

Bianca Günther

---

Untersuchungen zur signalabhängigen  
Regulation der Enzymaktivität von  
Argonaut 2

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**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 2013

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 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

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)

**Untersuchungen zur signalabhängigen  
Regulation der Enzymaktivität von  
Argonaut 2**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereiches Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Bianca Günther**  
aus Ibbenbüren

Gießen 2013

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. Michael Kracht

Gutachter: Prof. Dr. M. Kracht

Gutachter: Prof. Dr. S. Kanse

Tag der Disputation: 17.12.2013

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	RNA-INTERFERENZ (RNAi)	1
1.1.1	ABLAUF DER RNA-INTERFERENZ	3
1.1.2	BESTANDTEILE DER RNA-INTERFERENZ	3
1.1.2.1	KLEINE NICHT-CODIERENDE RNAs	3
1.1.2.1.1	<i>SMALL INTERFERING RNA</i> (siRNA)	4
1.1.2.1.2	<i>MICRO RNA</i> (miRNA)	5
1.1.2.1.3	<i>PIWI-INTERACTING RNA</i> (piRNA)	7
1.1.2.2	ARGONAUT-PROTEINE (AGO)	8
1.1.2.3	ZIEL-RNA	12
1.1.2.4	RNASE III-RIBONUKLEASEN	12
1.1.3	RISC ( <i>RNA-INDUCED SILENCING COMPLEX</i> )	13
1.1.3.1	RISC-ASSAY	14
1.2	MAP-KINASEN ( <i>MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES</i> )	15
1.2.1	JNK (cJUN N-TERMINALE KINASE)	17
1.2.2	c-JUN	20
1.2.3	p38	21
1.2.4	BEDEUTUNG DER MAP-KINASEN FÜR DIE THERAPIE NEOPLASTISCHER ERKRANKUNGEN	22
1.3	FRAGESTELLUNG	23
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
2.1	VERBRAUCHSMATERIAL	24
2.2	GERÄTE	24
2.3	CHEMIKALIEN	25
2.4	LÖSUNGEN UND PUFFER	26
2.5	ZELLINIE	28
2.6	MEDIEN	29
2.7	ENZYM UND ENZYMPUFFER	29
2.8	ANTIKÖRPER	29
2.9	REKOMBINANTE PROTEINE	31
2.10	ZYTOSTATIKA	31
2.11	ANTIBIOTIKA	31
2.12	VEKTOREN	31
2.13	STANDARDS	32
2.14	BAKTERIENSTÄMME	32
2.15	SONSTIGE MATERIALIEN, REAGENZIEN UND KITS	32
2.2	METHODEN	34
2.2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	34
2.2.1.1	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	34
2.2.1.2	DNA-GELEXTAKTION MIT DEM <i>QIAGEN QUICK GEL EXTRACTION KIT</i>	35
2.2.1.3	IN VITRO TRANSKRIPTION MIT DEM <i>MEGASCRIPT KIT</i>	35
2.2.1.4	BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION MIT DER NANODROP™ 100	35
2.2.1.5	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	36
2.2.1.6	HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEM GST-AGO2	37
2.2.1.7	<i>RNA-INDUCED SILENCING COMPLEX ASSAY (RISC-ASSAY)</i>	37
2.2.1.8	PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION UND ETHANOLFÄLLUNG	38
2.2.1.9	AGILENT RNA 6000 NANO ASSAY	38
2.2.1.10	GSH-BEADS ASSAY	39
2.2.1.11	IMMUNPRÄZIPITATION	39
2.2.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	40
2.2.2.1	DISKONTINUIERLICHE SDS-PAGE NACH LAEMMLI	40
2.2.2.2	FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELN MIT <i>COOMASSIE BRILLIANT BLUE</i>	41
2.2.2.3	WESTERN BLOT UND IMMUNODETEKTION MITTELS ECL	41

2.2.3	ZELLKULTURTECHNIKEN.....	43
2.2.3.1	AUFTAUEN VON ZELLEN.....	43
2.2.3.2	KULTIVIEREN UND PASSAGIEREN ADHÄRENT WACHSENDER ZELLEN.....	43
2.2.3.3	STIMULATION UND ERNTEN VON ZELLEN.....	43
2.2.3.4	ZELLZÄHLUNG.....	44
2.2.3.5	TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT CALCIUMPHOSPHAT.....	44
2.2.3.6	HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN.....	45
2.2.3.6.1	ZELLYSE MIT GANZZELLYSEPUFFER.....	45
2.2.3.6.2	ZELLYSE MIT $\beta$ -GALAKTOSIDASE-PUFFER.....	45
2.2.3.6.3	ZELLYSE MIT TAP-LYSEPUFFER.....	45
2.2.3.6.4	ZELLYSE MIT BOHMANN-LYSEPUFFER.....	46
2.2.3.7	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION (BRADFORD, 1976).....	46
2.2.3.8	LUZIFERASE-REPORTERGENASSAY.....	46
2.2.3.9	$\beta$ -GALAKTOSIDASE-MESSUNG.....	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
3.1	HERSTELLUNG DER KOMPONENTEN DES RISC-ASSAYS.....	48
3.1.1	AUFREINIGUNG VON REKOMBINANTEM GST-AGO2.....	48
3.1.2	<i>IN-VITRO</i> TRANSKRIPTION EINER LUZIFERASE-RNA UND ANSCHLIEßENDE ÜBERPRÜFUNG DER INTEGRITÄT.....	49
3.2	OPTIMIERUNG DES RISC-ASSAYS.....	52
3.2.1	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN INKUBATIONSZEIT FÜR DEN RISC-ASSAY.....	53
3.2.2	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN GST-AGO2-MENGE FÜR DEN RISC-ASSAY.....	54
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR SIGNALABHÄNGIGEN REGULATION DER AGO2- AKTIVITÄT MITTELS GSH-BEADS ASSAY.....	55
3.3.1	GSH-BEADS ASSAY MIT IL-1-STIMULIERTEN HEK293IL-1R-ZELLEN.....	56
3.3.2	GSH-BEADS ASSAY MIT ELUTION.....	57
3.3.3	GSH-BEADS ASSAY MIT ERHÖHTER GST-AGO2-KONZENTRATION.....	58
3.3.4	EINFLUSS DER INKUBATIONSZEIT UND -TEMPERATUR AUF DIE AKTIVITÄT VON GST-AGO2 IM GSH-BEADS ASSAY.....	59
3.3.5	GSH-BEADS ASSAY MIT $\beta$ -GALAKTOSIDASE-PUFFER ( $\beta$ -GAL-PUFFER).....	61
3.3.6	TAP-LYSEPUFFER.....	62
3.4	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VERSCHIEDENER ZYTOSTATIKA AUF AUSGEWÄHLTE MAP-KINASEN UND AGO2.....	63
3.4.1	CISPLATIN.....	64
3.4.1.1	CISPLATIN MIT AGO2-ÜBEREXPRESSION.....	65
3.4.2	DOXORUBICIN.....	66
3.4.2.1	DOXORUBICIN MIT AGO2-ÜBEREXPRESSION.....	67
3.4.3	VINBLASTIN.....	68
3.4.3.1	VINBLASTIN MIT AGO2-ÜBEREXPRESSION.....	69
3.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR SIGNALABHÄNGIGEN REGULATION DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT VON ARGONAUT 2 MITTELS LUZIFERASE- REPORTERGENASSAY.....	70
3.5.1	LUZIFERASE-REPORTERGENASSAY NACH TRANSFEKTION VON MEKK1 UND TAK1 <sub>KD</sub> -TAB1- <sub>AD</sub> FUSIONSPROTEIN.....	71
3.5.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VERSCHIEDENER ZYTOSTATIKA AUF DIE AGO2-AKTIVITÄT MITTELS LUZIFERASE-REPORTERGENASSAY.....	72
3.5.2.1	CISPLATIN.....	73
3.5.2.2	DOXORUBICIN.....	74
3.5.2.3	VINBLASTIN.....	75
3.5.3	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VERSCHIEDENER ZYTOSTATIKA AUF DIE RISC-AKTIVITÄT NACH ÜBEREXPRESSION VON AGO2 MITTELS LUZIFERASE- REPORTERGENASSAY.....	76
3.5.3.1	CISPLATIN.....	77
3.5.3.2	DOXORUBICIN.....	78
3.5.3.3	VINBLASTIN.....	79

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>81</b>
4.1	RISC-ASSAY.....	81
4.2	LUZIFERASE-REPORTERGENASSAY.....	84
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>90</b>
5.1	ABSTRACT.....	91
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b> .....	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>101</b>





Proteinsynthese wird durch kleine RNAs, die in der Zelle generiert werden (3) und die RNA-Interferenz-vermittelte Suppression der Transkription (4) blockiert. Diese Prozesse können ebenfalls durch das experimentelle Einbringen von siRNA induziert werden und die Aktivität spezifischer Gene inhibieren (5).

