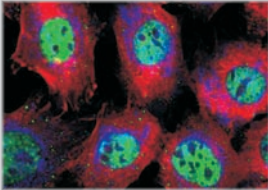
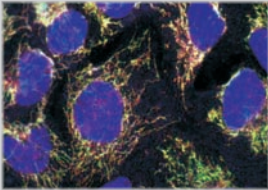
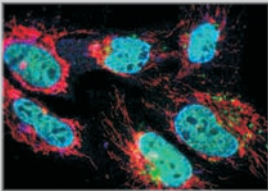
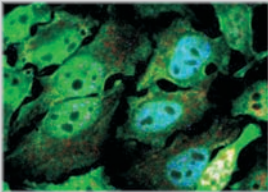


# UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSION p53- REGULIERTER GENE NACH REDUKTION DER ZELLULÄREN LEVEL DES INHAT REPRESSORS NIR MITTELS RNA-INTERFERENZTECHNOLOGIE

**NICOLE DUBOIS**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus Liebig Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel

**und**

der Klinik für Innere Medizin I, José Carreras Forschungszentrum der  
Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar

Betreuer: Prof. Dr. Klaus Roemer

**Untersuchungen zur Expression p53-regulierter Gene nach  
Reduktion der zellulären Level des INHAT Repressors NIR  
mittels RNA-Interferenztechnologie**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Nicole Dubois**

Tierärztin aus Illingen

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. H.- J. Thiel

Prof. Dr. K. Roemer

Tag der Disputation: 28. November 2007

## **Vorwort**

Die Experimente zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Virologie sowie dem José Carreras Forschungszentrum der Klinik für Innere Medizin I der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:

21.09.2005      9. Saar- Lor- Lux Meeting on Virus Research, Luxemburg

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Roemer für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung der praktischen und vor allem der theoretischen Arbeit, die kritische Durchsicht der vorliegenden Dissertation, sowie die fachlich aufschlussreichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus- Liebig- Universität Gießen zu vertreten und für die gründliche Durchsicht dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Nikolaus Müller- Lantzsch danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis seines Instituts für Virologie, für die Förderung dieser Arbeit und sein Vertrauen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Roemer bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Biol. Kristina Heyne für die Vermittlung und Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden und ihre ständige Hilfsbereitschaft bei den Problemen des Laboralltags.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dipl. Biol. Thorsten Pfuhl für seine stete Bereitschaft der kollegialen Unterstützung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie sowie des José Carreras Forschungszentrums danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben. Ein herzlicher Dank gilt insbesondere meiner Mutter, die mich während dieser Arbeit immer unterstützt, fortwährend motiviert und mir in allen Phasen dieser Arbeit Verständnis entgegengebracht hat.

Meinen Eltern gewidmet





## Inhaltsverzeichnis:

<b>Inhaltsverzeichnis:</b> .....	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abbildungen</b> .....	<b>V</b>
<b>Verzeichnis der Tabellen</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 DNA im Zellkern</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Aufbau des Zellkerns .....	1
<b>1.2 Chromatin</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Histone .....	2
1.2.1.1 Histon- Subtypen.....	3
1.2.2 Nucleosomen.....	4
1.2.3 Chromatinfasern.....	5
<b>1.3 Der Histon Code</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Histon- Modifikationen</b> .....	<b>8</b>
1.4.1 Histon- Methylierung .....	8
1.4.1.1 Histon- Demethylierung.....	9
1.4.2 Histon- Phosphorylierung .....	10
1.4.3 Histon- Acetylierung.....	11
1.4.3.1 Histon- Deacetylierung .....	13
1.4.3.2. Inhibitoren der Histon- Deacetylasen (HDACs).....	15
1.4.3.3. Posttranslationale Acetylierung von Nicht- Histon- Proteinen .....	15
<b>1.5. Der Tumorsuppressor p53</b> .....	<b>16</b>
1.5.1. Posttranslationale Modifikationen von p53.....	18
1.5.2. Kontrolle zellulärer Funktionen durch p53 .....	19
<b>1.6. INHATs (Inhibitor of Acetyltransferase)</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7. NIR, ein neuer INHAT Repressor</b> .....	<b>23</b>
<b>1.8. p53- regulierte Gene</b> .....	<b>26</b>
1.8.1. survivin, ein bifunktioneller Inhibitor von apoptotischen Proteinen.....	26
1.8.2. Stathmin, ein Regulatorprotein im Zellzyklus .....	27
1.8.3. p53 DINP1, ein positiver Regulator der p53- abhängigen Apoptose.....	28
1.8.4. p21, ein Cyclin- abhängiger Kinase Inhibitor .....	29
1.8.5. Die Bcl-2 Familie .....	30
1.8.5.1. Die „BH-3 only“ Proteine PUMA und Noxa .....	31
1.8.5.2. Die „multidomain proapoptotic“ Proteine Bax und Bak.....	32

1.8.6.	GADD 45, ein negativer Zellwachstums- Regulator .....	33
1.8.7.	PIG3, ein REDOX- Gen.....	34
1.8.8.	REDD1, ein Zielgen der Transkriptionsfaktoren p53 und p63 .....	35
<b>1.9.</b>	<b>Bedeutung der Tumorforschung in der Veterinärmedizin .....</b>	<b>36</b>
<b>1.10.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>Material .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien, Membranen .....</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Puffer und Lösungen.....</b>	<b>40</b>
<b>2.3</b>	<b>Enzyme .....</b>	<b>41</b>
<b>2.4</b>	<b>Größen- und Molekulargewichtsmarker .....</b>	<b>41</b>
2.4.1	DNA- Größenmarker.....	41
2.4.2	Protein- Molekulargewichtsmarker.....	42
<b>2.5</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>42</b>
2.5.1	Primärantikörper.....	42
2.5.2	Sekundärantikörper .....	43
<b>2.6</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>43</b>
2.6.1	HCT116 .....	43
2.6.2	HCT116 Bax-/-.....	43
2.6.3	HCT116 p53-/- .....	43
2.6.4	MCF7 .....	43
<b>2.7</b>	<b>Medien und Lösungen für die Zellkultur.....</b>	<b>44</b>
<b>2.8</b>	<b>Materialien für die Zellkultur .....</b>	<b>44</b>
<b>2.9</b>	<b>siRNAs .....</b>	<b>45</b>
2.9.1	NIR siRNA .....	45
2.9.2	Control siRNA.....	45
<b>2.10</b>	<b>Synthetische Oligonukleotide („Primer“) .....</b>	<b>46</b>
2.10.1	Bak (Homo sapiens Bcl-2- antagonist/ killer1).....	46
2.10.2	Bax (Homo sapiens Bcl-2- associated X Protein).....	46
2.10.3	$\beta$ - Actin.....	46
2.10.4	GADD45 (Homo sapiens growth arrest and DNA- damage 45) .....	46
2.10.5	GAPDH .....	46
2.10.6	HPRT.....	47
2.10.7	NOXA .....	47
2.10.8	REDD1 (DDIT4).....	47

2.10.9	p21(Homo sapiens cyclin dependent kinase inhibitor1A) .....	47
2.10.10	p53 DINP1 $\alpha$ (p53- dependant damage- inducible nuclear protein 1) .....	47
2.10.11	PIG3 (Homo sapiens tumor protein p53 inducible protein 3).....	48
2.10.12	PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis).....	48
2.10.13	stathmin .....	48
2.10.14	survivin.....	48
<b>2.11</b>	<b>Verwendete Laborgeräte .....</b>	<b>49</b>
<b>2.12</b>	<b>Computersoftware.....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Kultivierung eukaryotischer Zellen.....</b>	<b>50</b>
3.1.1	Kultivierung von HCT116 Zellen .....	50
3.1.2	Kultivierung von MCF7 Zellen.....	51
<b>3.2</b>	<b>Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY.....</b>	<b>51</b>
<b>3.3</b>	<b>Transfektionseffizienz.....</b>	<b>52</b>
<b>3.4</b>	<b>Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen .....</b>	<b>52</b>
3.4.1	Transiente Transfektionen mit RNAiFect® (Quiagen).....	53
<b>3.5</b>	<b>Fixierung von mit FITC- gekoppelter control siRNA transfizierter Zellen mittels FACS- Fix.....</b>	<b>54</b>
<b>3.6</b>	<b>Durchfluscytometrie (FACS-Analyse).....</b>	<b>54</b>
<b>3.7</b>	<b>Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen .....</b>	<b>55</b>
3.7.1	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	56
<b>3.8</b>	<b>SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE).....</b>	<b>56</b>
3.8.1	Herstellen eines SDS- Polyacrylamidgels.....	57
<b>3.9</b>	<b>Western Blot (Immunoblot) .....</b>	<b>58</b>
3.9.1	Proteintransfer .....	59
3.9.2	Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine.....	59
<b>3.10</b>	<b>RNA- Techniken.....</b>	<b>60</b>
3.10.1	RNA- Isolierung aus eukaryotischen Zellen .....	60
3.10.2	DNase- Verdau isolierter RNA .....	61
3.10.3	Herstellung von cDNA: Reverse Transkription .....	61
<b>3.11</b>	<b>Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....</b>	<b>62</b>
<b>3.12</b>	<b>Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>63</b>
<b>3.13</b>	<b>Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA.....</b>	<b>68</b>

3.13.1	Herstellung eines Agarosegels .....	68
3.13.2	Agarosegelelektrophorese .....	69
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1</b>	<b>Repression des NIR Gens .....</b>	<b>70</b>
4.1.1	RNA- Interferenz.....	70
<b>4.2</b>	<b>Transiente RNA-Interferenztechnik mittels synthetisch hergestellter siRNAs....</b>	<b>73</b>
<b>4.3</b>	<b>Transfektionseffizienzen .....</b>	<b>74</b>
<b>4.4</b>	<b>NIR- Repression in den Zelllinien HCT116 wt und HCT116 p53-/- .....</b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Untersuchungen zur Expressionsanalyse p53- regulierter Gene unter NIR knockdown .....</b>	<b>78</b>
4.5.1	Semiquantitative RT- PCRs in HCT116 wt Zellen nach Transfektion einer NIR siRNA .....	78
4.5.2	Semiquantitative RT- PCRs in HCT116 p53-/- Zellen nach Transfektion einer NIR siRNA.....	81
4.5.3	Semiquantitative RT- PCRs in MCF7 Zellen nach Transfektion einer NIR siRNA .....	83
<b>4.6</b>	<b>Untersuchungen zur Veränderung der Bax- Protein- Expression unter NIR knockdown in HCT116 wt und HCT116 p53-/- Zellen.....</b>	<b>87</b>
<b>4.7</b>	<b>Abhängigkeit der durch NIR knockdown induzierten p53- vermittelten Apoptose von dem proapoptotischen Protein Bax .....</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>117</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb.1.1: Die „dynamische Struktur“ des Chromatins .....	6
Abb.1.2: Das Tumorsuppressor- Gen p53.....	17
Abb.1.3: Strukturelle Veränderungen einer Zelle während der Apoptose.....	20
Abb.1.4: Der INHAT Repressor NIR (Novel INHAT Repressor).....	23
Abb. 1.5: Die Bcl- 2 Familie.....	30
Abb.4.1: Funktionsprinzip der RNA- Interferenz .....	72
Abb.4.2: Transfektionseffizienz der HCT116 wt Zellen für siRNA.....	74
Abb.4.3: Transfektionseffizienz der HCT116 p53-/- Zellen für siRNA .....	75
Abb.4.4: NIR knockdown in HCT116 wt Zellen.....	77
Abb.4.5: NIR knockdown in HCT116 p53-/- Zellen .....	77
Abb.4.6: Semiquantitative RT- PCRs in HCT116 wt Zellen unter NIR knockdown .....	79
Abb.4.7: Semiquantitative RT-PCRs in HCT116 p53 -/- Zellen unter NIR knockdown .....	82
Abb.4.8: Transfektionseffizienz der MCF7 Zellen für siRNA .....	83
Abb.4.9: NIR knockdown in MCF7 Zellen.....	84
Abb.4.10: Semiquantitative RT- PCRs in MCF 7 Zellen unter NIR knockdown.....	86
Abb.4.11: Bax-Protein- Expression unter NIR knockdown in HCT116 wt Zellen .....	88
Abb.4.12: Bax- Protein- Expression unter NIR knockdown in HCT116 p53-/- Zellen.....	88
Abb.4.13: Transfektionseffizienz der HCT116 Bax-/- Zellen für siRNA.....	89
Abb.4.14: Transfektionseffizienz der MCF7- Zellen für siRNA.....	90
Abb.4.15: Transfektionseffizienz der HCT116 wt- Zellen für siRNA .....	90
Abb.4.16: Grundprinzip der Zellzyklusverteilung gemessen in der FACS- Analyse.....	92
Abb.4.17: FACS- Daten der HCT116 wt Zellen.....	93
Abb.4.18. FACS- Daten der HCT116 Bax-/- Zellen.....	93
Abb.4.19: FACS- Daten der MCF 7 Zellen .....	94
Abb.4.20: Relative Apoptose 48 Stunden nach Reduktion der zellulären NIR- Level durch RNA-Interferenz in MCF 7, HCT116 wt und HCT116 Bax-/- Zellen.....	95

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.1: Klassifikation der HDACs beim Mensch und in Hefen.....	14
Tabelle 3.1: Komponenten eines 10% und 13% SDS- Trenngels sowie eines Sammelgels	58
Tabelle 3.2: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes.....	64
Tabelle 3.3: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für die Gene <i>Bax</i> , <i>Bak</i> , ..	65
<i>Noxa und Redd 1</i> .....	65
Tabelle 3.4: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen <i>p21</i> .....	65
Tabelle 3.5: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für die Gene <i>Stathmin</i> , ..	65
<i>Survivin und Gadd 45</i> .....	65
Tabelle 3.6: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen <i>DINP1α</i> .....	66
Tabelle 3.7: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen <i>Puma</i> .....	66
Tabelle 3.8: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen <i>PIG3</i> .....	66
Tabelle 3.9: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen <i>GAPDH</i> .....	67
Tabelle 3.10: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen <i>HPRT</i> .....	67
Tabelle 3.11: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen <i>β-Actin</i> .....	67
Tabelle 3.12: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche.....	69

# 1 Einleitung

## 1.1 DNA im Zellkern

### 1.1.1 Aufbau des Zellkerns

Der Zellkern stellt die größte, lichtmikroskopisch sichtbare Organelle der eukaryotischen Zelle dar. Er ist der wichtigste Ort der Speicherung, Replikation und Expression genetischer Information und hat einen Durchmesser von 10-20  $\mu\text{m}$ . Gegen das Cytoplasma der Zelle ist der Zellkern durch eine Hülle abgegrenzt, die aus einer äußeren und einer inneren Kernmembran besteht. Zwischen diesen beiden Lipidmembranen befindet sich ein perinukleärer Spalt. Die äußere Membran ist ein Bestandteil oder eine Fortsetzung des endoplasmatischen Retikulums, wo Ribosomen die Synthese von Proteinen durchführen. Die innere der beiden Membranen steht in Verbindung mit fadenförmigen Proteinstrukturen, der Kern- Lamina, die der Kern- Hülle ihre Festigkeit verleiht.

Die Kern- Hülle wird von Kern- Poren unterbrochen, die von einem Porenkomplex aus Proteinen gebildet werden. Die Zahl der Kern- Poren wechselt von Zelltyp zu Zelltyp und mit dem Funktionszustand der Zelle. Die Funktion des Kern- Poren- Komplexes ist der Transport von Molekülen in den Zellkern und aus dem Zellkern heraus. Somit werden die im Kern synthetisierten mRNA- und tRNA- Moleküle zur Protein- Synthese (Translation) ins Cytoplasma exportiert, während alle Kernproteine (Histone, Nichthiston- Proteine) in den Kern importiert werden müssen.

Im Innern des Zellkerns befindet sich das Chromatin, ein Komplex aus DNA und Proteinen. Es ist bemerkenswert, dass das komplette Genom mit einer Länge von fast 2 Metern in einen Zellkern mit 10 bis höchstens 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser hineinpasst. Man kann also davon ausgehen, dass das Innere des Zellkerns einem hochviskösen, polymorphen Gel vergleichbar ist. Jedoch muss in dieser dichten Masse jedes Gen quasi zu jeder Zeit auf Abruf bereitstehen. Das setzt eine geordnete und zugleich flexible Anordnung des Genoms voraus.

Die maximale Verpackung der DNA erfolgt während der Mitose bei der Bildung der Chromosomen.

Bei elektronenoptischen Aufnahmen kann im Innern des Zellkerns ein besonders dunkler Bereich identifiziert werden, der als Nucleolus bezeichnet wird. Er bildet sich im Bereich der vielen hintereinander geschalteten rRNA- Gene. In proliferierenden Zellen erfolgt dort eine massive Synthese von rRNA und zugleich auch der Beginn des Ribosomen- Zusammenbaus.

## 1.2 Chromatin

Chromatin besteht im Wesentlichen aus folgenden Komponenten:

- aus dem DNA- Faden,
- aus einer Gruppe basischer Proteine, den Histonen (s. Kap. 1.2.1.),
- sowie aus einer Gruppe Nicht- Histon- Chromatin- Proteinen.

Das Verhältnis von DNA zu Histonen ist in allen eukaryotischen Zellen gleich und ändert sich nicht wesentlich mit dem physiologischen Zustand der Zelle. Bei den Nicht- Histon- Chromatin- Proteinen kommt es hingegen in Abhängigkeit vom Zelltyp sowie der genetischen Aktivität der Zelle zu Veränderungen in der Zusammensetzung und Menge dieser Proteine in einer Zelle. Zu den Nicht- Histon- Chromatin- Proteinen zählen unter anderem Enzyme wie DNA- Polymerasen oder RNA- Polymerasen sowie Transkriptionsfaktoren.

Die Struktur des Chromatins wird in erster Linie durch Wechselwirkungen zwischen DNA und Histonen bestimmt. In der Phase zwischen den Zellteilungen, der Interphase, ist die DNA in vielen Bereichen des Zellkerns dicht gepackt und liegt zusammen mit RNA und Proteinen als *Heterochromatin* vor. Locker gepackte DNA- Bereiche, die man als *Euchromatin* bezeichnet, sind der Ort der aktiven Transkription von DNA in RNA.

### 1.2.1 Histone

In den Kernen aller Tier- und Pflanzenzellen konnten mittels biochemischer Untersuchungen fünf verschiedene Histone identifiziert werden: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Der Histon- Typ H1 hingegen fehlt in den Kernen der Hefen, während die übrigen vier Histon- Typen nachgewiesen werden konnten.

Histone sind kleine, stark basische Proteine, die direkt mit der DNA assoziiert sind. Ihre Masse liegt im Bereich von 11 bis 21 kDa. Betrachtet man die Struktur der Histone, so kann man feststellen, dass alle Histone eine ähnliche Struktur aufweisen. Diese gliedert sich in eine zentrale, annähernd globuläre Domäne mit flexiblen aminoterminalen und carboxyterminalen Armen. Das entscheidende Merkmal von Histonen ist der hohe Gehalt an basischen Aminosäuren, Arginin und Lysin. Diese basischen Aminosäuren sind nicht gleichmäßig über



das Molekül verteilt, sondern treten bevorzugt in den flexiblen Armen auf. Sie neutralisieren die negativ geladenen Phosphat-Gruppen und ermöglichen so die dichte Packung der DNA im Zellkern.

Ihre Aminosäuresequenz hat sich im Laufe der Evolution kaum verändert. Dies wird deutlich, wenn man die Sequenzen der Histone von Säugetieren, Pflanzen und Pilzen vergleicht. Zum Beispiel unterscheidet sich das Histon H4 aus tierischen Zellen nur an zwei Aminosäure-Positionen von dem Histon H4 aus pflanzlichen Zellen. Am geringsten ist die Ähnlichkeit zwischen den Histon H1-Sequenzen verschiedener Tier- und Pflanzenarten ausgeprägt. Zusammenfassend kann man aber sagen, dass Histone zu den höchst konservierten Proteinen gehören und ihnen somit eine wichtige Bedeutung bei der Organisation des genetischen Materials von Eukaryoten zugesprochen werden kann. So wird es möglich, die 46 DNA-Moleküle des diploiden menschlichen Genoms mit ihren  $6 \times 10^9$  Basenpaaren und einer Gesamtlänge von etwa 2 m in einem Zellkern von nur 10 µm Durchmesser unterzubringen.

### **1.2.1.1 Histon- Subtypen**

Die oben erwähnten Histon-Typen können in verschiedene Histon-Subtypen oder Histon-Varianten unterteilt werden. Im Human-Genom sowie in den Genomen anderer Vertebraten gibt es oft mehr als ein Dutzend Gene für jedes der einzelnen Histone. Außerdem können die Histon-Typen anhand verschiedener Modifikationen (s. Kap. 1.4.) der Aminosäure-Seitenketten in den flexiblen Armen der Histone unterschieden werden.

So lässt sich z.B. das Histon H3 in 3 Subtypen unterteilen, während die 14 humanen H4-Gene alle die gleiche Histon-Sequenz kodieren. In den Kernen der meisten Säugetier-Zellen findet man 6-8 verschiedene H1-Subtypen, die sich meist in ihren variablen amino- und carboxyterminalen Armen unterscheiden. Ebenso werden die Histone H2A und H2B von einer Vielzahl von Histon-Genen kodiert. Von den 12 H2A-Genen kodieren sechs völlig identische H2A-Proteine, während die sechs anderen sich voneinander gerade einmal an zwei oder drei Stellen ihrer Sequenz unterscheiden. Ähnlich die H2B-Gene, von denen zehn Gene leicht unterschiedliche H2B-Varianten kodieren. Auffällige H2A-Varianten sind Makro-H2A (Funktion beim Abschalten von Genen), H2AX sowie H2AZ.

Entscheidend ist, dass die Standard- Histone ausschließlich zur Zeit der DNA- Synthese in das neu entstehende Chromatin aufgenommen werden, während die selteneren Subtypen unabhängig davon an das Chromatin gelangen, womöglich in Abhängigkeit von Gen-Aktivierungen.

### 1.2.2 Nucleosomen

1974 entwickelte Roger Kornberg ein Modell, wonach Chromatin aus sich wiederholenden Einheiten besteht. Jede Einheit gliedert sich in einen Proteinkern mit je zwei Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3 und H4 (→ **Histon- Oktamer**) sowie ein DNA- Stück von 160-240 Basenpaaren. Die DNA- Längen wechseln mit Zelltyp und Organismus. Unterschiede lassen sich auf die DNA- Abschnitte zwischen benachbarten Nucleosomen zurückführen (**linker DNA oder Verbindungs- DNA**). Um ein Histon- Oktamer ist der DNA- Faden in zwei linksgerichteten superhelikalen Windungen geschlungen. Das Histon H1 liegt dem oktameren Komplex auf und überdeckt die Eintritts- und Austrittsstelle der DNA. Man bezeichnet diese sich wiederholenden Einheiten als **Nucleosomen**.

Nach einer länger andauernden Nuclease- Behandlung des Chromatinfadens ist die Verbindungs- oder Linker DNA vollständig abgebaut. Zurückbleiben lediglich die Histon- Oktamere mit der direkt aufliegenden DNA. Dieses DNA- Stück besteht aus 147 Basenpaaren. Zusammen mit dem Histon- Oktamer spricht man vom Kern des Nucleosoms, dem **Core Partikel**.

Untersuchungen bezüglich der Positionen der einzelnen Histone im oktameren Komplex ergaben, dass der globuläre Anteil der Histone in Wirklichkeit eine Folge von  $\alpha$ - Helices mit verbindenden Schleifen ist. Charakteristisch ist eine zentral gelegene lange  $\alpha$ - Helix, die beiderseits von kürzeren  $\alpha$ - Helices begrenzt wird. Dieses als Histon- Falte bekannte Strukturmotiv ist für die Kontaktaufnahme mit dem Partner- Histon von Bedeutung. Somit gliedert sich das Histon- Oktamer in zwei Dimere der Histone H2A und H2B sowie ein Tetramer aus je zwei Dimeren der Histone H3 und H4. Der C- terminale Bereich des Histons H3 vermittelt den Kontakt zum Histon H3 im zweiten H3/H4- Dimer.

Desweiteren binden die Histone mit ihren globulären Anteilen in Abständen von etwa 10 Basenpaaren an die DNA. Diese Bindungen bestimmen im Wesentlichen die Stabilität des

Nucleosoms, während die flexiblen, basischen amino- und carboxyterminalen Histon- Arme über das Nucleosom hinausreichen. Sie können Wechselwirkungen mit den benachbarten Nucleosomen im Chromatin eingehen. Durch Modifikationen (s. Kap. 1.4.) an den N- und C-terminalen Histon- Armen kommt es zu Veränderungen dieser Wechselwirkungen, was natürlich Konsequenzen für die Anordnung der Nucleosomen im Chromatin und damit auch für die Genexpression hat.

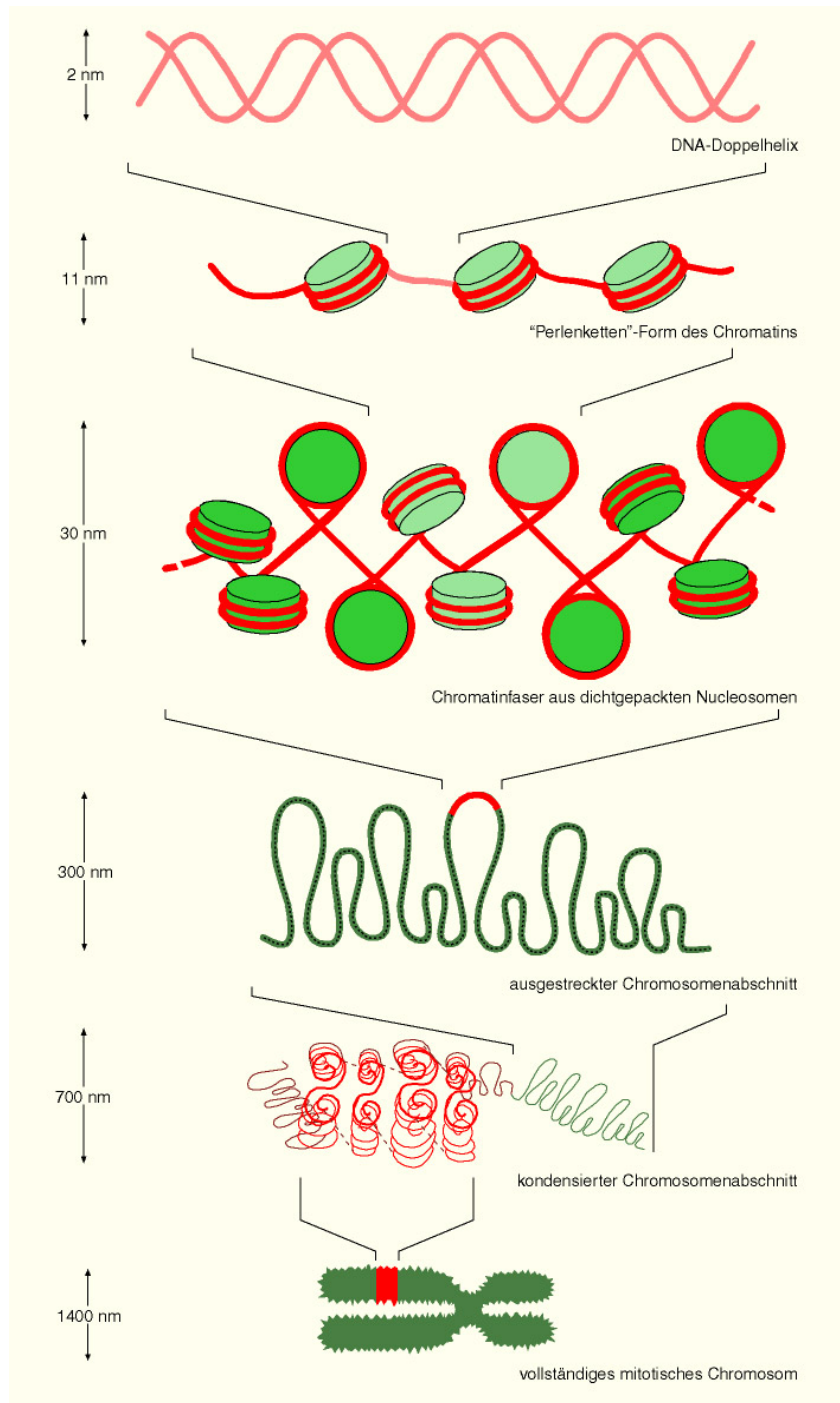
### 1.2.3 Chromatinfasern

Der Durchmesser eines Nucleosoms beträgt etwa 10 nm, während die Chromatin- Fäden im Zellkern an den meisten Stellen Durchmesser von etwa 30 nm haben. Daraus folgt, dass die Kette von Nucleosomen gefaltet sein muss (s. Abb.1.1.). Diese Faltungen werden teilweise durch die Wechselwirkungen zwischen den Histonen benachbarter Nucleosomen hervorgerufen. Die zentrale Funktion übernimmt dabei das Histon H1. Dieses liegt dem Histon- Oktamer auf und bedeckt die Eintritts- und Austrittsstelle der DNA.

Eine 30 nm- Faser umfasst somit 6-8 Nucleosomen in einer Windung. Man geht davon aus, dass die Nucleosomen in dieser Faser schraubenförmig oder helical als sogenanntes Solenoid angeordnet sind. Eine andere Möglichkeit wäre eine Zickzack- Anordnung der Nucleosomen. Dabei ist die Linker- DNA zwischen den Nucleosomen gerade gestreckt, und die 30 nm- Faser aus zwei Nucleosomen- Säulen aufgebaut.

Untersuchungen zu diesen Aspekten sind insofern von Bedeutung, da Übergänge von der gestreckten 10 nm- Faser zur dichter gepackten 30 nm- Faser und umgekehrt die Aktivität von Genen beeinflussen.

Im Weiteren werden die 30 nm- Fasern zu mehreren tausend Schleifen organisiert, wobei jede Schlaufe DNA- Abschnitte von etwa 50-100 Kilo- Basenpaaren umfasst. Die Basis jeder Schlaufe ist wahrscheinlich an Strukturen der Kernmatrix gebunden. Durch diese Struktur und Anordnung des Chromatins kann eine dichte Verpackung des Genoms im Zellkern gewährleistet werden.



**Abb.1.1: Die „dynamische Struktur“ des Chromatins:**

Die Anordnung der Nucleosomen und Faltungen von Chromatin- Fasern ändern sich mit der Funktion.

### 1.3 Der Histon Code

Wie bereits in Kapitel 1.2.1. erwähnt, sind die Aminosäuresequenzen der Histone vor allem im zentralen globulären Bereich hoch konserviert. Die Seitenketten der Aminosäuren in den flexiblen aminoterminalen Domänen können jedoch durch Anheftung von Acetylgruppen an Lysin, durch Methylierung von Lysin und Arginin oder auch durch Phosphorylierungen vielfach modifiziert werden. In diesem Zusammenhang ist von besonderer Wichtigkeit, an welchen Stellen der Sequenz Modifikationen stattfinden. Außerdem können Modifikationen in sehr zahlreichen Kombinationen auftreten, eventuell auch nacheinander und an einem oder an mehreren aminoterminalen Enden. Man unterscheidet sowohl lokale Modifikationen, die meist im Bereich eines Promotors liegen als auch Modifikationen, die sich über einen großen Bereich des Chromosoms ausbreiten können. Es kann somit eine Hypothese aufgestellt werden, dass einzelne Modifikationsmuster spezifische Funktionen auslösen, die eine wichtige Rolle in der Genregulation spielen (Strahl und Allis, 2000).

Durch diese Modifikationen kommt es an der Oberfläche der Nucleosomen zu einer Ladungsänderung. Eine nicht modifizierte Lysin- Seitenkette trägt zum Beispiel eine positive Ladung, während eine Acetylierung mit einer Neutralisierung der Seitenkette einhergeht. Infolge dieser Ladungsänderung tritt eine Abschwächung der elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen DNA und Histonen ein, die Chromatinstruktur wird aufgelockert, so dass der RNA Polymerase II Holoenzym- Komplex binden und die Transkription starten kann (Glass und Rosenfeld, 2000).

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Veränderungen an der Nucleosomenoberfläche infolge von spezifischen Histonmodifikationen eine Art Code darstellen, durch welchen Nucleosomen mit der Umgebung kommunizieren, indem sie die Bindung von Faktoren fördern oder verhindern, mit entsprechenden Konsequenzen für Chromatinstruktur und Genexpression.

## 1.4 Histon- Modifikationen

### 1.4.1 Histon- Methylierung

Bei der Histon- Methylierung handelt es sich um Modifikationen in den Seitenketten der Aminosäuren der flexiblen aminoterminalen Domänen, die durch sogenannte Histon-Methyltransferasen durchgeführt werden. Eine der ersten bekannten Histon-Methyltransferasen (HMTase) wurde bei der Fliege *Drosophila melanogaster* sowie bei Hefen entdeckt.

In den meisten Fällen handelt es sich um Methylierungen in den flexiblen aminoterminalen Domänen des Histons H3 und H4. Dabei werden die Aminosäuren Lysin und Arginin methyliert. Lysin kann mono-, di- und trimethyliert werden, während Arginin mono- und dimethyliert sein kann. Durch diese Vielzahl an Methylierungsmöglichkeiten an Lysin- und Argininresten der aminoterminalen Domänen wird das Angebot an verschiedenen Modifikationsmustern, die spezifische Funktionen in der Gen- Regulation auslösen können, enorm vergrößert. Auch im Vergleich zu anderen Modifikationen zeigen Methylierungen ein größeres Kombinationspotential auf (Santos-Rosa et al., 2002; Grewal und Rice, 2004).

Die Methylierung von Arginin- Resten erfolgt durch **Protein- Arginin- Methyltransferasen (PRMT)**. In Säugetierzellen unterscheidet man 2 verschiedene Typen. Typ I katalysiert die asymmetrische, Typ II die symmetrische Dimethylierung von Arginin. (Santos- Rosa et al., 2005). Einige Forschergruppen konnten zeigen, dass die Methylierung von Arginin ebenso wie die Histon- Acetylierung mit einer Aktivierung der Transkription korreliert (Stallcup et al., 2000; Koh et al., 2002; Daujat et al., 2002).

Des Weiteren spielen Arginin- Methyltransferasen eine wesentliche Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Proliferation und somit auch in der Regulation der Expression von Tumorsuppressor- Genen (Singh et al., 2004; Pal et al., 2004).

Während die Arginin- Methylierung bei einer Vielzahl von Genen eine Aktivierung der Transkription hervorruft, kommt es nach Lysin- Methylierung zu unterschiedlichen Resultaten. Sie kann sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Repression der Transkription führen. Außerdem kann sie an der Ausbildung des Heterochromatins beteiligt sein.

