vermittelt wird (HAUSER et al., 2011). Ferner wurde in dieser Studie beobachtet, dass die durch den Verlust von LIN9 verursachte Seneszenz durch retrovirale Infektion der Zellen mit dem Large T-Antigen, das sowohl p53 als auch pRB und die pRB-verwandten *Pocket-Proteine* inhibiert, durchbrochen werden kann, nicht jedoch durch Large T-Mutanten, die nur jeweils einen der beiden Signalwege inhibieren können. Damit wurde gezeigt, dass die bei Lin9-defizienten Zellen beobachtete Zunahme seneszenten Zellen jeweils unabhängig voneinander über den p53- und den pRB-Signalweg vermittelt werden kann (HAUSER et al., 2011).

Umgekehrt wurde in einer Studie von SONG et al. (2010) gezeigt, dass die LIN9-Expression bei seneszenten Zellen p19^{ARF}- und p53-abhängig herabreguliert ist. Es wurde beschrieben, dass p19^{ARF} die Translokation von LIN9 in den Nukleolus vermitteln und die LIN9-Expression posttranskriptionell inhibieren kann. Gleichzeitig wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Lin9-Depletion in p53-negativen Zellen zu einer Induktion von p16^{INK4} und p19^{ARF} und zu einem Seneszenz-ähnlichen Phänotyp führt. Von den Autoren dieser Arbeit wird angenommen, dass die Herabregulation von Lin9 an einer Feedback-Schleife beteiligt ist, die einerseits zu einer verminderten G₂/M-Expression und andererseits durch Aktivierung Seneszenz-fördernder Faktoren wie p16^{INK4} und p19^{ARF} zu einem G₁/S-Arrest führt. Die Aktivierung von p16^{INK4} und p19^{ARF}

nach Depletion von Lin9 ist dabei nicht auf eine direkte LIN9-abhängige Repression, sondern auf den Wegfall der LIN9-vermittelten transkriptionellen Aktivierung von bekannten p16^{INK4}/p19^{ARF}-Repressoren wie BUBR1 und CDC6 zurückzuführen. Nach diesem Modell kann die Depletion von Lin9 zum einen als Auslöser von Seneszenz-induzierenden Mechanismen fungieren. Auf der anderen Seite kann eine anderweitig ausgelöste p19^{ARF}-Aktivierung, z. B. durch DNA-Schäden oder onkogenen Stress, eine p19^{ARF}- und p53-abhängige nukleoläre Sequestration von LIN9 sowie dessen posttranskriptionelle Expressionsinhibition fördern, was letztlich zur irreversiblen zellulären Seneszenz führt (SONG et al., 2010).

Während die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie die Studien von HAUSER et al. (2011) und SONG et al. (2010) zeigen, dass die Depletion von Lin9 (und anderen LINC-Bestandteilen) zur zellulären Seneszenz beiträgt, beobachteten LITOVCHICK et al. (2011) eine andere Funktion von LINC / DREAM bei der G₀/G₁-Genregulation und Seneszenz-Induktion. Sie beschrieben, dass die DYRKA1 (*Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*)-abhängige S28-Phosphorylierung von LIN52 die Assemblierung des MuvB-Kernkomplexes an E2F4/p130 vermittelt. Die Inhibition dieser Modifikation durch Depletion von DYRKA1 mittels RNA-Interferenz geht ebenso wie eine *Missense*-Punktmutation, die zum Austausch des Serin 28 von LIN52 führt, mit dem Verlust der Fähigkeit zur G₀-Arretierung bei Entzug von Wachstumsfaktoren einher. Auch die Seneszenz-Induktion durch RAS ist bei diesen Zellen beeinträchtigt (LITOVCHICK et al., 2011). Diese Studie dokumentiert demnach, dass DREAM / LINC bei der Induktion eines G₀/G₁-Arrests sowie bei der Vermittlung Onkogen-induzierter Seneszenz essentiell ist. Von den Autoren wird angenommen, dass durch die DYRKA1-vermittelte LIN52-Phosphorylierung eine Veränderung der Komplexzusammensetzung vom Myb-MuvB-Komplex zum p130-, E2F4- und DP1-bindenden DREAM vermittelt wird.

Die potentielle klinische Bedeutung dieses Mechanismus wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie dokumentiert. Durch BOICHUK et al. (2013) wurde beschrieben, dass ein Teil der Zellen von gastro-intestinalen Stromatumoren (GIST) *in vitro* und *in vivo* unter Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib nicht apoptotisch wird, sondern in einen quieszenten Zustand eintritt. Es konnte gezeigt werden, dass die S28-Phosphorylierung von LIN52 an der Vermittlung des Übertritts von GIST-Zellen in die G₀-Phase unter Behandlung mit Imatinib beteiligt ist. Mittels pharmakologischer Inhibition von DYRKA1 durch Harmin konnte der Anteil apoptotischer Zellen unter Imatinib-Behandlung *in vitro* signifikant gesteigert werden (BOICHUK et al., 2013). Diese

Ergebnisse zeigen, dass DREAM bzw. DREAM-Bestandteile in Zukunft im onkologischen Kontext als therapeutische Angriffspunkte dienen könnten.

Ähnlich zu den Beobachtungen bei der Regulation der Genexpression scheint die Funktion des DREAM / LINC sowie der einzelnen Bestandteile und Bindungspartner der Multiproteinkomplexe bei der Vermittlung der Quieszenz und der zellulären Seneszenz vielschichtig zu sein. Hier erscheint es nötig, durch weitere Untersuchungen noch detaillierter herauszuarbeiten, welche Funktionen die einzelnen Bestandteile von LINC abhängig vom zellulären Kontext gemeinsam ausführen und wo möglicherweise einzelne LINC-Komponenten exklusive Funktionen ausüben, für die andere Komplexbestandteile nicht essentiell sind. Auch erscheint es in diesem Zusammenhang nötig, zu klären, ob bestimmte Funktionen von DREAM / LINC bei der Inhibition der Zellzyklusprogression durch die Interaktion mit weiteren Repressor-Komplexen wie dem humanen NuRD-Komplex, wie sie bei *C. elegans* angenommen wird (siehe Kapitel 1.3.1), vermittelt werden.

4.3.2 Immortalisierte MEFs können sich an den Verlust von Lin9 adaptieren, neigen dann jedoch zur onkogenen Transformation

Nachdem gezeigt wurde, dass die durch den Verlust von Lin9 bedingte Seneszenz durch das Large T-Antigen durchbrochen werden kann, wurde der Phänotyp dieser Lin9-defizienten immortalisierten Zellen untersucht um zu klären, ob Large T auch andere Auswirkungen des Lin9-Verlustes kompensieren kann. Dabei wurde gezeigt, dass auch in Gegenwart des Large T-Onkogens die Depletion von Lin9 mit einem nachhaltigen Wachstumsdefekt einhergeht (Abb. 3.12; HAUSER et al., 2011). Bei der Untersuchung des binukleären Phänotyps ergab sich analog zu den Beobachtungen bei primären MEFs eine erhebliche Zunahme an binukleären Zellen nach Depletion von Lin9 (Abb. 3.13A). Auch bei den durchflusszytometrischen Profilen zeigte sich, dass die Immortalisierung durch Large T keinen Einfluss auf die durch den Verlust von Lin9 verursachte An- und Polyploidie nimmt und damit nicht in der Lage ist, den mitotischen Phänotyp der Lin9-Defizienz zu kompensieren.

Trotz des Lin9-Verlustes konnten im Kolonie-Bildungs-Assay nach einer Passage mit hoher Verdünnung auch bei den Lin9-defizienten MEFs einige Kolonien heranreifen (Abb. 3.12). Diese Kolonien wurden einzeln von den Kulturplatten abgelöst und expandiert, sodass die entstandenen Zelllinien analysiert werden konnten. Da zunächst angenommen wurde, dass das Wachstum der Kolonien möglicherweise auf eine

insuffiziente Depletion von Lin9 in den jeweiligen Ausgangszellen zurückzuführen sein könnte, wurde durch genomische PCR die erfolgreiche Depletion von Lin9 bestätigt (HAUSER et al., 2011). Somit liegt der Schluss nahe, dass es Mechanismen geben muss, über die es den Zellen möglich ist, sich an den Verlust von Lin9 zu adaptieren. Interessanterweise wurden jedoch auch bei diesen Zellen die typischen Aberrationen der Zellzyklusverteilung beobachtet (Abb. 3.13C), die zuvor bereits bei Lin9-defizienten primären MEFs und bei den Ausgangszellpools der immortalisierten Zellen vor den Kolonie-Bildungs-Assays (Abb. 3.13B) dokumentiert wurden. Im Durchschnitt der vier analysierten Lin9-negativen Einzelkolonien fanden sich fast 80% Zellen mit einem DNA-Gehalt $> 4n$. Im Unterschied zu den primären MEFs war jedoch der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von weniger als $2n$ (SubG₁-Fraktion) bei den einzelnen Kolonien erheblich geringer. Diese Feststellung ist gut vereinbar mit den vorherigen Beobachtungen, dass die SubG₁-Fraktion bei primären Lin9-defizienten MEFs vor allem auf seneszente Zellen zurückzuführen ist und mit der Tatsache, dass Large T die Seneszenz durch p53- und pRB-Inhibition durchbricht. Die ausgeprägte Polyploidie Lin9-negativer immortalisierter Zellen wurde durch Karyogramme bestätigt. Während sich bei zwei der drei untersuchten immortalisierten Kontrollzell-Kolonien überwiegend diploide und in einer Kontrollzell-Kolonie überwiegend stabil tetraploide Zellen fanden, zeigte sich bei der Lin9-defizienten Zellpopulation ein hoher Anteil aneuploider und polyploider Zellen. In einzelnen Zellen wurden bis zu 296 Chromosomen nachgewiesen (HAUSER et al., 2011).

Damit einhergehend wurde eine Bildung großvolumiger Kolonien im Weichagar beobachtet (Abb. 3.13D; HAUSER et al., 2011). Das Substrat-unabhängige Wachstum im Weichagar gilt als charakteristisches Kennzeichen onkogen transformierter Zellen (HAMBURGER & SALMON, 1977). Diese Beobachtungen dokumentieren folglich, dass der homozygote Verlust von LIN9 in Kooperation mit dem Large T-Antigen zur onkogenen Transformation von MEFs beiträgt, was frühere Studien unserer Arbeitsgruppe unterstreicht, die eine Tumorsuppressor-Eigenschaft des humanen LIN9 beschrieben (GAGRICA et al., 2004). Vor dem Hintergrund der dokumentierten Funktion von LIN9 für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und der Tatsache, dass die Aneuploidie zu den Kernmerkmalen von Tumorzellen gehört (Kapitel 1.1.1; HANAHAHAN & WEINBERG, 2000; RAJAGOPALAN & LENGAUER, 2004), erscheint eine Bedeutung von LIN9 als Tumorsuppressor nachdrücklich plausibel.