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) wurde erstmals 1998 von Fire et al. beschrieben. Für die Entdeckung wurde ihnen 2006 der Nobelpreis für Medizin oder Physiologie verliehen. Sie zeigten, dass doppelsträngige RNA (dsRNA), die im Verlauf zu einer *small-interfering* RNA (siRNA) prozessiert wird, die Expression einzelner Gene unterdrücken kann (Zamore 2006). Die siRNA-vermittelte RNAi ist in vielen Organismen Teil des angeborenen Immunsystems und wurde als antiviraler Mechanismus zur Abwehr von RNA-Viren beobachtet (Meister and Tuschl 2004). Bereits in den 1960er Jahren kam erstmals die Idee auf, dass kleine RNA-Moleküle an Gene binden und diese so ausschalten. Nach Entdeckung der Transkriptionsfaktoren wurde diese Hypothese jedoch wieder verlassen (Zamore 2006). Fire et al. beschrieben, dass das Injizieren von langen doppelsträngigen RNAs (dsRNA) in die Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) das posttranskriptionelle *silencing* von Genen, die für die homologe mRNA codieren, induziert und somit deren Translation unterbindet. Das Einbringen spezifischer dsRNA in Zellen führte zu einer ausgeprägten Suppression der intrazellulären mRNA-Menge. Dieser Effekt ist durch doppelsträngige RNA 10-fach deutlicher als durch das Einbringen von *sense*- oder *antisense*-RNA allein. Das experimentelle Einbringen von dsRNA in Zellen kann in bestimmten biologischen Systemen genutzt werden um in die Funktion endogener Gene einzugreifen. Die Effekte beruhen auf einer Hybridisierung zwischen der injizierten RNA und der endogenen mRNA, wodurch ein spezifischer Abbau der mRNA oder eine Translationshemmung eingeleitet wird (Fire, Xu et al. 1998). Der Entdeckung der RNA-Interferenz wird eine ähnliche Bedeutung wie der der PCR (*polymerase chain reaction*) zugeschrieben (Zamore 2006). Die hohe Sequenzspezifität und die einfache Applikation doppelsträngiger RNA (dsRNA) machen die RNAi zu einem der wichtigsten Werkzeuge für die Untersuchungen der Genomfunktion von Organismen, wie z.B. *C. elegans*, deren Genom vollständig entschlüsselt ist (Tuschl 2001). Des Weiteren ist sie eine etablierte Methode zum *Gen-knockdown* (Shafer and Taghert 2009). Die Möglichkeit der Anwendung dieser Methode lässt für die Zukunft hoffen, dass es möglich sein könnte, siRNAs in Form von Medikamenten zu verabreichen, um so virale oder humane Gene, die Krankheiten auslösen, zu blockieren. Es wurde bereits im Maus- und Affenmodell nachgewiesen, dass die intravenöse Injektion

von modifizierten siRNAs eine langanhaltende sequenzspezifische Blockierung der korrespondierenden mRNA in verschiedenen Geweben auslösen kann. Erste Ergebnisse aus Studien am Menschen versprechen eine gute Toleranz des menschlichen Körpers gegenüber siRNAs (Zamore 2006).

### **1.1.1 Ablauf der RNA-Interferenz (RNAi)**

Der Mechanismus der RNA-Interferenz kann in drei Schritte unterteilt werden. Zunächst wird eine lange doppelsträngige RNA (dsRNA), welche in der Zelle selbst exprimiert oder in diese eingeschleust wird, durch eine Ribonuklease III (RNase III) namens Dicer zu kleinen RNA-Duplexen prozessiert. Diese werden entwunden und ein Strang, der sogenannte *guide*-Strang, wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) aufgenommen. Im letzten Schritt bindet dieser einzelsträngige *guide*-Strang an eine komplementäre mRNA und induziert die Spaltung dieser durch das zum RISC gehörende Argonautprotein (Siomi and Siomi 2009).

### **1.1.2 Bestandteile der RNA-Interferenz**

#### **1.1.2.1 Kleine nicht-codierende RNAs**

Nicht-codierende oder *non-messenger* RNAs sind Moleküle mit strukturellen, enzymatischen und regulatorischen Funktionen. Es sind mehr als 2000 Gensequenzen für die zu dieser Gruppe gehörigen *micro* RNAs (miRNA) in tierischen Genomen bekannt, jedoch kennt man nur bei wenigen die Funktion (Ambros 2004; Landi et al. 2012). Eine Aufgabe der kleinen RNAs ist es, die Argonautproteine direkt zu binden und sie zur Ziel-mRNA zu führen. In diesem Komplex ist die kleine RNA für die Spezifität zuständig, während das Argonautprotein die Spaltung der RNA (*slicing*) sicherstellt. Auch DNA kann ein Zielmolekül sein (Kim 2008).

Hamilton und Baulcombe beschrieben 1999, ein Jahr nach der Entdeckung der RNA-Interferenz, dass in Pflanzen, in denen ein spezifisches Gen blockiert wurde, eine Akkumulation von *antisense*-RNA auftrat, welche eine Länge von ca. 25 Nukleotiden hatten. Diese kleinen RNAs sind komplementär zu dem blockierten Gen und werden heute *small interfering* RNAs (siRNA) genannt. In Zellkulturexperimenten zeigten sie, dass diese siRNAs

durch Dicer, eine Endonuklease, prozessiert werden (Zamore 2006). Die Reifung der kleinen RNAs ist ein schrittweise ablaufender Prozess der sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma stattfindet. Beteiligt an diesem Prozess sind zwei dsRNA-spezifische Endonukleasen vom RNase III-Typ: Drosha und Dicer (Meister and Tuschl 2004).

Entsprechend ihrer Herkunft oder Funktion sind bisher drei Typen natürlich vorkommender kleiner RNAs beschrieben worden: *small interfering RNAs* (siRNA), *piwi-interacting RNAs* (piRNAs) und *micro RNAs* (miRNA) (Kim 2008). In der Natur wird eine dsRNA durch RNA-Polymerisation nach Vorlage eines RNA-*templates* (z.B. viraler Herkunft) oder durch Hybridisierung überlappender Transkripte produziert. Aus solchen dsRNAs entstehen dann siRNAs oder rasiRNAs (*repeat associated small interfering RNA*) welche die mRNA-Degradierung oder Chromatinmodifikationen einleiten. Endogene Transkripte, die 20-50 komplementäre Basenpaare enthalten formen dsRNA-*hairpins*, die zu miRNAs prozessiert werden. Diese führen eine Translationshemmung herbei und leiten möglicherweise ebenfalls die Degradierung der mRNA ein (Meister and Tuschl 2004).

Obwohl alle Klassen kleiner RNAs mit jedem Subtyp der Argonautproteine in gewissem Ausmaß assoziiert sind, findet sich eine klare Präferenz für spezifische Klassen kleiner RNAs. Argonaut 2-Komplexe z.B. sind reich an tasiRNAs (*trans acting RNA*) und enthalten eine relative hohe Menge an rasiRNAs (*repeat associated small interfering RNA*). Mi et al. (2008) und Montgomery et al. (2008) untersuchten Merkmale dieser kleinen RNAs, die eine Zielführung zu spezifischen Ago-Komplexen bedingen. Die Wahl des Argonautproteins hat wichtige funktionelle Konsequenzen, da unterschiedliche Argonautproteine verschiedene Effekte auf RNA und Chromatin haben. Aufgrund der Tatsache, dass am 5'-Ende der verschiedenen Argonautproteine bestimmte Nukleotide deutlich überwiegen, stellten Mi et al. (2008) die Hypothese auf, dass die Bindungsaffinität der Argonautproteine durch das terminale Nukleotid am 5'-Ende bedingt ist (Kim 2008).

#### **1.1.2.1.1 *small interfering RNA* (siRNA)**

siRNAs gehören zur Gruppe der kleinen, nicht-codierenden RNAs und sind ein wichtiger Bestandteil der RNA-Interferenz (Siomi and Siomi 2009). Sie funktionieren als *guide* für Argonautproteine zu ihren homologen Substraten (Hannon 2002; Zamore 2006; Jinek and Doudna 2009).

siRNAs leiten sich von langen doppelsträngigen RNAs (dsRNA) ab, die bei RNA-Virus-Replikation, Transkription von zellulären Genen oder mobilen genetischen Elementen oder experimenteller Transfektion auftreten (Jinek and Doudna 2009). Die RNase III Dicer prozessiert diese dsRNA und generiert die 21-25 Nukleotide langen siRNAs (Jinek and Doudna 2009; Siomi and Siomi 2009). Diese haben als Kennzeichen einer RNase III-vermittelten Spaltung eine Monophosphatgruppe an beiden 5'-Enden sowie Hydroxylgruppen und einen Dinukleotidüberhang an beiden 3'-Enden (Siomi and Siomi 2009). Diese Kennzeichen, wie auch die charakteristische Länge des RNA-Duplexes, stellen die Aufnahme in den RISC sicher (Elbashir, Lendeckel et al. 2001; Jinek and Doudna 2009). Strukturelle Untersuchungen der prokaryotischen RNase III und dem eukaryotischen Dicer haben ergeben, dass diese typischen Eigenschaften während der Biogenese durch Drosha und/oder Dicer generiert werden (Jinek and Doudna 2009).