Alle bereits bekannten HMTasen zeichnen sich durch das Vorkommen einer eigenen **SET-Domäne** aus. Der Name steht für eine Gruppe von *Drosophila*- Genen, die Proteine mit einem

gemeinsamen Sequenzmotiv kodieren: Suv, Enhancer- of- Zeste, Trithorax. Zurzeit sind mehr als hundert SET- Domänen- Proteine bekannt. Viele davon sind HMTasen. In spezieller Sequenzumgebung funktioniert die SET- Domäne als aktives Zentrum der Methyltransferase-Reaktion in Lysin- Seitenketten. Andere Abschnitte der HMTasen dienen der Auswahl der Histon-Substrate.

#### **1.4.1.1 Histon- Demethylierung**

Man hat lange Zeit vermutet, dass es sich bei der Methylierung um einen irreversiblen Prozess handelt. Diese Schlussfolgerung beruhte auf der Beobachtung, dass die Halbwertszeiten der Histone gleich der Halbwertszeiten der Methyl- Lysin Reste sind (Bannister, Schneider und Kouzarides, 2002). Vor 2 Jahren hingegen hat man die ersten Lysin- und Arginin- Demethylasen entdeckt.

Wie bereits von Kouzarides und seinen Mitarbeitern vermutet, existieren verschiedene Möglichkeiten der Demethylierung von Histonen. Methyliertes Arginin an den Histonen H3 und H4 wird nicht demethyliert, sondern umgewandelt in Citrullin. Diese Reaktion wird katalysiert durch PAD4 (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Mit Hilfe einer Aminotransferase wird Citrullin anschließend wieder in Arginin umgewandelt.

Methyliertes Lysin am Histon H3 wird durch eine Amino- Oxidase- Reaktion demethyliert. Die erste Lysin Demethylase, LSD1 ist eine FAD- abhängige Amino- Oxidase mit einer Substratspezifität für Lysin K4 am Histon H3 (Shi et al., 2004). LSD1 ist Bestandteil einiger Transkriptionsrepressor- Komplexe (Shi et al., 2003; You et al., 2001).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die bis zum heutigen Zeitpunkt identifizierten Arginin- und Lysin- Demethylasen lediglich nur einige Histon- Methylierungen aufheben, während andere auch nach Veränderung von Genexpressionen am Promotor verbleiben (Kousskoti und Talianidis, 2005).

## 1.4.2 Histon- Phosphorylierung

Die Histon- Phosphorylierung ist eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation von Histonen. Spezielle Proteinkinasen übertragen Phosphatgruppen vorwiegend auf Serin- und Threonin- Seitenketten der Histone H1, H2A und H3. Das wichtigste Substrat der Phosphorylierung ist das Histon H3.

Die Phosphorylierung der aminoterminal gelegenen Aminosäure Serin 10 des Histons H3 resultiert in zwei scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen. Auf der einen Seite ist sie notwendig zur Initiation der Chromosomenkondensation und damit für das Eintreten der Zelle in die Mitose, während sie auf der anderen Seite auch eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der Transkription spielt (Nowak und Corces, 2004). Im Zusammenhang mit der Chromosomenkondensation konnten weitere Phosphorylierungen am Histon H3 (Serin 11, Threonin 28) nachgewiesen werden, so dass man davon ausgeht, dass die Kombination verschiedener Phosphorylierungen am Histon H3 mit dem Eintritt der Zelle in die Mitose einhergeht, während die alleinige Phosphorylierung von Serin 10 zur Aktivierung der Transkription führt.

Auffällig ist auch die massive Phosphorylierung von Threonin- und Serin- Resten des Histons H1 während der DNA- Replikation und Mitose.

Die Phosphorylierung der Histone kann durch sogenannte Phosphatasen wieder aufgehoben werden.



### 1.4.3 Histon- Acetylierung

Bereits vor mehr als 30 Jahren wurden Acetylierungen an Histonen in Verbindung mit transkriptionell aktivem Chromatin gefunden (Allfrey, Faulkner und Mirsky, 1964). Die erste **Histon- Acetyltransferase (HAT)** wurde hingegen erst 1995 in *Tetrahymena thermophila* entdeckt (Brownell und Allis, 1995). Durch den Nachweis der Homologie zu dem bereits früher charakterisierten Transkriptionscofaktor Gcn5 in Hefen konnte die Verbindung zwischen Histon- Acetylierung und Aktivierung der Transkription hergestellt werden (Brownell et al., 1996).

Histon- Acetyltransferasen (HAT) katalysieren die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl- CoA auf die  $\epsilon$ - Aminogruppe von Lysinen in den flexiblen aminoterminalen Domänen von Histonen. Die Acetylierung kann an allen vier Histonen (H2A, H2B, H3, H4) erfolgen, wobei am häufigsten aber die N- terminal gelegenen Lysinreste der Histone H3 und H4 modifiziert werden. Außerdem können auch Nicht- Histon- Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren (s. Kapitel 1.4.4.) oder Strukturproteine der Zelle acetyliert werden.

Durch diese Modifikationen kommt es an der Oberfläche der Nucleosomen zu einer Ladungsänderung. Eine nicht acetylierte Lysin- Seitenkette trägt eine positive Ladung, während eine Acetylierung mit einer Neutralisierung der Seitenkette einhergeht. Infolge dieser Ladungsänderung tritt eine Abschwächung der elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen DNA und Histonen ein, die Chromatinstruktur wird aufgelockert, so dass der RNA Polymerase II Holoenzym- Komplex binden und die Transkription starten kann.

Aufgrund ihrer Übereinstimmung in den Sequenzen können Histon- Acetyltransferasen in verschiedene Familien unterteilt werden (Marmorstein und Roth, 2001). Zu der p300/CBP Familie gehören zahlreiche, bereits gut charakterisierte HATs, die als vielfältige Transkriptionsregulatoren fungieren. Neben einer aus 500 Aminosäuren bestehenden HAT- Domäne verfügen sie, wie viele andere HATs, über eine sogenannte **Bromodomäne**. Hierbei handelt es sich um eine etwa 100- Aminosäure große hydrophobe Domäne aus einem Bündel von vier  $\alpha$ - Helices, die der Erkennung und Bindung von Acetyl- Lysin- Resten dient (Strahl und Allis, 2000). Dies hat zur Konsequenz, dass ein einmal an einen Transkriptionsfaktor gebundener HAT- Komplex eine andere HAT, und diese dann weitere HATs rekrutieren kann, wodurch sich die Modifikation durch Histon- Acetylierung über einen großen Chromatin- Abschnitt ausbreiten kann. Die Bromodomäne ist auch in anderen zahlreichen Enzymen, die an Strukturveränderungen des Chromatins beteiligt sind, zu finden.

Die meisten HATs sind Bestandteil großer Proteinkomplexe, die aus zahlreichen Untereinheiten bestehen. Zu diesen Untereinheiten gehören u.a. eine DNA- Bindungsdomäne zur Erkennung der spezifischen Targetsequenz sowie Untereinheiten, die zu Veränderungen des Chromatins führen. Aufgrund ihrer Substratspezifität sind häufig verschiedene HATs in einem Proteinkomplex vorhanden. Diese sind zum einen notwendig, um eine ausreichende Acetylierung (quantitative Effekte) über einen bestimmten Bereich des Chromatins zu erreichen, zum anderen spielt aber auch die Acetylierung spezifischer Positionen (qualitative Effekte) bei der Regulation der Transkription eine wesentliche Rolle.

Die Spezifität der HAT- Komplexe wird häufig auch durch Kombinationen mit anderen Modifikationen (Methylierung, Phosphorylierung) bestimmt. Zum Beispiel begünstigt eine Phosphatgruppe am Serin 10 in Histon H3 die Bindung einer Gcn5- verwandten HAT und die Acetylierung des Lysins 14 (K14). Auf der anderen Seite verhindert eine Phosphatgruppe am Serin 10 die Methylierung von Lysin 9. Dies ist von erheblichem Interesse, denn Lysin 9 (K9) kann sowohl methyliert als auch acetyliert werden, wobei eine K9- Methylierung das Kennzeichen von inaktivem, dicht gepacktem Chromatin ist (Nowak und Corces, 2004; Lo et al., 2001).

Die Acetylierung spielt ebenfalls eine zentrale Rolle bei der DNA- Replikation. Während der S- Phase des Zellzyklus kommt es zu einer vorübergehenden Acetylierung der Histone. Diese erfolgt zum Zeitpunkt der Bildung der Histonoktamere, noch bevor sich diese zu den Nucleosomen zusammenschließen. Kurze Zeit später werden die Acetylgruppen wieder abgespalten. Es konnte gezeigt werden, dass bei Ausbleiben der Acetylierung der Histone H3 und H4 während der Replikation die Lebensfähigkeit von Hefen deutlich vermindert ist.

### 1.4.3.1 Histon- Deacetylierung

Bei der Histon- Acetylierung handelt es sich wie bei der Methylierung um einen reversiblen Vorgang, der durch sogenannte **Histon- Deacetylasen (HDAC)** katalysiert wird. Infolge einer Deacetylierung kommt es durch Zunahme der elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen Nucleosomen und DNA zu einer Umwandlung des aktiven Euchromatins in das dicht gepackte, inaktive Heterochromatin. Damit ist die um Histone gewundene DNA für Transkriptionsfaktoren nicht mehr zugänglich.

Man unterscheidet drei große Familien von humanen HDACs (class I, class II, class III) (s. Tab.1.1.). Die Einteilung beruht auf ihrer Sequenz-Homologie zu den Hefen- HDACs Rpd3, Hda1 und Sir2/Hst (de Ruijter et al., 2003; Thiagalingam et al., 2003).

Bei den **Klasse I HDACs** handelt es sich um Kernproteine, die in zahlreichen Geweben exprimiert werden. Sie gleichen sich sehr in ihren Strukturmerkmalen und enthalten ein Zinkmolekül im aktiven Zentrum, welches eine wichtige Rolle in der Inhibition der Deacetylase- Aktivität und damit in der Entwicklung von Chemotherapeutika spielt.

Die **Klasse II HDACs** bilden im Vergleich zu den Klasse I Deacetylasen größere Proteinkomplexe und pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her. Sie verfügen ebenfalls über ein Zinkmolekül im aktiven Zentrum, sind aber weniger gut in den verschiedenen Gewebetypen verteilt.

Die Mitglieder der **Klasse III HDACs** zeigen sowohl strukturell als auch bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften große Unterschiede. Sie wurden ursprünglich als Protein Sir 2 in Hefezellen entdeckt, in denen dieses für die Repression der Paarungstyp-Gene verantwortlich ist (SIR, silent information regulator). In Säugetier- Zellen unterscheidet man 7 verschiedene Typen von Klasse III HDACs. Ihre Enzymaktivität ist von dem Cofaktor  $\text{NAD}^+$  abhängig. Dieser zerfällt während der Histon- Deacetylierung in O- acetyl-ADP- ribose und Nicotinamid (NAM) (Blander und Guarente, 2004). Zielproteine dieser Klasse III HDACs sind Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53 oder NF-  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) (Blander und Guarente, 2004).

Die Aktivität der Klasse I und II HDACs kann durch Trichostatin (TSA) und Natriumbutyrat gehemmt werden. Klasse III HDACs hingegen sind sensibel auf Nicotinamid, ein wie bereits erwähnt physiologisches Produkt einer Deacetylierung durch Klasse III HDACs.

Ähnlich den Histon- Acetyltransferasen (HATs) sind auch die HDACs ein Bestandteil von großen Proteinkomplexen, in denen sie die Funktion eines Transkriptions- corepressors innehaben. Aufgrund dieser Funktion spielen HDACs eine wichtige Rolle in der

Tumorentstehung. Infolge einer abnormalen Erhöhung der HDAC- Aktivität kommt es zu einer transkriptionellen Inaktivierung von verschiedenen Tumorsuppressorgenen wie z.B. dem p53- Gen. Es konnte gezeigt werden, dass die HDACs 4,8 und 9 wesentlich stärker in Tumorgewebe als in normalem Gewebe exprimiert werden (de Ruijter AJ et al, 2003).

Auf der anderen Seite benötigt aber der Tumorsuppressor Rb die Aktivität der Klasse I HDACs, um seine eigentliche Funktion auszuüben. Mutationen in dieser Familie von Deacetylasen können folglich zur Entartung von Geweben beitragen.

	Klasse I	Klasse II	Klasse III
Hefen	Rpd3	Hda1	Sir2
		HOS1	
		HOS2	
		HOS3	
Mensch	Rpd3	HDAC4	SIRT1
	HDAC1	HDAC5	SIRT2
	HDAC2	HDAC6	SIRT3
	HDAC3	HDAC7	SIRT4
	HDAC8	HDAC9	SIRT5
		HDAC 10	SIRT6
			SIRT7

**Tabelle 1.1: Klassifikation der HDACs beim Mensch und in Hefen**

### **1.4.3.2. Inhibitoren der Histon- Deacetylasen (HDACs)**

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene maligne Tumoren infolge von Mutationen und chromosomalen Translokationen eine Überexpression von HDACs aufweisen. Aus dieser abnormalen Erhöhung der HDAC- Aktivität resultiert eine Repression der Transkription, die ausschlaggebend war für die Entwicklung von HDAC- Inhibitoren, einer neuen Gruppe von Anti- Tumor- Therapeutika. Man unterscheidet 6 strukturell unterschiedliche Klassen von HDAC- Inhibitoren, die in Säugetierzellen in der Lage sind, viele der bekannten HDACs zu inhibieren (La Thangue, 2004). In ersten klinischen Studien konnte eine gute Verträglichkeit sowie Wirksamkeit gegenüber einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen werden. HDAC- Inhibitoren eignen sich v.a. in Kombination mit Chemotherapeutika sowie Bestrahlungen zur Reduktion unkontrollierter Zellproliferation (La Thangue, 2004).

### **1.4.3.3. Posttranslationale Acetylierung von Nicht- Histon- Proteinen**

Neben der Acetylierung von Histonen kommt es im Rahmen der Regulation der Genexpression auch zur Acetylierung von sogenannten Nicht- Histon- Proteinen. Zu diesen gehören die DNA- bindungsspezifischen Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53, ELKF, TCF, NFκB, MyoD, GATA1, HMGI(Y), E2F1, HNF4; Transkriptions- Co- Regulatoren wie ATCR, β- Catenin, c-Myc, RB sowie generelle Transkriptionsfaktoren wie z.B. TFIIE, TFIIF und TFIIB (Santos- Rosa et al., 2005). Eine Acetylierung von Transkriptionsfaktoren in der Nähe ihrer spezifischen DNA- Bindungsdomäne resultiert in einem Anstieg ihrer relativen DNA- Bindungsaffinität (Gu und Roeder, 1997; Sartorelli et al., 1999; Martinez-Balbas et al., 2000).

Ein wesentlicher Faktor in der Entwicklung von malignen Tumoren ist die Acetylierung sowohl von humanen (c- Myc) als auch viralen Onkoproteinen (Adenovirus E1A) (Zhang et al., 2000; Patel et al., 2004). Eine Acetylierung von c-Myc durch die Acetyltransferasen hGCN5/PCAF und TIP60 führt zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinstabilität (Patel et al., 2004).

Außerdem spielt die Acetylierung von Non- Histon- Proteinen eine wesentliche Rolle bei Protein- Protein- Interaktionen (Dhalluin et al., 1999) sowie beim Transport von Proteinen in den Zellkern (Bannister et al., 2000).m Rahmen der Regulation der Transkription können

Non- Histon- Proteine auch methyliert (z.B. p53, s. Kap. 1.5.1.), ubiquitiniert sowie durch SUMO-1 (z.B. p53, HDAC1, c-Myc) modifiziert werden (Chuikov et al., 2004; Gill, 2004).

## 1.5. Der Tumorsuppressor p53

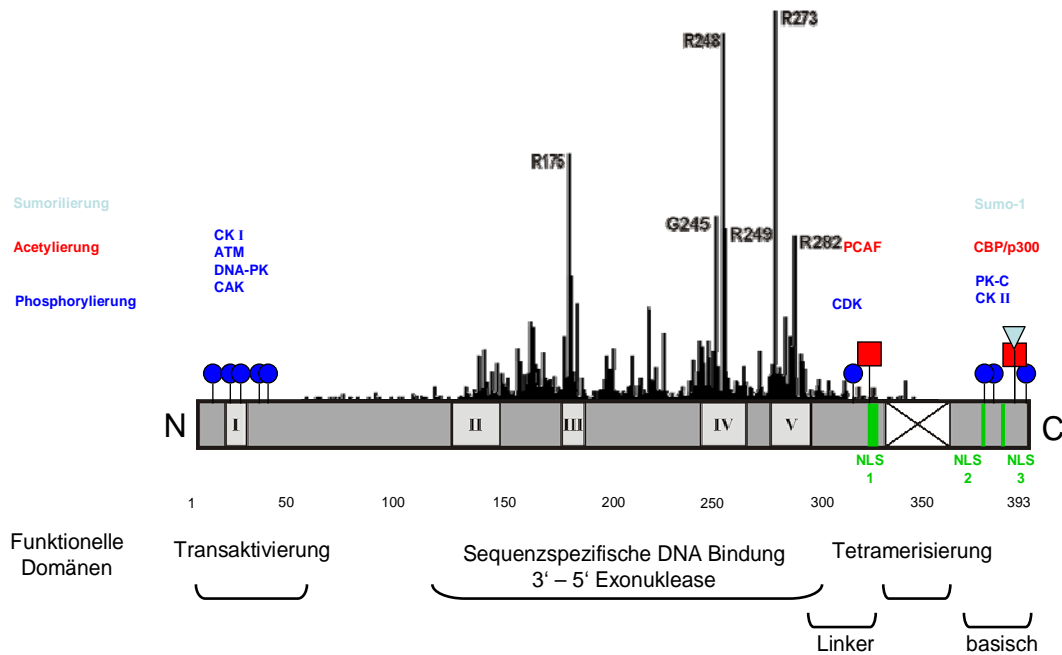
Der Tumorsuppressor p53 wurde erstmals im Jahre 1979 beschrieben (Lane und Crawford, 1979; Linzer, Maltzman und Levine, 1979). Das p53- Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa. Es besteht aus 393 Aminosäureresten und gliedert sich in eine Transaktivierungs-, sequenzspezifische DNA- Bindungs- sowie Tetramerisierungsdomäne (s. Abb.1.2.). Außerdem kann es in fünf evolutionär hochkonservierte Domänen unterteilt werden, die von zentraler Bedeutung für die Aktivität von p53 sind (Soussi, Caron de Fromental und May, 1990).

Mehr als die Hälfte aller Tumoren weisen Mutationen im p53- Gen auf (Hollstein et al., 1991). Infolge dieser Mutationen kann es sowohl zu einem Funktionsverlust („loss of function“) für Wildtyp- p53 als auch zu einem Funktionszugewinn („gain of function“) kommen, indem die Expression eines veränderten Proteins mit neuer, onkogener Eigenschaft resultiert (Roemer, 1999).

In den restlichen Tumoren, in denen Wildtyp- p53 erhalten ist, werden häufig Mutationen der Signalwege gefunden, die zum indirekten Ausfall des Proteins führen (Hollstein, 1991; Levine, Momand, und Finlay, 1991). Somit kann man wahrscheinlich davon ausgehen, dass kein Tumor existiert, der über einen vollständig intakten p53- Pfad verfügt.

Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen p53 resultieren in einem bereits frühzeitigen Wachstum multipler Tumoren. Man bezeichnet diese Erkrankung als Li- Fraumeni Syndrom (Malkin und Friend, 1993; Srivastava et al., 1990).

Ein weiterer Hinweis für die bedeutende Rolle von p53 als Tumorsuppressor ist das Auftreten spontaner Tumoren bei p53- negativen Mäusen.



**Abb.1.2: Das Tumorsuppressor- Gen p53:**

Die mit römischen Ziffern gekennzeichneten Boxen repräsentieren die fünf evolutionär hochkonservierten Domänen. Die mit einem Kreuz markierte Box stellt die Oligomerisierungsdomäne dar. Die Kernlokalisierungssignale („nuclear localization signal“, NLS) sind als grüne Balken eingezeichnet (NLS1: AS 316-325; NLS2: AS 369-375; NLS3: AS 379-384). Die vertikalen Linien repräsentieren die Häufigkeit des Auftretens von Mutationen und sogenannter „hot spot mutations“ (AS R175, G245, R249, R273, R282), die in humanen Tumoren identifiziert wurden (Hollstein et al., 1991). Die viereckigen, runden und dreieckigen Symbole zeigen die Phosphorylierungs- (CK I Ser-4, Ser-6, Ser-9, ATM Ser-15; DNA-PK Ser- 15, Ser-37; CAK Ser- 33; CDK Ser-315; PK-C Ser-371, Ser-376, Ser- 378; CK II Ser- 392), Acetylierungs- (PCAF Lys-320; CBP/p300 Lys-382) und Sumorylierungstellen (Sumo-1 Lys-386). Unter dem Schema sind die funktionellen Domänen von p53 dargestellt.

### 1.5.1. Posttranslationale Modifikationen von p53

p53 kann auf verschiedene Weise posttranslational modifiziert werden. Dies erfolgt zum einen durch **Phosphorylierungen** der Aminosäuren Serin und Threonin in den Domänen am N- und C- Terminus des Proteins. Von zentraler Bedeutung für die Erhöhung der sequenzspezifischen DNA- Bindungsfähigkeit ist die Phosphorylierung von Serin 15 und 37 durch DNA- PK (DNA- dependant protein kinase) bzw. Serin 15 durch ATM (ataxia teleangiectasia mutated), jeweils am N- Terminus von p53. Infolge dieser Phosphorylierungen kommt es auch zu einer verstärkten Transaktivierung von p53- regulierten Genen (Banin et al., 1998; Nakagawa et al., 1999).

Eine negative Regulierung der sequenzspezifischen DNA- Bindung von p53 erfolgt *in vitro* durch Phosphorylierung des Carboxy- Terminus. Diese Phosphorylierung erfolgt über Cyclin- abhängige Kinasen (CDKs) der S- und G2/M- Phase des Zellzyklus.

Ein neuer Mechanismus der posttranslationalen Modifikation des Tumorsuppressors p53 ist die **Methylierung** eines Lysinrestes am Carboxy- Terminus durch die Methyltransferase SET 9/7. Aus dieser Art der Modifikation resultiert die Konstanthaltung der Halbwertszeit von p53 und dem Verbleiben des Proteins im Zellkern (Chuikov et al., 2004).

Bei der **Sumoylierung** tritt eine Verbindung zwischen der Aminosäure Lysin 386 und dem Ubiquitin- verwandten Protein SUMO-1 ein, was ebenso wie die bereits oben erwähnten Phosphorylierungen zu einer verstärkten Aktivierung der Transkription durch p53 führt. Außerdem fördert diese Interaktion die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors mit anderen zellulären Faktoren zu interagieren.

Der Tumorsuppressor p53 gehört auch zur Gruppe der Nicht- Histon- Proteine, die durch Histon- Acetyltransferasen (HATs) acetyliert werden können (Gu, W. und Roeder, R.G., 1997; Sakaguchi, K. et al., 1998). Die **Acetylierung** erfolgt an zahlreichen Lysinresten am C- Terminus von p53 durch die Acetyltransferase p300/CBP (Liu. et al., 1999; Gu, W. und Roeder, R.G., 1997; Sakaguchi et al., 1998). Diese Art der posttranslationalen Modifikation beeinflusst sowohl die DNA- Bindungsaffinität (Liu et al., 1999), die Proteinstabilität (Ito et al., 2001; Ito et al., 2002) als auch die subzelluläre Lokalisation von p53 (Nakamura, Roth, und Mukhopadhyay, 2000; Pearson et al., 2000).

Durch Untersuchungen von Espinosa und Emerson (Espinosa und Emerson, 2001) konnte hingegen gezeigt werden, dass die Acetylierung von p53 durch die HAT p300 keine erkennbaren Effekte auf die Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an den endogenen p21- Promotor hat. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass durch



die Acetylierung von p53 die Bindung von weiteren Co- Aktivatoren (CBP und TRRAP) an den p21- Promotor gefördert wird. Infolgedessen kommt es zu einer verstärkten Acetylierung der Histone H3 und H4 am p21- Promotor (Barlev et al., 2001) und somit zur Aktivierung der Transkription des p21- Gens. Demzufolge spielt die Acetylierung von p53 dennoch eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung seiner Zielgene.

Weiterhin führt die Acetylierung von p53 zu einer erhöhten Stabilität des Proteins. Die Acetylierung an den Lysinresten von p53 verhindert eine Ubiquitinierung und damit eine sich anschließende Degradation des Proteins. Durch Deacetylierung werden die Lysinreste für eine Ubiquitinierung durch die E3 Ubiquitin Ligase zugänglich.

Die Acetylierung des Transkriptionsfaktors p53 kann durch die Histondeacetylase HDAC1 und SIRT1, ein Klasse III HDAC sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wieder aufgehoben werden (Juan et al., 2000; Luo et al., 2001; Luo et al., 2000; Vaziri et al.; 2001).

### **1.5.2. Kontrolle zellulärer Funktionen durch p53**

p53 liegt als multifunktionelles nukleäres Protein in ungestressten Zellen inaktiv und in sehr geringen Konzentrationen vor. Man ordnet ihm eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Aufrechterhaltung der Zellfunktion und des Zellzyklus zu.

p53 wird durch zahlreiche genotoxische Stressfaktoren wie z.B. Hypoxie, Bestrahlung, Aktivierung von Onkogenen, Hitzeschock sowie Applikation von Zytostatika (Vogelstein, Lane und Levine, 2000; Vousden, 2002) aktiviert. Diese Aktivierung äußert sich in einem raschen Anstieg der p53- Konzentration in der Zelle und in der Induktion von p53 als Transkriptionsfaktor.

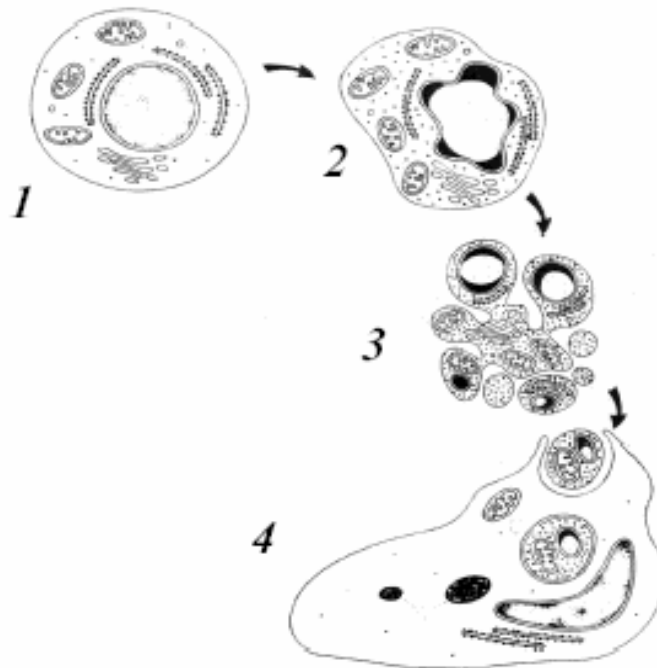
p53 fungiert zum einen als Transkriptionsaktivator von Genen, die eine p53- Bindungsstelle in ihren regulatorischen Sequenzen aufweisen. Dazu zählen u.a. das p21<sup>WAF1/CIP1</sup>- Gen, dessen Produkt ein Inhibitor Cyclin- abhängiger Kinasen ist (el-Deiry et al., 1993) sowie das Bax- Gen, das als proapoptotischer Faktor eine wichtige Rolle bei der Apoptose spielt (Miyashita und Reed, 1995).

Zum anderen besitzt der Tumorsuppressor p53 auch die Fähigkeit, Gene zu reprimieren. Zu diesen Genen gehören das Retinoblastoma- Tumorsuppressorgen (Rb), das an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist (Donehower und Bradley, 1993), sowie das Bcl-2-

Gen (Miyashita et al., 1994), dessen Genprodukt als Gegenspieler von Bax die Apoptose negativ reguliert.

Abhängig vom Zelltyp, der Zellumgebung und dem Grad der Zellschädigung kommt es nach p53- Aktivierung entweder zum Zellzyklusarrest oder zum programmierten Zelltod (Apoptose) mit dem Ziel, das Genom vor einer Anhäufung von Mutationen zu schützen.

Die Apoptose ist essentiell für multizelluläre Organismen und charakterisiert durch die Aktivierung einer Familie von Zelltod- Proteasen (= Caspasen), die durch Proteolyse die Funktionen von wichtigen Regulatorproteinen ausschalten und die Zelle somit veranlassen, den Zelltod einzuleiten (Martin und Green, 1995). Der programmierte Zelltod wird geprägt durch morphologische Veränderungen der Zelle, die vor allem den Zellkern betreffen (s. Abb.1.3.). Typisch sind die Chromatinkondensations, die Fragmentierung der DNA, die cytoplasmatische Bläschenbildung und das Schrumpfen der Zelle (Wyllie, Kerr, und Currie, 1980; Enari et al., 1998).



**Abb.1.3: Strukturelle Veränderungen einer Zelle während der Apoptose:** Nach dem Schrumpfen der Zelle (1) kondensieren Zytoplasma und Chromatin (2). Nun wird der Zellkern fragmentiert und es kommt zur Abschnürung von Vesikeln an der Zytosolmembran (3). Diese sog. "apoptotic bodies" können dann von Phagozyten beseitigt werden (4) (nach Kerr et al., 1994).

Bezüglich der Frage, warum p53 in einigen Fällen einen Zellzyklusarrest und in anderen Apoptose induziert, entwickelten sich im Laufe der Zeit verschiedene Hypothesen. Die am weitesten verbreitete Hypothese besagt, dass das p53-Protein unter Stress durch posttranslationale Modifikation stabilisiert wird und infolgedessen eine allosterische Veränderung erfährt. Dadurch erlangt p53 die Fähigkeit mit relativ hoher Affinität an Promotoren der zellzyklusregulierenden Gene und mit relativ niedriger Affinität an Promotoren der apoptoseinduzierenden Gene zu binden (Hupp und Lane, 1994; Ludwig et al., 1996; Chen et al., 1996). Untersuchungen von Espinosa und Emerson (2001) stellen hingegen dieses Modell der allosterischen Regulation in Frage. Es konnte gezeigt werden, dass p53 bereits ohne Stresseinwirkung auf die Zellen an einigen seiner Zielgene gebunden vorliegt, ohne diese zu transaktivieren (Kaeser und Iggo, 2002). Dies lässt vermuten, dass an der p53-vermittelten Transkription inhibitorische Regulationsmechanismen beteiligt sein müssen.

Man geht heutzutage davon aus, dass die Genexpression größtenteils durch Anlagerung oder Abspaltung von Acetyl-, Methyl- und Phosphatgruppen an den aminoterminalen Domänen der Histone reguliert wird (Strahl und Allis, 2000) (s. Kap. 1.3.). Ein wesentlicher Aspekt scheint die Auflockerung der Chromatinstruktur durch Acetylierung von Lysinresten mittels Histonacetyltransferasen (HATs) zu sein (Glass und Rosenfeld, 2000). Der Transkriptionsaktivator p53 ist in der Lage die HATs p300/CBP und p/CAF zu binden und somit eine Acetylierung der an die Zielpromotoren angrenzenden Histone zu gewährleisten (Gu und Roeder, 1997, Espinosa und Emerson, 2001; Liu, Xia, und Chen, 2003; Espinosa, Verdun und Emerson, 2003). Andererseits vermag p53 auch mit Histon-de-acetylierenden Enzymen (HDACs, s. Kap. 1.4.3.1.) zu interagieren und damit die aktivierende Acetylgruppe von den Histonen wieder abzuspalten (Murphy et al., 1999). Somit kann p53 auch eine wesentliche Rolle bei der Repression der Transkription zugeordnet werden.

Ein weiterer, relativ neuer Faktor der negativen transkriptionellen Regulation sind die INHATs (inhibitor of acetyltransferase). Im Gegensatz zu den HDACs, die lediglich zu einer Umkehrung der HAT-vermittelten Acetylierung führen, wirken INHATs durch direkte Inhibition der Acetylierung, indem sie ebenfalls an die aminoterminalen Domänen der Histone binden. Es konnte gezeigt werden, dass der Tumorsuppressor p53 als ein Interaktionspartner des erst kürzlich entdeckten INHATs NIR fungiert (Hublitz et al., 2005) (s. Kap. 1.6).

## 1.6. INHATs (Inhibitor of Acetyltransferase)

Wie bereits in Kapitel 1.4.3. erwähnt, nimmt die Acetylierung von Histonen eine zentrale Rolle im Chromatin Remodeling und folglich in der Regulation der Genexpression ein. Die HAT- Aktivität verschiedener Transkriptions- coaktivatoren kann durch zelluläre und virale Regulatorproteine sowie durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden (Chakravarti et al., 1999; Hamamori et al., 1999; Creaven et al., 1999; Weissman et al., 1998; Ait-Si-Ali et al., 1998; Barlev et al., 1998; Kawasaki et al., 2000). Ein potentieller Mechanismus, der zu einer Blockade der Histon- Acetylierung führen kann, ist zum einen die direkte Bindung der Regulatorproteine an Histon- Acetyltransferasen mit anschließender Inhibition dieser Enzyme. Zum anderen besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Regulatorproteine an die Histone binden und somit den Zugang für die HATs zu den aminoterminalen Domänen der Histone verschließen. Dieser Vorgang wird als „**histon masking**“ bezeichnet.

Im Jahre 2001 entdeckte Seo zusammen mit seinen Mitarbeitern einen neuen Zellkomplex mit dem Namen INHAT (**in**hibitor of **ac**etyltransferase), der die Fähigkeit besitzt, die HAT- Aktivität von p300/CBP und PCAF durch direkte Bindung ihrer Histone zu inhibieren. Der Komplex gliedert sich in zahlreiche Untereinheiten, zu denen das mit der myeloischen Leukämie assoziierte Onkoprotein Set/TAF-I $\beta$  (Suv, Enhancer of Zeste, Trithorax / template activating factor I $\beta$ ), das TAF- I $\alpha$  sowie das Phosphoprotein pp32 gehört (von Lindern et al., 1992; Adachi, Pavlakis und Copeland, 1994; Nagata et al., 1995; Chen et al., 1996). Es handelt sich jeweils um Kernproteine, die vorwiegend die Acetylierung der Histone H3 und H4 inhibieren. Die Acetylierung von Lysin 8 des Histons H4 spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der Transkription (Strahl und Allis, 2000). Die Inhibitionsstellen von TAF- I $\alpha$ , Set/TAF-I $\beta$  sowie pp32 an den Histonen sind abhängig davon, ob diese als freie Proteine bzw. als Untereinheit des INHAT Komplexes vorliegen (Seo et al., 2002).