4.3.3 Die Expression von G₂/M-Zielgenen erfolgt in Zellen, die sich an den Verlust von Lin9 adaptiert haben, Lin9-unabhängig

Um die Vorgänge in immortalisierten Lin9-defizienten Zellen auf der Ebene der transkriptionellen Aktivität der Lin9-Zielgene besser zu verstehen, wurden sowohl von den Ausgangzellpools nach Large T-Immortalisierung +/- Behandlung mit 4-OHT als auch von den erhaltenen Einzelzelllinien Genexpressionsanalysen durchgeführt. Bei den Ausgangzellpools zeigte sich für alle untersuchten mitotischen Zielgene eine um mindestens Faktor 1,74 reduzierte Expression nach Lin9-Depletion (Abb. 3.14). Auf der anderen Seite zeigte sich, dass die aus den Kolonien expandierten Zelllinien trotz des persistierenden Expressionsdefizits von Lin9 eine fast vollständig restituierte G₂/M-Genexpression aufweisen (HAUSER et al., 2011). Es muss diesen Zellen also offensichtlich gelungen sein, die Expression der Lin9-Zielgene von der Verfügbarkeit von Lin9 zu entkoppeln. Aus dieser Beobachtung ergeben sich zwei zentrale Fragen, die in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert werden sollen.

4.3.3.1 Wie kann es zur Lin9-unabhängigen Restitution der Zielgen-Expression kommen?

Die wahrscheinlichste Erklärung für die Lin9-unabhängige Zielgenexpression stellt die Übernahme der Expressionsinduktion durch andere Regulatoren dar. Es ist bekannt, dass nach der LINC-abhängigen Rekrutierung von Fox-M1 dieser Transkriptionsfaktor zusammen mit dem LINC-Kernkomplex an die Promotoren von G₂/M-Genen binden und deren Transkription aktivieren kann (Kapitel 4.1.2; SADASIVAM et al., 2012; SADASIVAM & DECAPRIO, 2013). Es ist bislang jedoch wenig darüber bekannt, welche LINC-Bestandteile diese Bindung nach der Rekrutierung und Phosphorylierung von Fox-M1 vermitteln und ob LIN9 nur für die Rekrutierung von Fox-M1 oder auch für dessen Bindung an die Zielgen-Promotoren selbst benötigt wird. Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass durch zelluläre Adaptationsprozesse Fox-M1 über andere Mechanismen rekrutiert oder stabilisiert werden kann, die bei primären MEFs aufgrund der zuvor eintretenden zellulären Seneszenz nicht mehr zum Tragen kommen. Insgesamt bleibt jedoch relativ unklar, welche Mechanismen es den Zellen ermöglichen können, bei bestimmten Funktionen wie der G₂/M-Genexpression von der LIN9-Funktion unabhängig zu werden.

Eine prinzipiell ebenfalls in Betracht zu ziehende methodische Erklärung wäre, dass ein Teil der Zellen bereits während der Large-T-Immortalisierung und Selektionierung

tetraploid geworden sein könnte und die anschließende cre-Induktion nur zwei oder drei der in diesem Falle vier Lin9-Allele erfolgreich depletieren konnte. Diese Annahme erscheint aufgrund mehrerer Tatsachen und Rahmenbedingungen zunächst nicht unplausibel. Zum einen ist bekannt, dass Large T auch mit Bub1 interferiert, wodurch der Spindel-Kontrollpunkt geschwächt wird, sodass vermehrt polyploide Zellen beobachtet werden (HEIN et al., 2009). Auch bei einer der untersuchten Kontrollzelllinien zeigte sich ein tetraploider Phänotyp. Bei weiteren unabhängigen Experimenten unter Verwendung von anderen Ausgangszellen (MEFs, die aus einem anderen Embryo präpariert wurden) war dieses Problem ebenfalls wiederholt aufgetreten (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wurde durch HAUSER et al. (2011) bei den aus Einzelzellen expandierten Zelllinien eine lediglich auf 20 bis 30% supprimierte Lin9-Expression beschrieben. Diese Werte liegen zwar durchaus im Rahmen der auch bei anderen Experimenten unter Verwendung der Lin9 fl/fl creER^{T2}-MEFs beobachteten Größenordnung und werden bei Zell-Pools dadurch erklärt, dass durch die cre-Induktion nie 100% der Zellen getroffen werden. Unter der Annahme von aus Einzelzellen expandierten Zelllinien würde jedoch aufgrund der Tatsache, dass die cre-Induktion auf der Ebene der Zell-Pools und damit vor der Ausplattierung des Kolonie-Bildungs-Assays erfolgte, entweder eine komplett fehlende Lin9-Expression oder ein Expressionslevel von ca. 50% (bei heterozygoter Depletion, vgl. Abb. 3.17) erwartet. Trotz dieser ungeklärten Beobachtung erscheinen die erhobenen Ergebnisse dennoch verwertbar, da einerseits beim Kontrollzellpool (Abb. 3.13B) keine signifikante Häufung von tetra- und polyploiden Zellen im Vergleich zu den Daten bei primären MEFs (Abb. 3.16A und REICHERT et al., 2010) beobachtet wurde und andererseits selbst im Falle einer Depletion von Lin9 auf lediglich 20 – 30% eigentlich eine signifikante Repression der G₂/M-Zielgene zu erwarten wäre, wie der Vergleich mit den in Abb. 3.9 und 3.14 dokumentierten Werten bei primären MEFs und den immortalisierten Zell-Pools belegt. Es ist daher davon auszugehen, dass eine biologische Erklärung wie die zuvor diskutierte Beteiligung von Transkriptionsfaktoren der Restitution der Lin9-Zielgen-Expression zu Grunde liegt.

Zur Vermeidung der beschriebenen methodischen Unsicherheit wäre allerdings zu erwägen, die Ergebnisse unter Verwendung der $\Delta 89-97$ -Mutante des Large T-Antigens, welche die Fähigkeit zur Bub1-Bindung verloren hat, anhand einer größeren Anzahl aus Einzelzellen expandierter Zelllinien zu validieren.

4.3.3.2 Warum zeigen die aus den einzelnen Kolonien expandierten Zelllinien eine hochgradige Poly- und Aneuploidie, obwohl die Expression der G₂/M-Zielgene weitgehend restituiert ist?

Unter der Annahme, dass nach dem Lin9-Verlust andere Mechanismen die G₂/M-Genexpression restituieren, wäre die wahrscheinlichste Erklärung hierfür, dass die Beeinträchtigung der genomischen Stabilität auf mitotische Aberrationen im Zeitraum zwischen der cre-Induktion und dem Eintritt der Kompensationsmechanismen zurückzuführen ist. Bei primären MEFs wurde eine sich innerhalb von 5 Tagen nach Beginn der cre-Induktion rasch verstärkende An- und Polyploidie gezeigt, einhergehend mit der Beobachtung multipler mitotischer und zytokinetischer Defekte und dem Nachweis einer signifikant reduzierten Expression von G₂/M-Genen. Die bei den immortalisierten Zell-Pools durchgeführten PI-FACS-Analysen zeigen, dass bereits vor dem Ausplattieren der Kolonie-Bildungs-Assays ein nicht unerheblicher Teil der Zellen polyploid ist (Abb. 3.13B). Parallel dazu wurde nachgewiesen, dass die G₂/M-Genexpression in einem ähnlichen Maße herabreguliert ist wie bei primären MEFs (Abb. 3.14), sodass davon auszugehen ist, dass bei den Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits eine nachhaltige Beeinträchtigung der genomischen Integrität besteht. Dennoch ist beim Vergleich des FACS-Profiles des Lin9-depletierten immortalisierten Zell-Pools mit der Zellzyklusverteilung der aus den Kolonien expandierten Zelllinien festzustellen, dass sich die Defekte offensichtlich weiter aggravieren. Unsere Untersuchungen ermöglichen bislang keinen Rückschluss darauf, zu welchem Zeitpunkt die Kompensationsmechanismen einsetzen. Um diese Frage zu klären, wäre es letztlich nötig, bei immortalisierten MEFs nach der Lin9-Depletion engmaschig Zellzyklusprofile und Genexpressionsanalysen zu erstellen. Außerdem könnte zusätzlich zum Endpunkt Aneuploidie die Rate der chromosomalen Instabilität in den Kolonien mittels FISH-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert werden.

4.4 Der heterozygote Verlust von Lin9 führt zu einer Schwächung des mitotischen Spindelkontrollpunktes und trägt zur onkogenen Transformation bei

Lin9-heterozygote Mäuse durchlaufen eine regelhafte Embryonalentwicklung, sind phänotypisch unauffällig und zeigen im Vergleich zu wildtypischen Tieren keine erhöhte spontane Tumorzinzidenz. Andererseits konnte gezeigt werden, dass der

heterozygoter Verlust von Lin9 bei Mäusen, die eine konstitutiv aktive CRAF1-Kinase unter Kontrolle des humanen SP-C-Promoters (BXB-raf) exprimieren, zu einer signifikanten Zunahme pulmonaler Adenome mit einer größeren Gesamttumorfläche führt. Damit einhergehend ist die Überlebenszeit dieser Tiere im Vergleich zu Lin9-positiven BXB-raf-Mäusen verkürzt (REICHERT et al., 2010). Diese Beobachtung unterstreicht den bisher angenommenen tumorsuppressiven Effekt von LIN9 und legt zudem nahe, dass bereits der Verlust eines Lin9-Allels zur Karzinogenese beitragen kann. Über die Auswirkungen des heterozygoten Lin9-Verlustes auf die Zellproliferation, die Zellzyklusverteilung und die Genexpression lagen bislang jedoch keine systematischen Studien vor. Daher blieb der Mechanismus, über welchen der heterozygoter Verlust von Lin9 zur Karzinogenese beiträgt, bislang unklar. Zur Klärung dieser Frage wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen an Lin9 fl/+ creER^{T2} MEFs vorgenommen.

Dabei zeigte sich, dass heterozygot Lin9-depletierte MEFs normal proliferieren (Abb. 3.15). Eine Verschiebung der Zellzyklusverteilung, wie sie in MEFs und humanen Zellen nach homozygotem Lin9-Verlust beobachtet wurde (Abb. 3.16A), konnte ebenso wenig detektiert werden wie eine Zunahme binukleärer Zellen (Abb. 3.16B). Bei der Untersuchung der relativen Expressionslevel fand sich nach heterozygoter Depletion von Lin9 eine Herabregulation der relativen Lin9-Expression auf 51%. Für die Lin9-Zielgene mit bekannter Funktion in der G₂/M-Phase zeigte sich für C9orf140, Cenpe, Cenpf und Hmnr eine um Faktor 1,23 – 1,43 reduzierte Expression, während die anderen untersuchten mitotischen Gene nicht signifikant different exprimiert waren (Abb. 3.17). Das Vorhandensein eines Lin9-Allels ist also offensichtlich in der Lage, eine normale Proliferationsfähigkeit und eine hinreichende Expression der meisten G₂/M-Gene zu gewährleisten.