Mit einem der beiden entstandenen RNA-Stränge, dem *guide*-Strang, wird das Argonautprotein des RISC beladen. Dies geschieht mithilfe des RISC-loading-complex (RLC). Der zweite RNA-Strang (*passenger*-Strang) wird durch Argonaut gespalten und verworfen. Nun nutzt das Argonautprotein den *guide*-Strang zur Auffindung der komplementären Ziel-mRNA und schneidet diese (Jinek and Doudna 2009). Die siRNA ist somit für die sequenzspezifische Spaltung der Ziel-mRNA verantwortlich und unterbindet auf diese Weise deren Expression (Siomi and Siomi 2009). Für miRNAs und piRNAs war von ihrer Entdeckung 1993 bzw. 2006 an klar, dass sie endogen produziert werden. Sie sind auf dem Genom codiert. Im Fall der siRNAs ging man zunächst davon aus, dass diese nur von exogen zugeführt werden können. In den letzten Jahren wurden jedoch von diversen Arbeitsgruppen endogene siRNAs identifiziert (endo-siRNAs). Alle bisher bekannten siRNAs, sowohl exogene als auch endogene, sind funktionell mit Proteinen der Argonautfamilie assoziiert (Golden, Gerbasi et al. 2008).

#### **1.1.2.1.2 *micro* RNA (miRNA)**

*Micro* RNAs (miRNAs) sind kleine endogene RNAs mit einer Länge von 21-25 Nukleotiden, die erstmals 1993 aus *C. elegans* isoliert wurden. Über die Beeinflussung der komplementären mRNA regulieren sie die Expression einer großen Anzahl endogener Gene (Ambros 2004; Diederichs and Haber 2007; Golden, Gerbasi et al. 2008; Jinek and Doudna 2009). Die

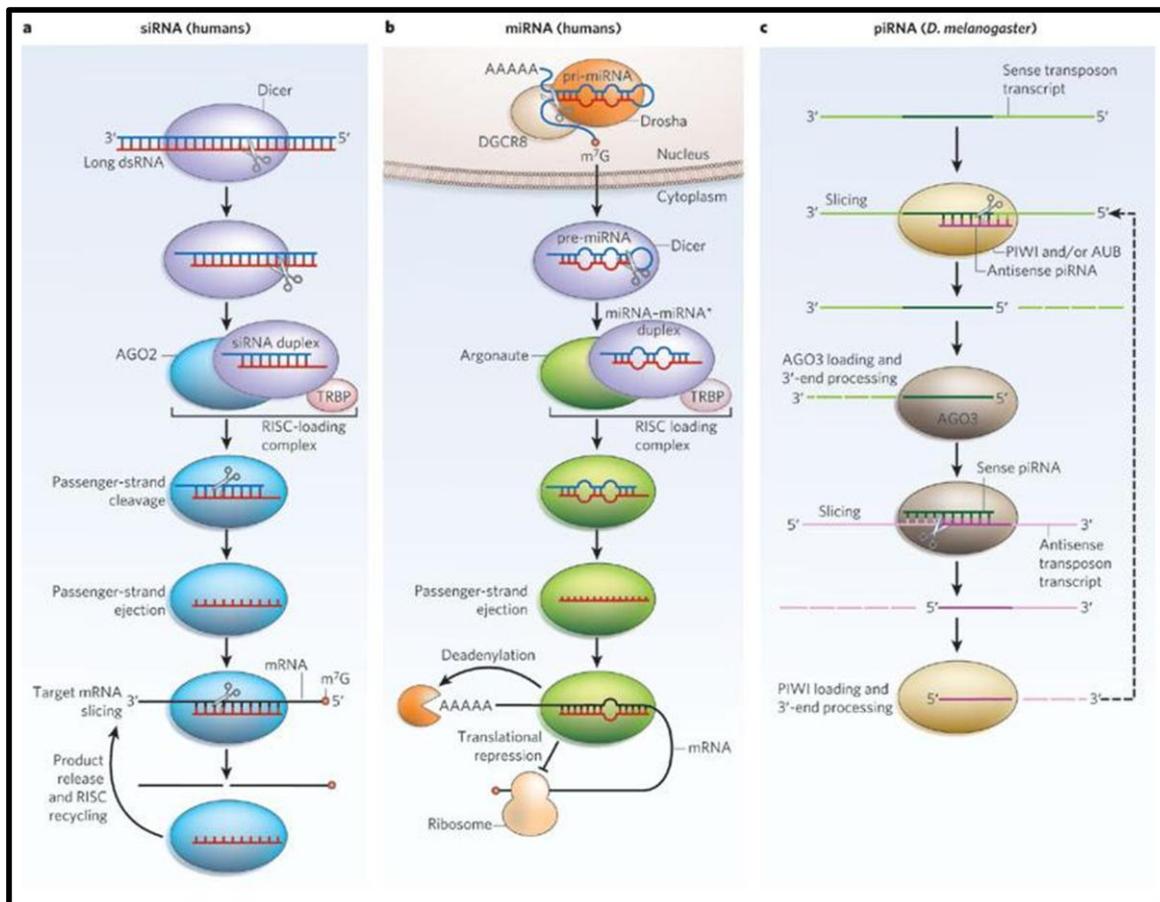
Regulation der mRNA-Stabilität und der Translation erfolgt mithilfe des RISC (Hendrickson et al. 2008). Bis zu einem Drittel der Säugetier-mRNAs stehen unter miRNA-Regulation (Beitzinger, Peters et al. 2007). *Micro* RNAs leiten Argonautproteine zur partiell komplementären Ziel-mRNA um entweder die Translation zum Protein oder deren Stabilität zu regulieren (Beitzinger, Peters et al. 2007). Sie spielen eine Rolle in der Entwicklungsbiologie, Apoptose, Zellproliferation, Hämatopoese und der Bildung des Nervensystems (Ambros 2004).

Die miRNA-Gene befinden sich oft in genomischen Clustern. Sie werden durch die RNA-Polymerase II oder III transkribiert (Beitzinger, Peters et al. 2007). Die primären Transkripte (pri-miRNA) beinhalten eine 65-70-Nukleotid-Haarnadelstruktur (*stem loop*). Diese wird im Nukleus durch die RNase III Drosha entfernt und es entsteht die Vorläufer-miRNA (*precursor* miRNA, pre-miRNA). Im Folgenden wird die pre-miRNA ins Zytoplasma transportiert und dort durch Dicer, ebenfalls eine Endonuklease der RNase III-Familie, zum reifen miRNA-Duplex, dessen *guide*-Strang sich im Folgenden mit Argonaut verbindet, prozessiert (Jinek and Doudna 2009). Die miRNAs erkennen partiell komplementäre Bindestellen an der 3'UTR (*untranslated region*) der Ziel-mRNA und funktionieren als Leitfaden für die Argonautproteine (Beitzinger, Peters et al. 2007).

Die Bindung an die Ziel-mRNA kann die Genexpression auf verschiedenen Wegen regulieren. Bei hoher Komplementarität funktionieren miRNAs in gleicher Weise wie siRNAs und leiten eine sequenzspezifische Spaltung der Ziel-mRNA ein (Beitzinger, Peters et al. 2007). In Pflanzen führen sie analog zur siRNA zur Spaltung einer Ziel-mRNA. Bei geringerem Grad an Komplementarität werden Enzyme, die zum *decapping* oder zur Depolymerisierung führen, rekrutiert oder es kommt zur Deadenylierung mit folgender mRNA-Degradierung oder die Translation wird gehemmt ohne die mRNA zu verändern (Beitzinger, Peters et al. 2007; Jinek and Doudna 2009). Tierische miRNAs sind überwiegend nur teilweise komplementär zu den Sequenzen an der 3'-UTR der Ziel-mRNA. Diese Tatsache schützt die Ziel-mRNA vor der Spaltung durch das Argonautprotein. Des Weiteren fehlt es einigen, in den miRNA-*pathway* involvierten Argonautproteinen, an der katalytischen Fähigkeit zur mRNA-Spaltung. In Säugerzellen regulieren miRNAs ihre Ziel-mRNA in den meisten Fällen herunter ohne diese zu spalten (Jinek and Doudna 2009).