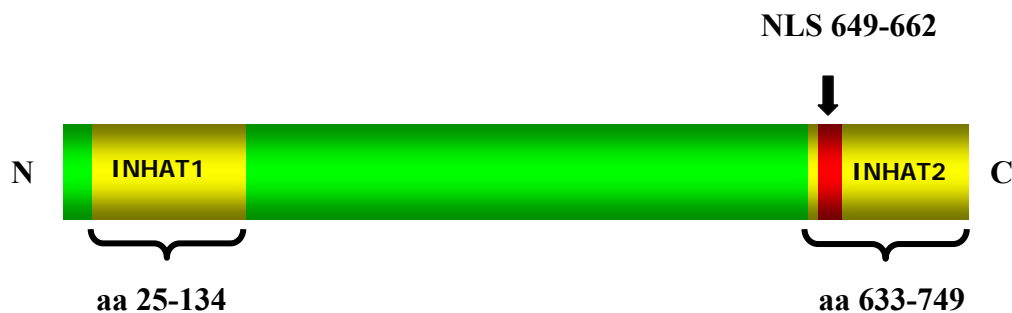
Set/ TAF-I $\beta$  und pp32 binden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* präferentiell an nicht bzw. unteracetylierte Histone (Kutney et al., 2004). Ihre Bindungsaffinität ist abhängig vom Ausmaß der Histon- Acetylierung. Unterstützend zu ihrer „histon masking“- Aktivität, assoziieren SET/TAF-I $\beta$  und pp32 mit Klasse I und/oder II (nicht aber mit Klasse III) HDACs (Kutney et al., 2004). Es ist vorstellbar, dass mit Hilfe dieser HDAC- Aktivität initial eine Deacetylierung von hyperacetylierten Histonen und somit ein inaktiver Zustand des Chromatins geschaffen wird. Dieser reprimierte Zustand wird weiterhin durch die direkte

Repression der INHAT- Untereinheiten SET/ TAF-I $\beta$  und pp32 („histon masking“) fortgesetzt.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass der INHAT- Komplex mit seinen Untereinheiten TAF-I $\alpha$ , Set/TAF-I $\beta$  und pp32 durch konzentrierte Deacetylierung und HAT- Inhibition eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung einer basalen / reprimierten Chromatinstruktur spielt.

## 1.7. NIR, ein neuer INHAT Repressor

Mittels Datenbank- Suche für Proteine mit putativen INHAT- Domänen gelang im Jahre 2005 Hublitz und seinen Kollegen die Identifizierung und Charakterisierung des neuen p53- interagierenden INHAT- Repressors NIR (*Novel INHAT Repressor*). Die humane cDNA kodiert für 749 Aminosäurereste (s. Abb. 1.4.). Das NIR- Protein gliedert sich in einen zentralen Teil sowie in zwei unabhängig voneinander agierende, C- und N-terminal gelegene INHAT- Domänen.



**Abb.1.4: Der INHAT Repressor NIR (*Novel INHAT Repressor*):**

Das *NIR* Gen kodiert für ein Protein bestehend aus 749 Aminosäureresten. Das NIR Protein gliedert sich in einen zentralen Teil sowie zwei unabhängig voneinander agierende, C- und N- terminal gelegene INHAT- Domänen.

NIR- Orthologe fanden sich in allen untersuchten Organismen von den Würmern bis zu den Säugetieren. Mit Hilfe von RT- PCRs und mRNA dot blot Analysen konnte gezeigt werden, dass NIR sowohl in allen Stadien der Mausembryogenese als auch in allen untersuchten humanen Geweben und Mausgeweben exprimiert wird, wenn auch in unterschiedlicher Menge. Folglich wird NIR ubiquitär exprimiert.

Das NIR- Protein vermag über seine beiden INHAT- Domänen mit Kernhistonen aus Kalbsthymus sowie mit Nukleosomen aus HeLa- Zellen zu interagieren. Außerdem können beide INHAT- Domänen an die unmodifizierten N- terminalen Aminosäurereste 1-30 des Histons H3 binden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen an anderen INHATs (Schneider et al., 2004; Kutney et al., 2004) hemmt die Acetylierung der H3- Lysine 9, 14, 18 und 23 die Bindung der INHAT- Domänen. Im weiteren konnte mit Hilfe eines Acetylierungsassays gezeigt werden, dass beide INHAT- Domänen die Acetylierung von Kernhistonen durch die enzymatisch aktive Domäne von p300 sowie durch p/CAF inhibieren können. Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so kann NIR als neuer, funktioneller Repressor mit zwei unabhängigen INHAT- Domänen angesehen werden.

In transienten Transfektionsassays konnte unter Verwendung des Fusionsproteins Gal - NIR gezeigt werden, dass NIR abhängig von der Dosis in der Lage ist, verschiedene Gal4- abhängige Promotoren zu reprimieren. In vergleichbaren Experimenten vermochte NIR auch die Aktivator- getriebene Transkription zu unterdrücken. Die Repression sowohl der basalen als auch aktivierten Transkription erfolgte sowohl Promotor- als auch Zelltyp- unabhängig. Chemische Inhibitoren aller drei Klassen von HDACs (Trichostatin A, Natriumbutyrat, Nicotinamid) zeigten keinerlei Einfluss auf die NIR- vermittelte Repression, sodass NIR im Gegensatz zu den bekannten INHATs HDAC- unabhängig ist.

Um Hinweise auf die biologische Funktion von NIR zu erhalten, wurden mittels Tandem- Affinitätsreinigung NIR- assoziierte Proteine aus humanen 293- Zellen isoliert und diese über eine MALDI- TOF/ TOF- spektrometrische Analyse identifiziert. Unter den insgesamt etwa 20 assoziierten Proteinen befand sich auch der Tumorsuppressor p53. Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie konnte gezeigt werden, dass NIR ebenso wie p53 im Zellkern lokalisiert ist.

GST- pulldown- Experimente erbrachten schließlich den Bindungsnachweis von NIR mit dem Transkriptionsfaktor p53. NIR bindet sowohl an die zentrale DNA- Bindungsdomäne (aa 102- 292) als auch an die C- terminal gelegene Tetramerisierungsdomäne (aa 293- 359) von p53, während p53 an die zentrale Domäne (aa 147-609) von NIR bindet.

In weiteren Versuchen wurde die Bedeutung des neuen INHATs für p53 regulierte Gene, wie z.B. p21, Noxa und PIG3, untersucht. Dabei zeigte sich NIR in verschiedenen p53-defizienten Tumorzelllinien als potenter Repressor der Aktivierung von exogenen und endogenen p53- regulierten Genen. Die Aktivierung erfolgte durch co- transfiziertes, exogenes p53. Die Repression war abhängig von der NIR- Dosis und der Anwesenheit von p53.

Eine Überexpression von NIR in mit Doxorubicin behandelten HCT116 p53<sup>+/+</sup> Zellen führte ebenfalls zu einer Inhibition verschiedener p53- regulierter Gene.

Mittels Chromatinimmunpräzitations- (ChIP)-Assays konnte gezeigt werden, dass p53 NIR an den p21- Promotor rekrutieren kann. Auch nach Doxorubicin- Behandlung verblieb NIR überraschenderweise mit dem p21- Promotor verbunden.

Ein Knockdown von NIR durch RNA- Interferenz in HCT116 p53<sup>+/+</sup> Zellen führte zu einer gesteigerten Expression des p21 Gens. Dieser Anstieg konnte in p53- negativen HCT116 Zellen nicht verzeichnet werden, so dass man davon ausgehen kann, dass die gesteigerte Expression von p21 p53- abhängig ist. Die Expression der p53- regulierten Gene Bax, Noxa und PIG3 verzeichnete keinen Anstieg.

Chromatinimmunpräzitations- (ChIP)- Assays zeigten eine signifikante Erhöhung der Acetylierung der Histone H3 und H4 nach NIR knockdown in HCT116 p53<sup>+/+</sup> Zellen. In HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen kam es zu keinen Veränderungen bezüglich der Acetylierung.

Untersuchungen, ob NIR auch einen Einfluss auf die p53- abhängige Apoptose hat, wurden mit Hilfe der FACS- Analyse durchgeführt. Dabei konnte in HCT116 p53<sup>+/+</sup> Zellen nach NIR knockdown ein deutlicher Anstieg der Apoptose, vornehmlich am dritten Tag nach Transfektion der NIR siRNA, festgestellt werden. In p53- negativen HCT116 Zellen konnte die Apoptoserate nicht wesentlich beeinflusst werden, was zu der Schlussfolgerung führte, dass die durch NIR knockdown induzierte Apoptose von p53 abhängig ist.

Hublitz und seinen Mitarbeitern gelang somit die Identifikation eines primär kernständigen und ubiquitär exprimierten, HDAC- unabhängigen Inhibitors von Acetyltransferasen (INHAT), der fähig ist, an Histone sowie an den Tumorsuppressor p53 zu binden und bei der Regulation der p53- vermittelten Transkription eine wesentliche Rolle spielt.

## 1.8. p53- regulierte Gene

### 1.8.1. survivin, ein bifunktioneller Inhibitor von apoptotischen Proteinen

survivin gehört zur Familie der „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP). Beim Menschen umfasst die Familie acht Mitglieder von hoch konservierten Zelltod- Inhibitoren: NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP, Ts-XIAP, ML-IAP, apollon und survivin. IAPs wurden erstmals in Baculoviren entdeckt (Birnbaum, Clem und Miller, 1994). Charakteristisch für diese Gruppe von Proteinen ist das Vorhandensein einer oder mehrerer BIR- (baculoviral IAP repeat) Domänen sowie die Fähigkeit zur Inhibition der Apoptose (Deveraux und Reed, 1999). Survivin besitzt nur eine N- terminal gelegene BIR- Domäne sowie eine C- terminal gelegene  $\alpha$ - Helices Region (Verdecia et al., 2000). Die BIR- Domäne spielt eine wesentliche Rolle bei der Bindung und Inhibition von Caspasen, während die C- terminal gelegenen  $\alpha$ - Helices für die Bindung an die Mikrotubuli des Spindelapparates bei der Zellteilung von Bedeutung sind. Somit kann Survivin auch bei der Durchführung der Mitose und damit bei der Regulation der Zellteilung eine wichtige Rolle zugeordnet werden. Es wird v.a. während der Mitose stark exprimiert und zeigt somit eine vom Zellzyklus abhängige Expression (Li et al., 1998). Man unterscheidet drei Isoformen, die in ihrer Fähigkeit zur Inhibition der Apoptose sowie in ihren subzellulären Lokalisationen variieren.

Survivin wird in fetalen Geweben, nicht aber in bereits differenzierten, adulten Geweben mit wenigen Ausnahmen (z.B. Thymus) exprimiert (Adida et al., 1998; Altieri und Marchisio, 1999; Ambrosini, Adida und Altieri, 1997). Eine Überexpression von Survivin ist in einer Vielzahl von Neoplasien zu finden, wobei hohe Expressionen mit einem sehr aggressiven Tumorwachstum und dem Auftreten von Resistenzen gegen Chemotherapeutika korrelieren (Ambrosini et al., 1997).

Die Transkription von Survivin kann durch Wildtyp- p53 reprimiert werden (Hoffman et al., 2002; Mirza et al., 2002; Zhou et al., 2002) wobei die Mechanismen dieser Repression noch weitgehend umstritten sind. Zum einen wird eine direkte Bindung des Tumorsuppressors p53 an dem Survivin- Promotor vermutet (Hoffman et al., 2002), während zum anderen inhibitorische Veränderungen der Chromatinstruktur im Bereich des Promotors diskutiert werden (Mesri et al., 2001).



### 1.8.2. Stathmin, ein Regulatorprotein im Zellzyklus

Stathmin, auch als Op (Oncoprotein) 18 bezeichnet, gehört zu einer kleinen Familie von Phosphoproteinen (Hailat et al., 1990) und ist ein zentraler Regulator der Zellproliferation. Weitere Mitglieder dieser Familie sind die Proteine SCG10, SCLIP sowie RB3/RB3`/ RB3``, die v.a. in Neuronen und Gliazellen eine wichtige Rolle spielen. Das Protein Stathmin hingegen wird in einer Vielzahl von Zellen wie z.B. Neuronen (Mori et al., 1990), Muskelzellen (Balogh, Mege und Sobel, 1996; Toutant and Sobel, 1987) und Lymphozyten (Gullberg et al., 1990) exprimiert. Stathmin besteht aus 148 Aminosäuren und gliedert sich in zwei Domänen, die sich im Bereich der Aminosäuren 50 bis 70 überlappen. Die N- terminal gelegene Regulationsdomäne verfügt über vier Phosphat- Bindungsstellen (Beretta, Dobransky und Sobel, 1993), während die C- terminal gelegene Interaktionsdomäne mit ihren  $\alpha$ - Helices der Interaktion mit weiteren Proteinen dient (Curmi et al., 1994; Doye et al., 1989). Stathmin liegt im Cytoplasma gelöst vor und nimmt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung ein, indem es zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli des Spindelapparates während der Interphase und der späten Mitosephase führt (Sobel, 1991; Sobel et al., 1989).

Seine Aktivität wird durch N- terminale Phosphorylierungen reguliert (Brattsand et al., 1994; Strahler et al., 1992). Die Inaktivierung (Phosphorylierung) in frühen sowie die Aktivierung (Dephosphorylierung) in späten Mitosephasen ist entscheidend für den Auf- und Abbau des Spindelapparates. Auf transkriptioneller Ebene wird die Expression von Stathmin durch den Tumorsuppressor und Zellzyklusregulator p53 inhibiert (Murphy et al., 1999).

Stathmin wird ebenso wie Survivin (s. Kap. 1.8.1.) v.a. in undifferenzierten, multipotenten Zellen verschiedener Gewebe exprimiert, während mit zunehmender Differenzierung seine Expression in den Zellen abnimmt (Doye et al., 1992; Koppel et al., 1990). Eine Stathmin Überexpression konnte in einer Vielzahl von Tumoren wie z.B. Lymphomen (Ghosh et al., 1993; Nylander et al., 1995) Adenokarzinomen (Bieche et al., 1998) und Karzinomen (Ghosh et al., 1993) festgestellt werden.

### 1.8.3. p53 DINP1, ein positiver Regulator der p53- abhängigen Apoptose

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindungsspezifität des Tumorsuppressors p53 an den Zielsequenzen seiner Targetgene durch verschiedene Modifikationen beeinflusst werden kann. So führt die Phosphorylierung von p53 an Serin 46 zu einer spezifischen Induktion von p53AIP1, einem Zielgen von p53, welches in der Lage ist, selbständig die Apoptose in verschiedenen Tumorzelltypen zu induzieren. Eine Inhibition der p53AIP1 Expression führt zu einer Blockade der durch p53 induzierbaren Apoptose (Oda et al., 2000b).

p53DINP1 (p53- dependant damage- inducible nuclear protein 1) ist ein Kernprotein und tritt in Form von 2 Splice- Varianten, dem p53 DINP1 $\alpha$  und dem p53 DINP1 $\beta$ , auf. Es unterliegt der Regulation des Tumorsuppressors p53 und spielt eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung der Aminosäure Serin 46 von p53 und folglich in der Induktion von p53AIP1 (Okamura et al., 2001). Man geht davon aus, dass p53DINP1 wahrscheinlich nach Induktion von Doppelstrangbrüchen (durch oxidativen Stress, Adriamycin Behandlung oder Endonuklease Aktivität) entweder einen Komplex mit einer Serin 46- Kinase bildet oder ein bedeutender Regulator für die Interaktion zwischen p53 und der Serin 46- Kinase ist (Okamura et al., 2001).

Der Transkriptionsfaktor p53 ist somit in der Lage sich selbst durch die transkriptionelle Regulation von p53DINP1 zu regulieren. Ein weiteres Beispiel für einen solchen Feedback Mechanismus ist die negative Regulation von p53 durch Mdm2, ein weiteres Zielgen von p53 (Prives, 1998; Momand et al., 1992; Oliner et al., 1992).

#### 1.8.4. p21, ein Cyclin- abhängiger Kinase Inhibitor

Eines der ersten beschriebenen Gene, welches durch wt p53, nicht jedoch durch mutiertes p53 eine transkriptionelle Aktivierung erfährt, ist das p21- Gen, dessen Produkt ein Inhibitor Cyclin- abhängiger Kinasen ist (el- Deiry et al., 1993). p21, auch als WAF1, CAP20, CIP1 und Sdi1 bezeichnet, gehören zur Cip/Kip Familie Cyclin- abhängiger Kinase Inhibitoren. Zu dieser Familie gehört auch p27 (Polyak et al., 1994; Toyoshima und Hunter, 1994) und p57 (Lee, Reynisdottir und Massague, 1995; Matsuoka et al., 1995). Sie verfügen über eine hoch konservierte, N- terminal gelegene Region, die für die Inhibition der Cyclin/Cdk- Komplexe von Bedeutung ist. Die C- terminal gelegene Domäne hingegen variiert bei den drei CKIs in Länge und Funktion (Lee, Reynisdottir und Massague, 1995; Polyak K. et al., 1994; Chen et al., 1995; Luo, Hurwitz und Massague, 1995). Sie sind in der Lage eine Vielzahl von Cyclin/ Cdk- Komplexen, v.a. solche mit Cdk2 zu binden und zu inhibieren (Harper et al., 1995; Zhang, Xiong und Beach, 1993). Die wesentliche Aufgabe von p21 besteht in der Kontrolle des Zellzyklus, indem es nach DNA- Schädigung überwiegend zu einem G1- Zellzyklusarrest führt (El- Deiry W.S. et al., 1994).

Die Regulation der p21 Expression auf Transkriptionsebene erfolgt sowohl durch p53- abhängige als auch p53- unabhängige Mechanismen (Gartel und Tyner, 1999). Der p21 Promotor verfügt über zwei konservierte p53- Bindungsstellen (el-Deiry et al., 1995). Eine p53- abhängige Induktion von p21 führt zur Aufhebung der apoptotischen Wirkung des Tumorsuppressors p53 und zum Eintritt der Zelle in den Zellzyklusarrest mit anschließender DNA- Reparatur, während durch Repression oder Elimination der p21 Expression die apoptotischen Effekte von p53 wieder überwiegen und die Zelle in die Apoptose übergeht (Shaulian et al., 2000; Chan et al., 2000). Somit agiert p21 auch als Inhibitor der p53- abhängigen Apoptose.

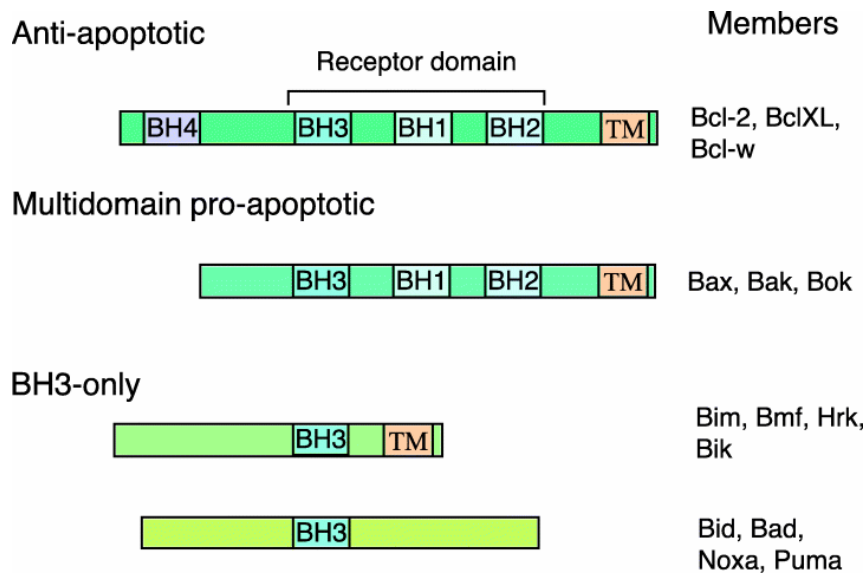
Die Transkription von p21 kann auch durch p53- unabhängige Mechanismen wie z.B. durch Ap2, STATs, Sp1, Sp3 sowie C/EBP  $\alpha$  und C/EBP  $\beta$  aktiviert werden (Gartel und Tyner, 1999). Posttranskriptionell erfolgt die Regulation der p21 Expression durch die Ubiquitin- abhängige sowie -unabhängige, durch Proteasomen vermittelte Degradation (Sheaff et al., 2000; Touitou et al., 2001).

p21 übernimmt auch wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung. Dies zeigen Untersuchungen, in denen p21- und p57- negative Embryonen Defekte in der Entwicklung der Lunge sowie der Skelettmuskulatur aufweisen (Zhang et al., 1999).

### 1.8.5. Die Bcl-2 Familie

Der Namensgeber dieser Proteinfamilie, das Bcl-2 Protoonkogen, wurde erstmals in humanen folliculären B- Zell Lymphomen identifiziert (Bakhshi et al., 1985; Cleary und Sklar, 1985; Tsujimoto et al., 1985) und schien anders als andere Onkogene die Zelle nicht zur Proliferation anzuregen, sondern die durch diverse Stimuli induzierbare Apoptose zu behindern (McDonnell et al., 1989; Vaux, Cory und Adams, 1988). Überraschend ist, dass die Mitglieder dieser Familie gänzlich entgegengesetzte Wirkungen aufweisen können. Durch die überwiegende Lokalisation von Bcl-2 an den Mitochondrien wird die große Bedeutung dieser Organelle im Apoptosegeschehen hervorgehoben (Hockenbery et al., 1990).

Die Bcl-2 Familie gliedert sich in Abhängigkeit vom Vorhandensein der entsprechenden Bcl-2 Homologie- Domänen (BH), von denen BH-1,-2,-3,-4 bekannt sind (s. Abb.1.5.) in drei Untergruppen.



#### Abb. 1.5: Die Bcl- 2 Familie.

Die Einteilung der Proteine erfolgt nach Wirkung und Anzahl der Homologiedomänen. Die meisten Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen zusätzlich eine Transmembrandomäne (TM), welche sie zur Verankerung in den Membranen der Mitochondrien, des ER und des Zellkernes befähigt (nach Chan und Yu, 2004).

Die Proteine Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 und Bcl-w verfügen über alle vier Homologiedomänen und werden somit den „multidomain antiapoptotic“ Bcl-2s zugeordnet. Die Vertreter der zweiten Untergruppe, die sogenannten „multidomain proapoptotic“ Proteine Bax, Bak und Bok, beinhalten nur die BH- Domänen -1,-2 und -3. Die dritte Untergruppe der Bcl-2 Familie weist lediglich eine Sequenz für die BH-3 Domäne auf (Strasser, O'Connor und Dixit, 2000), der vorwiegend eine proapoptotische Wirkung durch die Inhibition antiapoptotischer Bcl-2s zugeschrieben wird (Bouillet und Strasser, 2002).

Die Domänen BH-1 bis -3 bilden eine hydrophobe Vertiefung, welche als Andockstelle für die BH-3 Domäne anderer Bcl-2s dient (Sattler et al., 1997). Die BH-4 Domäne der antiapoptotischen Vertreter ist höchstwahrscheinlich an Protein- Protein Interaktionen mit nicht Bcl-2 Proteinen wie z.B. der Proteinkinase Raf-1 beteiligt (Wang et al., 1994).

Außerdem verfügen einige Bcl-2s auch über eine Transmembrandomäne, welche die Proteine zur Einlagerung in die Mitochondrienmembran, die Membran des ER und des Zellkerns befähigt (Bouillet und Strasser, 2002).

#### **1.8.5.1. Die „BH-3 only“ Proteine PUMA und Noxa**

Die „BH-3 only“ Proteine PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) und Noxa gehören zu den potentesten mitochondrialen Apoptoseauslösern der Bcl-2 Familie (Kelekar und Thompson, 1998). Ihre Transkription wird durch p53 nach DNA- Schädigung aktiviert (Nakano und Vousden, 2001; Oda et al., 2000a; Yu et al., 2001). Dabei führt Noxa auf direktem und PUMA auf indirektem Wege, durch Aktivierung des „multidomain“ proapoptotischen Bax Proteins, zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien sowie zur Aktivierung von Apaf-1 (Green und Reed, 1998; Miyashita und Reed, 1995; Oda et al., 2000).

Charakteristisch für beide „BH-3 only“ Proteine ist die Bindung von antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen wie z.B. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> und Mcl-1 sowie die Induktion weiterer „apoptotischer“ Faktoren (Gross, McDonnell und Korsmeyer, 1999; Adams und Cory, 1998).

Das *PUMA* Gen kodiert für zwei „BH-3 only“ Proteine, PUMA- $\alpha$  und PUMA- $\beta$ , während PUMA- $\gamma$  und PUMA- $\delta$  keine BH-3- Domäne besitzen und somit auch keine wachstumshemmende sowie apoptotische Wirkung aufweisen (Nakano und Vousden, 2001).

Die Funktion der beiden letztgenannten Proteine ist noch ungewiß. Die im ersten Intron gelegene p53- Bindungsstelle lässt darauf schließen, dass es sich bei dem proapoptotischen Protein PUMA um ein direktes Zielgen von p53 handelt (Nakano und Vousden, 2001).

Ebenso ist Noxa aufgrund seiner im Promotorbereich gelegenen p53- Bindungsstelle ein direktes Targetgen des Tumorsuppressors p53 (Oda et al., 2000). Das humane Noxa Protein besteht aus 54 Aminosäuren und verfügt im Gegensatz zu dem Noxa Protein der Maus nur über eine BH-3- Domäne (Oda et al., 2000).

Als Hauptwirkort beider Proteine gilt das Mitochondrium (Oda et al., 2000; Nakano und Vousden, 2001).

### **1.8.5.2. Die „multidomain proapoptotic“ Proteine Bax und Bak**

Die beiden Hauptvertreter dieser proapoptotischen Proteine sind Bax und Bak. Sie sind in zahlreichen Zelllinien vertreten.

Bax ist ein ca. 21 kDa großes, aus 192 Aminosäureresten bestehendes Protein, welches im inaktiven Zustand als Monomer im Zytosol bzw. in wenigen Zelllinien an die äußere Mitochondrienmembran gebunden vorliegt (Suzuki, Youle und Tjandra, 2000).

Bak, ein ca. 24 kDa großes, aus 211 Aminosäureresten bestehendes Protein, liegt hingegen auch im inaktiven Zustand gebunden an der Membran von Mitochondrien bzw. vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) vor (Wei et al., 2001; Scorrano et al., 2003). Dort wird es durch Bildung von Heterodimeren mit Proteinen der eigenen Familie, aber auch anderer Proteine, in seiner proapoptotischen Wirkung behindert (Griffiths et al., 2001).

Die Induktion der mitochondrialen Apoptose mittels diverser Stimuli (Griffiths et al., 1999; Martinou et al., 1999; Murphy et al., 2000; Gilmore et al., 2000) führt im Falle von Bak zu einer Konformationsänderung am N-Terminus, sowie an der BH-1 Domäne (Griffiths et al., 2001). Infolgedessen vermag das Protein sowohl Homooligomere zu bilden, als auch seine sequestrierende Bindung an Bcl- X<sub>L</sub> bzw. VDAC2 auflösen zu können.

Das Bax Protein erfährt nach Aktivierung sowohl N- als auch C- terminal eine Konformationsänderung. Erstgenanntes befähigt Bax, ebenfalls wie Bak, zur Homooligomerisierung, während die Veränderung am C-Terminus einerseits das Protein befähigt, sich in Membranen einzulagern, und zum anderen zur Freilegung der BH-3 Domäne führt, die normalerweise durch den C- Terminus verdeckt ist. Mit Hilfe dieser freiliegenden

BH-3 Domäne können nun Protein- Protein Interaktionen mit anderen Bcl-2 Proteinen eingegangen werden (Griffiths et al., 2001).

### 1.8.6. GADD 45, ein negativer Zellwachstums- Regulator

Das *GADD 45* Gen (*growth arrest and DNA damage 45*) gehört zu einer Gruppe von Genen, die nach Einwirkung multipler DNA- schädigender Reagenzien sowie durch bestimmte Stressfaktoren wie z.B. ionisierende Strahlung, einen Wachstumsarrest der Zelle induzieren (Fornace, Alamo und Hollander, 1988). Die Gene der GADD- Familie sind in zahlreichen Säugerzellen vertreten (Fornace, 1992). GADD 45 ist das einzige Mitglied dieser Gruppe von Genen, dessen Regulation dem Transkriptionsfaktor p53 unterliegt (Kastan et al., 1992; Papathanasiou et al., 1991) Neben dieser p53- abhängigen Regulation sind aber auch p53- unabhängige Regulationsmechanismen von GADD 45 in der Literatur beschrieben (Zhan et al., 1996).

GADD 45 ist ein ca. 19 kDa großes Protein, das in geringen Konzentrationen im Kern vorliegt (Carrier et al., 1994). Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Inhibition der DNA- Replikation, der DNA- Reparatur sowie bei der Kontrolle der Zellproliferation, indem es nach Einwirkung bestimmter Arten von DNA- schädigender Reagenzien (z.B. UV- Bestrahlung) als Zellzyklus- Inhibitor zu einem G2/M- Arrest führt. In diesem Zusammenhang, so scheint es, ist die Interaktion zwischen GADD 45 und der Cyclinkinase Cdc2, und damit deren Inhibition von Bedeutung (Jin et al., 2000). Die Inhibition der Cyclinkinase Cdc2 trägt somit beträchtlich zu der durch GADD 45 vermittelten Suppression des Zellwachstums bei. Neben der Fähigkeit zur Inhibition des Zellwachstums vermag GADD 45 auch nach dessen Überexpression *in vitro* die Apoptose zu induzieren (Takekawa und Saito, 1998). Durch Interaktion mit dem Proliferationsfaktor PCNA (proliferating cell nuclear antigen) wird die Funktion von GADD 45 als negativer Zellwachstums- Regulator zu agieren, inhibiert (Vairapandi et al., 2000).

### 1.8.7. PIG3, ein REDOX- Gen

Im Rahmen von Untersuchungen, die sich mit der Identifizierung p53- regulierter Gene beschäftigten, wurden auch solche Gene entdeckt, die in der Lage sind, die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) in der Zelle zu beeinflussen. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang das *PIG3* Gen (**p**53- **i**nducible **g**ene **3**), dessen p53- abhängige Induktion bereits vor dem Einsetzen der Apoptose eintritt (Flatt et al., 2000). Das PIG3 Protein besteht aus 332 Aminosäuren und ist im Cytoplasma lokalisiert. Es existieren verschiedene Splicevarianten. Außerdem konnte eine p53- Bindungsstelle im Bereich des Promotors nachgewiesen werden. Zur Transaktivierung des *PIG3* Gens ist zusätzlich eine Prolin- reiche Domäne des p53 Proteins notwendig, die ebenfalls bei der Induktion der Apoptose von Bedeutung ist (Venot et al., 1998). Die p53- abhängige PIG3 Expression setzt im Vergleich zur Expression anderer p53- regulierter Gene nach Adriamycin- Behandlung oder Bestrahlung erst verzögert ein und bleibt aber nach Abklingen des p53- Stimulus länger bestehen (Flatt et al., 2000).

PIG3 zeigt eine Sequenz- Homologie zu NAD(P)H- Oxidoreduktasen in verschiedenen Spezies (Polyak et al., 1997). Seine p53- abhängige Expression korreliert mit dem Vorkommen von Sauerstoffradikalen in der Zelle. PIG3 kann somit eine wesentliche Rolle im ROS- abhängigen Zelltod zugeordnet werden, während seine alleinige Induktion aber nicht zur Apoptoseeinleitung ausreicht (Flatt et al., 2000). Seine exakte Rolle in der p53- abhängigen Apoptose ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt.



### 1.8.8. REDD1, ein Zielgen der Transkriptionsfaktoren p53 und p63

Ellison und seine Mitarbeiter entdeckten 2002 in einer Expressionsanalyse nach einer induzierten Telomerschädigung einen deutlichen Anstieg der REDD1 (*regulated in development and DNA damage responses*) Expression. Noch im gleichen Jahr wurde REDD1 als RTP801 identifiziert, ein Gen, welches nach Hypoxie durch den HIF-1 Faktor (hypoxia-inducible factor) aktiviert wird (Shoshani et al., 2002). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass REDD1 durch verschiedene Stressfaktoren aktiviert werden kann.

Es handelt sich um ein aus 232 Aminosäureresten bestehendes Serin-reiches Protein, dessen C-Terminus evolutionär hoch konserviert ist. REDD1-Orthologe finden sich in allen untersuchten Organismen wie z.B. *Xenopus*, *Drosophila* und der Maus (Ellison et al., 2002). REDD1, ein 25 kDa großes Protein, liegt, ohne Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zellorganelle, auch nach Stresseinwirkung im Cytoplasma gelöst vor (Ellison et al., 2002). Der REDD1-Locus wurde in allen untersuchten Geweben exprimiert.

Ähnlich wie p21 und GADD 45 wird REDD1 sowohl durch p53-abhängige als auch p53-unabhängige Mechanismen nach Einwirkung verschiedener Stressfaktoren aktiviert (Loignon et al., 1997; Jin et al., 2001). Die Induktion von REDD1 nach Einwirkung von ionisierender Strahlung erfolgt nur in Gegenwart von p53 und ATM.

Mittels Immunfluoreszenz konnte die Co-Lokalisation von REDD1 mit p63, einem mit dem Transkriptionsfaktor p53 verwandten Protein, im Ektoderm und somit während der Embryonalentwicklung des Epithelgewebes nachgewiesen werden. Aufgrund der reduzierten REDD1 Level in p63-negativen Mausembryonen kam man zu der Schlussfolgerung, dass die Expression von REDD1 im Rahmen der Epithelzeldifferenzierung dem Transkriptionsfaktor p63 unterliegt (Ellison et al., 2002). Diese Abhängigkeit konnte für andere p53-regulierte Gene wie z.B. p21 und GADD 45 nicht nachgewiesen werden.

Außerdem gelang es Ellison und seinen Mitarbeitern zu zeigen, dass REDD1 eine wesentliche Rolle in der p63-abhängigen Regulation der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) spielt, obwohl die genauen Mechanismen noch weitgehend unbekannt sind. Eine direkte Regulation der ROS durch REDD1 erscheint unwahrscheinlich, da das Protein REDD1 zum einen keine Homologie zu bekannten oxidativen Enzymen zeigt, und zum anderen nicht gehäuft im Bereich der Mitochondrien, der Produktionsstelle von ROS zu finden ist.

## 1.9. Bedeutung der Tumorforschung in der Veterinärmedizin

Die Tumorforschung hat in den letzten Jahren nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der Tiermedizin v.a. im Bereich der Kleintierkrankheiten, einen erheblichen Auftrieb erhalten. Die vorliegenden epidemiologischen Studien in der Tiermedizin umfassen meist nicht die komplette Population an Tieren, die an Tumorerkrankungen leiden, so dass die existierenden Zahlen sicherlich zum Teil noch sehr stark nach oben korrigiert werden können. Gründe für die Schwierigkeiten, eine entsprechende Grundpopulation zu bestimmen, liegen darin, dass viele Tiere mit Tumorerkrankungen nicht onkologisch untersucht und behandelt sowie exstirpierte Tumoren oft keiner histologischen Untersuchung unterzogen werden. Im humanen Bereich lassen sich hingegen Populationen relativ gut erfassen, sowohl in Bezug auf die Anzahl der Individuen als auch auf ihre Alters- und Geschlechterverteilung.