Auf der anderen Seite fand sich eine verminderte Arretierung LIN9-heterozygoter MEFs nach Behandlung mit dem Spindelgift Nocodazol als Hinweis auf eine Schwächung des mitotischen Spindelkontrollpunktes (Abb. 3.18). Es erscheint vor diesem Hintergrund möglich, dass die leichte Expressionsminderung einiger G₂/M-Gene zur Schwächung der Kontrollmechanismen beitragen. Die bisher beschriebenen Funktionen der vier bei den qPCR-Analysen als signifikant herabreguliert nachgewiesenen Gene erklären diesen Effekt nur unzureichend (siehe Kapitel 4.2.2). Es ist jedoch vorstellbar, dass die leichte Expressionsminderung einer Vielzahl von mitotischen Genen zu einer Beeinträchtigung der Kontrollmechanismen führt. Um einen umfassenden Überblick über die Genexpression in Lin9-heterozygoten MEFs zu

gewinnen und ggf. weitere in diesen Zellen herabregulierte Gene mit einer Bedeutung für die mitotische Regulation und den Spindelkontrollpunkt zu detektieren, wären auch bei Lin9-heterozygoten Zellen genomweite Expressionsanalysen zu erwägen.

Aufgrund der Beeinträchtigung der mitotischen Arretierung bei Nocodazol-induzierten Spindeldefekten in Lin9-heterozygoten MEFs in Verbindung mit der Herabregulation von Genen, für deren Produkte eine Schlüsselrolle bei der korrekten Ausbildung des Spindelapparates und der Mikrotubuli-Assoziation an die Kinetochoren beschrieben ist (Hmnr, Cenpe, Cenpf; siehe Kapitel 4.2.3), wäre es nahe liegend, dass es im Langzeitverlauf auch bei heterozygoter Lin9-Depletion zu einer Beeinträchtigung der genomischen Stabilität kommt. Diese Fragestellung wurde durchflusszytometrisch mittels PI-FACS bei Large T-immortalisierten MEFs adressiert, die sich im Gegensatz zu primären MEFs problemlos über mehrere Passagen kultivieren lassen. Dabei wurde die nicht Bub1-bindende $\Delta 89-97$ -Mutante des Large T-Antigens verwendet um eine zusätzliche Beeinträchtigung des mitotischen Spindelkontrollpunktes durch Large T zu vermeiden. Es zeigte sich, dass die Lin9-Heterozygotizität mit einem erhöhten Anteil polyploider Zellen assoziiert ist, der sich in der zweiten Passage verstärkt. Im Langzeitverlauf scheint der heterozygote Verlust von Lin9 zumindest in immortalisierten Zellen folglich zu einer Beeinträchtigung der genomischen Stabilität zu führen, wozu wahrscheinlich die dokumentierte Schwächung des mitotischen Kontrollpunktes maßgeblich beiträgt.

Analog zu den homozygot Lin9-depletierten MEFs stellte sich nun die Frage, ob es bei Lin9-heterozygoten MEFs in Anbetracht der beobachteten veränderten Zellzyklusverteilung und der Beeinträchtigung des mitotischen Kontrollpunktes zur onkogenen Transformation *in vitro* kommt. Dies wurde mittels Transformations-Assays im Weichagar untersucht. Es zeigte sich die Bildung einer hochsignifikant größeren Anzahl von Substrat-unabhängig im Weichagar wachsenden Kolonien bei den Lin9-heterozygoten MEFs im Vergleich zu Lin9-positiven Zellen, was als experimentelle Evidenz für einen Beitrag des heterozygoten Verlustes von Lin9 zur onkogenen Transformation zu betrachten ist. In der Gesamtschau der in dieser Arbeit und durch REICHERT et al. (2010) am BXB-raf-Mausmodell erhobenen Daten ist anzunehmen, dass der heterozygote Verlust von Lin9 durch eine Beeinträchtigung des mitotischen Spindelkontrollpunktes und damit der genomischen Integrität in Kooperation mit Onkogenen zur Transformation *in vitro* und Karzinogenese *in vivo* beitragen kann, während hingegen die spontane Tumorzinzidenz durch Lin9-Haploinsuffizienz nicht erhöht wird.

Diese Beobachtung ist konsistent mit den Erkenntnissen zum Einfluss des heterozygoten Verlustes von anderen mitotischen (Kontrollpunkt-)Regulatoren. Für BubR1 wurde gezeigt, dass selbst Mäuse mit einem Expressionslevel von 10% die Embryonalentwicklung regelhaft durchlaufen, dann aber Aspekte einer vorzeitigen Alterung zeigen. Eine erhöhte spontane Tumorinzidenz wurde nicht beobachtet (BAKER et al., 2004). Beim Zusammenwirken von BubR1-Haploinsuffizienz und Behandlung mit dem Karzinogen DMBA wurde jedoch ein erhöhte Inzidenz von Lungentumoren beschrieben (BAKER et al., 2006). In einer anderen Studie wurde bei BubR1-heterozygoten Mäusen ein signifikant vermehrtes Auftreten Azoxymethan-induzierter intestinaler Adenokarzinome und pulmonaler Tumoren nachgewiesen (DAI et al., 2004). Für Rae1 wurde ebenfalls gezeigt, dass der heterozygote Verlust nicht zu einer erhöhten spontanen Tumorinzidenz führt, jedoch zu Karzinogen-induzierter Tumorfornation beiträgt (BABU et al., 2003).

4.5 LIN9 – ein essentieller Faktor für Zellproliferation und Tumorsuppression

Die Untersuchung des konditionellen Lin9-*Knockout*-Mausmodells ermöglichte die Gewinnung neuer Erkenntnisse über die verschiedenen Funktionen des LIN9-Proteins. Die Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowie die weiteren Untersuchungen von REICHERT et al. (2010) und HAUSER et al. (2011) dokumentieren einen zentralen Dualismus der Funktion von Lin9 als essentieller Faktor für die Zellproliferation und zugleich als Tumorsuppressor, dessen gemeinsame Grundlage die Regulation der Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen durch Lin9 darstellt (Abbildung 4.2). Auf der einen Seite wurde dargelegt, dass Lin9 für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung ist. Nach Verlust von Lin9 zeigen MEFs selbst in Anwesenheit von Onkogenen wie dem Large T-Antigen einen schweren Proliferationsdefekt und bei adulten Mäusen spielt Lin9 eine kritische Rolle für die regelhafte Zellhomöostase und die Regeneration schnell proliferierender Gewebe. Bei der murinen Embryonalentwicklung ist Lin9 essentiell für die Ausbildung der inneren Zellmasse und damit der drei Keimblätter (REICHERT et al., 2010). Hinweise auf eine Bedeutung von Lin9 als Onkogen ergaben sich aus den Studien von OSTERLOH et al. (2007), bei denen eine Überexpression von Lin9 in Tumorgewebe von Ovarial- und Uterus-Malignomen dokumentiert wurde.

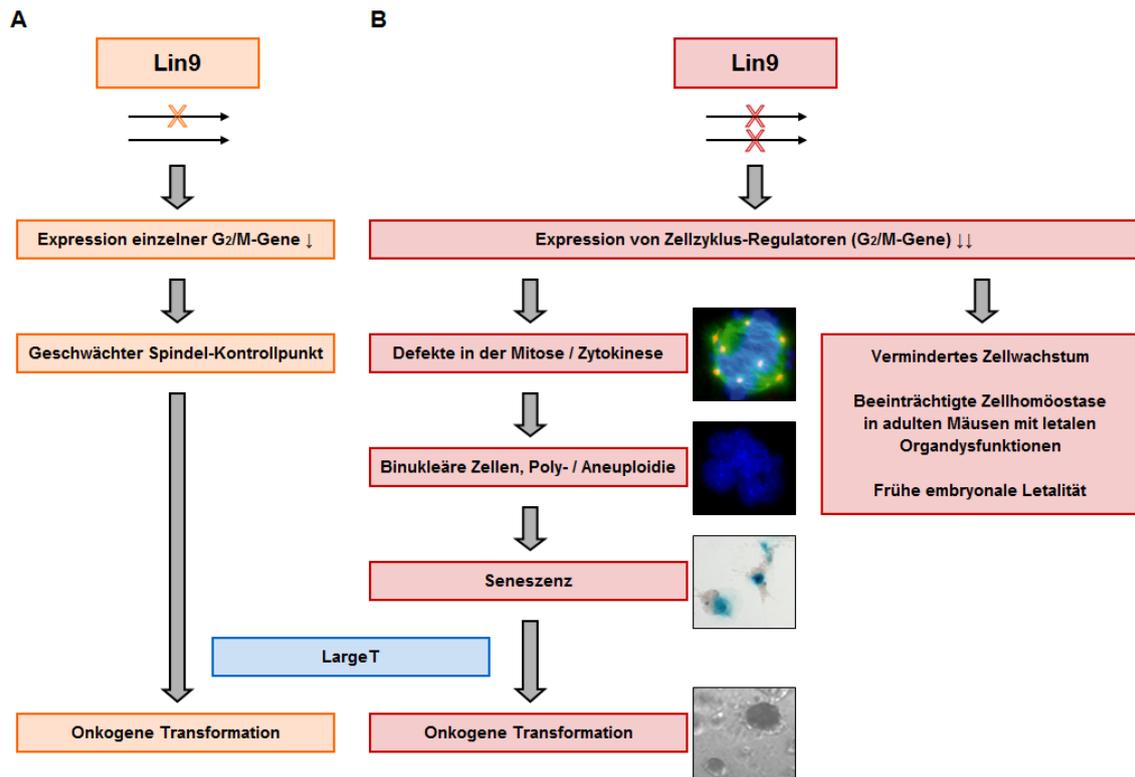


Abbildung 4.2 → Auswirkungen der Lin9-Defizienz

A) Folgen des heterozygoten Verlustes von Lin9. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Lin9-Haploinsuffizienz zu einer leicht verminderten Expression von einigen G₂/M-Genen führt. Damit einhergehend fand sich eine Schwächung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes. In Kooperation mit dem Large T-Antigen wurde *in vitro* eine Substrat-unabhängige Koloniebildung im Weichagar als Indikator für eine onkogene Transformation beobachtet. *In vivo* zeigte sich bei den Studien von REICHERT et al. (2010) am BXB-raf-Mausmodell eine Zunahme pulmonaler Adenome und eine kürzere Überlebenszeit bei Lin9-heterozygoten Mäusen. B) Folgen des homozygoten Verlustes von Lin9. In dieser Arbeit konnte anhand von konditionell Lin9-depletierten MEFs bestätigt werden, dass Lin9 eine essentielle Rolle für die Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen und insbesondere von G₂/M-Genen besitzt. Die gezeigten Veränderungen der Genexpression haben verschiedene Konsequenzen zur Folge. Einerseits konnte in dieser Arbeit dokumentiert werden, dass Störungen der Mitose und Zytokinese bei Lin9-defizienten Zellen zur Chromosomenfehlverteilung, zu binukleären Zellen, Poly- und Aneuploidie führen. Hierdurch kommt es zur prämaturnen zellulären Seneszenz und – wenn diese durch Large T durchbrochen wird – zur onkogenen Transformation. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass selbst in Gegenwart des Large T-Onkogens Lin9 für ein regelhaftes Zellwachstum benötigt wird. In adulten Mäusen wurde beobachtet, dass Lin9 von entscheidender Bedeutung für die Zellhomöostase in schnell proliferierenden Geweben ist (REICHERT et al., 2010).