1.1.2.1.3 PIWI-interacting RNA (piRNA)

Diese kleinen RNAs sind in der Lage an Proteine der Argonautfamilie, die PIWI-Proteine, zu binden und dadurch die Spaltung von Transposontranskripten zu vermitteln (Jinek and Doudna 2009; Siomi and Siomi 2009). piRNAs bestehen aus 24-31 Nukleotiden und supprimieren die potenziell gefährliche Mobilität von Transposons (mobile genetische Elemente) in der tierischen Keimbahn (Golden, Gerbasi et al. 2008; Jinek and Doudna 2009). Die Biogenese und der Mechanismus der Funktion von piRNAs sind bisher nur wenig verstanden. Sie werden im Gegensatz zu siRNAs und miRNAs aus einzelsträngigen Vorläufern und ohne Mithilfe von Dicer generiert (Jinek and Doudna 2009).



**Abbildung 2: Biogenese und Mechanismus der Hauptklassen kleiner regulatorischer RNAs (Jinek and Doudna 2009):** Kleine RNAs sind nicht-codierende RNA-Moleküle, die Ziel-RNAs sequenzspezifisch herunterregulieren. *Small interfering RNAs* (siRNA), *micro RNAs* (miRNA) und *PIWI-interacting RNAs* (piRNA) stellen die drei Hauptklassen dar. siRNAs vermitteln eine endonukleolytische Spaltung von Ziel-RNAs. Sie leiten sich von langen doppelsträngigen RNAs (dsRNA), die z.B. aus RNA-Virusreplikationen oder aus der Transkription von Transposons stammen, ab. Die Endonuklease Dicer schneidet diese dsRNA in 21-25 nt lange Produkte. Ein RNA-Strang, der *guide-strand*, wird im Anschluss an das Argonautprotein gebunden. Der zweite Strang (*passenger-strand*) wird durch Argonaut gespalten und eliminiert. Die Beladung des Argonautproteins findet im

*RISC-loading complex* (RLC), bestehend aus Argonautprotein, Dicer und einem dsRNA-bindenden Protein (TRBP), statt. Das Argonautprotein nutzt den *guide*-Strang zur Auffindung einer dazu komplementären Ziel-RNA, welche dann degradiert und eliminiert wird. Micro RNAs (miRNA) sind im Genom codiert. Pflanzliche miRNAs vermitteln eine Spaltung von Ziel-RNAs analog zu den siRNAs. Da tierische miRNAs zumeist nur eine partielle Komplementarität zur Ziel-RNA aufweisen, werden diese supprimiert, ohne gespalten zu werden. Micro RNAs werden von endogenen miRNA-Genen als *primary* miRNA (pri-miRNA), welche eine *hairpin*-Struktur aufweisen, transkribiert. Im Zellkern wird diese *hairpin*-Struktur durch die Endonuklease Droscha entfernt und es entsteht die *precursor* miRNA (pre-miRNA), welche ins Zytoplasma gelangt. Dort wird durch Dicer ein miRNA-Duplex generiert (miRNA = *guide*-Strang, miRNA\* = *passenger*-Strang). Das Argonautprotein wird mit dem *guide*-Strang beladen. Die dritte Klasse der kleinen RNAs, piRNAs, sind 24-31 nt lang und regulieren Transposons (mobile genetische Elemente) in tierischen Zellen. Die Biogenese und der Mechanismus dieser Gruppe kleiner RNAs sind bisher nur wenig verstanden. Die Abbildung zeigt ein Modell aus *Drosophila melanogaster*. piRNAs werden aus einzelsträngigen Vorläufern generiert. Dicer wird nicht benötigt. Die kleinen RNAs induzieren die Spaltung von *sense*- und *antisense*-Transposontranskripten. Dieser Prozess wird durch die Subfamilie PIWI, welche zu den Argonautproteinen gehört, vermittelt.

### 1.1.2.2 Argonaut-Proteine (Ago)

Argonautproteine sind die wichtigsten Interaktionspartner der kleinen RNAs. Seit ihrer Erstbeschreibung Ende des letzten Jahrhunderts sind sie Gegenstand intensiver Forschung. Es wurde klar, dass ihnen eine Schlüsselrolle in vielen verschiedenen *RNA-silencing-pathways* zukommt. Sie haben eine große Bedeutung für die Embryonalentwicklung, die Zelldifferenzierung und Stammzellen (Peters and Meister 2007). Mitglieder der Argonautfamilie wurden sowohl mit Gen-*silencing*-Phänomenen als auch mit der Kontrolle der Entwicklung verschiedener Spezies in Zusammenhang gebracht. Hammond, Boettcher et al. identifizierten Argonaut 2 (Ago2) erstmals 2001 als Bestandteil des RISC (Hammond, Boettcher et al. 2001). Rivas, Tolia et al. formten 2005 einen rekombinanten humanen RISC, bestehend aus Ago2 und einer siRNA (*minimal* RISC) und zeigten, dass Ago2 in der Lage ist, RNAs zu spalten, also eine *slicer*-Aktivität hat (Rivas, Tolia et al. 2005).

Die Anzahl der Argonautproteine variiert stark zwischen verschiedenen Spezies. *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) besitzt nur ein Protein dieser Familie während der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) 27 aufweist (Peters and Meister 2007). Das menschliche Genom codiert für vier Argonautproteine und vier der Argonautfamilie zugehörige Proteine (*Ago-related-proteins*), die als PIWI bezeichnet werden (MacRae, Ma et al. 2008). Im Laufe der Evolution teilte sich diese Proteinfamilie in die zwei Subfamilien Argonaut und PIWI, die verschiedene Typen von kleinen RNAs erkennen. siRNAs und miRNAs

interagieren mit Mitgliedern der Ago-Subfamilie, während piRNAs an PIWI-Proteine binden (Jinek and Doudna 2009). Insgesamt besitzt der Mensch also 8 Proteine der Argonautfamilie (MacRae, Ma et al. 2008) von denen Argonaut 2 als einziges eine Endonukleaseaktivität aufweist (Jinek and Doudna 2009).

Bei der klassischen RNA-Interferenz, die durch siRNAs induziert wird, legen Argonautproteine Ziel-mRNAs durch endonukleolytische Spaltung still. Dieser Prozess wird als *slicing* bezeichnet. Es ist eine perfekte Komplementarität zwischen der siRNA und der Ziel-mRNA im Bereich um die Spaltungsstelle erforderlich. Argonautproteine können ebenfalls unabhängig ihrer *slicer*-Aktivität Transkripte herunterregulieren. Im tierischen miRNA-*pathway* inhibieren sie die Translation der Ziel-mRNA und induzieren eine Deadenylierung mit folgendem Zerfall der mRNA (Jinek and Doudna 2009).

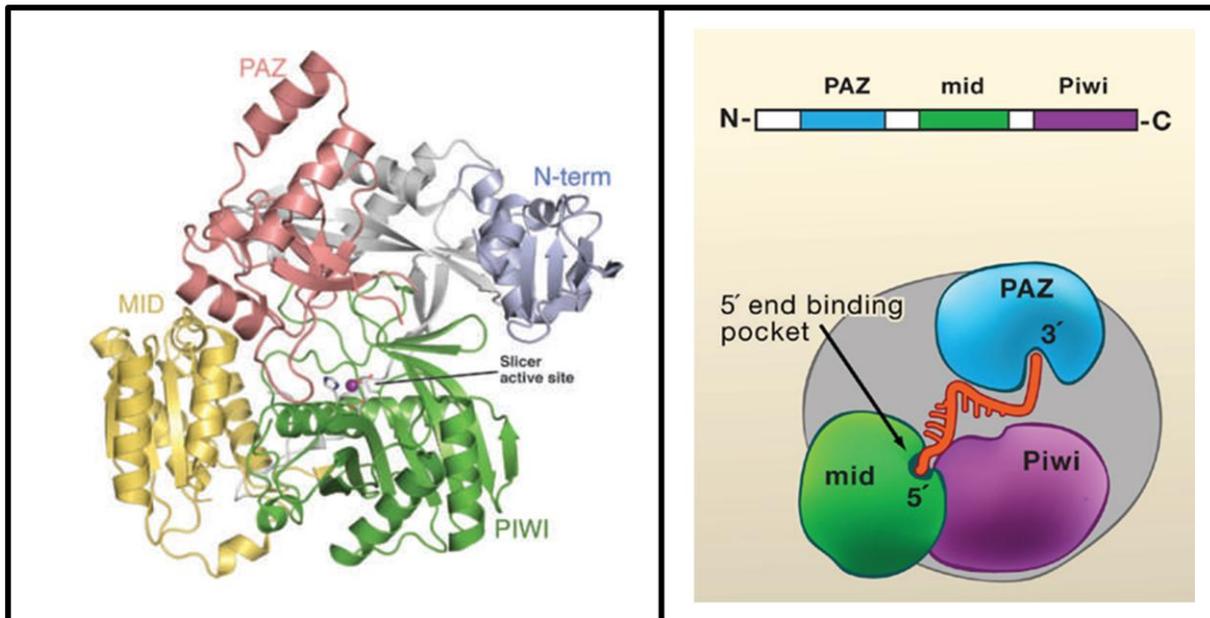
Argonautproteine setzen sich aus den drei Domänen PAZ, MID und PIWI (Peters and Meister 2007) sowie einer variablen aminoterminalen Domäne (Siomi and Siomi 2009) zusammen. Das Molekulargewicht beträgt ca. 100kDa (Peters and Meister 2007).