Tumorerkrankungen gehören in der Tiermedizin neben den Erkrankungen des Herz-Kreislaufapparates zu den häufigsten Todesursachen bzw. Indikationen der Euthanasie. Vor allem in der Kleintiermedizin ist eine zunehmende Nachfrage nach neuen Diagnostik- und Therapieverfahren gegeben. Neben der chirurgischen Exstirpation und den zahlreichen verschiedenen Chemotherapien gewinnen sowohl die kurative als auch die palliative Bestrahlungstherapie zur Linderung von Schmerzen zunehmend an Bedeutung (Kleiter et al, 2002; Kaser-Hotz et al., 2002). Grundvoraussetzung für die Entwicklung dieser modernen Heilungsmethoden sind Kenntnisse über die Entwicklung und Ausbreitung der Tumoren, die wiederum die Basis für das Verständnis von deren Ätiologie und Pathogenese sind. Von menschlichen Tumorzellen ist bekannt, dass sie eine Unabhängigkeit von physiologischen Wachstumssignalen erlangen, sowie resistent gegenüber Wachstumshemm- signalen und gegenüber der Apoptose werden. Sie sind fähig, sich unbeschränkt teilen zu können und vermögen eine permanente Angiogenese zu induzieren. Tumoren haben die Potenz zu invasivem Wachstum und können Metastasen bilden (Hanahan und Weinberg, 2000). Beeinflusst wird die Tumorbildung durch Onkogene, Virusinfektionen (z.B. felines Leukämievirus, felines Immundefizienzvirus), Tumorsuppressorgene sowie DNA-Reparaturgene.

In dieser Arbeit werden wir uns auf den Tumorsuppressor p53 und dessen Regulationsmechanismen konzentrieren. Es hat sich gezeigt, dass das *p53*- Gen in mehr als 50% aller malignen Tumoren Mutationen aufweist. Tumoren, die über ein intaktes *p53*- Gen verfügen, weisen meist Veränderungen in der Aktivität von apoptotischen Co- Faktoren auf, die essentiell für die Induktion der *p53*- abhängigen Apoptose sind (Vousden und Lu, 2002).

---

Die Identifizierung dieser apoptotischen Regulationsmechanismen des Transkriptionsfaktors p53 beziehungsweise die Abweichungen dieser Reaktionswege in Tumorzellen stellen die Basis für die Entwicklung einer effektiven und gut tolerierten Tumorthherapie dar. Ein weiteres Kriterium ist auch die Erforschung molekularbiologischer Marker, die eine bessere Einteilung und genauere Prognose bestimmter Tumoren erlauben.

## 1.10. Zielsetzung der Arbeit

Der Tumorsuppressor p53 ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der zahlreiche Zellzyklus- und Apoptose- regulierende Gene nach Einwirkung verschiedener Stressfaktoren wie z.B. Hypoxie, Bestrahlung oder Onkogenexpression reguliert. Aktuelle Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass p53 auch in Abwesenheit von Stress an den Promotoren einiger seiner Zielgene gebunden vorliegen kann, ohne diese jedoch zu transaktivieren. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellte sich die Frage, wie die Regulation des bereits Promotor- assoziierten p53 erfolgt. In diesem Zusammenhang gelang Hublitz und Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe die Identifizierung und Charakterisierung des neuen INHAT- Repressors NIR. NIR ist in der Lage, sowohl mit dem Transkriptionsfaktor p53 als auch mit anderen zellulären Proteinen zu interagieren.

Ziel der Arbeit war, zu untersuchen, ob alle oder nur einige der bekannten p53- Targetgene durch NIR reguliert werden, und wie sich die Expression der NIR- regulierten Gene unter NIR knockdown verändern. Die Reduktion der zellulären NIR Level erfolgte mittels RNA- Interferenztechnik. Eine weitere Fragestellung war, ob eventuell beobachtete Änderungen der Genexpression p53- vermittelt oder p53- unabhängig sind.

Begleitend zu diesen Untersuchungen sollten die Veränderungen der Genexpression des kompletten menschlichen Genoms unter NIR knockdown mittels Nimble Gen Human Gene Expression Microarrays analysiert werden.

Weil Vorarbeiten gezeigt hatten, dass es in HCT116 wt Zellen nach NIR knockdown zur Induktion einer p53- abhängigen Apoptose kommt, war ein letztes Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob das Apoptose- regulierende *Bax*- Gen für diese p53- abhängige Apoptose nach NIR knockdown verantwortlich ist.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Membranen

Acrylamid	Serva (Heidelberg)
Agarose	Seakem (Rockland, USA)
Ammoniumpersulfat	Serva
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL™)	Amersham (Freiburg)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma
Glycin	Serva
Hyperfilm ECL™	Amersham
Magermilchpulver	Glücksklee (Hamburg)
3- Mercapto-1,2-Propandiol	Sigma
Natriumjodid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Nukleotide (dNTPs)	Boehringer (Mannheim)
PVDF- Immobilon- Membran	Millipore
RNAifect Transfectionsreagenz	Quiagen
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Röntgen-Fixier-Konzentrat	ADEFO Chemie GmbH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Serva
Zellulosefilter Whatman™ #1	Herolab (Maidstone, USA)

Alle weiteren Chemikalien, die verwendet wurden und hier nicht aufgeführt sind, wurden über die Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) in analysereiner Form bezogen.

## 2.2 Puffer und Lösungen

Blaumarker:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)	
	Glycerol	50% (v/v)	
	EDTA	50mM	
Blockingpuffer:	Magermilchpulver in PBS-Puffer	5% (w/v)	
Ethidiumbromidlösung:	Ethidiumbromid	10 mg/ml H <sub>2</sub> O	
FACS- Fix:	NaCL	0,145 M	
	Paraformaldehyd ad 200 ml H <sub>2</sub> O ad pH 7,4 mit NaOH ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O	1%	
1x Laufpuffer für SDS- PAGE:	Tris	25 mM	
	SDS	0,1% (w/v)	
	Glycin	192 mM	
		ad pH 8,3	
PBS	:	NaCl	140 mM
		KCl	25 mM
		MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
		CaCl <sub>2</sub>	1 mM
		Na-K-Phosphat	10 mM
2x SDS- Probenpuffer (2x Sample-Buffer)	:	Tris HCL (pH6,8)	100 mM
		SDS	4% (w/v)
		DTT	200 mM
		Glycerin	20% (w/v)
		Bromphenolblau	0,2% (w/v)

TAE-Puffer 50x	:	Tris (pH8,0)	2 M
		Essigsäure	1 M
		EDTA	0,05 M
		ad pH 8,0	
Transferpuffer	:	Tris/HCl	25 mM
		Glycin	192 mM
		Methanol	20% (v/v)

Zusätzliche Puffer werden bei der jeweiligen Methode genannt.

## 2.3 Enzyme

DNase (RNase-frei)	Roche
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen
Taq-Polymerase	Pharmacia Biotech oder Sigma
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH

## 2.4 Größen- und Molekulargewichtsmarker

### 2.4.1 DNA- Größenmarker

Zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger DNA- Fragmente wurde der “1 kb Plus- DNA-Ladder“ der Firma Invitrogen verwendet. Dieser Marker ist zur Bestimmung von Fragmenten der Größe zwischen 0,1 und 12 kbp geeignet.

Fragmentgrößen (kbp): 12000 / 11000 / 10000 / 9000 / 8000 / 7000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3000 / 2000 / 1650 / 1000 / 850 / 650 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

## 2.4.2 Protein- Molekulargewichtsmarker

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde der “Peqlab Gold Prestained Protein Marker IV“ der Firma Peqlab eingesetzt. Er enthält Proteine der folgenden Molekulargewichte:

180 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa und 10 kDa

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Primärantikörper

Antikörper		Verdünnung
<b>DO-1</b> (Calbiochem)	Anti- p53 monoklonaler Antikörper; IgG (Maus)	1:2000
<b>Bax</b> (SantaCruz)	Anti- Bax monoklonaler Antikörper (Maus)	1: 300
<b>NIR</b> (Arbeitsgruppe Prof. Schüle, Freiburg)	Anti- NIR monoklonaler Antikörper (Kaninchen)	1: 1000
<b>p21</b> (BD Biosciences Pharmingen)	Anti- p21 monoklonaler Antikörper (Maus)	1: 500
<b>Anti- <math>\beta</math>- Aktin</b> (Sigma)	Monoklonaler Anti- $\beta$ - Aktin Antikörper (Maus)	1:5000



## 2.5.2 Sekundärantikörper

<b>Anti-Kaninchen-POX</b> (Sigma)	Peroxidase- gekoppelter anti- Kaninchen-Antikörper	1:2000
<b>Anti-Maus-POX</b> (Sigma)	Peroxidase- gekoppelter anti- Maus Antikörper IgG	1:2000

## 2.6 Zelllinien

### 2.6.1 HCT116

Humane Kolonkarzinom- Zelllinie mit Wildtyp p53  
(American Type Culture Collection ATCC CCL-247)

### 2.6.2 HCT116 Bax-/-

Stammt von der oben genannten Zelllinie ab, das *Bax*- Gen wurde durch gerichtete, homologe Rekombination ausgeschaltet; die Zelllinie wurde vom Labor Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, USA bezogen.

### 2.6.3 HCT116 p53-/-

Stammt ebenfalls von der oben genannten Zelllinie ab, das *p53*- Gen wurde durch gerichtete, homologe Rekombination ausgeschaltet; die Zelllinie wurde uns vom Labor Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, USA zur Verfügung gestellt.

### 2.6.4 MCF7

Humane Mammakarzinom- Zelllinie mit Wildtyp p53  
(ATCC HTB-22<sup>TM</sup>)

## 2.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Mc Coy's 5A- Medium with Glutamax	Gibco
DMEM- Medium	PAA Laboratories
Trypsin /EDTA- Lösung	PAA Laboratories
Fötiales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratoties

## 2.8 Materialien für die Zellkultur

6- Lochplatten	Corning Costar
Zellkulturflaschen 75 cm	Greiner Bio one
Zellkulturflaschen 25 cm	Greiner Bio one
Zellkulturschalen 10 cm	Corning Costar
Zellschaber	Greiner Bio one

## 2.9 siRNAs

### 2.9.1 NIR siRNA

Sequenzen der Doppelstrang siRNA des humanen NIR Proteins:

Sequenz 1:                    r(GACAGGAGGGAUGAAGACA)dTdT  
                                  r(UGUCUUCAUCCUCCUGUC)dTdT

Sequenz 2:                    r(GACCUGAACUUCCCAGAGA)dTdT  
                                  r(UCUCUGGGAAGUUCAGGUC)dTdT

Die Vorlage für die Auswahl dieser Sequenzen stammt von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Schüle von der Frauenklinik der Albert- Ludwigs- Universität in Freiburg.

### 2.9.2 Control siRNA

Sequenz der Kontroll (non- silencing) siRNA

                                  r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)dTdT  
                                  r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)dTdT

Fluoreszein (FITC)- gekoppelte siRNA zur Kontrolle der Transfektionseffizienz

Die Sequenz der Fluoreszein- gekoppelten siRNA entspricht der der control- siRNA.  
Alle siRNA Produkte wurden von der Firma Qiagen bezogen.

## 2.10 Synthetische Oligonukleotide („Primer“)

Zur Durchführung semiquantitativer RT- PCRs wurden folgende Primer verwendet:

### 2.10.1 Bak (Homo sapiens Bcl-2- antagonist/ killer1)

Bak forward 5' TAGGCGCTGGGGAGACTGATAACT 3'

Bak reverse 5' AGGCTTGGAGGCTTCTGACACG 3'

Die Fragmentgröße beträgt 440 bp.

### 2.10.2 Bax (Homo sapiens Bcl-2- associated X Protein)

Bax forward 5' CCCCAGAGAGGTCTTTTCCGAGTG 3'

Bax reverse 5' GAAAAATGCCCATGTCCCCCAATC 3'

Die Fragmentgröße beträgt 410 bp.

### 2.10.3 $\beta$ - Actin

$\beta$ - Actin forward 5' GCTGTGCTATGTTGCTCTAGACTTC 3'

$\beta$ - Actin reverse 5' CTCAGTAACAGTCCGCCtAGAAGC 3'

Die Fragmentgröße beträgt 500 bp.

### 2.10.4 GADD45 (Homo sapiens growth arrest and DNA- damage 45)

GADD45 forward 5' ATGACTTTGGAGGAATTCTCGGC 3'

GADD45 reverse 5' GAATGTGGATTCGTCACCAGCAC 3'

Die Fragmentgröße beträgt 400 bp.

### 2.10.5 GAPDH

GAPDH M 5' TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC 3'

GAPDH N 5' AGTCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC 3'

Die Fragmentgröße beträgt 190 bp.

### 2.10.6 HPRT

HPRT forward 5' GTTGAGAGATCATCTCCACC 3'

HPRT reverse 5' AGCGATGATGAACCAGGTTA 3'

Die Fragmentgröße beträgt 350 bp.

### 2.10.7 NOXA

NOXA forward 5' ATGCCTGGGAAGAAGGCGCGCAA 3'

NOXA reverse 5' CTTTGATGTATTCCATCTTCCGT 3'

Die Fragmentgröße beträgt 470 bp.

### 2.10.8 REDD1 (DDIT4)

REDD1 forward 5' CGTCCTTGCCCCGAACTCC 3'

REDD1 reverse 5' GGCAACGACACCCCATCCA 3'

Die Fragmentgröße beträgt 180 bp.

### 2.10.9 p21(Homo sapiens cyclin dependent kinase inhibitor1A)

p21 forward 5' GGCGGCAGACCAGCATGACAGATT 3'

p21 reverse 5' ATGAAGCCGGCCCACCCAACCTC 3'

Die Fragmentgröße beträgt 350 bp.

### 2.10.10 p53 DINP1 $\alpha$ (p53- dependant damage- inducible nuclear protein 1)

p53 DINP1 $\alpha$  forward 5' TTGTGGGTGAAGTCAGTTCTTC 3'

p53 DINP1 $\alpha$  reverse 5' GAGCTTCCACTCTGGGACTACT 3'

Die Fragmentgröße beträgt 460 bp.

**2.10.11 PIG3 (Homo sapiens tumor protein p53 inducible protein 3)**

PIG3 forward 5' GTGCACTTTGACAAGCCGGGAGGA 3'

PIG 3 reverse 5' CAGCCTGGGTCAGGGTCAATCCCT 3'

Die Fragmentgröße beträgt 350 bp.

**2.10.12 PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis)**

PUMA2 forward 5' CAGGATGAAATTTGGCATGGGGT 3'

PUMA2 reverse 5' AGAGCGAGGGCTGAGGACCGT 3'

Die Fragmentgröße beträgt 400 bp.

**2.10.13 stathmin**

stathmin forward 5' GTGGTCAGGCGGCTCGGACTG 3'

stathmin reverse 5' CTCTCGTTTCTCAGCCAGCTGC 3'

Die Fragmentgröße beträgt 320 bp.

**2.10.14 survivin**

survivin forward 5' GGCAGCCCTTTCTCAAGGACCACC 3'

survivin reverse 5' GATGGCACGGCGCACTTTCTTCGC 3'

Die Fragmentgröße beträgt 450 bp.

Alle angewendeten Oligonukleotide wurden über die Firma MWG Biotech sowie Operon bezogen.

## 2.11 Verwendete Laborgeräte

- **Blotkammer**  
LKB 2005 Transphor Electro Blotting Uni
- **PCR-Maschine**  
Peltier Thermal Cycler 200 der Firma MJ Research
- **Photometer**  
Pharmacia Biotech Ultraspec 300
- **UV-Gerät**  
MWG Biotech Gelprint 2000 i
- **Zentrifugen**  
Heraeus Megafuge 1,0 R (mit Kühlung)  
Heraeus Picofuge (Tischzentrifuge ohne Kühlung)  
Sigma 202 MK (Tischzentrifuge mit Kühlung)

## 2.12 Computersoftware

Zur Textverarbeitung diente Microsoft XP (Microsoft Corp.). Grafiken wurden mit dem Programm CorelDRAW 9.0™ (Corel Corp.) sowie Powerpoint 97 (Microsoft) erstellt. Die Auswertung von Daten erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel (Microsoft).

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Unter Zellkultur versteht man die Kultivierung und Vermehrung eukaryotischer Zellen *in vitro*. Dies erfolgt in der kontrollierten Umgebung CO<sub>2</sub>- begaster und auf 37°C temperierte Brutschränke. Die Zellen werden dabei in sterilen Kulturgefäßen aus Plastik oder Glas kultiviert, deren Oberflächen zum Teil beschichtet sind, um den Zellen das Wachstum auf der festen Unterlage zu ermöglichen.

Beim Wachstum *in vitro* organisieren sich die Zellen nicht mehr in einem Gewebe, sondern wachsen als Einzelschicht (Monolayer), in vielschichtigen Zellschichten (Multilayer) oder in Suspension (Suspensionskultur).

Um eine möglichst natürliche physiologische Umgebung für die Zellen herzustellen, werden sie in halbsynthetischen Nährmedien gehalten. Diese gepufferten Medien enthalten u.a. Aminosäuren, Nukleotide, Salze, Vitamine und gewöhnlich einen Zusatz von Serum (meist fötales Kälberserum, „FKS“).

#### 3.1.1 Kultivierung von HCT116 Zellen

Zur Kultivierung von HCT116 wt und von diesen abgeleiteten Zellen (HCT116 p53<sup>-/-</sup>, HCT116 Bax<sup>-/-</sup>) wurde McCoy's 5A Medium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (PAA Laboratories GmbH) verwendet. Alle 3 Zelllinien wurden zur Stammhaltung in 75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> in einem NUAIRE™ CO<sub>2</sub>- Water- Jacketed- Incubator gehalten.

Die Kulturen wurden 2x pro Woche gesplittet, indem die Zellschicht zweimal mit jeweils 2 ml Trypsin/EDTA- Lösung (PAA Laboratories GmbH) behandelt und bis zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche bei 37°C inkubiert wurde. Trypsin ist eine Protease, welche Proteinbindungen zwischen einzelnen Zellen sowie zwischen Zellen und Unterlage spaltet. Das EDTA komplexiert die für diese Proteinwechselwirkungen notwendigen Ca<sup>2+</sup> -



Ionen. Danach wurden die Zelllinien 1:6 mit frischem Medium verdünnt und in neue Kulturflaschen mit jeweils 13 ml Nährmedium überführt.

### **3.1.2 Kultivierung von MCF7 Zellen**

Die Stammhaltung dieser Zelllinie erfolgte in 75cm<sup>2</sup> - Kulturflaschen mit 13 ml DMEM-Medium. Die Temperatur betrug 37°C bei einem CO<sub>2</sub>- Gehalt von 7% in einem NUAIRETEM CO<sub>2</sub>-Water- Jacketed- Incubator. Die Zellen wurden 2x pro Woche 1:4 gesplittet.

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

## **3.2 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY**

Bei einigen Experimenten war es notwendig, die Anzahl der in einer Zellsuspension enthaltenen Zellen zu bestimmen. Dies geschah mit Hilfe des "Cell counter and Analyser SYstem" (CASY) der Firma Schärfe. Bei diesem Verfahren ist es möglich, gleichzeitig Zelldichte und Größenverteilung einer Zellpopulation zu bestimmen. Passieren die Zellen eine Lichtmesszelle im Gerät, so wird die Änderung des Widerstandes in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die Widerstandsmessung wird computertechnisch mit der Signalauswertung über Pulsflächenanalyse verbunden. Dabei ist die Fläche des gemessenen Impulses proportional zum Zellvolumen, was die gleichzeitige Messung von Dichte und Größenverteilung innerhalb der untersuchten Zellpopulation ermöglicht.

Die Messung erfolgte, indem eine 1:1000- Verdünnung der zu untersuchenden Zellpopulation (10 µl Zellsuspension + 10 ml CASYton) mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare bekannter Geometrie gesaugt wurde. Diese elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen

eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung. Da intakte Zellen Isolatoren darstellen, kommt es innerhalb der Kapillare zu einer Erhöhung des Widerstandes. Diese Widerstandsänderung ist, unter der Voraussetzung, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren, ein Maß für das Volumen der Zelle. Aus zwei Messsignalen errechnet der Computer einen Mittelwert in Form eines Integrals, das dem Zelldurchmesser proportional ist. Als Ergebnis der Messung ergibt sich ein Histogramm, bei dem die relative Zellzahl gegen den Durchmesser aufgetragen wird.

### **3.3 Transfektionseffizienz**

Zur Beurteilung der Transfektionsraten in verschiedenen Experimenten war es von Bedeutung die Transfektionseffizienzen zu bestimmen. Hierzu wählten wir die Transfektion einer Fluoreszin (FITC)- gekoppelten siRNA und die Zählung der fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie (s. Kap. 3.6.). Mit Hilfe eines Transfektionsreagenzes wurde die FITC-gekoppelte siRNA in die Zellen eingebracht (s. Kap. 2.9.). 5 Stunden nach Transfektion konnte nun die aufgenommene Menge an FITC- siRNA in den Zellen mittels FACS- Analyse bestimmt werden. Die Anregung der FITC- Moleküle durch einen Argonlaser erfolgte bei einer Wellenlänge von 480nm, das Emissionsmaximum betrug 530 nm.

### **3.4 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen**

Im Gegensatz zur stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen, bei der eine Integration der DNA in das Zellgenom stattfindet, kommt es bei einer transienten Transfektion nur zu einer vorübergehenden Einschleusung der DNA in die Wirtszellen. Die so eingeschleusten Gene sind nur vorübergehend aktiv und gehen bei weiteren Zellteilungen wieder verloren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transiente Transfektionen einer siRNA durchgeführt.

### 3.4.1 Transiente Transfektionen mit RNAiFect® (Quiagen)

Das RNAiFect® Transfektionsreagenz basiert auf einem liposomalen Transportmechanismus, durch den speziell siRNAs in die Zellen eingeschleust werden.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  Zellen abhängig vom Zelltyp auf 35 mm-Platten (6-Loch Platten) ausgesät, so dass sie am darauffolgenden Tag zu 40-60% konfluent waren. Das dafür auszusäende Volumen der in 6ml Medium aufgenommenen Zellen einer dicht bewachsenen 75cm<sup>2</sup>- Zellkulturflasche war vorher mittels CASY- Zellzählgerät bestimmt worden.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst das sich auf den Zellen befindende Medium abgenommen und pro 35 mm- Platte 600 µl neues Medium vorsichtig hinzugegeben. Im Anschluß wurden pro Transfektionsansatz (ein Ansatz entspricht einer 35 mm- Platte) 98 µl RNAiFect®- Puffer in ein Reagiergefäß vorgelegt. Zu diesem Puffer wurden 2 µl siRNA sowie 12 µl RNAiFect® Transfektionsreagenz hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Dieses Gemisch wurde für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Das Reaktionsgemisch mit FITC- gekoppelter siRNA sollte aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit während der Inkubationszeit dunkel gestellt werden.

Anschließend wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Platten aufgetragen. 5 Stunden nach Transfektion wurden auf jede 35mm- Platte 1,3 ml Nährmedium zu den 600 µl Medium und den 112 µl Transfektionsgemisch hinzugegeben und bis zur weiteren Verwendung belassen. Die Zellen, die mit FITC- gekoppelter control siRNA zur Bestimmung der Transfektionseffizienz transfiziert worden waren, erhielten kein zusätzliches Nährmedium.

Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **3.5 Fixierung von mit FITC- gekoppelter control siRNA transfizierter Zellen mittels FACS- Fix**

5 Stunden nach Transfektion wurden die 600 µl Nährmedium von den mit FITC- gekoppelter control siRNA transfizierten Zellen abgenommen. Durch Zugabe von 500 µl Trypsin auf den Zellrasen wurde dieser bei 37°C zum Ablösen vom Boden der 6- Loch Platten gebracht. Nach Ablösung überführte man die Zellen mit Hilfe des Trypsins in ein Reagiergefäß. Vor der sich anschließenden Zentrifugation (1 min, 13000 rpm) wurden 1000 µl PBS hinzugegeben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl FACS- Fix aufgenommen. Bis zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS- Analyse sollten die Proben dunkel und bei 4°C gelagert werden.

### **3.6 Durchfluscytometrie (FACS-Analyse)**

Die Durchfluscytometrie bzw. FACS- Analyse („Fluorescence activated cell sorting“) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Während des Messvorgangs werden die Zellen durch Überdruck stark beschleunigt, so dass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt und am Messpunkt fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Durch die gleichzeitige Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes kann die relative Größe und Granularität der Einzelzellen bestimmt werden. Dabei korrelieren sowohl Größe als auch Granularität direkt mit der Lichtintensität. Somit ist die Einheit der FACS- Analyse die relative Lichtintensität.

Im Falle einer Zellzyklusanalyse wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in 6- Loch- Platten ausgesät und je nach experimentellem Ansatz mit einer siRNA transfiziert (s. Kap. 2.9.). Um die Zellen zu ernten, wurden sie trypsiniert und zusammen mit dem Mediumüberstand in 2ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 1 min) wurden die Zellen einmal mit 500µl PBS gewaschen, wiederum abzentrifugiert und in 200 µl 0,9 %iger NaCl- Lösung resuspendiert. Um die Zellen zu vereinzeln wurde die Zellsuspension durch eine 23 gauge Kanüle passagiert und anschließend in 1,8 ml Methanol zur Fixierung aufgenommen. Die Fixierung erfolgte für mindestens 1 Stunde bei -20°C.

Nach der Fixierung wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal mit 500 µl PBS gewaschen und mit 250 µl RNaseA in PBS (25 µg/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 250 µl Propidiumiodid (PI; 10 µg/ml) zugegeben, die Ansätze vermischt und wiederum für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert und diese so markiert. Über einen Argon- Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm generiert, erfolgt eine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes, dessen emittiertes Licht über ein optisches System gemessen wird. Anhand eines Verteilungsdiagramms kann die Zahl der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowie die der apoptotischen Zellen ermittelt werden. Da PI in die DNA interkaliert und sich in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase auch der DNA- Gehalt in der Zelle variiert, ist eine Differenzierung der einzelnen Zellzyklusphasen sowie apoptotischer Zellen (Fragmentierung der DNA) möglich.

### **3.7 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen**

Diese Methode diente zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten unter denaturierenden Bedingungen.

Die in 35 mm- Platten (6- Loch- Platten) wachsenden adhären Zellen wurden zweimal mit PBS- Puffer gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber vom Plattenboden abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Vor Zugabe von 100 µl heißem (90°C) 1x SDS- Gel- Ladepuffer wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und der Überstand verworfen. Das mit 1x SDS- Gel- Ladepuffer versetzte Zellpellet wurde leicht resuspendiert, um die Zellen zu lysieren und anschließend für 10 Minuten gekocht.

Mit Hilfe des SDS- Probenpuffers werden die Disulfidbrücken gespalten und somit die Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Durch die fehlende Tertiärstruktur ist die Wanderungstrecke der Proteine im Gel proportional zu ihrer Größe und die saubere Auftrennung der Proteine wird verbessert. Außerdem werden Protein- Protein- Interaktionen wegen der fehlenden nativen Struktur nicht mehr eingegangen.

Um die in den Proben enthaltene chromosomale DNA zu scheren, wurde das Lysat wiederholt durch eine 23-gauge- Kanüle passagiert. Das nach Zentrifugation (10min, 13000rpm)

erhaltene Pellet wurde verworfen und die Proteine im Überstand nach Bestimmung der Proteinkonzentration zur Analyse in der SDS- PAGE eingesetzt bzw. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.7.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden  $10\ \mu\text{l}$  des Proteinextraktes in  $500\ \mu\text{l}$   $0,1\ \text{M}$  NaOH verdünnt und die  $\text{OD}_{280\ \text{nm}}$  im Photometer gemessen. Die Proteinmenge wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$6,4 / \text{OD}_{280} = x\ \mu\text{l}, \text{ die } 15\ \mu\text{g Protein enthalten}$$

## 3.8 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE)

In einer SDS-PAGE werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung kann nach Molekulargewicht, der Gesamtladung oder der dreidimensionalen Struktur der Proteine erfolgen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich unter denaturierten Bedingungen gearbeitet und die Auftrennung der Proteine nur nach deren Molekulargewicht durchgeführt. Das negativ geladene SDS, das sich im Puffer und in der Gelmatrix im Überschuss befindet, lagert sich an die hydrophoben Regionen der Proteine an. An der Aminosäurenkette lagert sich pro zwei Aminosäurenreste je ein SDS-Molekül an. Dadurch werden die positiven Ladungen der Proteine kompensiert und sie erhalten eine stark negative Ladung. Diese überlagert die Eigenladung des Proteins und ist zu dessen Masse ungefähr proportional. Mit dieser Vorgehensweise wird eine Wanderung der Proteine ausschließlich zur Anode und eine vollständige Denaturierung erreicht. Das SDS löst fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen und die Tertiärstruktur geht verloren. Die Matrix des Gels besteht aus Ketten polymerisierten Acrylamids, die durch N,N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt sind. Gestartet wird die Polymerisation durch Ammoniumpersulfat (APS) und katalysiert durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Die Porengröße und somit

die Auftrennungseigenschaften der chemisch inerten Polyacrylamid-Gelmatrix hängen direkt von den Mengenverhältnissen der eingesetzten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration ab. Die Proteine wandern also in einem Gel geeigneter Porengröße entsprechend ihrer Molmasse, wobei die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts darstellt. Um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erreichen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, das aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und unterschiedlichen pH-Werten besteht. Die Proteine laufen zuerst durch ein grobporiges Sammelgel (Uppergel), in dem sie konzentriert werden und eine einheitliche Lauffront erreicht wird. Dann wandern sie in ein feinporiges Trenngel (Bottomgel), in dem die Auftrennung erfolgt. Parallel zu den zu untersuchenden Proteinen wurden Markerproteine, deren Molekulargewicht bekannt ist, aufgetrennt um das relative Molekulargewicht der Proteine zu ermitteln.

### 3.8.1 Herstellen eines SDS- Polyacrylamidgels

Es wurden zwei Glasplatten (14,5 x 16,5 cm) verwendet, von denen eine an einer Seite eine Aussparung aufweist. Die Platten wurden vor der Verwendung mit Ethanol (70% [v/v]) gereinigt. An den drei Seiten ohne Aussparung wurde je ein Teflon-Abstandhalter eingelegt und die Platten dann mit Klammern aufeinander befestigt. Um zu verhindern, dass das SDS-Gel aus der Gießkammer ausläuft, wurden die Ränder mit Agarose (1%) abgedichtet. Dann wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen (bis 3 cm unter den Rand) und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  vollständig abgenommen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Um später die Proteinproben aufzutragen, wurden Geltaschen mit einem Teflonkamm ausgespart. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden der Kamm sowie der Abstandhalter an der Unterseite des Trenngels entfernt. Danach wurde das Gel senkrecht in eine Elektrophoresekammer eingespannt und beide Pufferkammern mit 1x Laufpuffer gefüllt. Das Gel bildet eine „Brücke“ für den Strom, der fließt, wenn Spannung an die Kammern angelegt wird. Die Proteinproben sowie der Proteinmarker wurden mit Hilfe einer Hamilton-Mikropipette in die Geltaschen pipettiert. Die

elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 150 V und später im Trenngel bei 220 V.

**Tabelle 3.1: Komponenten eines 10% und 13% SDS- Trenngels sowie eines Sammelgels**

Gelkomponenten	Trenngel		Sammelgel
	10 %	13 %	5 %
<b>1M Tris pH 6,8</b>	0	0	750 µl
<b>1 M Tris pH 8,8</b>	6 ml	6 ml	0
<b>30% Acrylamid</b>	5,3 ml	8 ml	1,0 ml
<b>2% Bis- Acrylamid</b>	2,12 ml	3,2 ml	400 µl
<b>10% SDS</b>	320 µl	320 µl	120 µl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub></b>	2,26 ml	0	3,67 ml
<b>APS</b>	140 µl	140 µl	50 µl
<b>TEMED</b>	14 µl	14 µl	10 µl

### 3.9 Western Blot (Immunoblot)

Beim Western Blot werden die zuvor in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen, wobei das nach der Auftrennung entstandene Proteinmuster immobilisiert auf der Membran erhalten bleibt. Die Proteine binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Da sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine weitgehend erhalten bleibt, können diese durch den Einsatz spezifischer Antikörper qualitativ und quantitativ immunologisch nachgewiesen werden (Immunoblot).



### 3.9.1 Proteintransfer

Die für den Western- Transfer eingesetzte PVDF- Immobilon- Membran (Millipore) wurde vor dem Aufbau des Blots in Methanol äquilibriert. Zum Aufbau des Blots wurde eine Vorrichtung verwendet, die aus zwei PVC- Gittern besteht, die zusammengesetzt wurden. Dabei wurden auf das eine Kunststoffgitter ein Schwammtuch, zwei Whatman- Papiere, das Polyacrylamidgel, die Immobilon- Membran, erneut zwei Whatman- Papiere und ein weiteres Schwammtuch aufgelegt. Durch das zweite Gitter wurde der Blot luftblasenfrei abgeschlossen. Schließlich wurde er, in richtiger Orientierung zur Anode hin, in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer („LKD 2005 Transphor electro blotting unit“) eingespannt. Der Transfer wurde für 3 Stunden bei 330 mA durchgeführt. Dabei wurden die zur Anode wandernden negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Immobilon- Membran luftgetrocknet und die Markerspür mit einem Skapell abgetrennt.

### 3.9.2 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Der immunologische Nachweis wird mit Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper kann radioaktiv erfolgen oder durch Chemilumineszenz. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die chemilumineszente Detektion verwendet. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose- Membran zunächst zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine in 5%iger PBS- Milch für 30 min geblockt. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden Antikörper in 2-5 ml PBS- Milch (5%) luftblasenfrei in Klarsichtfolien eingeschweißt und auf einem Taumler über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 30 min in PBS- Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran mit einem entsprechenden Sekundärantikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist in 2-5 ml PBS-Milch (5%) erneut in Klarsichtfolien eingeschweißt und auf einem Schüttler 90 min bei 4°C inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten von jeweils 15 min in PBS-Puffer erfolgte die Detektion gebundener Sekundärantikörper mit Hilfe des ECL™-Kits (Enhanced Chemoluminescence,

Amersham). Bei der Detektion erfolgt eine durch Peroxidase-katalysierte Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und gleichzeitig eine Oxidation von Luminol, was eine Licht-Emission der Wellenlänge  $\lambda=428$  nm zur Folge hat, die durch einen blaulichtempfindlichen ECL™-Film (Hyperfilm ECL™, Amersham) dokumentiert werden kann. Dazu wurde die Membran in einer Kunststoffschale mit den kurz vorher 1:1 gemischten ECL™-Lösungen 1 und 2 für eine Minute inkubiert, mit Whatman-Papier getrocknet und der ECL™-Film für die entsprechende Expositionszeit aufgelegt. Der Film wurde anschließend entwickelt, fixiert und zum Trocknen aufgehängt.