Andererseits konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Lin9-Verlust zu nachhaltigen Defekten bei der Mitose und Zytokinese und damit zur Beeinträchtigung der genomischen Integrität führt. Hierdurch trägt der Lin9-Verlust zur onkogenen Transformation *in vitro* und zur Karzinogenese im BXB-raf-Mausmodell bei. Auch ist aus den Studien von OSTERLOH et al. (2007) bekannt, dass Lin9 bei bestimmten Tumorentitäten (v. a. bei Malignomen der Schilddrüse) herabreguliert ist, was eine potentielle Bedeutung von Lin9 als Tumorsuppressor unterstreicht.

Störungen der Zellzykluskontrolle und der Expression von Zellzyklusregulatoren sind ein grundlegendes Phänomen bei der Entstehung von malignen Neoplasien. Die Beobachtung, dass bestimmte Zellzyklusregulatoren sowohl essentiell für das Zellwachstums sind und potentiell als Onkogen fungieren und zugleich tumorsuppressive Eigenschaften besitzen können, wurde bei anderen Regulatoren und Transkriptionsfaktoren ebenfalls erhoben (ROWLAND & PEEPER, 2006).

Aufgrund der dualen Lin9-Funktion in Abhängigkeit vom zellulären Kontext wird es von entscheidender Bedeutung sein, den Einfluss von Lin9 und anderen LINC-Komponenten mit *in vivo* Tumorigenese-Modellen und in humanen Tumorgewebe weiter zu analysieren. Anhand der wenigen bisherigen Studien erscheint es durchaus plausibel, dass die Ausschaltung von Lin9 bei manchen Tumorentitäten (z. B. durch zunehmende genomische Instabilität) die Tumorigenese bzw. die Tumorprogression fördert, während die Lin9-Defizienz in einem anderen Kontext aufgrund der essentiellen Bedeutung von Lin9 für die Zellproliferation zu einem tumorpräventiven Effekt führen kann.

Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass LIN9 im Zusammenspiel mit anderen Bestandteilen des DREAM / LINC agiert und dieser abhängig vom zellulären Kontext und der Zellzyklusphase mit verschiedenen Bindungspartnern assoziieren kann (SCHMIT et al., 2007; SADASIVAM et al., 2012; SADASIVAM & DECAPRIO, 2013). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass DREAM / LINC und dessen Interaktionspartner die Tumorbilogie auf vielfältige Weise beeinflussen können.

So ist zum Beispiel für B-MYB, das Zellzyklus-abhängig mit dem LINC-Kernkomplex (MuvB) interagiert, bekannt, dass es in vielen Tumorentitäten überexprimiert ist (PEROU et al., 2000; WHITFIELD et al., 2002). Zugleich wurde beobachtet, dass Mybl2-haploinsuffiziente Mäuse ein vermehrtes Auftreten von myeloischen Leukämien zeigen (CLARKE et al., 2013), was für B-MYB ebenfalls eine duale Funktion bei der Tumorigenese nahe legt. Das humane Mybl2-Gen liegt auf dem 20q-Locus, der bei Patienten mit myelodysplastischen Syndromen regelmäßig deletiert ist (MULLIER et al.,

2012). Auch beim Zebrafisch wurde ein Zusammenhang zwischen bmyb-Mutationen und einer erhöhten Tumorzinzidenz gezeigt (SHEPARD et al., 2005).

Weiterhin ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Fox-M1, der die G₂/M-Genexpression zusammen mit dem LINC-Kernkomplex reguliert (siehe Kapitel 4.1.2), bei verschiedenen Tumorentitäten überexprimiert ist und häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (WANG et al., 2007; FRANCIS et al., 2009; LOK et al., 2011).

Die Untersuchungen von BOICHUK et al. (2013) zur DREAM-abhängigen Regulation der Quieszenz in gastrointestinalen Stromatumoren (Kapitel 4.3.1) dokumentieren zudem einen von der unmittelbaren Einflussnahme auf die Tumorigenese unabhängigen Mechanismus, bei dem DREAM indirekt durch die Beeinflussung des Ansprechens von Tumorzellen auf chemotherapeutische Maßnahmen eine Rolle im klinischen Kontext spielen kann.

Letztlich bleiben trotz der diversen Studien verschiedener Arbeitsgruppen zur Charakterisierung der DREAM / LINC-Komponenten die genauen Funktionen der meisten Bestandteile, die Interaktionsmechanismen innerhalb des Komplexes und mit anderen Bindungspartnern sowie die Beteiligung bei der Tumorigenese zum großen Teil noch ungeklärt. So ist zum Beispiel die genaue Struktur des Kernkomplexes noch nicht abschließend charakterisiert. Obgleich durch SADASIVAM et al. (2012) erste mechanistische Grundlagen beschrieben wurden, bleibt noch überwiegend unklar, mit welchen Transkriptionsfaktoren oder chromatin-modifizierenden Enzymen der Komplex bei der Regulation der Expression von Zellzyklusgenen interagiert und ob es konservierte Funktionen des Komplexes bei der Regulation von Zellzyklus-unabhängigen Genen gibt. Auch das Zusammenwirken mit anderen Tumorsuppressor-Signalwegen ist noch weitgehend unverstanden.

Wenn diese Fragen geklärt werden können und weitere Untersuchungen zur Beteiligung von LIN9 und anderen LINC-Komponenten bei der Entstehung von humanen Malignomen vorliegen, ist es basierend auf den bisherigen Erkenntnissen durchaus vorstellbar, dass Bestandteile und Bindungspartner des DREAM / LINC zukünftig als Ansatzpunkte für zielgerichtete Ansätze (*Targeted Therapy*) bei der Therapie verschiedener Tumorentitäten fungieren können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Pocket-Proteine und E2F-Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Zellzyklus-assoziierten Genen und spielen eine zentrale Rolle bei der Koordination der Zellteilung, Differenzierung und Apoptose. Störungen dieser Signalwege tragen zur Entstehung zahlreicher Tumorentitäten beim Menschen bei. Trotz der intensiven Untersuchung der Zellzyklusregulation sind viele Details noch unverstanden.

Der LIN-Komplex (LINC / DREAM) ist ein kürzlich entdeckter humaner Multiproteinkomplex, welcher dynamisch mit *Pocket*-Proteinen und E2F-Transkriptionsfaktoren interagiert. Eine essentielle Komponente des LIN-Komplexes ist das LIN9-Protein. Um die Funktion dieses Proteins bei der Zellzyklusregulation und Tumorentstehung genauer untersuchen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein konditionelles *Lin9-Knockout*-Mausmodell etabliert.

Primäres Ziel der Arbeit war es, den Phänotyp embryonaler Fibroblasten (MEFs) aus diesen Mäusen zu charakterisieren. Bereits kurz nach Inaktivierung von *Lin9* konnte ein stark verlangsamtes Zellwachstums beobachtet werden. In *Lin9*-depletierten MEFs wurden multiple mitotische Defekte detektiert, die u. a. strukturelle Auffälligkeiten des Spindelapparates, aberrante Zellkerne, Störungen der Chromosomensegregation sowie zytokinetische Defekte umfassen und in einer dramatischen Zunahme polyploider und aneuploider Zellen resultieren. Im Langzeitverlauf führen diese erheblichen Aberrationen zu einer vorzeitigen zellulären Seneszenz. Wird diese durch das Large T-Protoonkogen durchbrochen, können sich MEFs an den Verlust von *Lin9* adaptieren, zeigen dann jedoch eine hochgradige genomische Instabilität und Substrat-unabhängiges Wachstum im Weichagar als Zeichen onkogener Transformation.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression in *Lin9*-defizienten MEFs mittels quantitativer *Real Time-PCR* untersucht um zu klären, ob die beschriebenen Defekte auf Veränderungen der transkriptionellen Aktivität zurückzuführen sind. Dabei wurde eine erhebliche Reduktion der Expressionslevel mitotischer Gene nach Verlust von *Lin9* beobachtet. Des Weiteren wurden zur Klärung der zu

Grunde liegenden molekularen Mechanismen Chromatin-Immünpräzipitations-Experimente (ChIP) durchgeführt. Im Vergleich zu Kontrollzellen wurden dabei in Lin9-defizienten Zellen signifikante epigenetische Veränderungen bezüglich aktivierender Histon-Modifikationen an den Promotoren mitotischer Lin9-Zielgene festgestellt.

Im letzten Abschnitt der Arbeit sollten die Auswirkungen des heterozygoten Verlustes von Lin9 analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass Lin9-haploinsuffiziente Zellen normal proliferieren, obwohl die Expression verschiedener G₂/M-Gene leicht vermindert war. Es wurde jedoch eine Schwächung des mitotischen Spindelkontrollpunktes und in der Folge über mehrere Zellgenerationen eine Zunahme polyploider Zellen beobachtet. Mit Weichagar-Assays konnte gezeigt werden, dass bereits der heterozygote Verlust des Lin9-Gens zur onkogenen Transformation beiträgt.

Zusammengenommen dokumentieren diese Studien, dass LIN9 eine entscheidende Bedeutung bei der Regulation von Zellzyklus-assoziierten Genen spielt und sowohl einen essentiellen Faktor für die Zellproliferation darstellt als auch durch die Gewährleistung genomischer Stabilität tumorsuppressive Eigenschaften aufweist.

5.2 English Summary

Pocket proteins and E2F transcription factors regulate the expression of cell cycle associated genes and play a central role in the coordination of cell division, differentiation and apoptosis. Disorders of these pathways contribute to the development of various human tumor entities. Despite intensive research in the field of cell cycle regulation many details are not yet understood.

The LIN complex (LINC / DREAM) is a recently discovered human multiprotein complex, which dynamically interacts with pocket proteins and E2F transcription factors. An essential component of the LIN complex is the LIN9 protein. In order to obtain a better insight into the function of this protein in cell cycle regulation and tumorigenesis, a conditional Lin9 knockout mouse model was established in our laboratory.