Die PAZ-Domäne (*piwi-argonaute-zwille*) hat eine Bindungsstelle für Nukleinsäuren (Song, Liu et al. 2003). Sie erkennt den charakteristischen 2-Nukleotid-Überhang am 3'-Ende der RNA (Rüdel, Wang et al. 2011). Dieser wird durch ein RNase III-Enzym, z. B. Dicer, generiert (Song, Liu et al. 2003; Peters and Meister 2007; Rüdel, Wang et al. 2011). Die Interaktion der PAZ-Domäne mit dem 3'-Ende der siRNA findet sowohl mit einzelsträngiger als auch doppelsträngiger siRNA statt. Diese Domäne ist hoch konserviert und kommt in Argonautproteinen und Dicer vor (Song, Liu et al. 2003).

An die MID-Domäne (*middle*) bindet das 5'-Ende der kleinen RNA (Peters and Meister 2007). Sie ist zusammen mit der PIWI-Domäne verantwortlich für die Erkennung des 5'terminalen Nukleotids der siRNA. Dieses wird in einer Tasche der MID-Domäne gebunden (Ma, Yuan et al. 2005; Kim 2008; Mi, Cai et al. 2008). Die die Tasche auskleidenden aromatischen und basischen Reste variieren möglicherweise zwischen den verschiedenen Argonautproteinen und es ist vorstellbar, dass diese die Präferenz für verschiedene 5'terminale Nukleotide bedingen (Kim 2008).

Die dritte Domäne, PIWI (*P-element induced wimpy testis*), hat Endonukleaseaktivität (*slicer*-Aktivität) mit auffallender Ähnlichkeit zur RNaseH-Familie (Meister and Tuschl 2004; Peters and Meister 2007). Analog zur Spaltung eines RNA/DNA-Hybrids durch die RNaseH spaltet die PIWI-Domäne mRNA/siRNA-Hybride (Meister and Tuschl 2004). Diese *slicer*-Aktivität

wird durch katalytische Asp-Asp-Asp/His-Reste beigesteuert (Wang, Juranek et al. 2009). Wie die RNaseH benötigt die Spaltung durch Argonautproteine zweiwertige Metallionen und ergibt ein 5'-Produkt mit einer freien Hydroxylgruppe am 3'-Ende sowie ein 3'-Produkt welches am 5'-Ende eine Phosphatgruppe trägt (Jinek and Doudna 2009). Im Gegensatz zur PAZ-Domäne wurde die PIWI-Domäne bisher nur in Argonautproteinen gefunden (Song, Liu et al. 2003).



**Abbildung 3: Links: Kristallstruktur des *Pyrococcus furiosus* Argonaut (Ago) (Jinek and Doudna 2009):** Das Protein weist eine bilobäre Struktur auf. Der Amino-Terminus (*N-term*) und die PAZ-Domäne bilden den einen, die MID- und PIWI-Domäne den anderen Lobus. Im aktiven Zentrum ist ein Metallion ( $Mg^{2+}$ ) gebunden. **Rechts: Domänenstruktur eines Ago-Proteins (oben) und schematische Darstellung der Interaktion zwischen Ago und der kleinen RNA (unten) (Kim 2008):** Das Nukleotid am 5'-Ende der kleinen RNA bindet an eine kleine Tasche der MID-Domäne. Das 3'-Ende interagiert mit der PAZ-Domäne.

Mittels RNAi-Reportersystemen und *in vitro* RNA cleavage Assays wurde gezeigt, dass Argonaut 2 (Ago2) das einzige Mitglied der humanen Ago-Subfamilie ist, welches Endonukleaseaktivität hat (Liu, Carmell et al. 2004; Meister, Landthaler et al. 2004; Beitzinger, Peters et al. 2007; Jinek and Doudna 2009; Rüdell, Wang et al. 2011). Auch andere Mitglieder der Argonautfamilie besitzen bestimmte hochkonservierte Aminosäuren. Daher ist es bislang unklar, welche die exakten Funktionen der einzelnen Argonautproteine sind (Rüdell, Wang et al. 2011). Ago2 ist die zentrale Komponente des RISC und in der Lage eine Ziel-mRNA zu spalten wenn eine perfekte siRNA/mRNA- oder miRNA/mRNA-Komplementarität vorliegt. Jedoch besteht bei den meisten Interaktionen von miRNA und mRNA nur partielle Komplementarität und es ist wahrscheinlich, dass ein Großteil der

miRNA-Ziele nicht durch Ago2 gespalten wird. Vermutlich führen miRNAs in den meisten Fällen zur Unterdrückung der Translation und/oder begünstigen den Abbau ihrer Ziel-mRNAs (Hendrickson et al. 2008).

Die Regulation der Argonautproteine ist bisher nur wenig verstanden. Qi zeigte 2008, dass Ago2 durch die Typ I-Kollagen Prolyl-4-Hydroxylase (C-P4H) an Prolin-700 hydroxyliert wird. Diese posttranslationale Modifikation ist wichtig für die Stabilität des Proteins und die Aktivität des RISC (Qi et al. 2008). Weiterhin wird Ago2 durch die MAP-Kinase p38 vermittelt an Serin-387 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine gesteigerte Lokalisierung des Proteins in sogenannten *processing bodies* (*P-bodies*) (Zeng et al. 2008). *P-bodies* sind dynamische Aggregate aus spezifischen mRNAs und Proteinen, welche für die mRNA-Degradierung benötigt werden. Viele Proteine, inklusive Ago, die mit dem RISC assoziiert und wichtig für die miRNA-vermittelte Suppression sind, konzentrieren sich in *P-bodies* (Kulkarni et al. 2010).

Rüdel, Wang et al. zeigten 2011, dass humane Argonautproteine an multiplen Aminosäuren phosphoryliert werden. Als wichtigste Phosphorylierungsstelle beschrieben sie Tyrosin-529, das sich in der Tasche der MID-Domäne befindet, welche das 5'-Ende der kleinen RNA bindet. Die Phosphorylierung scheint zu einer Inhibierung der RNA-Bindung zu führen. Die Phosphorylierung von Ago2 an Tyrosin-529 führt möglicherweise zu einer Vielzahl biologischer Konsequenzen. Spezifische Kinasen und Phosphatasen könnten Argonautproteinen, abhängig von zellulären Gegebenheiten, an- und ausschalten. Es gibt Hinweise darauf, dass die Expression von Ago2 durch MAP-Kinasen kontrolliert wird (Rüdel, Wang et al. 2011).

Ago2 wird durch mLin41, eine E3-Ubiquitinligase, ubiquitiniert. Über diesen Mechanismus wird der miRNA-*pathway* inhibiert (Rybak et al. 2009).

Argonautproteine spielen ebenfalls eine Rolle in der Regulation der miRNA-Prozessierung. Sie sind in der Lage, die miRNA-Menge durch posttranskriptionale Mechanismen zu steigern. Alle Argonautproteine steigern die Produktion oder die Stabilität der reifen miRNA. Ein Ago2-Verlust reduziert die Expression von reifen endogenen miRNAs. Dieser Effekt beruht auf der direkten Bindung zur miRNA, jedoch nicht auf der RNase-Aktivität. Ago2, das einzige Argonautprotein mit Endonukleaseaktivität, generiert einen zusätzlichen miRNA-Vorläufer, die *Ago2-cleaved precursor miRNA* (ac-pre-miRNA). Des Weiteren haben Argonautproteine Bedeutung bei der Vermittlung der pre-miRNA-Spaltung (Diederichs and Haber 2007).