## **3.10 RNA- Techniken**

### **3.10.1 RNA- Isolierung aus eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung von Gesamt- RNA aus eukaryotischen Zellen wurden Monolayer- Zellen in 10 cm- Schalen bzw. in 6- Loch- Platten kultiviert. Nach Abnahme des Mediums von den Zellen wurde sofort 1 ml Lösung D auf die Zellen gegeben. Durch das in Lösung D enthaltene Guanidiniumthiocyanat werden im Zusammenwirken mit  $\beta$ - Mercaptoethanol und N-Guanosyl- Sarcosin die Zellen unmittelbar lysiert und gleichzeitig die Proteine, darunter auch Ribonukleasen, denaturiert. Anschließend wurden 0,1 ml 2M Natriumacetat (pH 4,0), 1 ml wassergesättigtes Phenol und 0,2 ml eines Chloroform- Isoamylalkohol- Gemisches (49:1) zupipettiert. Nach Zugabe jedes einzelnen Reagenz wurde der Ansatz durch Inversion gemischt. Letztendlich wurde das Gemisch für 10 sec kräftig geschüttelt, 15 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C abzentrifugiert (Heraeus Minifuge RF, 10000 rpm, 20 min). Danach wurde die RNA- enthaltende Oberphase (DNA befindet sich in der Interphase) vorsichtig abgenommen und in ein steriles Polypropylen- Röhrchen überführt. Zum Fällern der RNA wurde 1 ml 100% Isopropanol zugegeben, über Nacht bei -20°C inkubiert und die RNA durch Zentrifugation pelletiert (Heraeus Minifuge RF, 10000 rpm, 20 min). Anschließend wurde das Pellet in 0,3 ml Lösung D resuspendiert und mit 0,3 ml 100% Isopropanol für 1h bei -20°C erneut gefällt. Die durch Zentrifugation (Tischfuge, 10000 rpm, 10 min) pelletierte RNA wurde einmal in 70% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das gewonnene RNA- Pellet konnte nun in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gelöst und die Konzentration bestimmt werden (s. Kap.3.14.). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -70°C gelagert.

Ansatz der Stocklösung für die Lösung D:

- 250 g 4M Guanidiniumthiocyanat in 293 ml H<sub>2</sub>O lösen
- 17,6 ml 0,75M Natriumcitrat pH 7
- 26,4 ml 10% Sarcosyl

Zum Ansetzen der Lösung D wurden 0,36ml  $\beta$ - Mercaptoethanol mit der oben erwähnten Stocklösung auf 50 ml aufgefüllt (bei Raumtemperatur 1 Monat haltbar).

### 3.10.2 DNase- Verdau isolierter RNA

Zur Entfernung von DNA- Verunreinigungen aus der isolierten RNA wurde ein DNase- Verdau durchgeführt. Dazu wurde die RNA mit 3  $\mu$ l (30Units) RNase- freier DNase versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase inaktiviert (15 min, 70°C). Zur Kontrolle des DNase- Verdau wurde eine Alu- PCR durchgeführt. Alu- Sequenzen sind hochrepetitive Elemente des menschlichen Genoms, die allerdings nicht transkribiert werden und somit einen „Marker“ für genomische DNA darstellen.

### 3.10.3 Herstellung von cDNA: Reverse Transkription

Unter cDNA („complementary DNA“) versteht man die mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA transkribierte DNA. Als Startpunkt für die Erststrangsynthese dienen sog. „random Hexamer“- Oligonukleotide, die sich nach dem Zufallsprinzip entlang der RNA anlagern und so Startpunkte für die reverse Transkription definieren. An diese Oligonukleotide lagert sich nun die Reverse Transkriptase an und erstellt in Anwesenheit von dNTPs einen komplementären DNA- Strang.

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit Hilfe der Superscript III Reversen Transkriptase (Invitrogen). Die Reaktion wird nach Herstellerangaben mit 4  $\mu$ g zuvor DNase- verdauter

RNA durchgeführt. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch eine 15 minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene cDNA bei -20°C gelagert.

### **3.11 Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Absorptionsspektroskopie erlaubt die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung. Dabei ist von Bedeutung, dass Nukleinsäuren in Lösung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert einzelsträngige DNA aufgrund des Hyperchromizitätseffektes stärker als doppelsträngige DNA. Eine gemessene optische Dichte bei 260 nm von 1,0 (Schichtdicke der Küvette: 1cm) entspricht:

- bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml
- bei einzelsträngiger DNA und RNA einer Konzentration von 40µg/ml
- bei einzelsträngigen Oligonukleotiden einer Konzentration von 33µg/ml.

Proteine, die als Verunreinigung in DNA-Lösungen auftreten, besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der Nukleinsäurelösungen wurde der Quotient der Extinktionswerte bei 260 nm und bei 280 nm ermittelt ( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ ). Bei reinen DNA Lösungen liegt dieser Wert zwischen 1,65 und 1,85. Tiefere Werte sind ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten, höhere Werte zeigen größere Mengen an RNA an.

Für die Messung wurden 3,5 µl DNA-Lösung 1:100 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt, und die OD<sub>260</sub> und die OD<sub>280</sub> in einem Ultrospec 3000 Photometer (Pharmacia) gemessen. Als Referenzlösung diente H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>.

### 3.12 Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase- Kettenreaktion ist ein *in vitro*- Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Abfolge aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Es werden dabei die Eigenschaften von DNA- Polymerasen zur Hilfe genommen, die, ausgehend von einem DNA- Einzelstrang als Matrize (Template), einen neuen komplementären Strang synthetisieren können.

In einem ersten Schritt wird die zunächst doppelsträngige DNA bei 94°C vollständig denaturiert, d.h. in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). In einem zweiten Schritt erfolgt nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf eine geeignete Temperatur die spezifische Anlagerung der Oligonukleotide an den jeweiligen Einzelstrang (Annealing). Die Annealing-Temperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt und GC- Gehalt der verwendeten Primer- DNA. Sie wird für jeden Primer bestimmt und gemittelt. Meist liegen die Werte zwischen 51°C und 65°C. Die Oligonukleotide werden stets so gewählt, dass sie jeweils Start- und Endpunkt der zu amplifizierenden Sequenz definieren. Die angelagerten Oligonukleotide bilden einen kurzen doppelsträngigen DNA- Bereich mit einem freien 3'- Hydroxy- Ende, den die Polymerase für ihre Verlängerungsreaktion benötigt. Diese Reaktion, die auch als Elongation bezeichnet wird, findet bei der für das Enzym optimalen Temperatur (72°C) und in Gegenwart der zur Synthese benötigten dNTPs (Desoxyribonukleotide) statt. Die neusynthetisierten DNA- Stränge sind zunächst von unbestimmter Länge, besitzen jedoch durch die Primer definierte Ausgangspunkte, die so den zu amplifizierenden Sequenzbereich genau festlegen.

Bei dem zweiten Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese) wird die DNA wieder aufgeschmolzen. Es entstehen nun zwei Typen von Tochtersträngen: zum einen die beiden ursprünglichen einzelsträngigen DNA-Templates und zum anderen die neusynthetisierten Stränge, deren 5' Ende einer der beiden Primer darstellt. In diesem zweiten Zyklus dienen beide Typen als Template. Ab dem dritten Zyklus entstehen dann Fragmente, die die gewünschte Länge aufweisen und ab dem vierten Zyklus vermehrt sich die Zielsequenz exponentiell, weil jeder neusynthetisierte Strang als Matrize dient. Durch eine 20-40malige Wiederholung dieser Reaktion würde theoretisch nach 30 PCR-Zyklen eine 27 millionenfache Amplifikation der Fragmente erwartet werden. Dieses Ergebnis wird allerdings nicht erreicht, weil limitierende Faktoren, wie abnehmende Enzymaktivität und steigende DNA-Konzentration zu ungünstigen Reaktionsbedingungen führen. Mittels einer PCR lassen sich auch spezifisch Mutationen in die DNA einfügen, da die Primer auch dann

noch an das Template binden, wenn die Sequenz nicht vollkommen übereinstimmt. Verwendet werden sogenannte „mutagene Primer“, die Mutationen in die Endbereiche der Amplifikate einbauen. Die Taq- Polymerase, welche für die PCR verwendet wurde, stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Da es sich hierbei um ein thermophiles Bakterium handelt, hat dessen DNA- Polymerase ein Temperaturoptimum von 72°C und ist darüber hinaus für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil. Dies ist Voraussetzung dafür, dass alle notwendigen Reaktionsschritte ohne Zerstörung des Enzyms im gleichen Reaktionsansatz automatisiert durchgeführt werden können.

Bei der Auswahl der Primerpaare wurde berücksichtigt, dass die Primer möglichst ähnliche Schmelztemperaturen besaßen, keine Selbstkomplementarität aufwiesen und keine Sekundärstrukturen ausbilden konnten.

Die verwendeten Primer wurden in lyophilisierter Form von der Firma Operon bezogen, in sterilem Wasser aufgenommen und in einer Endkonzentration von 1 µM in der PCR eingesetzt. Zur Durchführung der PCR wurde der Thermocycler PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) der Firma MJ Research verwendet.

Der PCR- Ansatz wurde nach folgendem Schema in 500 µl- PCR- Gefäße pipettiert:

**Tabelle 3.2: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
<b>10xReaktionspuffer</b>	5 µl	1x
<b>dNTP mix (10 mM)</b>	1 µl	200 µM
<b>5'-Primer</b>	1 µl	100 µM/µl
<b>3'-Primer</b>	1 µl	100 µM/µl
<b>cDNA</b>	5 µl	0,2 µg
<b>Taq Polymerase</b>	0,5 µl	2,5 U
<b>H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>st</b>	ad 50 µl	

Zur Überprüfung auf etwaige Kontaminationen wurde stets ein H<sub>2</sub>O- Kontrollansatz (komplett, aber ohne Template- DNA) angesetzt. Abschließend wurden jeweils 25 µl eines Reaktionsansatzes im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 3.3: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für die Gene *Bax*, *Bak*, *Noxa* und *Redd 1***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	3 min.
Denaturierung	95°C	30 sec. } x 35 30 sec. } 30 sec. }
Annealing	65°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 3.4: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen *p21***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min.
Denaturierung	94°C	50 sec. } x 25 50 sec. } 1 min. }
Annealing	64°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 3.5: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für die Gene *Stathmin*, *Survivin* und *Gadd 45***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min.
Denaturierung	94°C	50 sec. } x 30 50 sec. } 3 min. }
Annealing	58°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

Tabelle 3.6: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen *DINP1a*

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min.
Denaturierung	94°C	50 sec.
Annealing	58°C	50 sec.
Extension	72°C	3 min.
		} x 32
Letzte Extension	72°C	10 min.

Tabelle 3.7: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen *Puma*

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min.
Denaturierung	94°C	50 sec.
Annealing	59°C	50 sec.
Extension	72°C	3 min.
		} x 40
Letzte Extension	72°C	10 min.

Tabelle 3.8: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen *PIG3*

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min.
Denaturierung	94°C	50 sec.
Annealing	58°C	50 sec.
Extension	72°C	3 min.
		} x 35
Letzte Extension	72°C	10 min.



**Tabelle 3.9: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen *GAPDH***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	3 min.
Denaturierung Annealing Extension	95°C 65°C 72°C	30 sec. 30 sec. 30 sec. } x 22
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 3.10: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen *HPRT***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min.
Denaturierung Annealing Extension	94°C 60°C 72°C	30 sec. 30 sec. 1 min. } x 29
Letzte Extension	72°C	3 min.

**Tabelle 3.11: Schema des verwendeten PCR Standardprogramms für das Gen  *$\beta$ -Actin***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min.
Denaturierung Annealing Extension	94°C 62°C 72°C	30 sec. 30 sec. 30 sec. } x 30
Letzte Extension	72°C	5 min.

### 3.13 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

(Maniatis, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese ist die am häufigsten verwendete Technik, um Nukleinsäuren aufzutrennen und DNA Fragmente unterschiedlicher Größe sichtbar zu machen. DNA ist wegen des Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandert im elektrischen Feld auf die Anode zu. Agarosegele wirken dabei wie Molekularsiebe. Sie bewirken, dass kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern, als große. Das konstante Masse-Ladungs-Verhältnis führt zu einer Auftrennung der DNA Fragmente entsprechend ihres Molekulargewichts. Daraus folgt, dass durch die Wahl einer geeigneten Agarosekonzentration eine optimale Auftrennung der DNA Moleküle erreicht werden kann. Je geringer die Agarosekonzentration ist, desto größer sind auch die Poren der Gelmatrix. Einfluss auf das Laufverhalten der DNA haben neben der Voltzahl, der Stromstärke, der Temperatur usw. auch die Konformation der DNA Moleküle. Die Konformation kann kovalent geschlossen und ringförmig (coiled und supercoiled Form) sein oder offen und linear. Die supercoiled Form wandert am schnellsten, während die offene lineare Form etwas langsamer ist. Als Puffer wurde Tris-Acetat-Puffer (TAE) verwendet. Die Anfärbung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dieser interkaliert in doppelsträngige DNA, sodass die DNA-Fragmente unter UV-Licht als orange gefärbte Banden erkennbar und dokumentierbar sind.

#### 3.13.1 Herstellung eines Agarosegels

Da der Auftrennungsbereich der Gelelektrophorese von der Porengröße, folglich von der Dichte der Gelmatrix, abhängt, wird der Auftrennungsbereich über die Agarosekonzentration, also die Menge der eingesetzten Agarose bestimmt. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto kleiner ist die Porengröße. In dieser Arbeit wurden aufgrund der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente ausschließlich 2%ige Agarosegele verwendet.

Die benötigte Agarosemenge wurde in dem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer unter Kochen aufgelöst. Nachdem der Ansatz auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben und der Ansatz in die vorbereitete Gießapparatur

gegossen. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde dieses bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

**Tabelle 3.12: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche**

Agarosemenge (%)	DNA-Trennbereich (kbp)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2	3-0,1

### 3.13.2 Agarosegelelektrophorese

Vor der Auftrennung wurden die Proben mit 5x Probenpuffer versetzt. Das darin enthaltene EDTA inaktiviert als Chelatkomplexbildner Enzyme, indem es den Enzymen, die für ihre Funktion essentiellen divalenten Kationen entzieht. Der enthaltene Farbstoff Bromphenolblau dient der Erkennung der Lauffront der DNA im Gel, während Glycerol ein Absinken der Proben in die Geltaschen gewährleistet. Aufgrund dieser Funktionen wird der Blaumarker auch als „Stopp- Lade- Mix“ bezeichnet.

Anschließend wurde das Gelstück in benötigter Größe in eine horizontale, mit 1x TAE- Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die Geltaschen mit den DNA- Proben beladen. Parallel dazu wurde eine Markerspur (10 µl 1 kb plus DNA ladder<sup>TM</sup> (Life technologies) zum Größenvergleich der Fragmente aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (1 h, 110 V) wurden die DNA- Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in DNA interkaliert, waren DNA- Fragmente nach dem Gellauf unter UV- Licht als orangefarbene Banden erkennbar. Die Gele wurden unter kurzwelligem UV- Licht betrachtet ( $\lambda = 254$  nm). Zur Dokumentation wurde ein digitalisiertes System eingesetzt (MWG Biotech Gel Print 2000i), bei dem Gele mit Hilfe einer CCD- Kamera aufgenommen und anschließend entweder auf digitalem Medium gespeichert oder auf einem Thermodrucker wiedergegeben wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Repression des NIR Gens

Um die Bedeutung des neuen INHAT- Repressors NIR für die Regulation p53 regulierter Gene zu untersuchen, war es notwendig, in den ausgewählten Tumorzelllinien eine signifikante Reduktion von NIR zu induzieren. Da wir nicht auf eine Zelllinie zurückgreifen konnten, in der das NIR- Gen durch homologe Rekombination ausgeschaltet worden war, nahmen wir uns vor, mit Hilfe der RNA- Interferenz eine Repression des Proteins zu erreichen.

#### 4.1.1 RNA- Interferenz

Die RNA- Interferenz, ein Mechanismus der Zelle zur Abwehr gegen virale Infektionen, ist eine der Möglichkeiten zur Stilllegung von Genen (Fire et al., 1998).

Die Zelle ist befähigt, einen aus über 200 Nukleotiden bestehenden, Virusgen- spezifischen RNA- Doppelstrang mit Hilfe eines RNase III ähnlichen Enzyms namens Dicer in ca. 19-21 Nukleotide lange „small interfering“ RNA- Stücke (siRNA) zu spalten. Diese werden von dem sogenannten „RNA- Induced Silencing Complex“ (RISC) gebunden, welcher eine Endoribonuklease Aktivität aufweist. Daraufhin erfolgt eine Aktivierung des RISC- Komplexes mit anschließender Entwindung der siRNA Duplex, wobei nur noch der antisense Strang mit dem RISC verbunden bleibt. Dieser Komplex aus aktiviertem RISC und antisense- Strang der siRNA vermag nun einen komplementären mRNA- Strang zu binden. Die gebundene, komplementäre mRNA kann dann ebenfalls gespalten werden, was zum posttranskriptionellen Ausschalten des Gens durch RNA- Abbau führt.

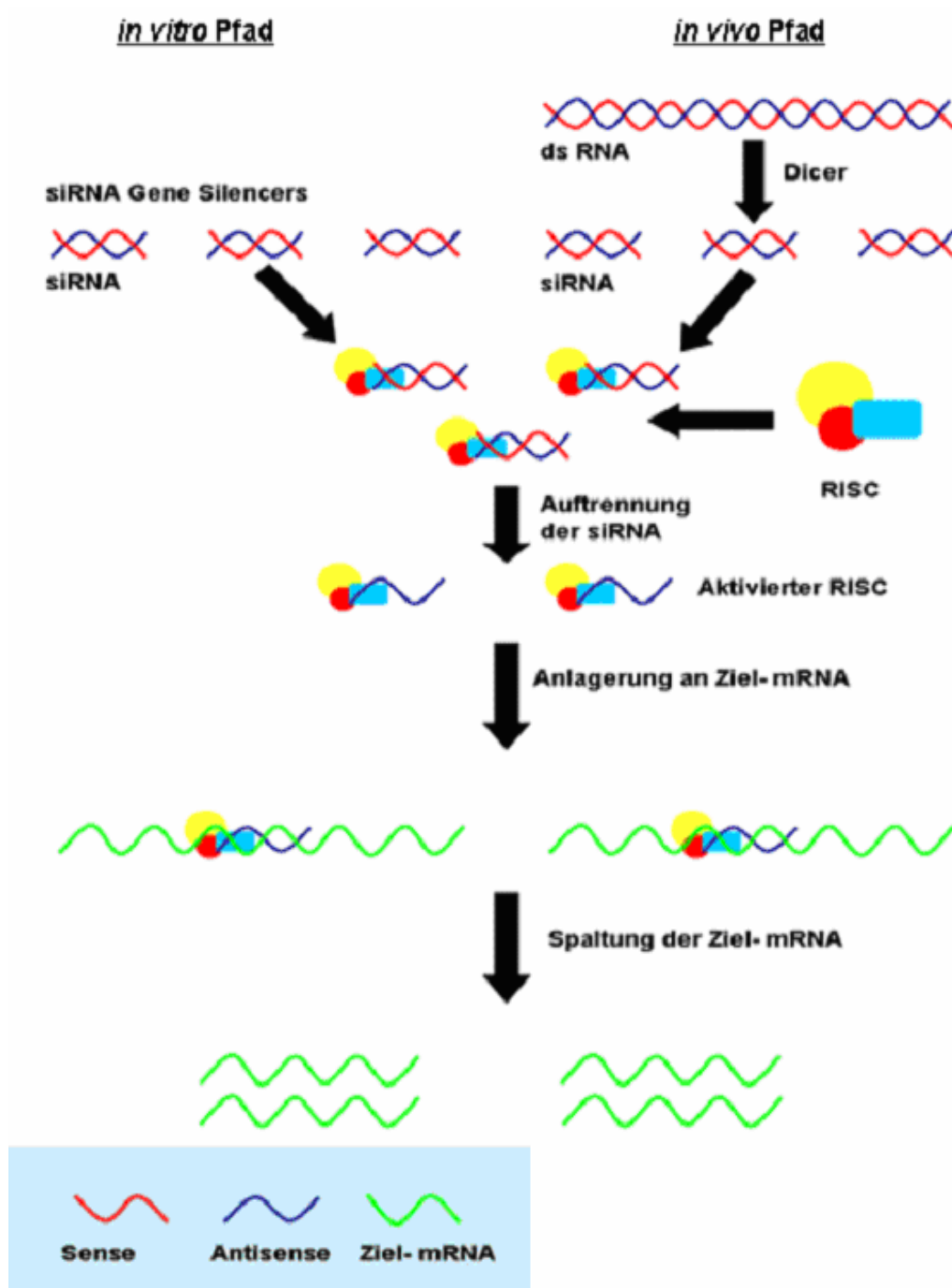
1999 gelang es der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Tuschl, eine RNA- Interferenz mittels synthetisch hergestellter, 19-21 bp großen siRNAs *in vitro* zu reproduzieren (Elbashir et al., 2001). Die Entdeckung und die Fähigkeit zur Herstellung der kurzen Doppelstrang RNA- Stücke erlangte von da an große Bedeutung bei der Stilllegung von Genen. Das zuvor

---

erforschte Einbringen langer genspezifischer Doppelstrang- RNA in Zellen, welche normalerweise den Ausgangspunkt für eine physiologische RNA- Interferenz darstellen, erwies sich wegen der Aktivierung des Interferon- Pathways als hochgradig toxisch (Hunter et al., 1975).

Ein Nachteil bei der Anwendung dieser kurzen Doppelstrang- RNA- Stücke ist jedoch, dass die erzielte Repression des entsprechenden Gens nur transient, das heißt von kurzer Dauer ist. Mit Hilfe einer stabilen Kotransfektion mit dem Expressionsvektor pSUPER besteht seit 2002 die Möglichkeit, eine längerfristige Repression eines Gens mittels RNA- Interferenz zu erreichen (Brummelkamp et al., 2002).

In der folgenden Abbildung werden die Vorgänge der RNA-Interferenz, wie sie für unsere Zwecke angewendet wurde, beschrieben.



**Abb.4.1: Funktionsprinzip der RNA- Interferenz:**

Synthetisch hergestellte siRNAs werden mittels eines Transfektionsreagenz von außen in die Zelle verbracht. Diese verbinden sich mit einem Endoribonuklease- Komplex namens RISC (RNA- Induced Silencing Complex). Daraufhin erfolgt eine Aktivierung des RISC- Komplexes mit anschließender Entwindung der siRNA Duplex, wobei nur noch der antisense Strang mit dem RISC verbunden bleibt. Dieser Komplex aus aktiviertem RISC und antisense- Strang der siRNA verbindet sich mit der dem antisense Strang komplementären mRNA, was zum posttranskriptionellen Ausschalten des Gens durch Degradation der mRNA führt.

## 4.2 Transiente RNA-Interferenztechnik mittels synthetisch hergestellter siRNAs

Die Sequenz der beiden NIR siRNAs stammt aus einer gemeinsamen Veröffentlichung der Arbeitsgruppen Schüle und Roemer (Hublitz et al., 2005), die diese siRNAs bereits erfolgreich in HCT116 Zellen eingesetzt hatten.

Das Einbringen der siRNAs in die humanen kolorektalen Adenokarzinom- Zelllinien HCT116 wt, HCT116 p53-/- und die humane Mammakarzinom- Zelllinie MCF7 Zellen erfolgte mittels Transfektion mit RNAiFect<sup>®</sup> der Firma Qiagen.

Da unsere Arbeitsgruppe bereits in Vorversuchen unter Zuhilfenahme des Versuchsprotokolls des Herstellers keine ausreichenden Transfektionsergebnisse erzielen konnte, mussten wir das Transfektionsprotokoll zunächst entsprechend anpassen:

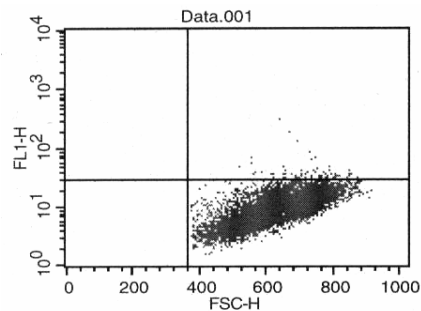
Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  MCF7 Zellen, sowie  $3 \times 10^5$  HCT116 wt und HCT116 p53-/- Zellen auf 35 mm- Platten (6- Loch Platten) ausgesät, so dass sie am darauffolgenden Tag eine Konfluenz von ca. 40-60% erreicht hatten.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst das sich auf den Zellen befindende Medium abgenommen und pro 35 mm Platte 600  $\mu$ l neues Nährmedium vorsichtig hinzugegeben. Im Anschluss wurden pro Transfektionsansatz (ein Ansatz entspricht einer 35 mm Platte) 98  $\mu$ l Transfektionspuffer in ein Eppendorfgefäß vorgelegt. Zu diesem Puffer wurden 2  $\mu$ l (= 2 $\mu$ g) NIR siRNA sowie 12  $\mu$ l RNAiFect<sup>®</sup> Transfektionsreagenz hinzugegeben und durch vorsichtiges, mehrmaliges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt. Dieses Gemisch wurde für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich die Transfektionskomplexe bilden konnten. Das Reaktionsgemisch mit FITC- gekoppelter siRNA sollte während der Inkubationszeit aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit dunkel gestellt werden.

Anschließend wurde das Transfektionsgemisch unter leichtem Schwenken auf die Platten getropft. 5 Stunden nach Transfektion wurden auf jede 35 mm Platte 1,3 ml Nährmedium zu den 600  $\mu$ l Medium und den 114  $\mu$ l Transfektionsgemisch hinzugegeben und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen, die mit FITC- gekoppelter Kontroll siRNA zur Bestimmung der Transfektionseffizienz transfiziert worden waren, erhielten kein zusätzliches Nährmedium.

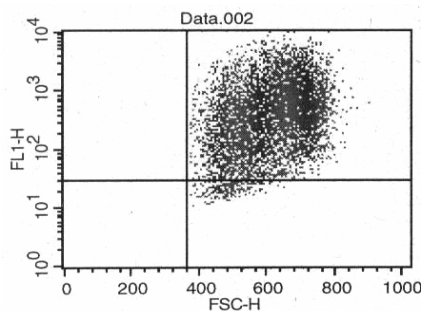
### 4.3 Transfektionseffizienzen

Vor der eigentlichen Transfektion der NIR siRNA war es von Bedeutung, zunächst die Transfektionseffizienz der einzusetzenden Tumorzelllinien HCT116 wt, HCT116 p53 -/- sowie den MCF7 bezüglich der siRNAs zu überprüfen. Dies war deshalb besonders wichtig, weil nur in den transfizierten Zellen eine Proteinreduktion zu erwarten war und diese vor einem relativ großen Hintergrund untransfizierter Zellen (mit normalen Proteinmengen) nur sehr schwer nachweisbar gewesen wäre. Dazu wurden die Zellen nach dem im Kapitel 3.4.1. beschriebenen Protokoll mit einer Fluoreszein (FITC)- gekoppelten Kontroll siRNA transfiziert und 5 Stunden nach Transfektion ihre Absorptionsrate bestimmt. Als Referenz dienten jeweils mit einer irrelevanten siRNA kontrolltransfizierte Zellen. Die Auswertung erfolgte mittels FACS- Analyse. Die Anregung der FITC- Moleküle erfolgte bei 480 nm, das Emissionsmaximum betrug 530 nm. Sowohl die Zellen für die Messung der Transfektionseffizienz als auch die Zellen für die Transfektion mit der eigentlichen NIR-siRNA wurden am gleichen Tag ausgesät und stammten somit aus derselben „Zellcharge“. Außerdem erfolgten beide Transfektionen zeitgleich, so dass man davon ausgehen konnte, dass das erhaltene Ergebnis der Transfektionsrate auch auf die NIR siRNA transfizierten Zellen übertragbar sein würde.



File: Data.001  
 Gate: G1  
 Total Events: 10000  
 Y Parameter: FL1-H (Log)  
 Acquisition Date: 23-Aug-05  
 Gated Events: 7522  
 X Parameter: FSC-H (Linear)  
 Quad Location: 365, 29

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	76	1.01	0.76
LL	0	0.00	0.00
LR	7446	98.99	74.46

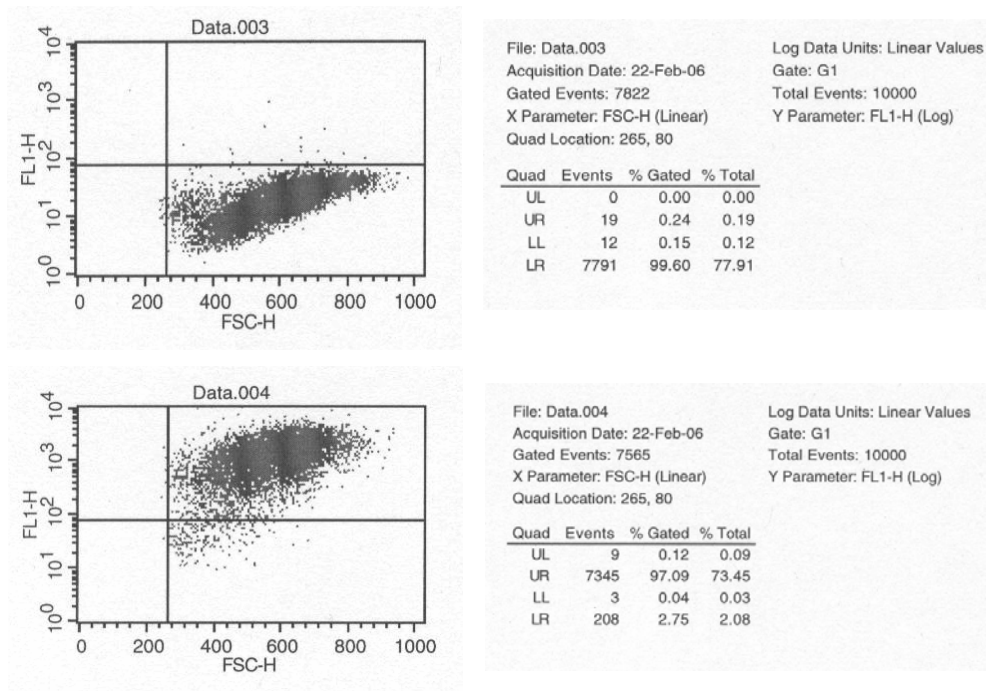


File: Data.002  
 Gate: G1  
 Total Events: 10000  
 Y Parameter: FL1-H (Log)  
 Acquisition Date: 23-Aug-05  
 Gated Events: 6079  
 X Parameter: FSC-H (Linear)  
 Quad Location: 365, 29

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	5807	95.53	58.07
LL	0	0.00	0.00
LR	272	4.47	2.72

**Abb.4.2: Transfektionseffizienz der HCT116 wt Zellen für siRNA:** 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Emissionsrate in einer FACS- Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca .95%.





**Abb.4.3: Transfektionseffizienz der HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen für siRNA:** 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Emissionsrate in einer FACS- Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca. 97%.

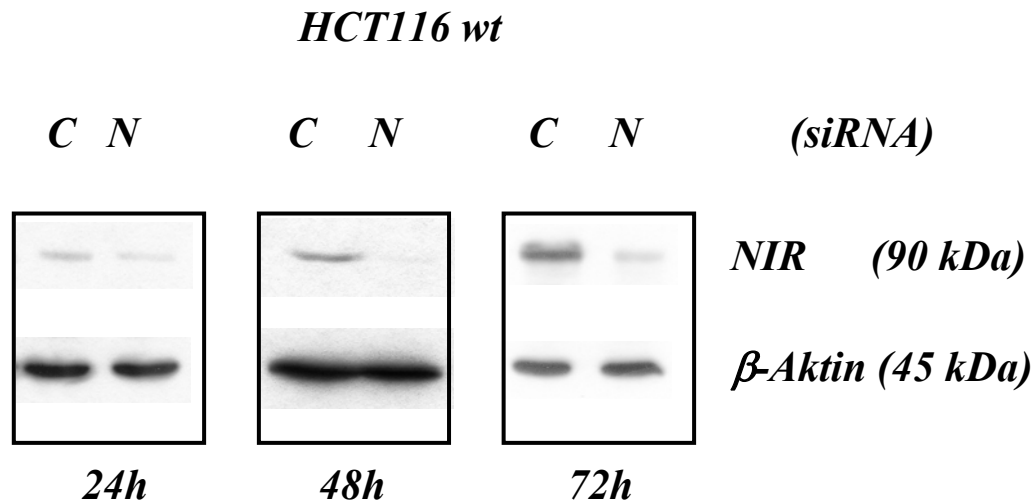
Um eine effiziente Reduktion der zellulären NIR- Level mittels RNA- Interferenztechnik nachweisen zu können, waren Transfektionsraten von mindestens 85% notwendig. Die Untersuchungen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS- Analyse ergaben bei beiden verwendeten Zelllinien eine hinreichend hohe Transfektionsrate zwischen 93% und 100%.

#### 4.4 NIR- Repression in den Zelllinien HCT116 wt und HCT116 p53-/-

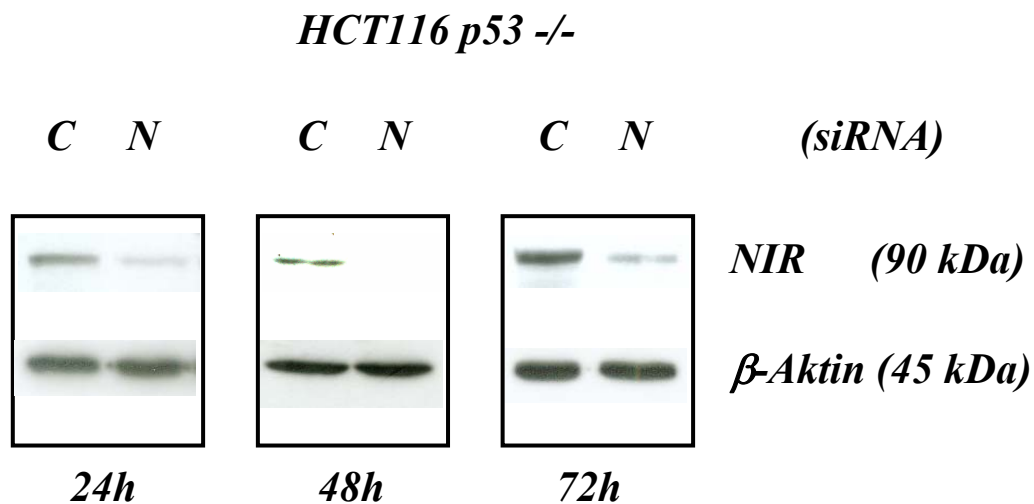
Nachdem die Bestimmung der Transfektionseffizienzen ein mehr als ausreichendes Ergebnis erbracht hatte, erfolgten die Transfektionen der Zelllinien HCT116 wt, und HCT116 p53-/- mit der NIR siRNA. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden bereits Verlaufsanalysen bezüglich der Repression eines Proteins mittels synthetischer siRNA über mehrere Tage durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der ersten drei Tage nach Transfektion zu einer beachtlichen Reduktion des zu reprimierenden Proteins kommt. Ab dem vierten Tag war aufgrund der transienten Wirkung der siRNA oftmals keine signifikante Verringerung des Proteins mehr feststellbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse legten wir den Untersuchungszeitraum auf die ersten drei Tage nach Transfektion der NIR siRNA fest. Hierzu befolgten wir das in Kapitel 3.4.1. beschriebene Protokoll. 24, 48 und 72 Stunden post transfectionem (p.t.) isolierten wir die Gesamtzellproteinextrakte und bestimmten den NIR- Protein- Gehalt der transfizierten Zellen in einem Western-Immunoblot- Verfahren. Zusätzlich zu den extrahierten Proteinen aus dem Zeitverlauf wurden Proteinextrakte aus Zellen aufgetragen, die mit einer non- silencing siRNA kontrolltransfiziert worden waren. Dieser Wert galt als Referenzwert zur Beurteilung des Grades der Repression von NIR. Wie dem Ergebnis des Western Blots (s. Abb. 4.4.) entnommen werden kann, war 24, 48 und 72 Stunden post transfectionem eine Reduktion des NIR Proteins in den HCT116 wt Zellen um ca. 70% (Ermittlung des Grades der Repression von NIR durch densitometrisches Scannen) festzustellen. Das NIR- Protein hat ein Molekulargewicht von 90 kDa. Als Kontrolle für die Beladung des Gels wurde das nicht reprimierte, ubiquitär exprimierte  $\beta$ - Aktin nachgewiesen.