The primary objective of this study was the phenotypic characterization of embryonic fibroblasts (MEFs) from these mice. Shortly after inactivation of Lin9 cell proliferation was massively impaired. Multiple types of mitotic defects such as structural abnormalities of the spindle apparatus, aberrant nuclei, failed nuclear segregation and cytokinesis failure have been observed in Lin9-depleted cells leading to a dramatic increase in polyploid and aneuploid cells. Ultimately these serious aberrations result in premature cellular senescence. If the senescence of Lin9-deficient cells is overcome by the Large T antigen the cells can adhere to the loss of Lin9, but show severe genomic instability and grow anchorage-independently in soft-agar as a sign of oncogenic transformation.

In the second part of the thesis the gene expression of Lin9-deficient cells was assessed by quantitative real time PCR analyses to determine, whether the mitotic abnormalities are caused by transcriptional defects. Here a significant reduction of mitotic gene expression was observed in Lin9-depleted cells. Additionally chromatin immunoprecipitation experiments were performed to clarify the underlying molecular mechanisms. Compared to control cells epigenetic alterations at the promoters of mitotic target genes with regard to activating histone modifications were found in Lin9-deficient MEFs.

In the last section of this study, the effects of Lin9 heterozygosity were analyzed. Lin9 heterozygous MEFs showed normal proliferation, although expression of different mitotic genes was slightly reduced. It appeared, however, that the mitotic spindle checkpoint of Lin9 heterozygous MEFs is weakened and thus over several cell generations an increase in polyploid cells was observed. Soft-agar assays showed that Lin9 heterozygosity contributes to oncogenic transformation.

Taken together, these results document a crucial role of LIN9 in the regulation of cell cycle-associated gene expression. LIN9 is an essential factor for cell proliferation on one hand, while at the same time it functions as a tumor suppressor.

6 LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

6.1 Literaturverzeichnis

ABRIEU A, BRASSAC T, GALAS S, FISHER D, LABBÉ JC, DORÉE M (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 111 (Pt 12):1751-1757.

ADAMS PD (2009). Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell* 36(1):2–14.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4. Auflage. Garland Science, New York.

AMATSCHEK S, KOENIG U, AUER H, STEINLEIN P, PACHER M, GRUENFELDER A, DEKAN G, VOGL S, KUBISTA E, HEIDER KH et al. (2004). Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 64(3):844-856.

AMES BN, GOLD LS, WILLETT WC (1995). The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12):5258-5265.

ANDERSEN SU, ALGREEN-PETERSEN RG, HOEDL M, JURKIEWICZ A, CVITANICH C, BRAUNSCHWEIG U, SCHAUSER L, OH SA, TWELL D, JENSEN EO (2007). The conserved cysteine-rich domain of a tesmin/TSO1-like protein binds zinc in vitro and TSO1 is required for both male and female fertility in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 58(13):3657-3670.

ARROYO M, RAYCHAUDHURI P (1992). Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. *Nucleic Acids Res* 20(22):5947-5954.

ASSMANN V, JENKINSON D, MARSHALL JF, HART IR (1999). The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments. *J Cell Sci* 112 (Pt 22):3943-3954.

BABU JR, JEGANATHAN KB, BAKER DJ, WU X, KANG-DECKER N, VAN DEURSEN JM (2003). Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J Cell Biol* 160(3):341–353.

BAER CF, MIYAMOTO MM, DENVER DR (2007). Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nat Rev Genet* 8(8):619–631.

BAKER DJ, JEGANATHAN KB, CAMERON JD, THOMPSON M, JUNEJA S, KOPECKA A, KUMAR R, JENKINS RB, DE GROEN PC, ROCHE P, VAN DEURSEN JM (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet* 36(7):744-749.

BAKER DJ, JEGANATHAN KB, MALUREANU L, PEREZ-TERZIC C, TERZIC A, VAN DEURSEN JM (2006). Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice. *J Cell Biol* 172(4):529-540.

BANDARA LR, BUCK VM, ZAMANIAN M, JOHNSTON LH, LA THANGUE NB (1993). Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J* 12(11):4317-4324.

BEALL EL, BELL M, GEORLETTE D, BOTCHAN MR (2004). Dm-myb mutant lethality in *Drosophila* is dependent upon mip130: positive and negative regulation of DNA replication. *Genes Dev* 18(14):1667-1680.

BEALL EL, LEWIS PW, BELL M, ROCHA M, JONES DL, BOTCHAN MR (2007). Discovery of tMAC: a *Drosophila* testis-specific meiotic arrest complex paralogous to Myb-Muv B. *Genes Dev* 21(8):904-919.

BEALL EL, MANAK JR, ZHOU S, BELL M, LIPSICK JS, BOTCHAN MR (2002). Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication. *Nature* 420(6917):833-837.

BEIJERSBERGEN RL, KERKHOVEN RM, ZHU L, CARLEE L, VOORHOEVE PM, BERNARDS R (1994). E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Genes Dev* 8(22):2680-2690.

BELLIZZI AM, FRANKEL WL (2009). Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol* 16(6):405-417.

BERTUCCI F, HOULGATTE R, BENZIANE A, GRANJEAUD S, ADELAIDE J, TAGETT R, LORIOD B, JACQUEMIER J, VIENS P, JORDAN B et al. (2002). Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 9(20):2981-2991.

BISCHOFF JR, ANDERSON L, ZHU Y, MOSSIE K, NG L, SOUZA B, SCHRYVER B, FLANAGAN P, CLAIRVOYANT F, GINTHER C et al. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17(11):3052-3065.

BOICHUK S, PARRY JA, MAKIELSKI KR, LITOVCHICK L, BARON JL, ZEWI JP, WOZNIAK A, MEHALEK KR, KORZENIEWSKI N, SENEVIRATNE DS et al. (2013). The DREAM Complex Mediates GIST Cell Quiescence and Is a Novel Therapeutic Target to Enhance Imatinib-Induced Apoptosis. *Cancer Res* 73(16):5120-5129.

CARTWRIGHT P, MULLER H, WAGENER C, HOLM K, HELIN K (1998). E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene* 17(5):611-623.

CEOL CJ, HORVITZ HR (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(3):461-473.

CEOL CJ, HORVITZ HR (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(4):563-576.

CHAN GK, JABLONSKI SA, SUDAKIN V, HITTLE JC, YEN TJ (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* 146(5):941-954.

CHEN X, LU C, MORILLO PRADO JR, EUN SH, FULLER MT (2011). Sequential changes at differentiation gene promoters as they become active in a stem cell lineage. *Development* 138(12):2441-2450.

CLARKE M, DUMON S, WARD C, JÄGER R, FREEMAN S, DAWOOD B, SHERIFF L, LORVELLEC M, KRALOVICS R, FRAMPTON J, GARCÍA P (2013). MYBL2 haploinsufficiency increases susceptibility to age-related haematopoietic neoplasia. *Leukemia* 27(3):661-670.

CLUTE P, PINES J (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* 1(2):82-87.

COOPER GM (2000). Chapter 14: The Eukaryotic Cell Cycle. *The cell: a molecular approach* (2. Auflage). ASM Press, Washington DC.

COVERLEY D, PELIZON C, TREWICK S, LASKEY RA (2000). Chromatin-bound Cdc6 persists in S and G2 phases in human cells, while soluble Cdc6 is destroyed in a cyclin A-cdk2 dependent process. *J Cell Sci* 113(Pt 11):1929-1938.

CRAINIE M, BELCH AR, MANT MJ, PILARSKI LM (1999). Overexpression of the receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) characterizes the malignant clone in multiple myeloma: identification of three distinct RHAMM variants. *Blood* 93(5):1684-1696.

CUDDIHY AR, O'CONNELL MJ (2003). Cell-cycle responses to DNA damage in G2. *Int Rev Cytol* 222:99-140.

CUI M, CHEN J, MYERS TR, HWANG BJ, STERNBERG PW, GREENWALD I, HAN M (2006). SynMuv genes redundantly inhibit lin-3/EGF expression to prevent inappropriate vulval induction in *C. elegans*. *Dev Cell* 10(5):667-672.

DAI W, WANG Q, LIU T, SWAMY M, FANG Y, XIE S, MAHMOOD R, YANG YM, XU M, RAO CV (2004). Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res* 64(2):440-445.

DEGREGORI J, LEONE G, MIRON A, JAKOI L, NEVINS JR (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(14):7245-7250.

DEPLANCKE B, MUKHOPADHYAY A, AO W, ELEWA AM, GROVE CA, MARTINEZ NJ, SEQUERRA R, DOUCETTE-STAMM L, REECE-HOYES JS, HOPE IA et al. (2006). A gene-centered *C. elegans* protein-DNA interaction network. *Cell* 125(6):1193-1205.

DIMRI GP, LEE X, BASILE G, ACOSTA M, SCOTT G, ROSKELLEY C, MEDRANO EE, LINSKENS M, RUBELJ I, PEREIRA-SMITH O et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20):9363-9367.

DO CARMO AVIDES M, GLOVER DM (1999). Abnormal spindle protein, Asp, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing centers. *Science* 283(5408):1733-1735.

DRAETTA G, LUCA F, WESTENDORF J, BRIZUELA L, RUDERMAN J, BEACH D (1989). Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56(5):829-838.

DUTCHER SK (2001). The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol* 13(1):49-54.

EKHOLM SV, REED SI (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12(6):676-684.

ESTERLECHNER J, REICHERT N, ILTZSCHE F, KRAUSE M, FINKERNAGEL F, GAUBATZ S (2013). LIN9, a subunit of the DREAM complex, regulates mitotic gene expression and proliferation of embryonic stem cells. *PLoS One* 8(5):e62882.

FARNHAM PJ (1996). Transcriptional control of cell growth: The E2F gene family. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Band 208. Springer, Berlin und New York.

FAY DS, HAN M (2000). The synthetic multivulval genes of *C. elegans*: functional redundancy, Ras-antagonism, and cell fate determination. *Genesis* 26(4):279-284.

FERGUSON EL, HORVITZ HR (1989). The multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways. *Genetics* 123(1):109-121.

FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-811.

FISH JL, KOSODO Y, ENARD W, PÄÄBO S, HUTTNER WB (2006). Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(27):10438-10443.

FRANCIS RE, MYATT SS, KROL J, HARTMAN J, PECK B, MCGOVERN UB, WANG J, GUEST SK, FILIPOVIC A, GOJIS O et al. (2009). FoxM1 is a downstream target and marker of HER2 overexpression in breast cancer. *Int J Oncol* 35(1):57-68.

FRIEND SH, BERNARDS R, ROGELJ S, WEINBERG RA, RAPAPORT JM, ALBERT DM, DRYJA TP (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323(6089):643-646.

FROLOV MV, DYSON NJ (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 117(Pt 11):2173-2181.

FUNG TK, POON RY (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin Cell Dev Biol* 16(3):335-342.

GAGRICA S, HAUSER S, KOLFSCHOTEN I, OSTERLOH L, AGAMI R, GAUBATZ S (2004). Inhibition of oncogenic transformation by mammalian Lin-9, a pRB-associated protein. *EMBO J* 23(23):4627-4638.