### 1.1.2.3 Ziel-RNA

Als Ziel-RNA kann sowohl eine mRNA als auch eine virale RNA dienen (Meister and Tuschl 2004). Kleine nicht-codierende RNAs binden bei kompletter oder partieller Komplementarität an die Ziel-RNA und leiten damit die RNA-Interferenz ein. Somit wird die Expression dieser RNA sequenzspezifisch herunterreguliert. Die 3'-UTR (*untranslated region*) der RNA ist entscheidend für die posttranskriptionale Regulation (Bhattacharyya and Filipowicz 2007). Als UTR bezeichnet man einen Randbereich der mRNA, der nicht für ein Protein codiert. Weitere solcher Bereiche sind das 5'-*Cap* und der Poly-A-Schwanz.

### 1.1.2.4 RNase III-Ribonukleasen

Enzyme der RNase III-Familie sind die Initiatoren der RNA-Interferenz. Sie sind spezifisch für dsRNAs. Aufgrund ihrer Struktur werden diese Enzyme in drei Klassen eingeteilt. Die bakterielle RNase III enthält eine katalytische Domäne sowie eine dsRNA-bindende Domäne. Mitglieder der Drosha-Familie besitzen eine duale katalytische Domäne sowie eine *double-stranded RNA-binding domain* (dsRBD) (Hannon 2002; Jinek and Doudna 2009). Sie katalysieren die initiale Prozessierung der pri-miRNA zu pre-miRNA, deren Haarnadelstruktur ein phosphoryliertes 5'-Ende und einen Dinukleotidüberhang am 3'-Ende aufweist. Drosha allein führt zu einer unspezifischen Spaltung der RNA. Die spezifische Zerteilung erfordert die Zusammenarbeit mit einem Protein namens DGCR8 in einem Komplex der als *microprocessor* bezeichnet wird (Jinek and Doudna 2009). Die dritte Klasse der RNase III-Ribonukleasen, Dicer, prozessiert lange dsRNAs oder pre-miRNAs in kleine dsRNAs (siRNA oder miRNA) mit einer typischen Länge von 21-25 Nukleotiden (Hannon 2002; Jinek and Doudna 2009). Dicer beinhaltet eine PAZ-Domäne welche man auch in Proteinen der Argonautfamilie findet und die spezifisch an das 3'-Ende der einzelsträngigen RNA bindet (Jinek and Doudna 2009). Des Weiteren weist dieses Enzym zwei katalytisch aktive RNase III-Domänen, eine dsRBD (*dsRNA-binding domain*) am Carboxyterminus, eine DEXD/H-box-Domäne am aminoterminalen Ende sowie die kleine DUF283-Domäne (*domain of unknown function283*) mit unbekannter Funktion auf (Jinek and Doudna 2009; Siomi and Siomi 2009). Dicer bildet mit TRBP (*TAR-RNA-binding-protein*) und Ago2 den *RISC-loading-complex* (RLC)

(Diederichs and Haber 2007). Es handelt sich um eine evolutionär hoch konservierte Gruppe von Proteinen (Hannon 2002).

### 1.1.3 RISC (*RNA-induced silencing complex*)

Als RISC (*RNA-induced-silencing-complex*) bezeichnet man einen Protein-RNA-Nuklease-Komplex der Ziel-mRNAs erkennt und zerstört (Hannon 2002). Er besteht aus einem Argonautprotein, das an eine miRNA oder siRNA gebunden ist (MacRae, Ma et al. 2008). Argonautproteine bilden das katalytische Zentrum des RISC (Rivas, Tolia et al. 2005).

Die Produktion doppelsträngiger kleiner RNAs durch Ribonuklease III-Enzyme initiiert die RNAi dessen Efferktorkomplex der RISC darstellt (Rivas, Tolia et al. 2005). Während der Bildung des RISC wird zunächst der *precursor*-RISC (pre-RISC), welcher einen kleinen RNA-Duplex enthält, gebildet. Durch das Entwinden der kleinen RNA und die Auswahl des *guide*-Strangs reift dieser zum *holo*-RISC heran. Dieser enthält eine einzelsträngige RNA (ssRNA) (Siomi and Siomi 2009). Der RNA-Strang mit der geringeren thermodynamischen Stabilität am 5'-Ende wird als *guide*-Strang beibehalten, der andere Strang (*passenger*-Strang) wird verworfen (Jinek and Doudna 2009; Siomi and Siomi 2009). Der *guide*-Strang führt zur sequenzspezifischen Degradierung einer komplementären mRNA (Meister and Tuschl 2004). Die siRNA erkennt die Ziel-mRNA über Basenpaarung nach dem Watson-Crick-Prinzip (Hannon 2002). Die Spaltung findet in der Mitte der komplementären Region, 10 Nukleotide vor dem Nukleotid, das mit dem 5'-Ende der siRNA hybridisiert ist, statt. Der RISC katalysiert eine Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen der Ziel-RNA (Meister and Tuschl 2004). Diese Spaltung wird durch die PIWI-Domäne des Argonautproteins herbeigeführt. Es besteht eine große Ähnlichkeit zur RNaseH, welche DNA-RNA-Hybride spaltet. Wie diese benötigt der RISC ein zweiwertiges Metallion, in diesem Fall Magnesium ( $Mg^{2+}$ ), für seine Aktivität (Meister and Tuschl 2004; Rivas, Tolia et al. 2005).

Rivas, Tolia et al. beschrieben 2005, dass humanes Ago2 mit einer siRNA einen minimalen RISC bildet, der Substrat-RNAs exakt spaltet (Rivas, Tolia et al. 2005). *In vivo* ist die Anordnung des RISC ATP-abhängig. Diese Energie wird vermutlich für das Entwinden des siRNA/mRNA-Hybrids durch RNA-Helikasen und weitere Umbauvorgänge benötigt (Meister and Tuschl 2004; Rivas, Tolia et al. 2005). Im Gegensatz dazu benötigt ein rekombinanter RISC keine Anwesenheit von ATP (Rivas, Tolia et al. 2005). Die einzelsträngige siRNA ist

extrem eng an das Argonautprotein gebunden, sodass Salzkonzentrationen bis 2,5M KCL die Verbindung nicht beeinflussen (Meister and Tuschl 2004).

Für die Bildung des RISC in *D. melanogaster* ist der Dinukleotidüberhang am 3'-Ende des siRNA-Duplex essenziell (Meister and Tuschl 2004). Das 5'-Phosphat der siRNA spielt eine besondere Rolle für die RNA-Interferenz. Zunächst vermutete man, dass es eine Art Eintrittskarte für siRNAs in den RNAi-*pathway* darstellt. Die Untersuchungen von Rivas, Tolia et al. 2005 deuteten auf eine Bedeutung dieses Phosphatrestes für die Stabilität des Ago2-siRNA-Komplexes und die Genauigkeit der enzymatischen Spaltung hin. Ago2 scheint die zu spaltende Stelle der mRNA durch Messung vom 5'-Ende her zu bestimmen (Rivas, Tolia et al. 2005).

Der Prozess des RISC-*loading* beinhaltet diverse RNA-Prozessierungsschritte wie Erkennung der pre-miRNA, *dicing*, Auswahl der *guide*-RNA, Beladen mit Ago2 und Beseitigung des *passenger*-Stranges. Beim Menschen wird Ago2 mithilfe des RISC-*loading*-complex (RLC) beladen (MacRae, Ma et al. 2008). Dieser RLC besteht aus Ago2, Dicer und TRBP (*TAR-RNA-binding-protein*) (MacRae, Ma et al. 2008; Jinek and Doudna 2009). MacRae, Ma et al. zeigten 2008, dass der humane RLC sich *in vitro* spontan aus den gereinigten Komponenten zusammenfügt und das hierzu keinerlei Kofaktoren, wie z.B. ATP, benötigt werden (MacRae, Ma et al. 2008; Jinek and Doudna 2009). Dieser *in vitro* hergestellte RLC bewahrt nicht nur die *dicing*- und *slicing*-Aktivitäten seiner Dicer- und Ago2-Komponenten, sondern ist ebenso in der Lage, die Beladung des RISC zu gewährleisten. Ist Ago2 einmal mit einer miRNA beladen, dissoziiert es vom Rest des RLC. Dicer und TRBP sind nicht direkt an der Prozessierung der Ziel-mRNA beteiligt (MacRae, Ma et al. 2008).

### 1.1.3.1 RISC-Assay

Mit dem RISC-Assay ist es möglich, die Aktivität der *RNA-induced silencing complex in vitro* zu messen.