Analog zu diesem Versuch erfolgte die Versuchsanordnung in den p53 negativen HCT116 Zellen (s.Abb. 4.5.). Auch hier wurde neben den extrahierten Proteinen aus dem Zeitverlauf, ein Proteinextrakt aus Zellen aufgetragen, die mit einer non- silencing control siRNA transfiziert worden waren. Dieser Wert galt wiederum als Referenzwert zur Beurteilung des Grades der Repression von NIR. In dieser Zelllinie konnten die zellulären NIR- Level 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion einer NIR siRNA ebenfalls um ca. 70% reduziert werden (Ermittlung des Grades der Repression von NIR durch densitometrisches Scannen).



**Abb.4.4: NIR knockdown in HCT116 wt Zellen:** HCT116 wt Zellen wurden mit einer NIR siRNA (N) und non-silencing control siRNA (C) transfiziert. 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden Proteinextrakte angefertigt, über ein 13% iges SDS Gel aufgetrennt und im Western Blot auf Reduktion des NIR Proteins mit monoklonalen NIR- AK untersucht. Zum Nachweis, dass gleiche Proteinmengen in den Extrakten vorhanden waren, wurde der Blot zusätzlich mit  $\beta$ - Aktin- AK behandelt. Als Sekundärantikörper dienten Anti- Kaninchen-Pox und Anti- Maus- Pox. Die Detektion erfolgte mittels ECL- Färbung.



**Abb.4.5: NIR knockdown in HCT116 p53-/- Zellen:** HCT116 p53-/- Zellen wurden mit einer NIR siRNA (N) und non silencing control siRNA (C) transfiziert. 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden Proteinextrakte angefertigt, über ein 13% iges SDS- Gel aufgetrennt und im Western Blot auf Reduktion des NIR Proteins mit monoklonalen NIR- AK untersucht. Zum Nachweis, dass gleiche Proteinmengen in den Extrakten vorhanden waren, wurde der Blot zusätzlich mit  $\beta$ - Aktin- AK behandelt. Als Sekundärantikörper dienten Anti- Kaninchen-Pox und Anti- Maus- Pox. Die Detektion erfolgte mittels ECL- Färbung.

## **4.5 Untersuchungen zur Expressionsanalyse p53- regulierter Gene unter NIR knockdown**

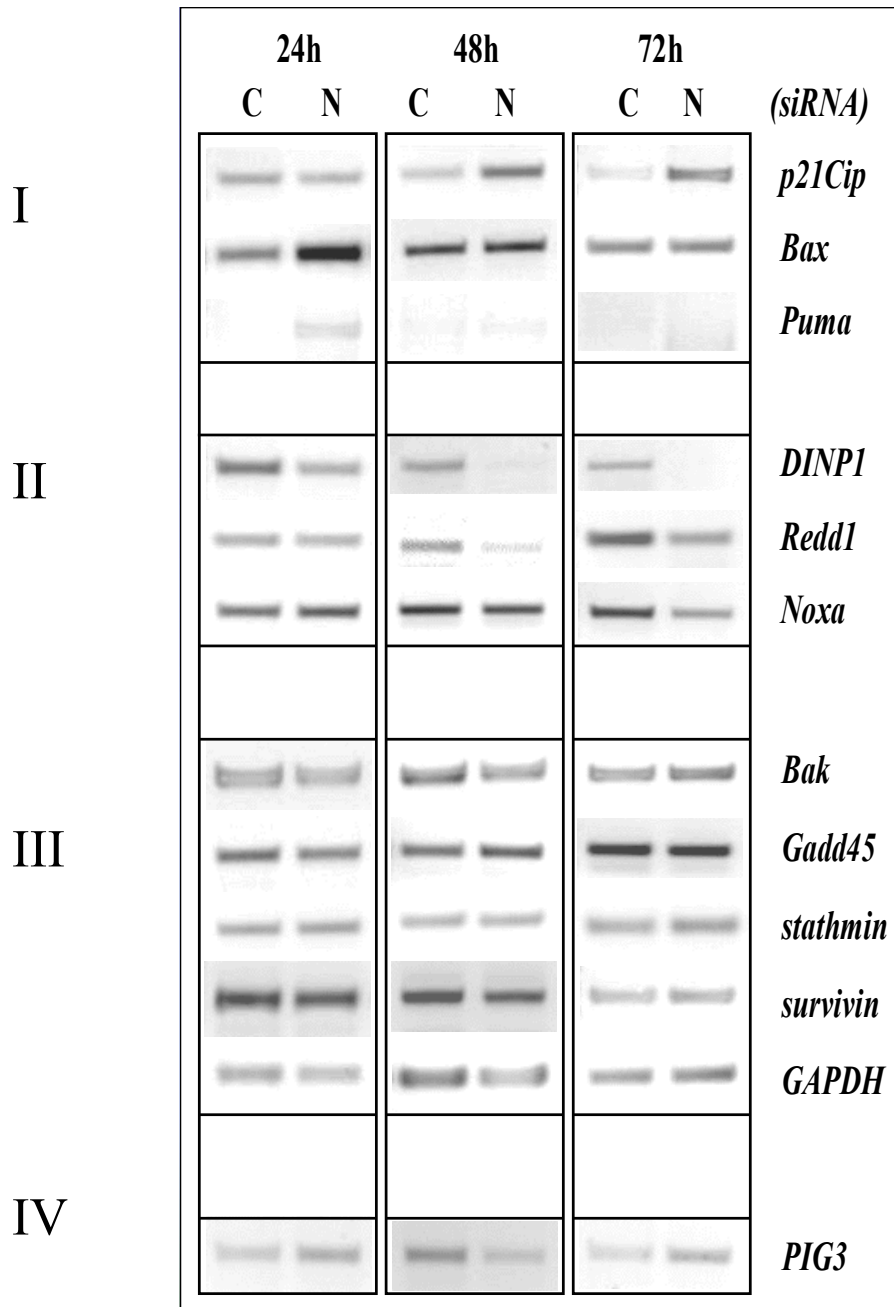
### **4.5.1 Semiquantitative RT- PCRs in HCT116 wt Zellen nach Transfektion einer NIR siRNA**

Nachdem wir durch RNA- Interferenz eine deutliche Repression der zellulären NIR- Level erzielen konnten, widmeten wir uns den Untersuchungen bezüglich der Veränderungen der Expression p53- regulierter Gene unter NIR knockdown.

Dazu transfizierten wir HCT116 wt Zellen gemäß dem Protokoll aus Kapitel 4.2. mit zwei verschiedenen NIR siRNAs. Durch die gleichzeitige Anwendung von zwei unterschiedlichen NIR siRNAs konnten wir in zahlreichen Vorversuchen eine bessere Repression von NIR erzielen, als nach Transfektion von nur einer NIR siRNA. Zur Beurteilung des Grades der Repression von NIR wurden wie bereits schon erwähnt weitere HCT116 wt Zellen mit einer non silencing siRNA kontrolltransfiziert. 24, 48 und 72 Stunden post transfectionem isolierten wir gemäß dem Protokoll aus Kapitel 3.10.1. Gesamt- RNA sowie nach dem Protokoll aus Kapitel 3.7. Gesamtzellproteinextrakte, um zunächst mittels Western Blot Analyse eine erfolgreiche Repression von NIR in diesem Versuch darzustellen.

Nach Bestimmung der Endkonzentration der Gesamt- RNA wurde diese DNase verdaut (s. Kap. 3.10.2.) und anschließend unter Zuhilfenahme des Enzyms Reverse Transkriptase (s. Kap. 3.10.3.) in cDNA umgeschrieben. Pro Reaktionsansatz setzten wir 2 µg RNA ein. Als Startpunkt für die Erststrangsynthese dienten sog. „random Hexamer“- Oligonukleotide, die sich nach dem Zufallsprinzip entlang der RNA anlagern und so Startpunkte für die reverse Transkription definieren. An diese Oligonukleotide lagerte sich nun die reverse Transkriptase an und erstellte in Anwesenheit von dNTPs einen komplementären DNA- Strang.

Im Anschluss wurde die so erhaltene Erststrang- cDNA für die verschiedenen PCR- Reaktionen eingesetzt. Die verwendeten PCR- Programme sind in Kapitel 3.12. aufgelistet. Jede PCR der zu untersuchenden Gene wurde mehrmals und mit verschiedenen Ansätzen aus unterschiedlichen RT- Reaktionen durchgeführt.



**Abb.4.6: Semiquantitative RT- PCRs in HCT116 wt Zellen unter NIR knockdown:**

24, 48 und 72 Stunden nach NIR knockdown zeigte sich eine komplexe Regulation der Expression verschiedener p53- regulierter Gene. Es können Gene unterschieden werden, die hochreguliert (I), herunterreguliert (II), nicht erkennbar verändert (III) oder eine komplexe Expression unter NIR knockdown (IV) aufweisen. Zur Beurteilung des Grades der Repression von NIR diente Gesamt- RNA von HCT116 wt- Zellen, die mit einer non silencing siRNA kontrolltransfiziert worden waren. (C= Kontroll siRNA; N= NIR siRNA)

Dabei konnte eine sehr variable Regulation der verschiedenen Gene in den HCT116 wt Zellen festgestellt werden (s. Abb. 4.6.). Die beiden proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bax und Puma sowie der Inhibitor Cyclin- abhängiger Kinasen p21 bilden eine Gruppe von Genen, die unter NIR knockdown einer Hochregulation unterliegen. Bax und Puma zeigen bereits 24 Stunden post transfectionem einen transienten Anstieg in ihrer Expression, während p21 erst 48 Stunden nach Transfektion einen Anstieg verzeichnen lässt.

Die beiden Gene p53DINP1 $\alpha$  und Redd1 zeigen hingegen an allen 3 Tagen eine deutliche Herunterregulation unter NIR knockdown, während das proapoptotische Bcl-2 Protein Noxa erst 72 Stunden post transfectionem in seiner Expression abnimmt. 24 und 48 Stunden nach Transfektion bleibt die Expression von Noxa unter NIR knockdown gleich.

Im Vergleich zu diesen beiden Gruppen von Genen konnten auch solche p53 regulierte Sequenzen identifiziert werden, die an allen drei Tagen eine konstante Expression aufweisen. Zu diesen Genen gehören Bak, Gadd45 sowie die beiden Apoptose- Inhibitoren Survivin und Stathmin. Das nicht p53- abhängige „house keeping“ Gen GAPDH zeigte wie erwartet post transfectionem keine Veränderungen auf.

Das durch p53 induzierbare Gen PIG3 lässt sowohl eine Hoch- als auch eine Herunterregulation unter NIR knockdown erkennen und ist somit komplex reguliert.

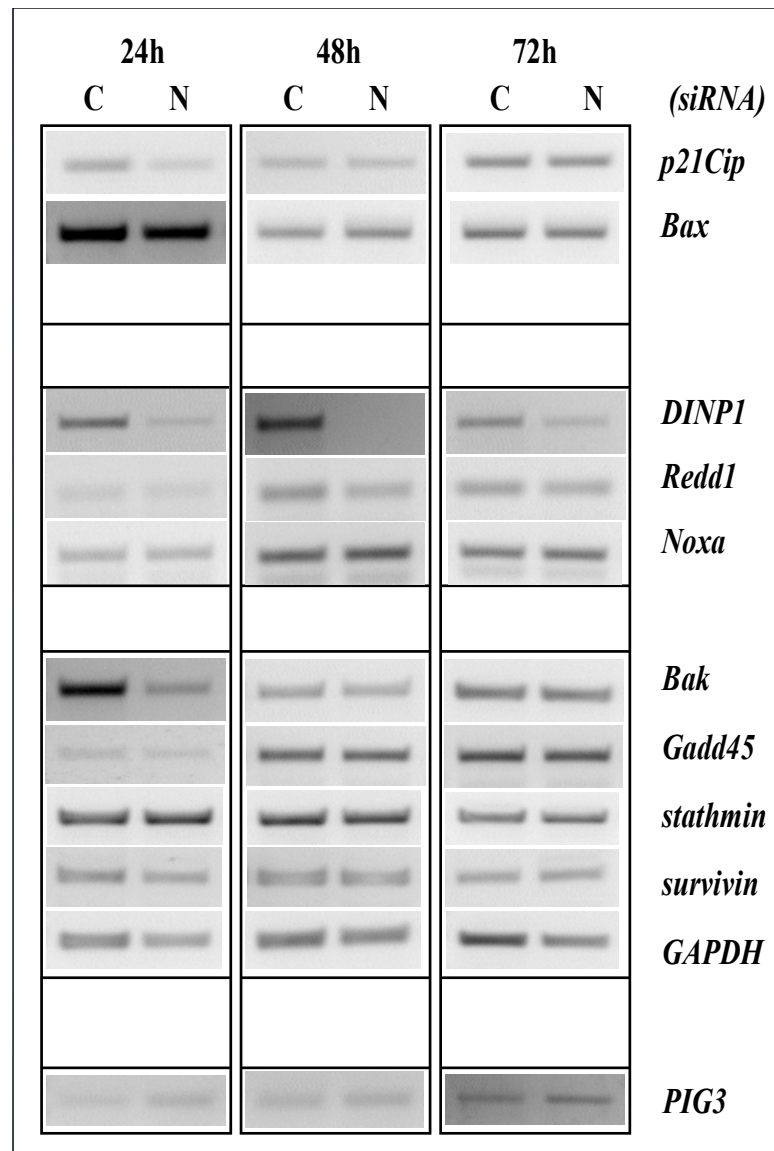
#### 4.5.2 Semiquantitative RT- PCRs in HCT116 p53-/- Zellen nach Transfektion einer NIR siRNA

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die beobachteten Veränderungen der Genexpression in den HCT116 wt Zellen durch den Tumorsuppressor p53 vermittelt werden oder p53- unabhängig sind. Dazu verwendeten wir isogene HCT116 p53 -/- Zellen, in denen das *p53*- Gen durch gerichtete, homologe Rekombination ausgeschaltet worden war. Die Versuchsanordnung erfolgte analog zu Kapitel 3.4.1.

Anhand der in Abbildung 4.7. dargestellten Resultate ist zu erkennen, dass die Mehrzahl der untersuchten Gene unter NIR knockdown in diesen Zellen keine Veränderungen in ihrem Expressionsprofil an allen drei Tagen nach Transfektion einer NIR siRNA aufweisen. Dies deutet daraufhin, dass die in den HCT116 wt Zellen beobachteten Veränderungen der Genexpression größtenteils tatsächlich über p53 vermittelt werden. Eine Ausnahme bildet p53DINP1 $\alpha$ , dessen Herunterregulation unter NIR knockdown von p53 unabhängig zu sein scheint. Offenbar ist NIR an der Genregulation auch anderer, nicht durch p53 regulierter Sequenzen beteiligt.

Bezüglich des *Puma*- Gens konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse in den HCT116 p53-/- Zellen erzielt werden.

Alle, den Daten für die HCT116 wt und HCT116 p53-/- Zellen zugrundeliegenden RT- PCRs wurden pro Transfektionsansatz dreifach durchgeführt. Die eingesetzte RNA entstammte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen.



**Abb.4.7: Semiquantitative RT-PCRs in HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen unter NIR knockdown:**

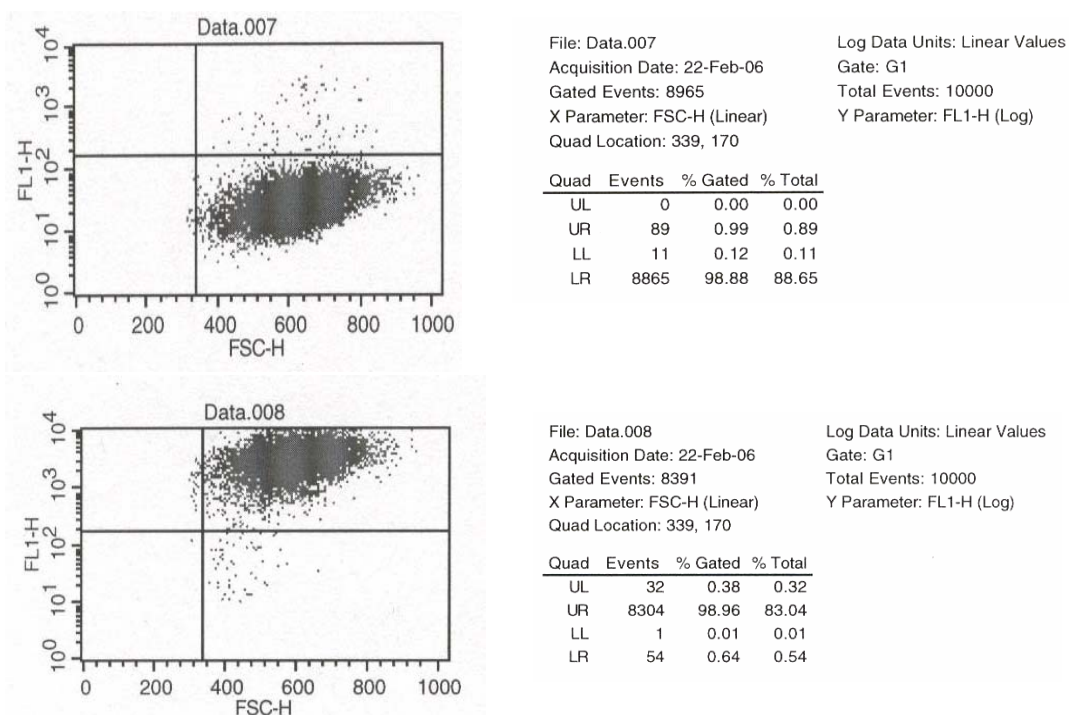
Nach Transfektion einer NIR siRNA (N) konnten bei der Mehrzahl der untersuchten Gene keine signifikanten Veränderungen im Expressionsprofil festgestellt werden. Eine Ausnahme bildet DINP1 $\alpha$ . Zur Beurteilung des Grades der Repression von NIR diente Gesamt-RNA von p53 negativen HCT116 Zellen, die mit einer non silencing siRNA (C) kontrolltransfiziert worden waren.



### 4.5.3 Semiquantitative RT- PCRs in MCF7 Zellen nach Transfektion einer NIR siRNA

Nach der erfolgreichen Untersuchung von HCT116 wt Zellen stellte sich die Frage, ob die erzielten Ergebnisse zelltypspezifisch oder in einer anderen Tumorzelllinie reproduzierbar sind. Folglich benötigten wir zur Durchführung unserer Versuche eine Tumorzelllinie, die ebenso wie die HCT116 wt Zellen über einen intakten p53- Pathway verfügten. Dieser Voraussetzung entsprachen die MCF7- Zellen. Es handelt sich hierbei um humane Mammakarzinomzellen (s. Kap. 2.6.4).

Zunächst war es auch hier wichtig, eine ausreichend hohe Transfektionsrate von mindestens 85% bezüglich der siRNAs zu erreichen. Wir transfizierten die MCF7 Zellen gemäß dem in Kapitel 3.4.1. beschriebenen Protokoll mit einer Fluoreszein (FITC)- gekoppelten siRNA und bestimmten nach 5 Stunden ihre Absorptionsrate mittels FACS- Analyse. Als Referenz dienten auch hier MCF7 Zellen, die mit einer non silencing siRNA kontrolltransfiziert wurden.

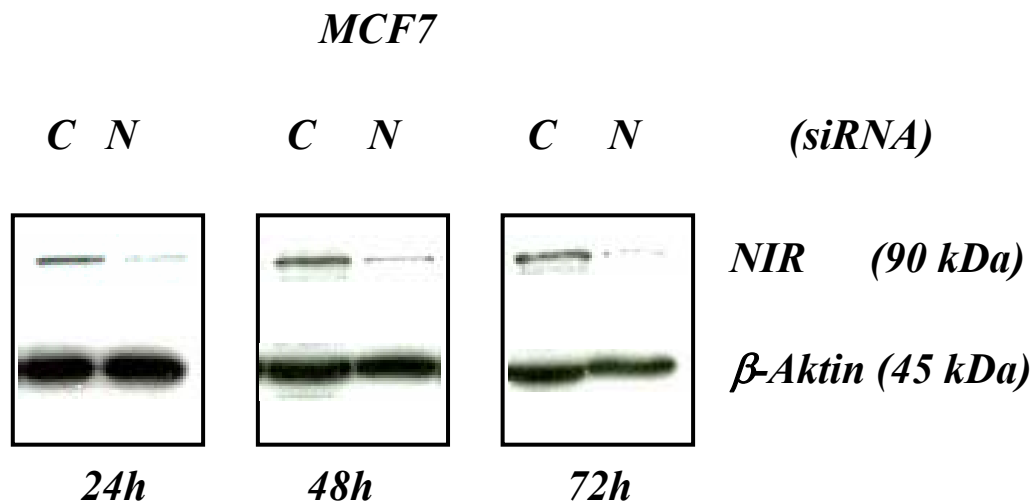


**Abb.4.8: Transfektionseffizienz der MCF7 Zellen für siRNA:** 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Emissionsrate in einer FACS- Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca. 99%.

Wie in Abbildung 4.8. zu erkennen ist, konnte auch mit dieser Zelllinie nach mehreren Vorversuchen schliesslich eine hinreichende Transfektionsrate erreicht werden.

Im Anschluss wurden die Transfektionen mit den beiden NIR siRNAs durchgeführt. Am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Transfektion der siRNA isolierten wir die Gesamtzellproteinextrakte und bestimmten die zellulären NIR- Protein- Level der transfizierten Zellen im Western Blot. Als Referenzwert zur Beurteilung des Grades der Repression von NIR dienten Proteinextrakte aus MCF7 Zellen, die mit einer non silencing siRNA kontrolltransfiziert worden waren.

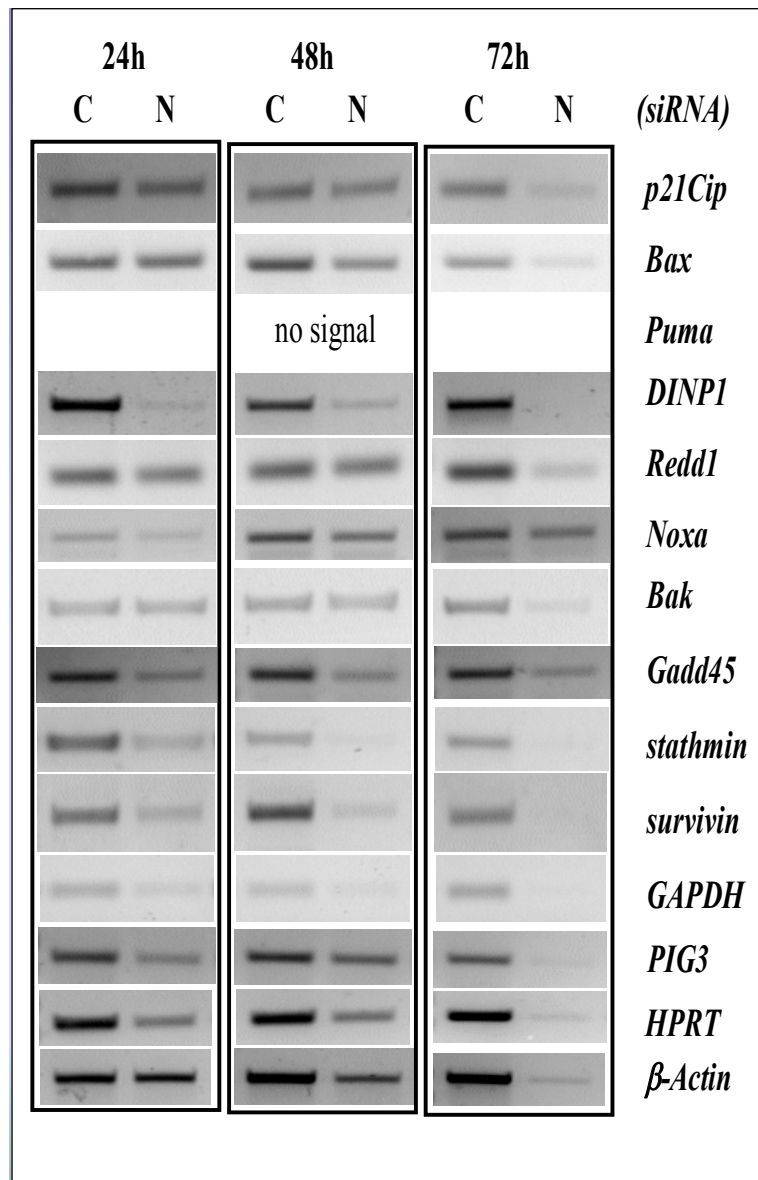
Das Ergebnis des Western Blots lässt 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion einer NIR siRNA eine Reduktion des NIR Proteins um ca. 60% (Ermittlung des Grades der Repression von NIR durch densitometrisches Scannen) erkennen.



**Abb.4.9: NIR knockdown in MCF7 Zellen:** MCF7 Zellen wurden mit einer NIR siRNA (N) und non silencing control siRNA (C) transfiziert. 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion wurden Proteinextrakte angefertigt, über ein 13% iges SDS- Gel aufgetrennt und im Western Blot auf Reduktion des NIR Proteins mit monoklonalen NIR- AK untersucht. Zum Nachweis, dass gleiche Proteinmengen in den Extrakten vorhanden waren, wurde der Blot zusätzlich mit  $\beta$ - Aktin- AK behandelt. Als Sekundärantikörper dienten Anti- Kaninchen-Pox und Anti- Maus- Pox. Die Detektion erfolgte mittels ECL- Färbung.

Parallel zur Gewinnung der Proteinextrakte wurde Gesamt- RNA (s. Kap. 3.10.1) isoliert. Nach DNase Verdau (s. Kap. 3.10.2) und reverser Transkription (s. Kap. 3.10.3) führten wir gemäß den in Kapitel 3.12. aufgeführten PCR- Programmen semiquantitative RT- PCRs für verschiedene p53- regulierte Gene durch. Die einzelnen RT-PCRs wurden mehrmals und mit aus verschiedenen Transfektionen stammenden Gesamt- RNAs durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10. zusammengefasst. In MCF7- Zellen beobachtet man sowohl 24, 48 als auch 72 Stunden nach Transfektion der NIR siRNAs eine signifikante Reduktion der Expression aller untersuchten p53- responsiven Gene einschliesslich der „house keeping Gene“ HPRT,  $\beta$ - Aktin sowie GAPDH.

Diese Beobachtung einer scheinbar generellen Transkriptionseinhibition indiziert, dass es hier zu einer „Toxizität“ spezifisch der NIR siRNA kommt. Bei dieser kann es sich nicht allein um eine Interferon- Antwort handeln, da durch die Kontroll siRNA gleicher Länge ein derartiger Effekt nicht verursacht wird. Vielmehr scheint es sich um einen NIR- spezifischen Effekt zu handeln, der in MCF7- Zellen bereits früh zu einer funktionellen Beeinträchtigung führt. Es sei darauf hingewiesen, dass NIR knockdown auch in HCT116 Zellen nicht lange toleriert wird und schliesslich zu Apoptose führt (siehe auch Hublitz et al., 2005).



**Abb.4.10: Semiquantitative RT- PCRs in MCF 7 Zellen unter NIR knockdown:**

Am ersten, zweiten und dritten Tag nach Transfektion einer NIR siRNA (N) zeigt sich bei allen untersuchten Genen einschließlich der „house keeping Gene“ HPRT,  $\beta$ - Aktin und GAPDH eine signifikante Repression der Genexpression. Zur Beurteilung des Grades der Repression diente Gesamt- RNA von MCF7- Zellen, die mit einer non silencing siRNA (C) transfiziert worden waren.

## 4.6 Untersuchungen zur Veränderung der Bax- Protein- Expression unter NIR knockdown in HCT116 wt und HCT116 p53-/- Zellen

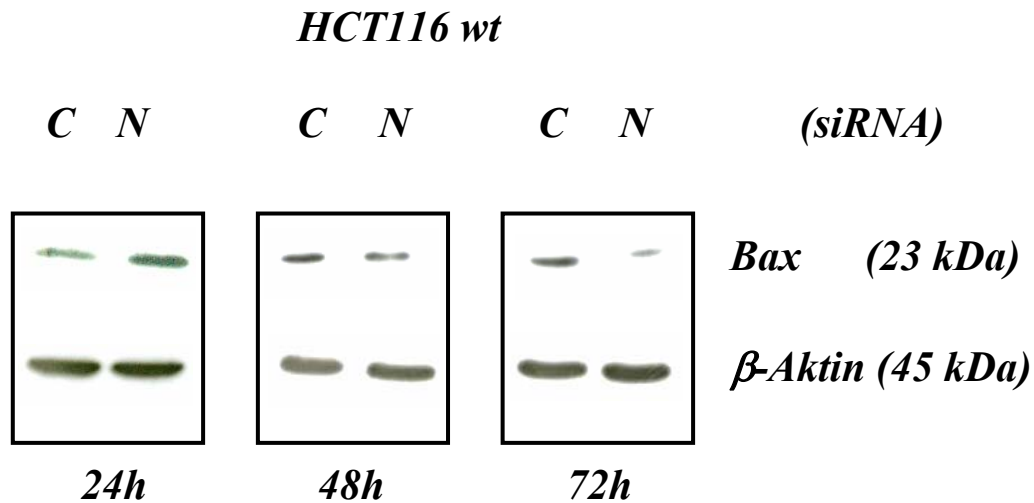
Das durch den Tumorsuppressor p53 regulierte Bax- Protein gehört neben Bak zu den Hauptvertretern der „multidomain proapoptotic“ Bcl-2 Proteine, einer Gruppe von Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen Apoptose spielen. Sie sind in zahlreichen Zelllinien vertreten. Ihr Charakteristikum sind die Sequenzen für die Homologiedomänen 1, 2 und 3. Bax ist ein ca. 23 kDa großes, aus 192 Aminosäureresten bestehendes Protein, welches in Abhängigkeit von der Zelllinie frei im Zytosol oder lose an die äußere Mitochondrienmembran gebunden vorliegen kann (Suzuki, 2000).

Wie wir in Kapitel 4.5.1 zeigen konnten, kommt es in HCT116 wt Zellen 24 Stunden nach Transfektion einer NIR siRNA zu einem Anstieg der Bax Expression auf RNA- Ebene. In p53- negativen HCT116 Zellen konnte dieser Anstieg aufgrund der Abhängigkeit von Bax von dem Transkriptionsfaktor p53 nicht nachgewiesen werden (s. Kap. 4.5.2).

Im Folgenden war es unser Ziel, diese Expressionsveränderungen auf Proteinebene in HCT116 wt sowie p53- negativen HCT116 Zellen zu untersuchen. Dazu verwendeten wir die aus den bereits beschriebenen Experimenten in Kapitel 4.5.1 und 4.5.2. gewonnenen Gesamtzellproteinextrakte und bestimmten den Bax- Proteingehalt in den transfizierten Zellen mittels Western- Immuoblotting.

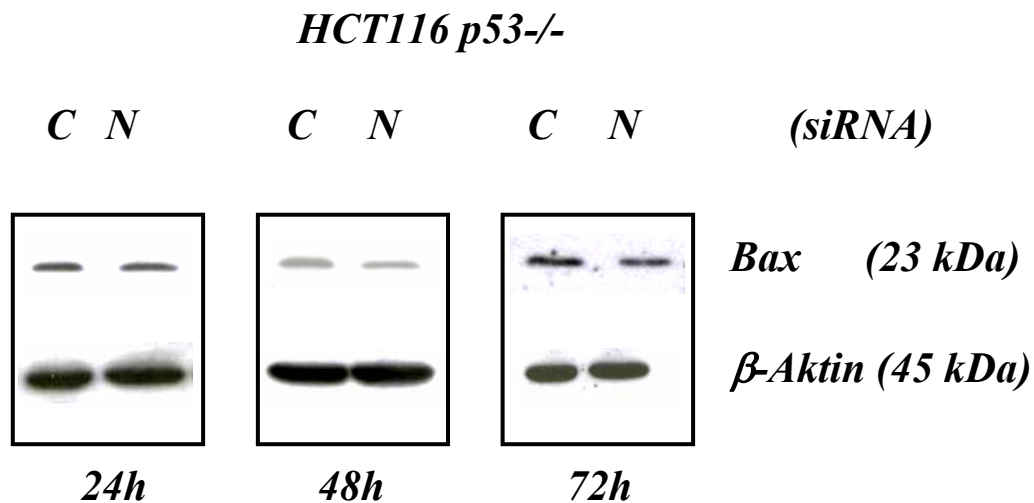
Wie aus den Abbildungen 4.11. und 4.12. ersichtlich ist, trat auch auf Proteinebene 24 Stunden nach NIR siRNA- Transfektion ein Anstieg des Bax- Protein- Gehaltes in den HCT116 wt Zellen auf, während in den p53- negativen Zellen ebenso wie auf RNA- Ebene keine signifikanten Veränderungen zu verzeichnen waren.

Dies zeigt, dass das proapoptotische *Bax*- Gen über den NIR- Inhibitor von Acetyltransferasen wahrscheinlich in einer p53- abhängigen Weise reguliert wird. Die Resultate zeigen weiterhin, dass die Regulation des *Bax*- Gens in den ersten drei Tagen nach NIR knockdown dynamisch ist.



**Abb.4.11: Bax-Protein- Expression unter NIR knockdown in HCT116 wt Zellen:**

Am ersten Tag nach Transfektion einer NIR siRNA (N) kommt es zu einem Anstieg der Bax- Protein- Expression um ca. 40% (Ermittlung des Grades der Expressionszunahme durch densitometrisches Scannen), während am zweiten und dritten Tag post transfectionem eine Abnahme der Bax Expression zu verzeichnen ist. Als Referenzwert zur Beurteilung des Grades der Repression von Bax dienen Proteinextrakte aus Zellen, die mit einer non silencing siRNA kontrolltransfiziert (C) worden waren.