GAUBATZ S, LEES JA, LINDEMAN GJ, LIVINGSTON DM (2001). E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol Cell Biol* 21(4):1384-1392.

GAUBATZ S, LINDEMAN GJ, ISHIDA S, JAKOI L, NEVINS JR, LIVINGSTON DM, REMPEL RE (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell* 6(3):729-735.

GAUBATZ S, WOOD JG, LIVINGSTON DM (1998). Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16):9190-9195.

GEORLETTE D, AHN S, MACALPINE DM, CHEUNG E, LEWIS PW, BEALL EL, BELL SP, SPEED T, MANAK JR, BOTCHAN MR (2007). Genomic profiling and expression studies reveal both positive and negative activities for the Drosophila Myb MuvB/dREAM complex in proliferating cells. *Genes Dev* 21(22):2880-2896.

GIACINTI C, GIORDANO A (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25(38):5220-5227.

GIET R, PETRETTI C, PRIGENT C (2005). Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol* 15(5):241-250.

GINSBERG D, VAIRO G, CHITTENDEN T, XIAO ZX, XU G, WYDNER KL, DECAPRIO JA, LAWRENCE JB, LIVINGSTON DM (1994). E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev* 8(22):2665-2679.

GLOTZER M (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307(5716):1735-1739.

GLOTZER M (2009). The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1):9-20.

GROTE P, CONRADT B (2006). The PLZF-like protein TRA-4 co-operates with the Gli-like transcription factor TRA-1 to promote female development in *C. elegans*. *Dev Cell* 11(4):561-573.

HAGTING A, DEN ELZEN N, VODERMAIER H C, WAIZENEGGERI C, PETERS J M, PINES J (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* 157(7):1125-1137.

HALLSTROM TC, NEVINS JR (2003). Specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19):10848-10853.

HAMBURGER AW, SALMON SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197(4302):461-463.

- HANAHAH D** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4):557-580.
- HANAHAH D**, WEINBERG RA (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- HANAHAH D**, WEINBERG RA (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5):646–674.
- HANNAK E**, KIRKHAM M, HYMAN AA, OEGEMA K (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 155(7):1109-1116.
- HARRISON MM**, CEOL CJ, LU X, HORVITZ HR (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(45):16782-16787.
- HAUSER S**, ULRICH T, WURSTER S, SCHMITT K, REICHERT N, GAUBATZ S (2011). Loss of LIN9, a member of the DREAM complex, cooperates with SV40 large T antigen to induce genomic instability and anchorage-independent growth. *Oncogene* 31(14):1859-1868.
- HENDZEL MJ**, BAZETT-JONES DP (1997). Fixation-dependent organization of core histones following DNA fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma* 106(2):114-123.
- HEIN J**, BOICHUK S, WU J, CHENG Y, FREIRE R, JAT PS, ROBERTS TM, GJOERUP OV (2009). Simian virus 40 large T antigen disrupts genome integrity and activates a DNA damage response via Bub1 binding. *J Virol* 83(1):117-127.
- HIJMANS EM**, VOORHOEVE PM, BEIJERSBERGEN RL, 'T VEER LJ, BERNARDS R (1995). E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. *Mol Cell Biol* 15(6):3082-3089.
- HIRAI H**, ROUSSEL MF, KATO JY, ASHMUN RA, SHERR CJ (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Mol Cell Biol* 15(5):2672-2681.
- HORVATH S**, ZHANG B, CARLSON M, LU KV, ZHU S, FELCIANO RM, LAURANCE MF, ZHAO W, QI S, CHEN Z et al. (2006). Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46):17402-17407.
- HOWARD A**, PELC SR (1953). Synthesis of Desoxyribonuclein Acid in Normal and Irradiated Cells and its Relation to Chromosome Breakage. *Heredity* 6:261-273.
- ITAHANA K**, CAMPISI J, DIMRI GP (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol* 371:21-31.
- JOUKOV V**, GROEN AC, PROKHOROVA T, GERSON R, WHITE E, RODRIGUEZ A, WALTER JC, LIVINGSTON DM (2006). The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell* 127(3):539-552.
- KARAIKOU A**, JESSUS C, BRASSAC T, OZON R (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci* 112(Pt 21):3747-3756.

KITAGAWA M, HIGASHI H, SUZUKI-TAKAHASHI I, SEGAWA K, HANKS SK, TAYA Y, NISHIMURA S, OKUYAMA A (1995). Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene* 10(2):229-236.

KLEINSCHMIDT MA, WAGNER TU, LIEDTKE D, SPAHR S, SAMANS B, GAUBATZ S (2009). lin9 is required for mitosis and cell survival during early zebrafish development. *J Biol Chem* 284(19):13119-13127.

KOOPMAN G, REUTELINGSPERGER CP, KUIJTEN GA, KEEHNEN RM, PALS ST, VAN OERS MH (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84(5):1415-1420.

KORENJAK M, TAYLOR-HARDING B, BINNE UK, SATTERLEE JS, STEVAUX O, AASLAND R, WHITE-COOPER H, DYSON N, BREHM A (2004). Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell* 119(2):181-193.

KOUPRINA N, PAVLICEK A, COLLINS NK, NAKANO M, NOSKOV VN, OHZEKI J, MOCHIDA GH, RISINGER JI, GOLDSMITH P, GUNSIOR M et al. (2005). The microcephaly ASPM gene is expressed in proliferating tissues and encodes for a mitotic spindle protein. *Hum Mol Genet* 14(15):2155-2165.

KOUZARIDES T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4):693-705.

KREK W, EWEN ME, SHIRODKAR S, ARANY Z, KAELIN WG JR, LIVINGSTON DM (1994). Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* 78(1):161-172.

KREK W, LIVINGSTON DM, SHIRODKAR S (1993). Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science* 262(5139):1557-1560.

LAZEBNIK Y (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 10(4):232-233.

LAZZERINI DE, HELIN K (2005). E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. *EMBO Rep* 6(7):661-668.

LEE MH, YANG HY (2001). Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* 58(12-13):1907-1922.

LEE WH, BOOKSTEIN R, HONG F, YOUNG LJ, SHEW JY, LEE EY (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235(4794):1394-1399.

LEONE G, DEGREGORI J, JAKOI L, COOK JG, NEVINS JR (1999). Collaborative role of E2F transcriptional activity and G1 cyclindependent kinase activity in the induction of S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12):6626-6631.

LEONE G, NUCKOLLS F, ISHIDA S, ADAMS M, SEARS R, JAKOI L, MIRON A, NEVINS JR (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol* 20(10):3626-3632.

LEVKAU B, KOYAMA H, RAINES EW, CLURMAN BE, HERREN B, ORTH K, ROBERTS JM, ROSS R (1998). Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1(4):553-563.

LEWIS PW, BEALL EL, FLEISCHER TC, GEORLETTE D, LINK AJ, BOTCHAN MR (2004). Identification of a *Drosophila* Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex. *Genes Dev* 18(23):2929-2940.

LI H, GUO L, LI J, LIU N, LIU J (2000). Alternative splicing of RHAMM gene in chinese gastric cancers and its in vitro regulation. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 17(5):343-347.

LIN SY, PAN HW, LIU SH, JENG YM, HU FC, PENG SY, LAI PL, HSU HC (2008). ASPM is a novel marker for vascular invasion, early recurrence, and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 14(15):4814-4820.

LIN TY, VISWANATHAN S, WOOD C, WILSON PG, WOLF N, FULLER MT (1996). Coordinate developmental control of the meiotic cell cycle and spermatid differentiation in *Drosophila* males. *Development* 122(4):1331-1341.

LIPINSKI MM, JACKS T (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18(55):7873-7882.

LITOVCHICK L, FLORENS LA, SWANSON SK, WASHBURN MP, DECAPRIO JA (2011). DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. *Genes Dev* 25(8):801-813.

LITOVCHICK L, SADASIVAM S, FLORENS L, ZHU X, SWANSON SK, VELMURUGAN S, CHEN R, WASHBURN MP, LIU XS, DECAPRIO JA (2007). Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell* 26(4):539-551.

LOK GT, CHAN DW, LIU VW, HUI WW, LEUNG TH, YAO KM, NGAN HY (2011). Aberrant activation of ERK/FOXO1 signaling cascade triggers the cell migration/invasion in ovarian cancer cells. *PLoS One* 6(8):e23790.

LU X, HORVITZ HR (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(7):981-991.

LU J, RUHF ML, PERRIMON N, LEDER P (2007). A genome-wide RNA interference screen identifies putative chromatin regulators essential for E2F repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22):9381-9386.

MAEHARA K, TAKAHASHI K, SAITOH S (2010). CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol* 30(9):2090-2104.

MANNEFELD M, KLASSEN E, GAUBATZ S (2009). B-MYB is required for recovery from the DNA damage-induced G2 checkpoint in p53 mutant cells. *Cancer Res* 69(9):4073-4080.

MARUMOTO T, HONDA S, HARA T, NITTA M, HIROTA T, KOHMURA E, SAYA H (2003). Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic events in HeLa Cells. *J Biol Chem* 278(51):51786-51795.

MASSAGUE J (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432(7015):298-306.

MAXWELL CA, KEATS JJ, CRAINIE M, SUN X, YEN T, SHIBUYA E, HENDZEL M, CHAN G, PILARSKI LM (2003). RHAMM is a centrosomal protein that interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol Biol Cell* 14(6):2262-2276.

MILLER KR (2000). Anaphase. *Biology* (5. Auflage). Prentice Hall, Pearson.

MILTON A, LUOTO K, INGRAM L, MUNRO S, LOGAN N, GRAHAM AL, BRUMMELKAMP TR, HIJMANS EM, BERNARDS R, LA THANGUE NB (2006). A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. *Oncogene* 25(22):3212-3218.

MOBERG K, STARZ MA, LEES JA (1996). E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 16(4):1436-1449.

MORGAN DO (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261-291.

MORITA S, KOJIMA T, KITAMURA T (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7(12):1063-1066.

MORKEL M, WENKEL J, BANNISTER AJ, KOUZARIDES T, HAGEMEIERS C (1997). An E2F-like repressor of transcription. *Nature* 390(6660):567-568.

MUDRAK I, OGRIS E, ROTHENEDER H, WINTERSBERGER E (1994). Coordinated trans activation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 14(3):1886-1892.

MULLIER F, DALIPHARD S, GARAND R, DEKEYSER M, CORNET Y, LUQUET I, TALMANT P, RICHEBOURG S, JAMAR M, DOGNÉ JM et al. (2012). Morphology, cytogenetics, and survival in myelodysplasia with del(20q) or ider(20q): a multicenter study. *Ann Hematol* 91(2):203-213.