Rivas, Tolia et al. zeigten 2005, dass rekombinantes humanes Argonaut 2 zusammen mit einer siRNA einen minimalen RISC formt, der die Ziel-RNA spaltet (Rivas, Tolia et al. 2005). Miyoshi et al. beschrieben 2008 einen ähnlichen *in vitro* Assay, mit dem sie zeigten, dass endogenes hAgo2 eine *slicer*-Aktivität hat (Miyoshi et al. 2008). Bisher wurde diese mittels radioaktiv markierter siRNA oder Ziel-mRNA visualisiert. Die Spaltprodukte wurden nach

Aufreinigung und Denaturierung mittels Autoradiographie gemessen. Diese Assays sind aufwendig, nehmen viel Zeit in Anspruch und liefern nur semiquantitative Ergebnisse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein nicht-radioaktiver RISC-Assay optimiert. *In vitro* wurde der minimale RISC, bestehend aus einem rekombinant hergestellten GST-Ago2 und einer siRNA, geformt. Als Ziel-mRNA wurde eine 180bp- oder 723bp-Luziferase-mRNA verwendet. Nach Aufreinigung wurde das Ergebnis mittels RNA-Chips durch den Agilent 2100 Bioanalyser visualisiert. Es wurde eine komplette Spaltung der Ziel-mRNA durch den minimalen RISC erreicht. Dieser nicht-radioaktive RISC-Assay stellt ein wichtiges Instrument zur Messung der RISC-Aktivität in zellfreien Systemen dar.

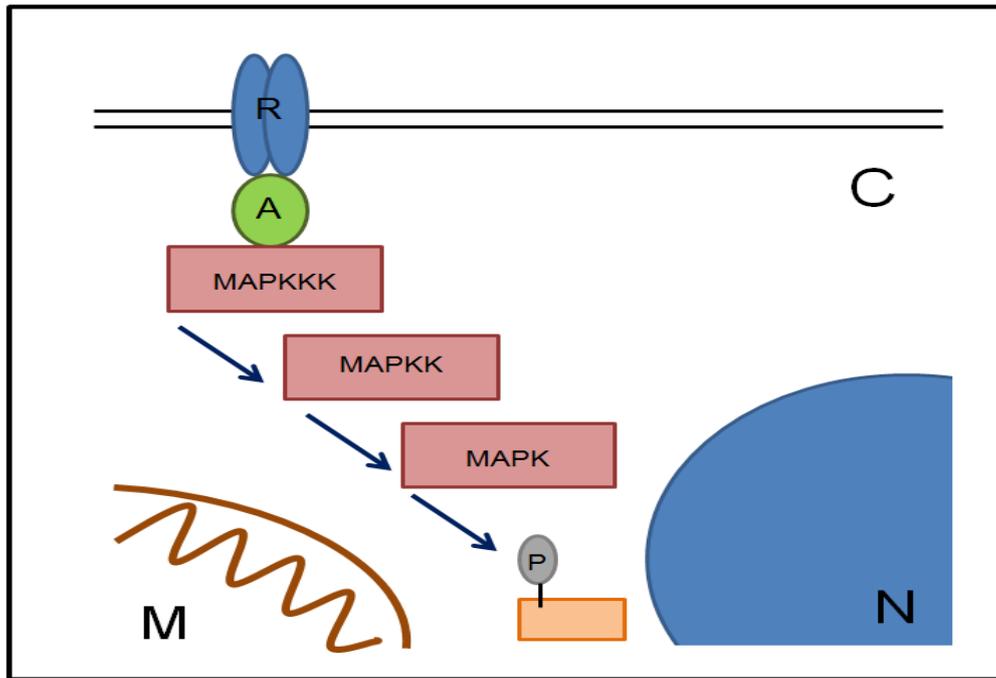
## 1.2 MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*)

Proteinkinasen und andere Botensysteme bilden interaktive Netzwerke um die Funktion einzelner Zellen in den Organismus einzubinden (Pearson, Robinson et al. 2001). Sie transduzieren verschiedenste Signale von Rezeptoren der Zelloberfläche in die intrazellulären Kompartimente (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Viele Tyrosinkinaserzeptoren und G-Protein-assoziierte Zytokinrezeptoren aktivieren intrazelluläre, als MAP-Kinasen bezeichnete, Seronin/Threonin-Kinasen (Sebolt-Leopold 2000). Die Weiterleitung dieser Signale sowie die Regulation der MAP-Kinasen wird durch Phosphorylierungskaskaden sichergestellt (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Pearson, Robinson et al. 2001). MAP-Kinasen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese einiger häufiger Erkrankungen unserer Zeit. Dazu gehören chronische Entzündungen, Hirninfarkt, Diabetes mellitus, kardiovaskuläre und neoplastische Erkrankungen (Kyriakis and Avruch 2001). Des Weiteren sind sie bedeutende Komponenten der Kontrolle von Embryogenese, Zelldifferenzierung und Zelltod (Pearson, Robinson et al. 2001).

Ihren Namen „*mitogen-activated protein kinases*“ erhielten sie aufgrund der Tatsache, dass sie erstmals in den frühen 1980er Jahren als Mitogen-stimulierte Tyrosinphosphoproteine detektiert wurden (Pearson, Robinson et al. 2001). Unter einem Mitogen versteht man ein Protein, das die Zellteilung anregt. Bisher wurden fünf Gruppen von MAP-Kinasen in Säugetieren charakterisiert: *extracellular signal-regulated kinases* 1 und 2 (ERK1/2), c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), die p38-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , ERKs 3/4 und ERK5 (Roux and Blenis 2004).

Die Aktivierung der MAP-Kinasen kann durch eine Vielzahl von Stimuli über verschiedene Rezeptoren stattfinden. Der ERK-*pathway* wird typischerweise durch Wachstumsfaktoren aktiviert und hat eine Bedeutung für das Zellüberleben (Roux and Blenis 2004; Ramesh and Reeves 2005). Der p38- sowie der JNK-*pathway* werden durch diverse Stressestimuli, beispielsweise Oxidationsmittel, UV-Licht, Hyperosmolarität, inflammatorische Zytokine, ionisierende Strahlung und ischämische Infarkte, angeschaltet (Kyriakis and Avruch 2001; Roux and Blenis 2004; Ramesh and Reeves 2005).

Jede Gruppe der MAP-Kinasen setzt sich aus drei evolutionär konservierten hintereinandergeschalteten Kinasen zusammen: eine MAP-Kinase (MAPK), eine MAPK-Kinase (MAPKK) und einer MAPKK-Kinase (MAPKKK) (Kyriakis and Avruch 2001; Roux and Blenis 2004). Die zu den Serin/Threonin-Kinasen gehörenden MAPKKK werden durch Phosphorylierung und/oder durch Interaktion mit kleinen GTP-bindenden Proteinen der Ras/Rho-Familie als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Stimuli aktiviert (Roux and Blenis 2004). Die aktivierte MAPKKK katalysiert die Phosphorylierung an Ser/Thr und somit die Aktivierung der MAPKK welche daraufhin die MAPK-Aktivität stimulieren (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Kyriakis and Avruch 2001; Roux and Blenis 2004). MAPKK aktivieren ihre Substrate durch duale Phosphorylierung an einem konservierten Thr-x-Tyr-Motiv (Kyriakis and Avruch 2001). „x“ steht für eine gegebene Aminosäure (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). JNK wird beispielsweise an Thr-Pro-Tyr phosphoryliert (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Nach Aktivierung phosphorylieren MAPK ihre Substrate an von Prolin gefolgt Serin- oder Threonin-Resten (Roux and Blenis 2004).



**Abbildung 4: Intrazelluläre MAPK-Kaskade (verändert nach Vlahopoulos, Zoumpourlis 2004):** Aktiviert durch ein mit einem Transmembranrezeptor (R) assoziiertes Protein (A) aktiviert die MAPKKK durch Phosphorylierung an Serin/Threonin die MAPKK. Durch Phosphorylierung an Threonin oder Tyrosin aktiviert diese die MAPK. Die MAPK aktiviert Transkriptionsfaktoren im Nukleus (N), andere Proteine im Zytoplasma (C), in den Mitochondrien (M) oder anderen Zellkompartimenten.

### 1.2.1 JNK (c-Jun N-terminale Kinase)

JNK ist eine Familie von stressaktivierten Proteinkinasen, die eine Rolle bei verschiedenen zellulären Phänomenen spielen (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Sie sind essenzielle Regulatoren physiologischer und pathologischer Prozesse (Waetzig and Herdegen 2005). Es handelt sich dabei um zum Teil entgegengesetzte Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Bode and Dong 2007). Diese unterschiedlichen Effekte werden auf die Beobachtung, dass JNK verschiedene Substrate je nach Stimulus, Zelltyp oder zeitlichen Aspekten aktiviert, zurückgeführt (Bode and Dong 2007). Des Weiteren ist JNK für die Induktion der Expression vieler Gene, z.B. Interleukinen und  $\text{TNF}\alpha$ , unerlässlich (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Bode and Dong 2007).