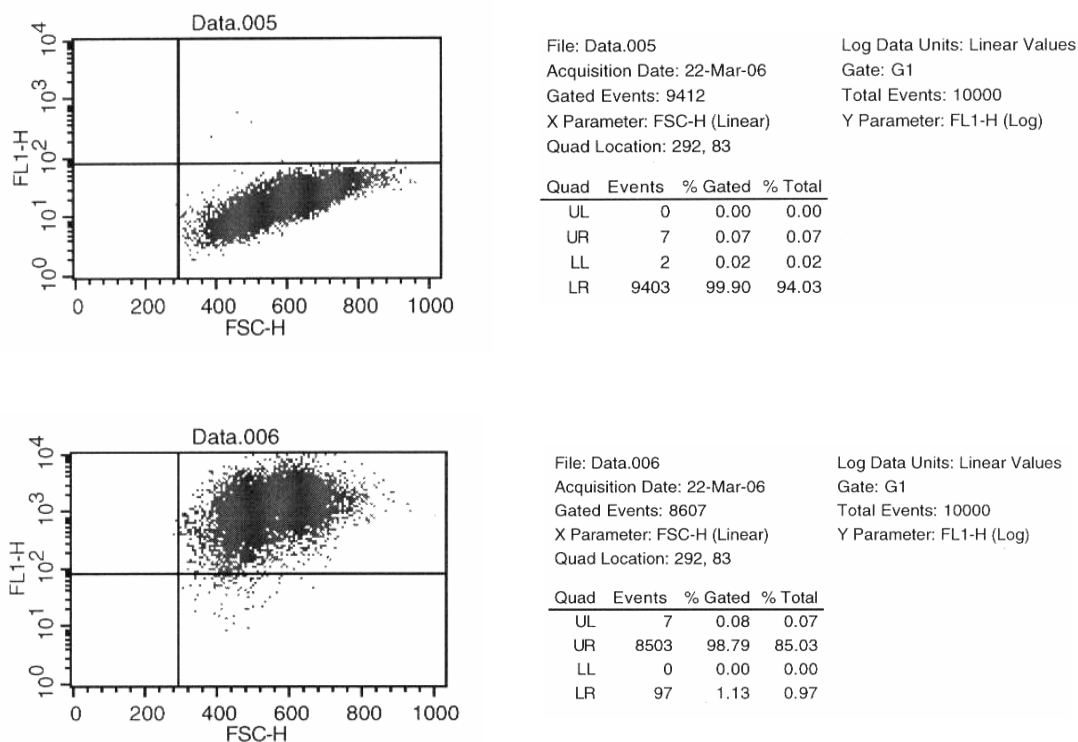


**Abb.4.12: Bax- Protein- Expression unter NIR knockdown in HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen:**

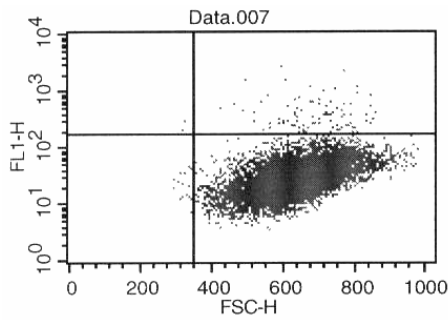
24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion einer NIR siRNA (N) kommt es zu keiner signifikanten Änderung der Bax- Expression auf Proteinebene. Als Referenzwert zur Beurteilung des Grades der Repression von Bax dienen Proteinextrakte aus Zellen, die mit einer non silencing siRNA kontrolltransfiziert (C) worden waren.

## 4.7 Abhängigkeit der durch NIR knockdown induzierten p53- vermittelten Apoptose von dem proapoptotischen Protein Bax

Um die Rolle des proapoptotischen Proteins Bax bei der Induktion der p53- vermittelten Apoptose nach NIR knockdown bestimmen zu können, transfizierten wir gemäß dem in Kapitel 3.4.1. beschriebenen Protokoll HCT116 wt, HCT116 Bax  $-/-$ , die durch homologe Rekombination Bax negativ waren sowie MCF7 Zellen mit einer NIR siRNA sowie einer Kontroll- siRNA. Dabei wurden pro Zelllinie 2 Ansätze für die Transfektion einer NIR siRNA sowie 2 Ansätze für die Transfektion einer Kontroll- siRNA erstellt. Außerdem war es auch bei dieser Versuchsanordnung von Bedeutung, die Transfektionsraten der drei verwendeten Zelllinien zu überprüfen. Diesbezüglich wurden die Zellen zusätzlich mit einer Fluoreszein (FITC)- gekoppelten siRNA transfiziert und die Emissionsrate nach 5 Stunden bestimmt. Als Referenzwert dienten jeweils mit einer irrelevanten siRNA kontrolltransfizierte Zellen. Die Auswertung erfolgte mittels FACS- Analyse.



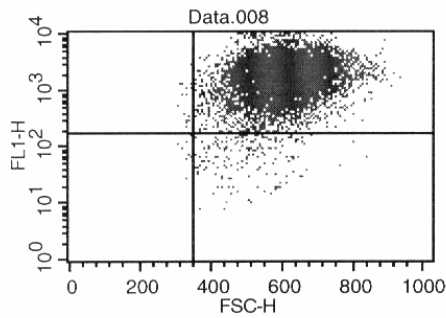
**Abb.4.13: Transfektionseffizienz der HCT116 Bax $-/-$  Zellen für siRNA:** 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Emissionsrate in einer FACS- Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca. 98%.



File: Data.007  
 Acquisition Date: 22-Mar-06  
 Gated Events: 8195  
 X Parameter: FSC-H (Linear)  
 Quad Location: 351, 170

Log Data Units: Linear Values  
 Gate: G1  
 Total Events: 10000  
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	2	0.02	0.02
UR	97	1.18	0.97
LL	19	0.23	0.19
LR	8077	98.56	80.77

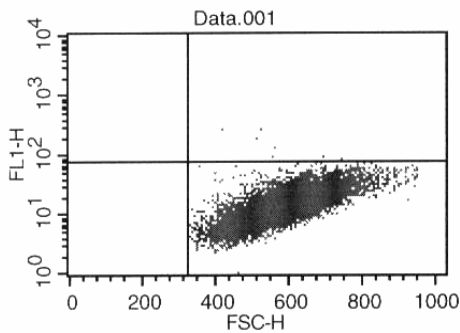


File: Data.008  
 Acquisition Date: 22-Mar-06  
 Gated Events: 6591  
 X Parameter: FSC-H (Linear)  
 Quad Location: 351, 170

Log Data Units: Linear Values  
 Gate: G1  
 Total Events: 10000  
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	18	0.27	0.18
UR	6380	96.80	63.80
LL	9	0.14	0.09
LR	184	2.79	1.84

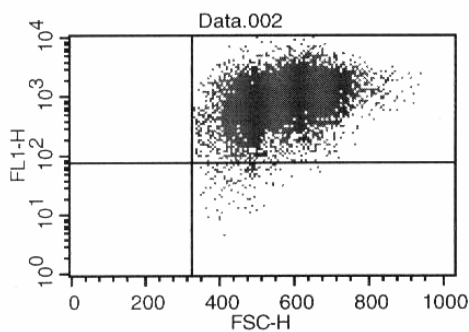
**Abb.4.14: Transfektionseffizienz der MCF7- Zellen für siRNA:** 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Emissionsrate in einer FACS-Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca. 96%.



File: Data.002  
 Acquisition Date: 22-Mar-06  
 Gated Events: 8052  
 X Parameter: FSC-H (Linear)  
 Quad Location: 324, 76

Log Data Units: Linear Values  
 Gate: G1  
 Total Events: 10000  
 Y Parameter: FL1-H (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	7928	98.46	79.28
LL	0	0.00	0.00
LR	124	1.54	1.24



File: Data.002  
 Acquisition Date: 22-Mar-06  
 Gated Events: 8052  
 X Parameter: FSC-H (Linear)  
 Quad Location: 324, 76

Log Data Units: Linear Values  
 Gate: G1  
 Total Events: 10000  
 Y Parameter: FL1-H (Log)

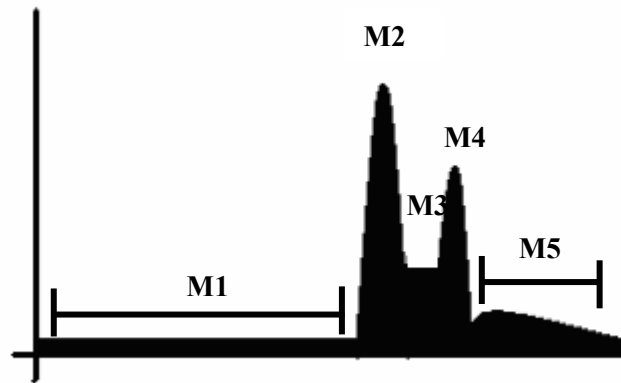
Quad	Events	% Gated	% Total
UL	0	0.00	0.00
UR	7928	98.46	79.28
LL	0	0.00	0.00
LR	124	1.54	1.24

**Abb.4.15: Transfektionseffizienz der HCT116 wt- Zellen für siRNA:** 5 Stunden nachdem die Zellen mit einer FITC- gekoppelten siRNA transfiziert worden waren, wurde die Emissionsrate in einer FACS- Analyse bestimmt. Die Effizienz lag in diesem Versuch bei ca. 98%.



Bei Vorliegen von ausreichend hohen Transfektionseffizienzen von mindestens 85% konnte der Versuch fortgesetzt werden, indem die Zellen, welche parallel zu den Zellen zur Messung der Transfektionsraten mit einer NIR siRNA sowie einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, 48 Stunden nach Transfektion mit Methanol fixiert und anschliessend einem RNase-Verdau unterzogen wurden. Im Anschluss erfolgte eine DNA-Färbung der Proben mit Propidiumiodid (PI). Dieses interkaliert in die DNA und liefert somit in der FACS- Analyse Informationen über den DNA- Gehalt der Zellen und damit über die Zellzyklusverteilung. Nach Laseranregung der Zelle sendet diese entsprechend ihrem DNA- Gehalt ein Lichtsignal aus. Je mehr DNA in der Zelle enthalten ist, desto mehr PI konnte in diese eingebaut werden und desto mehr Fluoreszenz wird von der Zelle emittiert. Nach Auswertung von 10000 Zellen können den dabei entstehenden Fraktionen dann Zellzyklusphasen zugeordnet werden (s. Abb.4.16.). Die mit M1 bezeichnete Fraktion stellt den Anteil der Zellen dar, der weniger als den diploiden Chromosomensatz enthält und welcher mit dem Anteil an apoptotischen Zellen gleichgesetzt wird. Der mit M2 bezeichnete Peak zeigt die Anzahl der Zellen in der Gap (G)-1-Phase des Zellzyklus, in der die Zellen den zweifachen Chromosomensatz ( $2n$ ) enthalten. Der M3- Peak entspricht Zellen in der Synthese (S)- Phase. Während dieser Zeit verdoppeln die Zellen ihren DNA- Gehalt zur anschließenden Zellteilung, so dass der gemessene DNA- Gehalt dieser Zellen zwischen  $2n$  und  $4n$  liegt. Der M4- Peak stellt den Anteil der Zellen dar, die sich in der Gap (G)-2-Phase bzw. in der Mitose (M)- Phase befinden. In diesem Stadium enthalten die Zellen den vierfachen Satz an Chromosomen. Die sich an den M4- Peak anschließende M5-Fraktion der Zellen enthält polyploide Chromosomensätze.

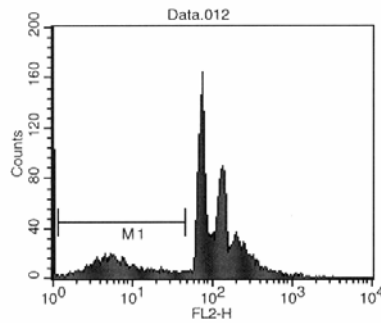
Für die vorliegende Arbeit war ausschliesslich die sub- $2n$ -Fraktion von Bedeutung. Sub-  $2n$  besagt, dass in den Zellen, die ein solches Signal abgeben, der in lebensfähigen Zellen mindestens vorhandene doppelte Chromosomensatz abgebaut worden ist. Dies erfolgt durch Endonukleaseaktivität, welche im Zusammenhang mit apoptotischem Zelltod zu beobachten ist.



**Abb.4.16: Grundprinzip der Zellzyklusverteilung gemessen in der FACS- Analyse:**

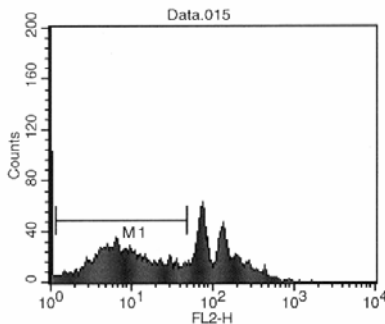
Der Fluoreszenzfarbstoff PI interkaliert in die DNA der Zelle. Durch einen Argonlaser wird das PI angeregt und das emittierte Licht durch ein optisches System gemessen. Da in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase der DNA- Gehalt variiert, ist es möglich anhand eines Verteilungsdiagramms die Zahl der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowie die der apoptotischen Zellen zu ermitteln. M1 stellt den Anteil der Zellen dar, welche einen Chromatingehalt von unter  $2n$  (weniger als der diploide Chromosomensatz) enthalten, was der Fraktion der apoptotischen Zellen entspricht. M2 bezeichnet Zellen in der G1- Phase. Diese enthalten den doppelten Chromosomensatz ( $2n$ ), M3 sind Zellen in der S- Phase mit einem Gehalt zwischen  $2n$  und  $4n$  und M4 solche Zellen, welche sich in der G2- bzw. M- Phase befinden und entsprechend  $4n$  besitzen. Die danach folgenden Zellen sind polyploid (M5).

Die folgenden Abbildungen sind repräsentativ für alle Ansätze der Zelllinien HCT116 wt, HCT116 Bax<sup>-/-</sup> sowie MCF 7 des Apoptose- Assays.

HCT116 wt transfiziert mit einer control siRNA

File: Data.012 Acquisition Date: 31-Mar-06  
 Gate: No Gate Gated Events: 10000  
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

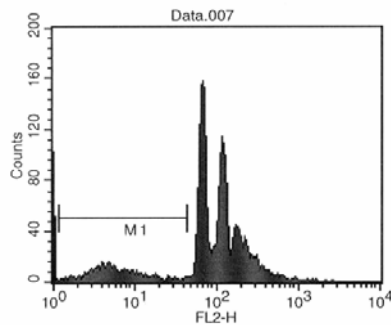
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	109.78
M1	1, 45	1986	19.86	19.86	8.76

HCT116 wt transfiziert mit einer NIR siRNA

File: Data.015 Acquisition Date: 31-Mar-06  
 Gate: No Gate Gated Events: 10000  
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

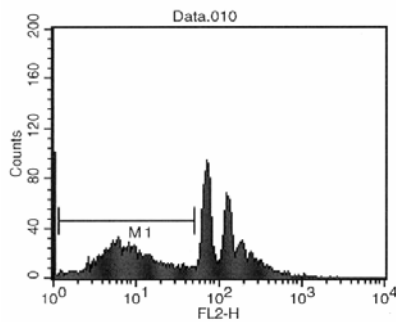
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	63.31
M1	1, 48	5104	51.04	51.04	11.87

**Abb.4.17: FACS- Daten der HCT116 wt Zellen:** In den mit einer control siRNA transfizierten Zellen lag die Apoptoserate bei 19,86%, während die Apoptoserate bei den mit einer NIR siRNA transfizierten Zellen 51,04% betrug.

HCT116 Bax<sup>-/-</sup> transfiziert mit einer control siRNA

File: Data.007 Acquisition Date: 31-Mar-06  
 Gate: No Gate Gated Events: 10000  
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

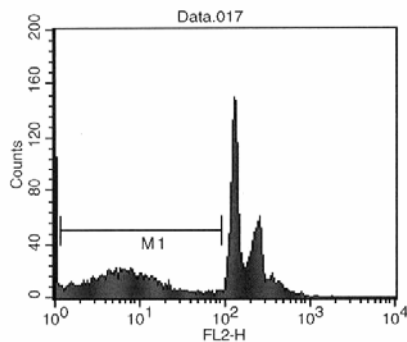
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	113.58
M1	1, 43	1357	13.57	13.57	7.75

HCT116 Bax<sup>-/-</sup> transfiziert mit einer NIR siRNA

File: Data.010 Acquisition Date: 31-Mar-06  
 Gate: No Gate Gated Events: 10000  
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

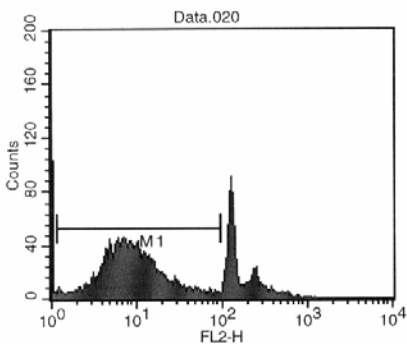
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	80.77
M1	1, 50	4025	40.25	40.25	11.16

**Abb.4.18: FACS- Daten der HCT116 Bax<sup>-/-</sup> Zellen:** In den mit einer control siRNA transfizierten Zellen lag die Apoptoserate bei 13,57%, während die Apoptoserate bei den mit einer NIR siRNA transfizierten Zellen 40,25% betrug.

MCF 7 transfiziert mit einer control siRNA

File: Data.017 Acquisition Date: 31-Mar-06  
 Gate: No Gate Gated Events: 10000  
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	105.63
M1	1, 91	3600	36.00	36.00	10.39

MCF 7 transfiziert mit einer NIR siRNA

File: Data.020 Acquisition Date: 31-Mar-06  
 Gate: No Gate Gated Events: 10000  
 Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	50.98
M1	1, 95	6725	67.25	67.25	12.26

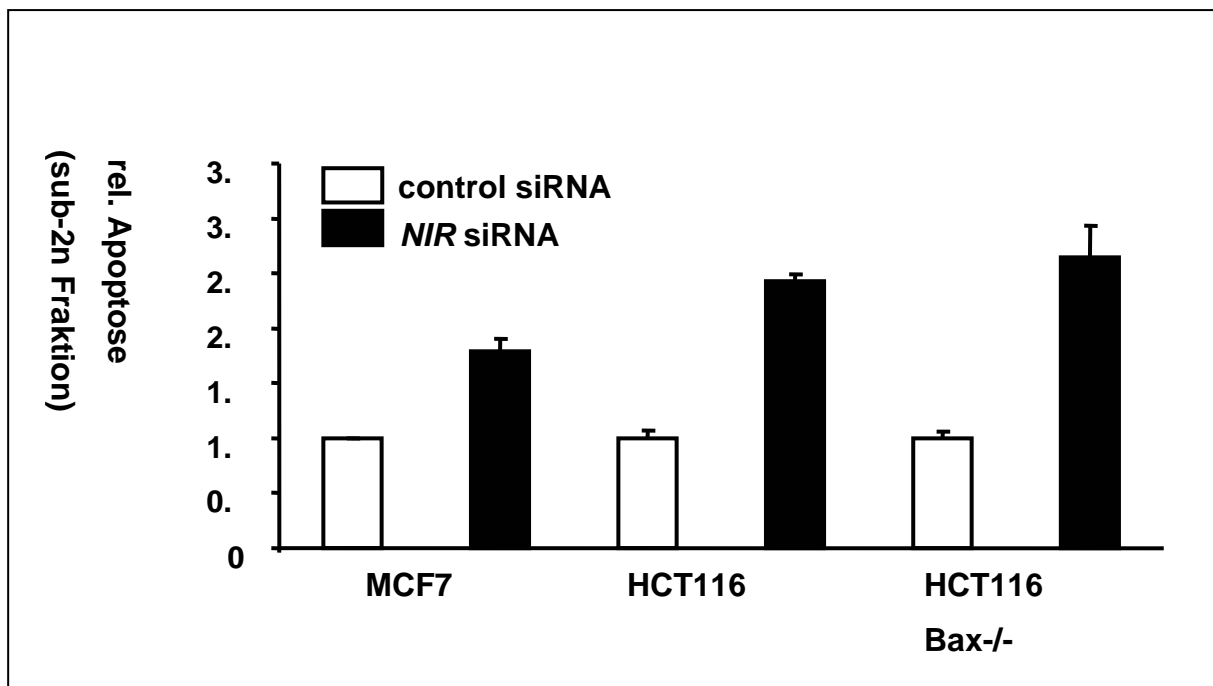
**Abb.4.19: FACS- Daten der MCF 7 Zellen:** In den mit einer control siRNA transfizierten Zellen lag die Apoptoserate bei 36,0%, während die Apoptoserate bei den mit einer NIR siRNA transfizierten Zellen 67,25% betrug.

Die statistische Auswertung aller erhobenen Daten ergab, dass in den HCT116 wt und HCT116 Bax<sup>-/-</sup> Zellen unter NIR knockdown keine signifikanten Unterschiede in bezug auf die Apoptoserate zu vermerken sind. In beiden Zelllinien tritt in etwa eine Verdopplung der Basalapoptose 48 Stunden nach Transfektion einer NIR siRNA ein. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass das Bax- Protein nicht verantwortlich ist für die Induktion der p53-abhängigen Apoptose unter NIR knockdown, und somit andere Mechanismen der Apoptoseinduktion in Betracht gezogen werden müssen.

In den MCF7 Zellen erhöhte sich die Apoptoserate unter NIR knockdown um das 1,7 fache der Basalapoptose. Auffallend war, dass in diesen Zellen die basale Apoptoserate unter Transfektion von control siRNA bereits sehr hoch war. Dies könnte darauf hinweisen, dass in MCF7 Zellen jedwede siRNA trotz ihrer kurzen Länge von ca. 21 bp eine toxische Interferonantwort auslöst. Dennoch zeigte sich, in Übereinstimmung mit den

Genexpressionsdaten in Abb. 4.10., dass NIR knockdown davon unabhängig weitere Toxizität zeigt.

Der ermittelte Durchschnittswert der Apoptoserate zur Berechnung der relativen Apoptose ergab sich aus jeweils zwei Ansätzen pro Transfektion einer kontroll siRNA bzw. NIR siRNA in den jeweils untersuchten Zelllinien.



**Abb.4.20: Relative Apoptose 48 Stunden nach Reduktion der zellulären NIR- Level durch RNA-Interferenz in MCF 7, HCT116 wt und HCT116 Bax<sup>-/-</sup> Zellen:**

Nach Berechnung der relativen Apoptose hat sich gezeigt, dass es sowohl in den HCT116 wt als auch Bax negativen HCT116 Zellen nach Transfektion einer NIR siRNA zu einer etwa gleich starken Erhöhung der Apoptoserate kommt. In den MCF7 Zellen erhöht sich die Apoptoserate unter NIR knockdown um das 1,7 fache der Basalapoptose.

Die jeweils linke Säule der transfizierten Zelllinien stellt die gemessene Basalapoptose der kontrolltransfizierten Zellen dar. Sie wurde willkürlich gleich 1 gesetzt. Die rechte Säule zeigt die relative Apoptose der mit einer NIR siRNA transfizierten Zellen.

---

Insgesamt hatten die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Resultate also gezeigt, dass sich der ubiquitär exprimierte Inhibitor von Acetyltransferasen NIR mittels siRNA- Technologien erfolgreich reprimieren lässt, dass eine solche Repression der NIR- Expression zu einer spezifischen Veränderungen in der Expression von Targetgenen des NIR regulierten Tumorsuppressors p53 nach sich zieht, zum anderen aber auch weitere nicht p53 kontrollierte Gene beeinflusst, und dass NIR knockdown generell toxisch für Zellen ist und Apoptose induzieren kann, die jedoch zumindest in HCT116 Zellen nicht vom NIR/p53- regulierten Bax abhängt.

In Zelltypen wie MCF7 scheint die durch NIR induzierte Toxizität, die zusätzlich zu einer unspezifischen Toxizität von siRNAs in diesen Zellen zu verzeichnen ist, eine generelle Transkriptionshemmung nach sich zu ziehen.

## 5 Diskussion

Der Tumorsuppressor p53 ist das am häufigsten mutierte Gen in humanen Tumorgeweben. Die Bedeutung von p53 im Bereich der Prävention der Tumorentstehung resultiert aus seiner Fähigkeit, entscheidende Vorgänge in der Zelle wie z.B. den Zellzyklus, die Apoptose sowie Alterungsprozesse der Zelle zu regulieren (Levine, 1997; Prives und Hall, 1999, Vogelstein et al., 2000). Das aus 393 Aminosäuren bestehende Protein bindet sequenzspezifisch an DNA und ist somit befähigt, die Transkription einer Vielzahl von Genen in Abhängigkeit von verschiedenen Stressfaktoren, die auf die Zelle einwirken können, zu aktivieren, aber auch zu reprimieren (Miyashita und Redd, 1995; el- Deiry et al., 1993; Mirza et al., 2002).

Trotz einer Vielzahl von Informationen bezüglich der Regulation der Transkription p53-abhängiger Gene ist es bis heute nicht gelungen, die entscheidenden Mechanismen, über die der Tumorsuppressor p53 die Expression seiner Zielgene und damit das „Schicksal der Zelle“ reguliert, im Detail zu entschlüsseln.

Vor zwei Jahren entdeckten Hublitz und Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe ein aus 749 Aminosäuren bestehendes Protein, welches als INHAT (*Inhibitor of Acetyltransferase*) fungiert, indem es durch Bindung an Nukleosomen die Acetylierung der Histone verhindert (Hublitz et al., 2005). Man gab ihm den Namen NIR, *Novel INHAT Repressor*. Er verfügt über die Fähigkeit direkt mit dem Transkriptionsfaktor p53 zu interagieren, die Aktivierung der Expression einiger p53- regulierter Gene zu inhibieren und die p53- vermittelte Apoptose zu regulieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, wie sich die Expression p53- regulierter Gene nach Herunterregulierung des NIR- Gens mittels RNA- Interferenz verändert und ob diese beobachteten Veränderungen der Genexpression p53- vermittelt und zelltypspezifisch sind. Eine weitere Aufgabe betraf die Klärung der Frage, ob das proapoptotische p53-responsive *Bax*- Gen für die Induktion der p53- abhängigen Apoptose nach NIR knockdown verantwortlich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expressionsprofile der untersuchten Gene unter NIR knockdown zelltypspezifische Unterschiede aufweisen. In den HCT116 wt Zellen kommt es

zu einer sehr variablen Regulation der Genexpression nach Reduktion der zellulären NIR-Level mittels RNA- Interferenz, während in den MCF7 Zellen eine allgemeine Herunterregulation von Genen nach Transfektion einer NIR siRNA zu erkennen ist. In den p53 negativen HCT116 Zellen bleibt die Genexpression unter NIR knockdown mit wenigen Ausnahmen konstant. Es lässt sich demnach schließen, dass der Effekt von NIR knockdown auf viele Gene tatsächlich p53- vermittelt ist. Einzig das als p53- Target bekannte p53DINP1 $\alpha$  (Okamura et al., 2001) wurde durch NIR eindeutig in einer p53- unabhängigen Weise reguliert. Zukünftige Arbeiten werden zeigen, welcher Transkriptionsfaktor diesen Effekt von NIR knockdown vermittelt.

Grundvoraussetzung für die Durchführung aller Versuche war die Reduktion der NIR Expression in verschiedenen Tumorzelllinien durch den Einsatz künstlich hergestellter siRNA. Nach zeitintensiven Vorarbeiten konnten die Bedingungen soweit optimiert werden, dass die RNA- Interferenz auf siRNA Basis zu einer deutlichen Reduktion von NIR in den transfizierten Zellen führte. Ziel war es, siRNA- Transfektionseffizienzen von mindestens 85% zu erreichen, um eine hinreichende Reduktion des NIR Proteins in der Gesamtkultur zu erhalten. In Übereinstimmung mit anderen, siRNA verwendenden Arbeiten konnte diese Transfektionsrate meist leicht übertroffen werden.

In der Western Blot Analyse zeigte sich an allen drei Tagen nach Transfektion der NIR siRNA eine deutliche Reduktion des NIR Proteins. Die Festlegung der Untersuchungszeitpunkte resultierte aus unseren Vorarbeiten, die zeigten, dass sich die Mengen an NIR in den NIR siRNA- transfizierten Zellen derjenigen der kontrolltransfizierten Zellen nach mehr als 3 Tagen wieder annähern. Dies beruhte darauf, dass die siRNAs nur transient, also vorübergehend wirksam sind.

NIR knockdown führte in den humanen HCT116 wt Zellen zu einer komplexen Regulation der p53- responsiven Gene. Auch die parallele Analyse der Expressionsprofile mittels cDNA-Microarrays an der Frauenklinik der Albert- Ludwigs- Universität (Arbeitsgruppe Prof. Roland Schüle) in Freiburg, die mit der von uns isolierten RNA nach NIR knockdown durchgeführt wurde, ergaben eine vergleichbar variable Regulation der Gene. Interessant ist, dass die untersuchten Gene z.T. eine transient verstärkte Expression unter NIR Knockdown erkennen lassen, während andere eine stetige Herunterregulation zeigen. Wieder andere Gene weisen ein konstant bleibendes Expressionsprofil auf.



Die beiden proapoptotischen Bcl-2- Proteine Bax und Puma sowie der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p21 bilden eine Gruppe von Genen, die unter NIR knockdown einer Hochregulation unterliegen. Bax und Puma zeigen bereits 24 Stunden post transfectionem einen transienten Anstieg in ihrer Expression, während p21 erst 48 Stunden nach Transfektion in seiner Expression ansteigt. Dieser Effekt ist kompatibel mit der Vorstellung, dass NIR ein Inhibitor von Acetyltransferasen und damit der p53- vermittelten Genregulation ist

Die beiden Gene p53DINP1 $\alpha$  und Redd1 zeigten hingegen an allen 3 Tagen eine deutliche Downregulation unter NIR knockdown, während das proapoptotische Bcl-2- Protein Noxa erst 72 Stunden post transfectionem in seiner Expression abnimmt. Dies deutet daraufhin, dass NIR Gen- spezifisch auch als positiver Regulator in Erscheinung treten kann. In der Tat weisen weitere Erkenntnisse aus unseren Arbeitsgruppen darauf hin, dass NIR eine Plattform für andere, positive Regulatoren darstellt (unveröffentlicht).

Im Vergleich zu den genannten Gruppen von Genen konnten auch solche identifiziert werden, die an allen drei Tagen eine konstante Expression aufweisen, also unbeeinflusst bleiben. Zu diesen Genen gehören Bak, Gadd45 sowie die beiden Apoptose- Inhibitoren Survivin und Stathmin. Das „house keeping“ Gen GAPDH zeigt ebenfalls post transfectionem keine Veränderungen.

Ein weiterer Grund für die Variabilität der Expressionsprofile p53- responsiver Gene unter NIR knockdown in HCT116 wt Zellen könnten auch die bereits nachgewiesenen Unterschiede in der Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors p53 zu seinen Zielpromotoren sein (Espinosa und Emerson, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass p53 bereits in nicht gestressten Zellen mit einer unterschiedlichen Bindungsintensität an den Promotoren gebunden vorliegt. Kaeser und Iggo (2002) haben in ihren Versuchen zeigen können, dass p53 zu den *p21*-, *Mdm2* und *Puma*-Promotoren eine wesentlich höhere Bindungsaffinität aufweist als zu den Promotoren der proapoptotischen Gene *Bax*, *AIP1* und *PIG3*. Die relativ schwache Bindung des Tumorsuppressors p53 am *PIG3*- Promotor konnte von Szak und seiner Arbeitsgruppe ebenfalls nachgewiesen werden (Szak, Mays und Pietenpol, 2001). Es besteht keine Korrelation zwischen der Bindung von p53 an den Promotoren der proapoptotischen Gene *Bax*, *PIG3*, *AIP1* und *Puma* und der Induktion der Apoptose (Kaeser und Iggo, 2002).

Ein weiterer Aspekt bezüglich der variablen Expressionsprofile unter NIR knockdown in den HCT116 wt Zellen könnten die bestehenden strukturellen Unterschiede in der basalen

Transkriptionsmaschinerie der verschiedenen p53- regulierten Promotoren vor Einwirkung eines Stressfaktors auf die Zelle sein (Espinosa et al., 2003). Ein solcher Faktor ist die variierende Menge an arretierter RNA Polymerase II an den Zielpromotoren des Transkriptionsfaktors p53 vor Stresseinwirkung. Proapoptotische Gene weisen niedrigere Level an vorgebundener RNA Polymerase II auf als Zellzyklus arretierende Gene wie z.B. p21 (Espinosa et al., 2003). Solche Gene zeichnen sich somit durch eine sehr rasche Transaktivierung nach Einwirkung von Stress aus.

Vergleicht man die Resultate der semiquantitativen RT- PCRs in den HCT116 wt Zellen mit denen in den MCF7 Zellen, so kann man unter NIR knockdown auf zelltypspezifische Expressionsveränderungen schließen. Im Gegensatz zu der komplexen Regulation in den HCT116 wt Zellen tritt in den MCF7 Zellen unter NIR knockdown eine komplette Repression aller untersuchten Gene einschließlich der „House keeping- Gene“ GAPDH, HPRT sowie  $\beta$ -Aktin auf. Die Herunterregulation der „House keeping- Gene“ läßt vermuten, dass durch Reduktion der zellulären NIR- Level auch die basale Transkriptionsmaschinerie negativ beeinflusst wird. Diese Erkenntnis zusammen mit der erhöhten basalen Apoptoserate nach siRNA- Transfektion in MCF7 Zellen deutet auf einen generellen Block der Transkriptionsmaschinerie, vielleicht durch Interferon- Toxizität kombiniert mit NIR knockdown spezifischer Toxizität, hin.

Man spekuliert, dass die Anwesenheit von NIR in der Zelle und dessen Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, u.a. mit p53, für den erfolgreichen Ablauf der basalen und Aktivator- getriebenen p53- abhängigen Transkription von essentieller Bedeutung ist. Mittels CHIP- Analyse konnte gezeigt werden, dass NIR unter p53- stimulierendem Stress nicht von den Promotoren p53- regulierter Gene abdiffundiert, sondern mit diesen verbunden bleibt (Hublitz et al., 2005). Insgesamt deuten diese Beobachtungen somit an, dass zwischen zwei nicht äquivalenten Funktionszuständen von NIR unterschieden werden muss: dem Zustand der Abwesenheit von NIR infolge des Knockdowns und dem Promotor- assoziierten, INHAT- inaktiven NIR. Dies lässt vermuten, dass NIR in gestressten Zellen posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen oder Acetylierungen unterliegt. Emerson und Espinosa stellten bereits 2003 die These auf, dass auch der Tumorsuppressor p53 in Abhängigkeit von dem jeweils einwirkenden Stressfaktor bestimmte Phosphorylierungen erfahren kann und folglich verschiedene Isoformen einnimmt, was letztendlich in einer unterschiedlichen Gen- Aktivierung resultiert.