OHTANI K, NEVINS JR (1994). Functional properties of a Drosophila homolog of the E2F1 gene. *Mol Cell Biol* 14(3):1603-1612.

OSTERLOH L, VON EYSS B, SCHMIT F, REIN L, HÜBNER D, SAMANS B, HAUSER S, 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(1):144-157.

OYA M, SCHULZ WA (2000). Decreased expression of p57 (Kip2) mRNA in human bladder cancer. *Br J Cancer* 83(5):626-631.

PAGANO M, PEPPERKOK R, VERDE F, ANSORGE W, DRAETTA G (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 11(3):961-971.

PARAMASIVAM M, CHANG YJ, LOTURCO JJ (2007). ASPM and citron kinase co-localize to the midbody ring during cytokinesis. *Cell Cycle* 6(13):1605-1612.

PE'ER T, LAHMI R, SHARABY Y, CHORNI E, NOACH M, VECSLER M, ZLOTORYNSKI E, STEEN H, STEEN JA, TZUR A (2013). Gas2l3, a novel constriction site-associated protein whose regulation is mediated by the APC/C Cdh1 complex. *PLoS One* 8(2):e57532.

PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406(6797):747-752.

PETERSEN BO, LUKAS J, SORENSEN CS, BARTEK J, HELIN K (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* 18(2):396-410.

PILKINTON M, SANDOVAL R, SONG J, NESS SA, COLAMONICI OR (2007). Mip/LIN-9 regulates the expression of B-Myb and the induction of cyclin A, cyclin B, and CDK1. *J Biol Chem* 282(1):168-175.

PINES J, HUNTER T (1992). Cyclins A and B1 in the human cell cycle. *Ciba Found Symp* 170:187-196.

PINES J, RIEDER CL (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 3(1):E3-6.

PLANAS-SILVA MD, WEINBERG RA (1997). The restriction point and control of cellproliferation. *Curr Opin Cell Biol* 9(6):768-772.

PORTIER N, AUDHYA A, MADDOX PS, GREEN RA, DAMMERMANN A, DESAI A, OEGEMA K (2007). A microtubule-independent role for centrosomes and Aurora A in nuclear envelope breakdown. *Dev Cell* 12(4):515-529.

PUJANA MA, HAN JD, STARITA LM, STEVENS KN, TEWARI M, AHN JS, RENNERT G, MORENO V, KIRCHHOFF T, GOLD B et al. (2007). Network modeling links breast cancer susceptibility and centrosome dysfunction. *Nat Genet* 39(11):1338-1349.

PULVERS JN, BRYK J, FISH JL, WILSCH-BRÄUNINGER M, ARAI Y, SCHREIER D, NAUMANN R, HELPPI J, HABERMANN B, VOGT J et al. (2010). Mutations in mouse *Aspm* (abnormal spindle-like microcephaly associated) cause not only microcephaly but also major defects in the germline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(38):16595-16600.

PUTKEY FR, CRAMER T, MORPHEW MK, SILK AD, JOHNSON RS, MCINTOSH JR, CLEVELAND DW (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell* 3(3):351-365.

QIAN YW, ERIKSON E, LI C, MALLER JL (1998). Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 18(7):4262-4271.

RAEMAEKERS T, RIBBECK K, BEAUDOUIN J, ANNAERT W, VAN CAMP M, STOCKMANS I, SMETS N, BOUILLON R, ELLENBERG J, CARMELIET G (2003). NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J Cell Biol* 162(6):1017-1029.

RAJAGOPALAN H, LENGAUER C (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature* 432(7015):338-3341.

REDDIEN PW, ANDERSEN EC, HUANG MC, HORVITZ HR (2007). DPL-1 DP, LIN-35 Rb and EFL-1 E2F act with the MCD-1 zinc-finger protein to promote programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 175(4):1719-1733.

REICHERT N, WURSTER S, ULRICH T, SCHMITT K, HAUSER S, PROBST L, GÖTZ R, CETECI F, MOLL R, RAPP U, GAUBATZ S (2010). Lin9, a subunit of the mammalian DREAM complex, is essential for embryonic development, for survival of adult mice, and for tumor suppression. *Mol Cell Biol* 30(12):2896-2908.

RIEDER CL, COLE RW, KHODJAKOV A, SLUDER G (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol* 130(4):941-948.

RIEDER CL, SCHULTZ A, COLE R, SLUDER G (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol* 127(5):1301-1310.

ROUSSEL MF (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18(38):5311-5317.

ROWLAND BD, PEEPER DS (2006). KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(1):11-23.

SADASIVAM S, DECAPRIO JA (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* 13(8):585-595.

SADASIVAM S, DUAN S, DECAPRIO JA (2012). The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes Dev* 26(5):474-489.

SANDOVAL R, XUE J, TIAN X, BARRETT K, PILKINTON M, UCKER DS, RAYCHAUDHURI P, KINEMAN RD, LUQUE RM, BAIDA G et al. (2006). A mutant allele of BARA/LIN-9 rescues the *cdk4*^{-/-} phenotype by releasing the repression on E2F-regulated genes. *Exp Cell Res* 312(13):2465-2475.

SAWADO T, YAMAGUCHI M, NISHIMOTO Y, OHNO K, SAKAGUCHI K, MATSUKAGE A (1998). dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2):409-415.

SCHERTEL C, CONRADT B (2007). *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development* 134(20):3691-3701.

SCHLIEKELMAN M, COWLEY DO, OQUINN R, OLIVER TG, LU L, SALMON ED, VAN DYKE T (2009). Impaired Bub1 function in vivo compromises tension-dependent checkpoint function leading to aneuploidy and tumorigenesis. *Cancer Res* 69(1):45-54.

SCHMIT F, CREMER S, GAUBATZ S (2009). LIN54 is an essential core subunit of the DREAM/LINC complex that binds to the *cdc2* promoter in a sequence-specific manner. *FEBS J* 276(19):5703-5716.

SCHMIT F, KORENJAK M, MANNEFELD M, SCHMITT K, FRANKE C, VON EYSS B, GAGRICA S, HÄNEL F, BREHM A, GAUBATZ S (2007). LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G2/M genes. *Cell Cycle* 6(15):1903-1913.

SCHNEIDER R, BANNISTER AJ, MYERS FA, THORNE AW, CRANE-ROBINSON C, KOUZARIDES T (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* 6(1):73-77.

SHEPARD JL, AMATRUDA JF, STERN HM, SUBRAMANIAN A, FINKELSTEIN D, ZIAI J, FINLEY KR, PFAFF KL, HERSEY C, ZHOU Y et al. (2005). A zebrafish bmyb mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(37):13194-13199.

SHERR CJ (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73(6):1059-1065.

SHERR CJ (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274(5293):1672-1677.

SHERR CJ, ROBERTS JM (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13(12):1501–1512.

SONG J, SANDOVAL R, PILKINTON MA, TIAN X, RAYCHAUDHURI P, COLAMONICI OR (2010). ARF-induced downregulation of Mip130/LIN-9 protein levels mediates a positive feedback that leads to increased expression of p16Ink4a and p19Arf. *Oncogene* 29(13):1976-1986.

SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):10869-10874.

SOTIRIOU C, NEO SY, MCSHANE LM, KORN EL, LONG PM, JAZAERI A, MARTIAT P, FOX SB, HARRIS AL, LIU ET (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18):10393-10398.

STEVAUX O, DIMOVA D, FROLOV MV, TAYLOR-HARDING B, MORRIS E, DYSON N (2002). Distinct mechanisms of E2F regulation by *Drosophila* RBF1 and RBF2. *EMBO J* 21(18):4927-4937.

STORRE J, ELSASSER HP, FUCHS M, ULLMANN D, LIVINGSTON DM, GAUBATZ S (2002). Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. *EMBO Rep* 3(7):695-700.

SUDAKIN V, CHAN GK, YEN TJ (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154(5):925-936.

SUDAKIN V, GANOTH D, DAHAN A, HELLER H, HERSHKO J, LUCA F C, RUDERMAN J V, HERSHKO A (1995). The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell* 6(2):185-197.

- SWENBERG JA**, LU K, MOELLER BC, GAO L, UPTON PB, NAKAMURA J, STARR TB (2011). Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment. *Toxicol Sci* 120 Suppl 1:S130-145.
- THOMPSON D**, EASTON DF, BREAST CANCER LINKAGE CONSORTIUM (2002). Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 94(18):1358-1365.
- TRIMARCHI JM**, LEES JA (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(1):11-20.
- UHLMANN F**, LOTTSPEICH F, NASMYTH K (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400(6739):37-42.
- UTOMO AR**, NIKITIN AY, LEE WH (1999). Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol* 17(11):1091-1096.
- VAIRO G**, LIVINGSTON DM, GINSBERG D (1995). Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev* 9(7):869-881.
- VAN DEN HEUVEL S**, DYSON NJ (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9):713-724.
- VAN DER VOET M**, BERENDS CW, PERREAULT A, NGUYEN-NGOC T, GÖNCZY P, VIDAL M, BOXEM M, VAN DEN HEUVEL S (2009). NuMA-related LIN-5, ASPM-1, calmodulin and dynein promote meiotic spindle rotation independently of cortical LIN-5/GPR/Galpha. *Nat Cell Biol* 11(3):269-277.
- VARMARK H** (2004). Functional role of centrosomes in spindle assembly and organization. *J Cell Biochem* 91(5):904-914.
- VERMES I**, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1):39-51.
- WAKEFIELD JG**, BONACCORSI S, GATTI M (2001). The drosophila protein asp is involved in microtubule organization during spindle formation and cytokinesis. *J Cell Biol* 153(4):637-648.
- WANG Z**, BANERJEE S, KONG D, LI Y, SARKAR FH (2007). Down-regulation of Forkhead Box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 67(17):8293-8300.
- WHITE-COOPER H**, LEROY D, MACQUEEN A, FULLER MT (2000). Transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes depends on a conserved chromatin associated protein, whose nuclear localisation is regulated. *Development* 127(24):5463-5473.

WHITFIELD ML, SHERLOCK G, SALDANHA AJ, MURRAY JI, BALL CA, ALEXANDER KE, MATESE JC, PEROU CM, HURT MM, BROWN PO, BOTSTEIN D (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* 13(6):1977-2000.

WOLTER P, SCHMITT K, FACKLER M, KREMLING H, PROBST L, HAUSER S, GRUSS OJ, GAUBATZ S (2012). GAS2L3, a target gene of the DREAM complex, is required for proper cytokinesis and genomic stability. *J Cell Sci* 125(Pt 10):2393-2406.

WU L, TIMMERS C, MAITI B, SAAVEDRA HI, SANG L, CHONG GT, NUCKOLLS F, GIANGRANDE P, WRIGHT FA, FIELD SJ et al. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 414(6862):457-462.

XU M, SHEPPARD KA, PENG CY, YEE AS, PIWNICA-WORMS H (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 14(12):8420-8431.

XU XL, MA W, ZHU YB, WANG C, WANG BY, AN N, AN L, LIU Y, WU ZH, TIAN JH (2012). The microtubule-associated protein ASPM regulates spindle assembly and meiotic progression in mouse oocytes. *PLoS One* 7(11):e49303.

YANG Z, GUO J, CHEN Q, DING C, DU J, ZHU X (2005). Silencing mitotin induces misaligned chromosomes, premature chromosome decondensation before anaphase onset, and mitotic cell death. *Mol Cell Biol* 25(10):4062-4074.

YAO X, ABRIEU A, ZHENG Y, SULLIVAN KF, CLEVELAND DW (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol* 2(8):484-491.

YEN TJ, LI G, SCHAAR BT, SZILAK I, CLEVELAND DW (1992). CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis. *Nature* 359(6395):536-539.

YU H (2002). Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14(6):706-714.

ZALMAS LP, ZHAO X, GRAHAM AL, FISHER R, REILLY C, COUTTS AS, LA THANGUE NB (2008). DNA-damage response control of E2F7 and E2F8. *EMBO Rep* 9(3):252-259.

ZETTERBERG A, LARSSON O (1991). Coordination between cell growth and cell cycle transit in animal cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56:137-147.

ZHANG Y, CHELLAPPAN SP (1995). Cloning and characterization of human DP2, a novel dimerization partner of E2F. *Oncogene* 10(11):2085-2093.

ZHONG X, LIU L, ZHAO A, PFEIFER GP, XU X (2005). The abnormal spindle-like, microcephaly-associated (ASPM) gene encodes a centrosomal protein. *Cell Cycle* 4(9):1227-1229.

ZHOU H, KUANG J, ZHONG L, KUO WL, GRAY JW, SAHIN A, BRINKLEY BR, SEN S (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20(2):189-193.

Internetseiten

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM - KREBSINFORMATIONSDIENST

Krebsstatistiken: Wie häufig ist Krebs in Deutschland?

<http://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php#inhalt2>

abgerufen am 11.09.2013

ROBERT-KOCH-INSTITUT

Krebs in Deutschland.

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/kid_2012_c00-97.pdf?__blob=publicationFile

abgerufen am 11.09.2013

STATISTISCHES BUNDESAMT

Todesursachen 2011.

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html>

abgerufen am 11.09.2013

STATISTISCHES BUNDESAMT

Todesursachen 2011 nach Kapiteln der ICD-10.

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/GestorbeneAnzahl.html>

abgerufen am 11.09.2013

6.2 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle	Beschreibung	Seite
Tab. 1.1	Zusammensetzung von pRB/E2F-Komplexen bei verschiedenen Spezies	15

Abbildung	Beschreibung	Seite
Abb. 1.1	Konditionelles Lin9- <i>Knockout</i> -Mausmodell (cre-loxP-Technologie)	20
Abb. 2.1	Schematische Darstellung des Inkubator-Aufbaus zur <i>Time lapse</i> -Mikroskopie	45
Abb. 3.1	Die Depletion von Lin9 führt zu verstärktem Auftreten von Zellen mit abnormaler Kernmorphologie und zu binukleären Zellen	60
Abb. 3.2	Der binukleäre Phänotyp Lin9-depletierter Zellen kann durch Lin9-Überexpression weitgehend kompensiert werden	62
Abb. 3.3	Die DNA-Synthese läuft auch in Lin9-defizienten Zellen mit abnormer Kernmorphologie weiterhin ab	64
Abb. 3.4	Lin9-defiziente Zellen treten nach Synchronisation in der G ₀ -Phase verzögert in die Mitose ein	66
Abb. 3.5	Die Depletion von Lin9 führt zu überzähligen Zentrosomen und zu Zytokinese-Fehlern	69
Abb. 3.6	<i>Time lapse</i> -Mikroskopie zur Dokumentation mitotischer und zytokinetischer Aberrationen	72
Abb. 3.7	Lin9-Defizienz führt zu einer Zunahme seneszenter Zellen	73
Abb. 3.8	Lin9-Defizienz führt nicht zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen	75
Abb. 3.9	Die Depletion von Lin9 führt zur verminderten Expression von G ₂ /M-Genen	77
Abb. 3.10	Expressionsanalysen von Lin9-Zielgenen nach Synchronisation in der G ₀ -Phase durch Serum-Entzug	79
Abb. 3.11	Lin9 bindet an die Promotoren mitotischer Zielgene und nimmt Einfluss auf posttranslationale Histon-Modifikationen	82
Abb. 3.12	Kolonie-Bildungs-Assay von Large T-immortalisierten Lin9 fl/fl creER ^{T2} -MEFs	84
Abb. 3.13	Die Kombination von Lin9-Verlust und onkogenem Stress führt zu chromosomaler Instabilität und zu onkogener Transformation	87
Abb. 3.14	Expression der Lin9-Zielgene in immortalisierten MEFs nach Verlust von Lin9	89
Abb. 3.15	Lin9-Heterozygotität führt nicht zu einem Wachstumsdefizit	91
Abb. 3.16	Lin9-heterozygote MEFs zeigen kein verändertes Zellzyklusprofil	92

Abb. 3.17	Der heterozygote Verlust von Lin9 führt zu einer leichten Herabregulation einiger G ₂ /M-Gene	94
Abb. 3.18	Der heterozygote Verlust von Lin9 führt zur Schwächung des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes	96
Abb. 3.19	Kolonie-Bildungs-Assay Large T-immortalisierter Lin9 fl/+ cre ER ^{T2} -MEFs	98
Abb. 3.20	Lin9-Heterozygotizität führt bei immortalisierten MEFs zu einer leichten Zunahme polyploider Zellen	99
Abb. 3.21	Der heterozygote Verlust von Lin9 trägt zur onkogenen Transformation von MEFs bei	100
Abb. 4.1	Zielgene von LIN9 und ihre Bedeutung für die Mitose und Zytokinese	104 105
Abb. 4.2	Auswirkungen der Lin9-Defizienz	130

ANHANG

Abkürzungen

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
APC	<i>Anaphase promoting complex</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromuridin
BSA	Bovines Serum-Albumin
C57BL/6	C57 <i>black</i> 6-Mäuse
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
cre	<i>cyclization recombination</i>
Ct-Wert	Zyklus-Schwellenwert (<i>cycle threshold</i>)
d	Tage (<i>days</i>)
dd	doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ds	doppelsträngig
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DOC	[Natrium]desoxycholol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS/FCS	Fötales bovines Serum / Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	mit loxP-Stellen flankiert („gefloxt“)
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein

GT	<i>gene trap</i>
h	Stunden (<i>hours</i>)
H	Histon
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (<i>HEPES buffered saline</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
KBA	Kolonie-Bildungs-Assay
LB	<i>lysogeny broth</i>
MEFs	Murine embryonale Fibroblasten
min	Minuten
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MW	Mediumwechsel
NP-40	Nonoxinol 40
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung + 0,1% v/v Triton X-100
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI	Propidiumjodid
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ss	einzelsträngig (<i>single strand</i>)
SV40	Simian-Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Einheiten (<i>units</i>)
UV	Ultraviolett
v	Volumen
w	Gewicht (<i>weight</i>)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Δ	Delta (Differenz; Depletion / fehlendes Allel)

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle all denjenigen danken, die mich während meines Studiums und bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zunächst gilt mein großer Dank Prof. Dr. Stefan Gaubatz für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit in seinem Labor anfertigen zu können, für die Überlassung des interessanten Projektes für diese Dissertation und für die exzellente wissenschaftliche Betreuung, die wertvollen Ratschläge und die stetige Motivation. Ich danke PD Dr. Roland Houben für die kurzfristige und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein herzlicher Dank gilt Nina Reichert für die hervorragende Einführung in die Arbeit mit den Lin9 *Knockout*-MEFs und die zahlreichen Tipps und Tricks für die zell- und molekularbiologischen Methoden. Auch den anderen Kollegen der Arbeitsgruppe Gaubatz (Markus Kleinschmidt, Stefanie Hauser, Kathrin Schmitt, Mirjam Mannefeld, Jasmina Esterlechner, Tanja Ulrich, Piero Ocone, Leona Probst, Adelgunde Wolpert und Susi Spahr) und des Lehrstuhl für Physiologische Chemie I, die durch ihre Ratschläge, konstruktiven Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt mein Dank. Besonders danken möchte ich Toni Wagner, Andreas Hock und Tim Krüger für die technische Unterstützung bei der *Time lapse*-Mikroskopie.

Dem Transregio 17 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Förderung des Projektes.

Weiterhin gilt mein Dank der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg und den engagierten Seminarleitern und Praktikumsbetreuern, die es mir ermöglicht haben, parallel zum klinischen Studienabschnitt meine naturwissenschaftlichen Kenntnisse und Labor-Fertigkeiten im Begleitstudium der Experimentellen Medizin zu erweitern.

Abschließend gilt mein tiefster Dank meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern für den großartigen Rückhalt, die stetige Begleitung und Motivation sowie die finanzielle Förderung meines Studiums. Ohne diese Unterstützung wären mein Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Sebastian Wurster

Geburtsdatum und -ort 27.07.1987 in Pforzheim

Schulische Ausbildung

08 / 1993 – 07 / 1997 Johannes-Kepler-Grundschule in Keltern-Ellmendingen

09 / 1997 – 07 / 2003 Gymnasium Neuenbürg

09 / 2003 – 07 / 2006 Bertha-von-Suttner-Schule Ettlingen
Biotechnologisches Gymnasium

06 / 2006 Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin und Prüfungen im Rahmen der ÄAppO

WS 2006 / 2007 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Studium der Humanmedizin
Beginn vorklinischer Studienabschnitt

08 / 2008 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08 / 2008 – 03 / 2009 Praktischer Abschnitt der Promotionsarbeit am Lehrstuhl
für Physiologische Chemie I
Betreuer: Prof. Dr. S. Gaubatz

Die Bedeutung von LIN9 für die Regulation der
Genexpression, die genomische Stabilität und die
Tumorsuppression

04 / 2009 – 06 / 2013 Klinischer Studienabschnitt

06 / 2013 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Studium der Experimentellen Medizin

SS 2009 – SS 2011: Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Begleitstudiengang Experimentelle Medizin

- 10 / 2013 – 07 / 2014 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Master-Studium der Experimentellen Medizin
- 10 / 2013 – 07 / 2014 Master-Thesis an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Betreuer: PD Dr. J. Löffler
- Interaktion humaner Immunzellen mit *Mucorales*: Analyse der Genexpression und Liberation wichtiger pro- und anti-inflammatorischer Zytokine

Beruflicher Werdegang

- 09 / 2014 – 01 / 2015 Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik II, Assistenzarzt
- Seit 02 / 2015 Universitätsklinikum Würzburg, Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung, Projektleiter Z-3/56, Assistenzarzt

Würzburg, den _____

Unterschrift: _____