Bei der Identifizierung von NIR- assoziierten Proteinen wurden neben dem Transkriptionsfaktor p53 auch eine Reihe weiterer Proteine gefunden (Hublitz et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass einzelne oder mehrere dieser Regulatorproteine NIR als Plattform für die Regulation von p53 oder p53- gebundener Gene benutzen. Die Bindung solcher Co- Faktoren an NIR könnte in Abhängigkeit vom Zelltyp und der einwirkenden Stressart wiederum durch verschiedene posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden.

Aufgrund der Eigenschaft von NIR, die genaktivierende Acetylierung durch HATs an den N-Termini von Histonen zu blockieren, stellt sich die Frage, in welchem Umfang NIR auch Einfluß auf die Acetylierung von p53 hat.

Die Acetylierung an den bekannten Lysinen im C-Terminus von p53 scheint keine Auswirkung auf die Bindungsaffinität von p53 zu seinen Zielpromotoren zu haben (Emerson und Espinosa, 2001; Barlev et al., 2001), während die Bindung weiterer Co- Aktivatoren an p53 (Nakamura et al., 2000; Emerson und Espinosa, 2001; Barlev et al., 2001) durch eine HAT- vermittelte Aktivität wahrscheinlich begünstigt wird.

Die Herunterregulation oder gleichbleibende Expression der von uns untersuchten Gene unter NIR knockdown in den HCT116 wt sowie MCF7 Zellen lässt auf eine weitere Hypothese bezüglich der p53- Acetylierung schließen. In Arbeiten von Vaziri (2001) und Luo (2001) wurde die Theorie aufgestellt, dass die Acetylierung von p53 der Markierung eines durch p53 aktivierten Promotors mit dem Ziel einer späteren Inaktivierung dient. Durch die Acetylierung von p53 wird die Bindung von HDAC- Komplexen begünstigt. In Abhängigkeit vom jeweiligen Deacetylase- Komplex erfolgt eine Deacetylierung der Histone im Bereich der Promotoren und somit die Induktion einer aktiven durch p53 vermittelten Repression von Genen (Murphy et al., 1999; Juan et al., 2000; Luo et al., 2000).

p53 vermag somit nicht nur als Transaktivator, sondern auch als Transrepressor von Genen zu agieren. Gegenstand einer direkten p53- vermittelten Repression über die Rekrutierung von inhibierenden Co- Aktivatoren scheinen die Gene von Überlebensfaktoren (IAPs, Bcl-2s) zu sein sowie solche Gene, deren Produkte den G2/M- Übergang im Zellzyklus regulieren (Taylor und Stark, 2001; Imbriano et al., 2005). Die Acetylierung von p53 ist für seine Fähigkeit, Gene zu reprimieren unabdingbar (Imbriano et al., 2005). In Bezug auf die Regulation dieser Abläufe werden verschiedene Ansatzpunkte diskutiert (Lambert et al., 1998; Dumaz und Meek, 1999; Dornan und Hupp, 2001; Kobet et al., 2000; Ito et al., 2001). Da Co- Aktivator- Interaktion durch HAT- vermittelte Acetylierung unterstützt wird (Barlev et al., 2001) und NIR die Acetylierung inhibiert (Hublitz et al., 2005), könnte NIR nicht nur

als negativer Regulator der Transaktivierung, sondern auch der Transrepression durch p53 wirksam sein. Somit würde NIR nicht nur die Funktion eines Repressors einnehmen, sondern auch über indirekte aktivierende Eigenschaften in nicht gestressten Zellen verfügen. Auch dies wäre kompatibel mit der Herunterregulation einiger p53- responsiver Gene unter NIR knockdown.

Der 72 Stunden nach NIR knockdown zu verzeichnende Anstieg von p21 auf RNA- Ebene könnte mit einer weiteren Form der aktiven Repression von Genen korrelieren. Der durch p53 induzierbare Inhibitor Cyclin- abhängiger Kinasen p21 vermag indirekt, als Effektor-Komplex, die Transkription weiterer p53- responsiver Gene zu inhibieren (Lohr et al., 2003). Die p53- abhängige Repression von Genen durch direkte Bindung von p53 an seine Zielpromotoren wie z.B. bei der Repression des Apoptose- Inhibitors Survivin, wird kontrovers diskutiert (Lohr et al., 2003; Mirza, A. et al., 2002) und steht vermutlich auch im Zusammenhang mit der bereits oben erwähnten Acetylierung des Transkriptionsfaktors p53.

Betrachtet man die Ergebnisse der RT-PCRs in den p53- negativen HCT116 Zellen, so kann man feststellen, dass die Mehrzahl der untersuchten Genexpressionsprofile 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion einer NIR siRNA keine Veränderungen aufweisen. Diese konstant bleibende Expression lässt darauf schließen, dass die untersuchten Gene durch NIR in Abhängigkeit von p53 reguliert werden. Abweichungen weisen die Gene *p21*, *Bak* und *p53DINP1 $\alpha$*  auf. Der Inhibitor Cyclin abhängiger Kinasen p21 sowie das zur Bcl-2 Familie gehörende proapoptotische *Bak*- Gen zeigen 24 Stunden post transfectionem eine geringgradige transiente Abnahme der Expression, während *p53DINP1 $\alpha$*  sowohl 24, 48 als auch 72 Stunden nach Transfektion eine deutliche Reduktion in seiner Expression erkennen lässt.

Dies lässt vermuten, dass die Aktivität dieser Gene auch über andere durch NIR regulierte Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden muss. Die Vermutung liegt nahe, dass die mit p53 verwandten Transkriptionsfaktoren p63 und p73 mit NIR interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine p63 und p73 befähigt sind, die apoptotische Aktivität von p53 durch Erhöhung der Bindungsaffinität zu seinen proapoptotischen Zielpromotoren zu beeinflussen (Flores et al., 2002).

Nachdem wir zeigen konnten, dass 24 Stunden nach Transfektion einer NIR siRNA in HCT116 wt Zellen das proapoptotische p53- responsive Bax- Protein sowohl auf RNA- als

auch auf Proteinebene ansteigt, stellten wir uns die Frage, ob dieses Protein für die Induktion der p53- abhängigen Apoptose unter NIR knockdown verantwortlich ist (Hublitz et al., 2005). Wie das Ergebnis des Apoptose- Assays zeigt, treten keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen Apoptoseraten in den HCT116 wt und Bax negativen Zellen auf. Folglich kann man davon ausgehen, dass das Bax Protein nicht allein verantwortlich ist für die Induktion der p53- abhängigen Apoptose unter NIR knockdown und somit andere Mechanismen in Betracht gezogen werden müssen. So könnte es sein, dass die unter NIR knockdown eingetretene Apoptose eher über den extrinsischen Pfad, also die Aktivierung von Todesrezeptoren induziert wird. Nicht zuletzt besteht auch die Möglichkeit, dass die Induktion der p53- abhängigen Apoptose nicht nur mit der Transaktivierung, sondern auch mit der p53- abhängigen Transrepression von Genen wie z.B. dem Überlebensfaktor Bcl-2 einhergeht. Auch die Möglichkeit, dass unter NIR knockdown eine direkte transkriptionsunabhängige Apoptose durch das an die Mitochondrien translozierte p53 induziert wird (Marchenko, Zaika und Moll, 2000), ist in Betracht zu ziehen.

Zur Analyse der Mechanismen und Modifikationen, die die Interaktion zwischen NIR und p53 unter Stresseinwirkung regulieren, müssen noch zusätzliche wissenschaftliche Studien in Angriff genommen werden. Ein weiterer Aspekt wäre die Klärung der Identität der anderen NIR- assoziierten Proteine und deren Bedeutung bei der Regulation von p53 sowie p53- responsiver  
Gene.

## 6 Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor p53 ist das am häufigsten mutierte Gen in Tumorgeweben. Die Bedeutung von p53 im Bereich der Prävention der Tumorentstehung resultiert aus seiner Fähigkeit, entscheidende Vorgänge in der Zelle wie z.B. den Zellzyklus, die Apoptose sowie Alterungsprozesse der Zelle zu regulieren (Levine, 1997; Prives und Hall, 1999; Vogelstein et al., 2000). Der multifunktionelle Transkriptionsfaktor p53 ist somit befähigt, die Transkription einer Vielzahl von Genen in Abhängigkeit von verschiedenen Stressfaktoren, die auf die Zelle einwirken können, zu aktivieren, aber auch zu reprimieren (Miyashita und Redd, 1995; el- Deiry et al., 1993; Mirza et al., 2002). Aktuelle Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass p53 auch in Abwesenheit von Stress an den Promotoren einiger seiner Zielgene gebunden vorliegen kann, ohne diese jedoch zu transaktivieren. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellte sich die Frage, wie die Regulation des bereits Promotor- assoziierten p53 erfolgt. In diesem Zusammenhang gelang Hublitz und Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe die Identifizierung und Charakterisierung des neuen INHAT- Repressors NIR. NIR ist in der Lage, sowohl mit dem Transkriptionsfaktor p53 als auch mit anderen zellulären Proteinen zu interagieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Resultate zeigten, dass sich der ubiquitär exprimierte Inhibitor von Acetyltransferasen NIR mittels siRNA- Technologien erfolgreich reprimieren lässt. Eine solche Repression der NIR- Expression führte zu einer zu spezifischen Veränderungen in der Expression von Targetgenen des NIR- regulierten Tumorsuppressors p53. Zum anderen konnte aber auch gezeigt werden, dass weitere, nicht-p53-kontrollierte Gene von NIR reguliert werden. Außerdem erwies sich die Repression der NIR- Expression toxisch für Zellen und führte zur Apoptoseinduktion. Diese induzierbare Apoptose war zumindest in den HCT116 wt Zellen nicht abhängig vom NIR/p53- regulierten Bax- Protein.

In Zelltypen wie MCF7 schien die durch NIR induzierte Toxizität, die zusätzlich zu einer unspezifischen Toxizität von siRNAs in diesen Zellen zu verzeichnen ist, eine generelle Transkriptionshemmung nach sich zu ziehen.

## 7 Summary

The tumour suppressor p53 is the most frequently mutated gene in tumours. The importance of p53 in the field of tumour prevention results from its ability to regulate decisive processes in cells such as the cell cycle, apoptosis and senescence (Levine, 1997; Prives und Hall, 1999; Vogelstein et al., 2000). The multifunctional transcription factor p53 is thus able to both activate and repress the transcription of a multitude of genes in dependance of various stress factors which can have an effect on cells (Miyashita und Redd, 1995; el- Deiry et al., 1993; Mirza et al., 2002).

Current research has demonstrated that p53 can be bound to the promoters of some of its target genes even in the absence of stress, but without transactivating them. The result of these scientific findings led us to ask how the regulation of the already promoter- associated p53 occurs. Along this line, Hublitz and colleagues of our research group have been successful in identifying and characterizing the new INHAT- Repressor NIR. NIR is able to interact with the transcription factor p53 and with other cellular proteins.

This study has shown that the ubiquitously expressed inhibitor of acetyl- transferases NIR can successfully be repressed through siRNA technologies. Repression of the NIR expression induced specific changes in the expression pattern of target genes of the NIR regulated tumour suppressor p53. On the other hand it could be shown that some genes not known to be controlled by p53 are nonetheless regulated by NIR. Moreover, we showed that NIR repression is toxic for cells and leads to apoptosis. This inducible apoptosis was not dependant on the NIR/p53 regulated Bax- protein, at least as HCT116 wt cells.

In cell types such as MCF7, the toxicity that was caused by NIR and appeared in addition to an unspecific toxicity by siRNAs, resulted in a general transcription inhibition.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adachi, Y., Pavlakis, G. N., and Copeland, T. D. (1994). Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem* **269**(3), 2258-62.
- Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**(5381), 1322-6.
- Adida, C., Crotty, P. L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., and Altieri, D. C. (1998). Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* **152**(1), 43-9.
- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396**(6707), 184-6.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 786-94.
- Altieri, D. C., and Marchisio, P. C. (1999). Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* **79**(11), 1327-33.
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**(8), 917-21.
- Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L., and Korsmeyer, S. J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**(3), 899-906.
- Balogh, A., Mege, R. M., and Sobel, A. (1996). Growth and cell density-dependent expression of stathmin in C2 myoblasts in culture. *Exp Cell Res* **224**(1), 8-15.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**(5383), 1674-7.
- Bannister, A. J., Miska, E. A., Gorlich, D., and Kouzarides, T. (2000). Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol* **10**(8), 467-70.
- Bannister, A. J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* **109**(7), 801-6.
- Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* **8**(6), 1243-54.
- Barlev, N. A., Poltoratsky, V., Owen-Hughes, T., Ying, C., Liu, L., Workman, J. L., and Berger, S. L. (1998). Repression of GCN5 histone acetyltransferase activity via bromodomain-mediated binding and phosphorylation by the Ku-DNA-dependent protein kinase complex. *Mol Cell Biol* **18**(3), 1349-58.
- Beretta, L., Dobransky, T., and Sobel, A. (1993). Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2. *J Biol Chem* **268**(27), 20076-84.
- Bieche, I., Lachkar, S., Becette, V., Cifuentes-Diaz, C., Sobel, A., Lidereau, R., and Curmi, P. A. (1998). Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer. *Br J Cancer* **78**(6), 701-9.



- Birnbaum, M. J., Clem, R. J., and Miller, L. K. (1994). An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* **68**(4), 2521-8.
- Blander, G., and Guarente, L. (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* **73**, 417-35.
- Bouillet, P., and Strasser, A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**(Pt 8), 1567-74.
- Brattsand, G., Marklund, U., Nylander, K., Roos, G., and Gullberg, M. (1994). Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38. *Eur J Biochem* **220**(2), 359-68.
- Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1995). An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14), 6364-8.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**(6), 843-51
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**(5567), 550-3
- Carrier, F., Smith, M. L., Bae, I., Kilpatrick, K. E., Lansing, T. J., Chen, C. Y., Engelstein, M., Friend, S. H., Henner, W. D., Gilmer, T. M., and et al. (1994). Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J Biol Chem* **269**(51), 32672-7.
- Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H. Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1999). A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* **96**(3), 393-403.
- Chan, T. A., Hwang, P. M., Hermeking, H., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2000). Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev* **14**(13), 1584-8.
- Chen, J., Jackson, P. K., Kirschner, M. W., and Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* **374**(6520), 386-8.
- Chen, T. H., Brody, J. R., Romantsev, F. E., Yu, J. G., Kayler, A. E., Voneiff, E., Kuhajda, F. P., and Pasternack, G. R. (1996). Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci. *Mol Biol Cell* **7**(12), 2045-56.
- Chuikov, S., Kurash, J. K., Wilson, J. R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G. S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S. J., Barlev, N. A., and Reinberg, D. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* **432**(7015), 353-60.
- Cleary, M. L., and Sklar, J. (1985). Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(21), 7439-43.
- Creaven, M., Hans, F., Mutskov, V., Col, E., Caron, C., Dimitrov, S., and Khochbin, S. (1999). Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat. *Biochemistry* **38**(27), 8826-30.
- Curmi, P. A., Maucuer, A., Asselin, S., Lecourtois, M., Chaffotte, A., Schmitter, J. M., and Sobel, A. (1994). Molecular characterization of human stathmin expressed in *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of two phosphorylatable serines (Ser-25 and Ser-63). *Biochem J* **300** ( Pt 2), 331-8.
- Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**(5), 545-53.

- Daujat, S., Bauer, U. M., Shah, V., Turner, B., Berger, S., and Kouzarides, T. (2002). Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* **12**(24), 2090-7.
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**(Pt 3), 737-49.
- Deveraux, Q. L., and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**(3), 239-52.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**(6735), 491-6.
- Donehower, L. A., and Bradley, A. (1993). The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* **1155**(2), 181-205.
- Dornan, D., and Hupp, T. R. (2001). Inhibition of p53-dependent transcription by BOX-I phospho-peptide mimetics that bind to p300. *EMBO Rep* **2**(2), 139-44.
- Doye, V., Kellermann, O., Buc-Caron, M. H., and Sobel, A. (1992). High expression of stathmin in multipotential teratocarcinoma and normal embryonic cells versus their early differentiated derivatives. *Differentiation* **50**(2), 89-96.
- Doye, V., Soubrier, F., Bauw, G., Bouterin, M. C., Beretta, L., Koppel, J., Vandekerckhove, J., and Sobel, A. (1989). A single cDNA encodes two isoforms of stathmin, a developmentally regulated neuron-enriched phosphoprotein. *J Biol Chem* **264**(21), 12134-7.
- Dumaz, N., and Meek, D. W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J* **18**(24), 7002-10.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. und Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**(2), 188-200
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4), 817-25.
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J. D., Velculescu, V. E., Burrell, M., Hill, D. E., Healy, E., Rees, J. L., Hamilton, S. R., and et al. (1995). Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* **55**(13), 2910-9.
- Ellisen, L. W., Ramsayer, K. D., Johannessen, C. M., Yang, A., Beppu, H., Minda, K., Oliner, J. D., McKeon, F., and Haber, D. A. (2002). REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Mol Cell* **10**(5), 995-1005.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**(6662), 43-50.
- Espinosa, J. M., and Emerson, B. M. (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**(1), 57-69.
- Espinosa, J. M., Verdun, R. E., and Emerson, B. M. (2003). p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell* **12**(4), 1015-27.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669)806-11
- Flatt, P. M., Polyak, K., Tang, L. J., Scatena, C. D., Westfall, M. D., Rubinstein, L. A., Yu, J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Hill, D. E., and Pietenpol, J. A. (2000). p53-dependent

- expression of PIG3 during proliferation, genotoxic stress, and reversible growth arrest. *Cancer Lett* **156**(1), 63-72.
- Flores, E. R., Tsai, K. Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* **416**(6880), 560-4.
- Fornace, A. J., Jr. (1992). Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control. *Annu Rev Genet* **26**, 507-26.
- Fornace, A. J., Jr., Alamo, I., Jr., and Hollander, M. C. (1988). DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23), 8800-4.
- Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* **246**(2), 280-9.
- Ghosh, P. K., Anderson, J., Cohen, N., Takeshita, K., Atweh, G. F., and Lebowitz, P. (1993). Expression of the leukemia-associated gene, p18, in normal and malignant tissues; inactivation of expression in a patient with cleaved B cell lymphoma/leukemia. *Oncogene* **8**(10), 2869-72.
- Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**(17), 2046-59.
- Gilmore, A. P., Metcalfe, A. D., Romer, L. H., and Streuli, C. H. (2000). Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* **149**(2), 431-46.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**(2), 121-41.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**(5381), 1309-12.
- Grewal, S. I., and Rice, J. C. (2004). Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr Opin Cell Biol* **16**(3), 230-8.
- Griffiths, G. J., Corfe, B. M., Savory, P., Leech, S., Esposti, M. D., Hickman, J. A., and Dive, C. (2001). Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak. *Oncogene* **20**(52), 7668-76.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C., and Hickman, J. A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**(5), 903-14.
- Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**(15), 1899-911.
- Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**(4), 595-606.
- Gullberg, M., Noreus, K., Brattsand, G., Friedrich, B., and Shingler, V. (1990). Purification and characterization of a 19-kilodalton intracellular protein. An activation-regulated putative protein kinase C substrate of T lymphocytes. *J Biol Chem* **265**(29), 17499-505.
- Hailat, N., Strahler, J., Melhem, R., Zhu, X. X., Brodeur, G., Seeger, R. C., Reynolds, C. P., and Hanash, S. (1990). N-myc gene amplification in neuroblastoma is associated with altered phosphorylation of a proliferation related polypeptide (Op18). *Oncogene* **5**(11), 1615-8.
- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P. L., Wu, H. Y., Wang, J. Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* **96**(3), 405-13.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1), 57-70.

- Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., and et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* **6**(4), 387-400.
- Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D., and Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**(6299), 334-6.
- Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J., and Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* **277**(5), 3247-57.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**(5015), 49-53.
- Hublitz, P., Kunowska, N., Mayer, U. P., Muller, J. M., Heyne, K., Yin, N., Fritzsche, C., Poli, C., Miguet, L., Schupp, I. W., van Grunsven, L. A., Potiers, N., van Dorsselaer, A., Metzger, E., Roemer, K., and Schule, R. (2005). NIR is a novel INHAT repressor that modulates the transcriptional activity of p53. *Genes Dev* **19**(23), 2912-24.
- Hunter, T., Hunt, T., Jacksen, R.J. and Robertson, H.D.(1975). The characteristics of inhibition of protein synthesis by double- stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem* **250**(2), 409-17
- Imbriano, C., Gurtner, A., Cocchiarella, F., Di Agostino, S., Basile, V., Gostissa, M., Dobbstein, M., Del Sal, G., Piaggio, G., and Mantovani, R. (2005). Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol* **25**(9), 3737-51.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C. H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E., and Yao, T. P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo J* **21**(22), 6236-45.
- Ito, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M. H., Appella, E., and Yao, T. P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J* **20**(6), 1331-40.
- Jin, S., Antinore, M. J., Lung, F. D., Dong, X., Zhao, H., Fan, F., Colchagie, A. B., Blanck, P., Roller, P. P., Fornace, A. J., Jr., and Zhan, Q. (2000). The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem* **275**(22), 16602-8.
- Jin, S., Fan, F., Fan, W., Zhao, H., Tong, T., Blanck, P., Alomo, I., Rajasekaran, B., and Zhan, Q. (2001). Transcription factors Oct-1 and NF-YA regulate the p53-independent induction of the GADD45 following DNA damage. *Oncogene* **20**(21), 2683-90.
- Juan, L. J., Shia, W. J., Chen, M. H., Yang, W. M., Seto, E., Lin, Y. S., and Wu, C. W. (2000). Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem* **275**(27), 20436-43.
- Kaesler, M. D., and Iggo, R. D. (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1), 95-100.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**(4), 587-97.
- Kawasaki, H., Schiltz, L., Chiu, R., Itakura, K., Taira, K., Nakatani, Y., and Yokoyama, K. K. (2000). ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* **405**(6783), 195-200.
- Kelekar, A., and Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**(8), 324-30.
- Knippers, R. Molekulare Genetik, Thieme Verlag, 9. komplett überarbeitete Ausgabe

- Kobet, E., Zeng, X., Zhu, Y., Keller, D., and Lu, H. (2000). MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23), 12547-52.
- Koh, S. S., Li, H., Lee, Y. H., Widelitz, R. B., Chuong, C. M., and Stallcup, M. R. (2002). Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J Biol Chem* **277**(29), 26031-5.
- Koppel, J., Bouterin, M. C., Doye, V., Peyro-Saint-Paul, H., and Sobel, A. (1990). Developmental tissue expression and phylogenetic conservation of stathmin, a phosphoprotein associated with cell regulations. *J Biol Chem* **265**(7), 3703-7.
- Kouskouti, A., and Talianidis, I. (2005). Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *Embo J* **24**(2), 347-57.
- La Thangue, N. B. (2004). Histone deacetylase inhibitors and cancer therapy. *J Chemother* **16 Suppl 4**, 64-7.
- Lambert, P. F., Kashanchi, F., Radonovich, M. F., Shiekhattar, R., and Brady, J. N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem* **273**(49), 33048-53.
- Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**(5701), 261-3.
- Lee, M. H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* **9**(6), 639-49.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**(3), 323-31.
- Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**(6326), 453-6.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**(6711), 580-4.
- Linzer, D. I., Maltzman, W., and Levine, A. J. (1979). The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology* **98**(2), 308-18.
- Liu, G., Xia, T., and Chen, X. (2003). The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB-binding protein. *J Biol Chem* **278**(19), 17557-65.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**(2), 1202-9.
- Lo, W. S., Duggan, L., Emre, N. C., Belotserkovskaya, R., Lane, W. S., Shiekhattar, R., and Berger, S. L. (2001). Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**(5532), 1142-6.
- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A., and Dobbstein, M. (2003). p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* **278**(35), 32507-16.
- Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J., and Drobetsky, E. A. (1997). A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res* **57**(16), 3390-4.
- Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**(2), 137-48.
- Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., and Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* **408**(6810), 377-81.

- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massague, J. (1995). Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375**(6527), 159-61.
- Malkin, D., and Friend, S. H. (1993). Correction: a Li-Fraumeni syndrome p53 mutation. *Science* **259**(5097), 878.
- Maniatis, T., Sambrook J. and Fritsch E.F. (1989). "*Molecular Cloning*, a laboratory manual 2nd ed." Cold Spring Harbor, Laboratory Press 1-3.
- Marchenko, N. D., Zaika, A., and Moll, U. M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **275**(21), 16202-12.
- Marmorstein, R., and Roth, S. Y. (2001). Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2), 155-61.
- Martin, S. J., and Green, D. R. (1995). Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**(3), 349-52.
- Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U. M., Nielsen, S. J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* **19**(4), 662-71.
- Martinou, I., Desagher, S., Eskes, R., Antonsson, B., Andre, E., Fakan, S., and Martinou, J. C. (1999). The release of cytochrome c from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J Cell Biol* **144**(5), 883-9.
- Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* **9**(6), 650-62.
- McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J. P., and Korsmeyer, S. J. (1989). bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* **57**(1), 79-88.
- Mesri, M., Wall, N. R., Li, J., Kim, R. W., and Altieri, D. C. (2001). Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* **108**(7), 981-90.
- Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S. F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Nielsen, L. L., Pickett, C. B., and Liu, S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* **21**(17), 2613-22.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J. C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* **54**(12), 3131-5.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**(7), 1237-45.
- Mori, N., Stein, R., Sigmund, O., and Anderson, D. J. (1990). A cell type-preferred silencer element that controls the neural-specific expression of the SCG10 gene. *Neuron* **4**(4), 583-94.
- Murphy, K. M., Ranganathan, V., Farnsworth, M. L., Kavallaris, M., and Lock, R. B. (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* **7**(1), 102-11.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K. K., Hoffman, W. H., Evans, R. M., Levine, A. J., and George, D. L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**(19), 2490-501.
- Nagata, K., Kawase, H., Handa, H., Yano, K., Yamasaki, M., Ishimi, Y., Okuda, A., Kikuchi, A., and Matsumoto, K. (1995). Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10), 4279-83.
- Nakagawa, K., Taya, Y., Tamai, K., and Yamaizumi, M. (1999). Requirement of ATM in phosphorylation of the human p53 protein at serine 15 following DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **19**(4), 2828-34.

- Nakamura, S., Roth, J. A., and Mukhopadhyay, T. (2000). Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol* **20**(24), 9391-8.
- Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3), 683-94.
- Nowak, S. J., and Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**(4), 214-20.
- Nylander, K., Marklund, U., Brattsand, G., Gullberg, M., and Roos, G. (1995). Immunohistochemical detection of oncoprotein 18 (Op18) in malignant lymphomas. *Histochem J* **27**(2), 155-60.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000a). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**(5468), 1053-8.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. (2000b). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**(6), 849-62.
- Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C. C., Taya, Y., Monden, M., and Nakamura, Y. (2001). p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell* **8**(1), 85-94.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**(6381), 80-3.
- Pal, S., Vishwanath, S. N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. (2004). Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol* **24**(21), 9630-45.
- Papathanasiou, M. A., Kerr, N. C., Robbins, J. H., McBride, O. W., Alamo, I., Jr., Barrett, S. F., Hickson, I. D., and Fornace, A. J., Jr. (1991). Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **11**(2), 1009-16.
- Patel, J. H., Du, Y., Ard, P. G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C. J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P. M., Lane, W. S., Blobel, G. A., and McMahan, S. B. (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* **24**(24), 10826-34.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**(6792), 207-10.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8**(1), 9-22.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**(6648), 300-5.
- Prives, C. (1998). Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* **95**(1), 5-8.
- Prives, C., and Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* **187**(1), 112-26.
- Roemer, K. (1999). Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* **380**(7-8), 879-87.

- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**(18), 2831-41.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**(6905), 407-11.
- Sartorelli, V., Puri, P. L., Hamamori, Y., Ogryzko, V., Chung, G., Nakatani, Y., Wang, J. Y., and Kedes, L. (1999). Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Mol Cell* **4**(5), 725-34.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B., and Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**(5302), 983-6.
- Schneider, R., Bannister, A. J., Weise, C., and Kouzarides, T. (2004). Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *J Biol Chem* **279**(23), 23859-62.
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S. J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* **300**(5616), 135-9.
- Seo, S.B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W.S., and Chakravarti, D. (2001). Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* **104**, 119-130
- Seo, S.B., Macfarlan, T., McNamara, P., Hong, R., Mukai, Y., Heo, S., and Chakravarti, D. (2002). Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 14005-14010.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F., and Karin, M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* **103**(6), 897-907.
- Sheaff, R. J., Singer, J. D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J. M., and Clurman, B. E. (2000). Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* **5**(2), 403-10.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., and Casero, R. A. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7), 941-53.
- Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar el, B., Whetstine, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P., and Nakatani, Y. (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* **422**(6933), 735-8.
- Shoshani, T., Faerman, A., Mett, I., Zelin, E., Tenne, T., Gorodin, S., Moshel, Y., Elbaz, S., Budanov, A., Chajut, A., Kalinski, H., Kamer, I., Rozen, A., Mor, O., Keshet, E., Leshkowitz, D., Einat, P., Skaliter, R., and Feinstein, E. (2002). Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**(7), 2283-93.
- Singh, V., Miranda, T. B., Jiang, W., Frankel, A., Roemer, M. E., Robb, V. A., Gutmann, D. H., Herschman, H. R., Clarke, S., and Newsham, I. F. (2004). DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo. *Oncogene* **23**(47), 7761-71.
- Sobel, A. (1991). Stathmin: a relay phosphoprotein for multiple signal transduction? *Trends Biochem Sci* **16**(8), 301-5.
- Sobel, A., Boutterin, M. C., Beretta, L., Chneiweiss, H., Doye, V., and Peyro-Saint-Paul, H. (1989). Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). *J Biol Chem* **264**(7), 3765-72.



- Soussi, T., Caron de Fromentel, C., and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5**(7), 945-52.
- Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E. H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* **348**(6303), 747-9.
- Stallcup, M. R., Chen, D., Koh, S. S., Ma, H., Lee, Y. H., Li, H., Schurter, B. T., and Aswad, D. W. (2000). Co-operation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. *Biochem Soc Trans* **28**(4), 415-8.
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765), 41-5.
- Strahler, J. R., Lamb, B. J., Ungar, D. R., Fox, D. A., and Hanash, S. M. (1992). Cell cycle progression is associated with distinct patterns of phosphorylation of Op18. *Biochem Biophys Res Commun* **185**(1), 197-203.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**, 217-45.
- Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**(4), 645-54.
- Szak, S. T., Mays, D., and Pietenpol, J. A. (2001). Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo. *Mol Cell Biol* **21**(10), 3375-86.
- Takekawa, M., and Saito, H. (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* **95**(4), 521-30.
- Taylor, W. R., and Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**(15), 1803-15.
- Thiagalingam, S., Cheng, K. H., Lee, H. J., Mineva, N., Thiagalingam, A., and Ponte, J. F. (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* **983**, 84-100.
- Toutou, R., Richardson, J., Bose, S., Nakanishi, M., Rivett, J., and Allday, M. J. (2001). A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *Embo J* **20**(10), 2367-75.
- Toutant, M., and Sobel, A. (1987). Protein phosphorylation in response to the tumor promoter TPA is dependent on the state of differentiation of muscle cells. *Dev Biol* **124**(2), 370-8.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**(1), 67-74.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C. M. (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **229**(4720), 1390-3.
- Vairapandi, M., Azam, N., Balliet, A. G., Hoffman, B., and Liebermann, D. A. (2000). Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control. *J Biol Chem* **275**(22), 16810-9.
- Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**(6189), 440-2.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., and Debussche, L. (1998). The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J* **17**(16), 4668-79.

- Verdecia, M. A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D. A., Hunter, T., and Noel, J. P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* **7**(7), 602-8.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**(6810), 307-10.
- von Lindern, M., van Baal, S., Wiegant, J., Raap, A., Hagemeijer, A., and Grosveld, G. (1992). Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Mol Cell Biol* **12**(8), 3346-55.
- Vousden, K. H. (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* **1602**(1), 47-59.
- Vousden, K. H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**(8), 594-604.
- Wang, H. G., Miyashita, T., Takayama, S., Sato, T., Torigoe, T., Krajewski, S., Tanaka, S., Hovey, L., 3rd, Troppmair, J., Rapp, U. R., and et al. (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* **9**(9), 2751-6.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y., Roeder, R. G., Clarke, S., Stallcup, M. R., Allis, C. D., and Coonrod, S. A. (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* **306**(5694), 279-83.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517), 727-30.
- Weissman, J. D., Brown, J. A., Howcroft, T. K., Hwang, J., Chawla, A., Roche, P. A., Schiltz, L., Nakatani, Y., and Singer, D. S. (1998). HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(20), 11601-6.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.
- You, A., Tong, J. K., Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2001). CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1454-8.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**(3), 673-82.
- Zhan, Q., Fan, S., Smith, M. L., Bae, I., Yu, K., Alamo, I., Jr., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. (1996). Abrogation of p53 function affects gadd gene responses to DNA base-damaging agents and starvation. *DNA Cell Biol* **15**(10), 805-15.
- Zhang, H., Xiong, Y., and Beach, D. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* **4**(9), 897-906.
- Zhang, P., Wong, C., Liu, D., Finegold, M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1999). p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes Dev* **13**(2), 213-24.
- Zhang, Q., Yao, H., Vo, N., and Goodman, R. H. (2000). Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26), 14323-8.
- Zhou, M., Gu, L., Li, F., Zhu, Y., Woods, W. G., and Findley, H. W. (2002). DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* **303**(1), 124-31.

## 9 Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A	Ampere
$\alpha$	anti
aa	amino acid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Apaf 1	“apoptotic protein activating factor 1”
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	“ataxia teleangiectasia mutated”
BcL	B- Cell Lymphoma
BH	Bcl- 2 Homology Domain
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CASY	Cell Counter And Analyser System
cDNA	“complementary DNA”, komplementäre DNA
cdk	“cyclin dependant kinase”, Cyclin abhängige Kinase
CIP	calf intestinal phosphatase
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	“double strand”, Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
ECL	„enhanced chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszein isothiocyanate
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase
h	Stunde

---

H <sub>2</sub> O <sub>(bi)dest</sub>	(bi)destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAT	Histon Acetyltransferase
HCL	Salzsäure
HCT	Humane Kolontumorzellen
HDAC	Histon Deacetylase
IAP	Inhibitor of Apoptosis- Protein
INHAT	Inhibitor of Acetyltransferase
Kap.	Kapitel
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge [nm]
M	Molar
m	Milli-
mA	Milliampere
μ	Mikro
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
N-	Amino-
NaOH	Natriumhydroxid
NIR	Novel INHAT Repressor
NLS	Kernlokalisierungssignal, "nuclear localization signal"
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.t.	post transfectionem
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
Pox	Peroxidase
Redd 1	regulated in development and DNA damage responses
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RLU	relative light units
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	„reactive oxygen species“
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	Reverse Transkriptase- Polymerase Chain Reaktion
s.	siehe

---

sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
Set	suv, enhancer of zeste, trithorax
siRNA	„short interfering“ ribonucleic acid
SV40	„Simian virus 40“
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraacetat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan
U	„Unit“ (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
V	Volumen
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
WAF	Wildtyp p53 activated fragment 1
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
z.B.	zum Beispiel

## **ERKLÄRUNG**

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig- Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5232-3



9 7 8 3 8 3 5 1 9 5 2 3 2 4