JNK kommt in allen Spezies von Nematoden und Fruchtfliegen bis zum Menschen vor (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Säugetiere besitzen drei Gene, welche für die drei JNK-Isoformen JNK1, JNK2 und JNK3 mit mindestens 10 alternativ gespleißten Formen (JNK1 $\alpha$ 1, JNK1 $\beta$ 1, JNK1 $\alpha$ 2, JNK1 $\beta$ 2, JNK2 $\alpha$ 1, JNK2 $\beta$ 1, JNK2 $\alpha$ 2, JNK2 $\beta$ 2, JNK3 $\alpha$ 1 und JNK3 $\alpha$ 2) codieren

(Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Pearson, Robinson et al. 2001; Waetzig and Herdegen 2005).

JNK1 und JNK2 kommen ubiquitär in allen Geweben vor (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Man geht davon aus, dass JNK1 und JNK2 überlappende und zum Teil redundante Funktionen haben (Bode and Dong 2007). JNK3 findet man nur in Gehirn, Herz und Hoden (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Aufgrund dieser relativen Gewebespezifität wird vermutet, dass sich die Funktion von JNK3 von der der anderen JNK-Proteine unterscheidet (Bode and Dong 2007). Die Molekulargröße der einzelnen Isoformen liegt, bedingt durch alternatives Spleißen, bei 46 oder 55 kDa (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004).

Das bisher am besten untersuchte Substrat von JNK ist c-Jun. Daher leitet sich der Name „c-Jun N-terminale Kinase“ ab. JNK wird durch verschiedene Formen von Stress aktiviert und daher auch als SAPK $\alpha$  (*stress-activated protein kinase  $\alpha$* ) bezeichnet (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004).

Zwei gut charakterisierte *upstream*-Aktivatoren von JNK sind TAK1 und MEKK1. Die *transforming growth factor  $\beta$  activated kinase-1* (TAK1) wird durch TAB1 (*TAK1-binding protein 1*) spezifisch aktiviert. Durch Fusion dieser beiden Proteine entstand eine aktive MAP3-Kinase. Das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein aktiviert unter anderem JNK und p38 (Sakurai et al. 2002; Adhikari, Xu et al. 2007). MEKK-1 gehört zur Familie der MAP3-Kinasen. MEKK-1 aktiviert die drei wichtigsten MAPK-*pathways*. Die stärkste Wirkung hat es auf JNK, welches über die Phosphorylierung von MKK4 aktiviert wird (Mokhtari, Myers et al. 2008).

JNK-Proteine sind in verschiedene Erkrankungen wie Diabetes, Arteriosklerose, und Hirninfarkt involviert (Waetzig and Herdegen 2005). Auch neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und die Alzheimer-Krankheit stehen in Zusammenhang mit der Aktivität von JNK. Hier kommt es zu einem unerwünschten JNK-vermittelten Zelltod (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Waetzig and Herdegen 2005). Das Inhibieren von JNK würde pathologische Vorgänge dieser Erkrankungen unterdrücken. Es käme jedoch auch zu einer Beeinflussung vieler physiologischer Funktionen, was es unmöglich macht, diese MAP-Kinase systemisch zu unterdrücken. Beispielsweise verhindert die Deletion des JNK1-Gens eine Insulinresistenz, führt aber auch zur Zerstörung der neuronalen Zytoarchitektur, was in der Pathogenese des Morbus Alzheimer eine Rolle spielt. Somit ist es ein aktuelles Forschungsziel, die schädigenden Einflüsse von JNK selektiv zu inhibieren (Waetzig and Herdegen 2005).

Einen weiteren Zusammenhang gibt es zwischen der JNK-Aktivität und neoplastischen Erkrankungen. JNK ist einerseits in den Zelltod bestimmter Krebszelllinien involviert und andererseits nötig für die Proliferation und Metastasierung anderer neoplastischer Zellen (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Vermutlich variiert die Funktion einzelner JNK-Subtypen bei verschiedenen malignen Erkrankungen. Beispielsweise scheint JNK1 als Suppressor des Hautkrebses und JNK2 als Suppressor von Lymphomen zu funktionieren (Bode and Dong 2007). Die Proliferation humaner Prostatakarzinomzellen wird durch JNK gefördert, hingegen ist es nicht essenziell für das Wachstum von Zellen eines Mammakarzinoms. Die genaue Rolle dieser MAP-Kinase ist also bisher ungeklärt. Jedoch scheint JNK eine zentrale Funktion in der Entscheidung zwischen Zellproliferation und Zelltod zu haben. Somit könnte die therapeutische Beeinflussung von JNK in Zukunft eine Möglichkeit zur Behandlung von Tumorerkrankungen sein (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004).

Alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid oder Gammastrahlung zerstören die DNA. Als Antwort auf die DNA-Schädigung wandert JNK in die Mitochondrien um Mitglieder der Bcl-2-Familie zu phosphorylieren und so die Apoptose einzuleiten. Auch hier könnte die detaillierte Kenntnis der JNK-Aktivierung eine Chance sein, die Progression solcher Erkrankungen zu stoppen (Vlahopoulos and Zoumpourlis, 2004).

JNK wird, wie andere MAP-Kinasen, durch Phosphorylierung an Tyrosin und Threonin aktiviert (Pearson, Robinson et al. 2001) und stellt das Substrat von MKK4 und MKK7 dar (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Diese beiden Enzyme werden wiederum durch vorgeschaltete MAPKKK über eine Phosphorylierung an Serin oder Threonin aktiviert. Ein Beispiel für eine solche MAPKKK ist MLK3 (*mixed lineage protein kinase 3*), welche wie MKK7 und JNK durch JIP (*JNK interacting protein*) gebunden wird. MLK3 aktiviert MKK7, welche daraufhin JNK phosphoryliert (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Die Aktivierung wird durch verschiedene Formen von Stress, wie z.B. Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), UV-Licht und Proteinsyntheseinhibitoren (z.B. Anisomycin) ausgelöst (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Pearson, Robinson et al. 2001). Je nach Isoform besteht eine Präferenz für bestimmte Substrate (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). JNK kann, je nach spezifischem Stimulus, Zelltyp und zeitlichen Aspekten, eine Vielzahl von Substraten aktivieren (Bode and Dong 2007). Dazu gehören die AP-1-assoziierten Proteine c-Jun, JunD und ATF2 (*activating transcription factor 2*), des Weiteren

Elk1, c-Myc, p53, MLK2, NFATc2, TIF-1A, die E3-Ligase Itch, Tau-Proteine, Histon H3, Histon H2AX, Insulinrezeptorsubstrate, JIP1 und verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie (Bode and Dong 2007). c-Jun ist das wichtigste Substrat der JNK-Enzyme (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Im Vergleich zu JNK1 scheint JNK2 eine höhere Bindungsaffinität zu c-Jun zu haben. Hingegen scheint die Effizienz der c-Jun-Phosphorylierung durch JNK1 weitaus höher zu sein (Bode and Dong 2007). Weitere Substrate sind ATF2 und Proteine der Bcl-2-Familie. Das Tumorsuppressorprotein p53 wird durch JNK an Threonin 81 phosphoryliert und leitet im Folgenden die Apoptose ein. JIP (*JNK interacting protein*) ist ein Inhibitor von JNK. Überexprimiertes JIP bindet JNK und führt zu dessen Zurückhaltung im Zytoplasma. JIP wird durch Stressstimulanzen wie UV-Licht oder den Proteinsynthesehemmer Anisomycin aktiviert und blockiert im Folgenden die JNK-Aktivität (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004).

### 1.2.2 c-Jun

JNK, dessen wichtigstes Substrat c-Jun ist, phosphoryliert dieses an Serin 63 und 73. Dies führt zu erhöhter Transkriptionsaktivität (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). c-Jun ist ebenfalls ein Substrat von cAbl, p34cd2, ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*), PKC, CKII, GSK-3, DNA-PK und CSK (Bode and Dong 2007). c-Jun ist ein Protoonkogen der Säugetiere. Es handelt es sich um einen induzierbaren Transaktivator, der zur bZip-Klasse (*basic region leucine zipper*) der Proteine gehört (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004).

c-Jun-Proteine können Homodimere oder Heterodimere mit anderen Proteinen wie c-Fos (*cellular homolog of Finkel Biskis Jinkins murine osteosarcoma virus oncogene*) oder ATF2 (*activating transcription factor 2*) bilden (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Die so entstandenen Heterodimere werden als AP-1 (*activator protein 1*) bezeichnet, welches in eine Vielzahl biologischer Prozesse eingebunden ist (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004; Sánchez-Pérez and Perona 1999). Die Aktivierung wird durch multiple Stimuli, z.B. Tumorpromotoren, ausgelöst. Aktiviertes AP-1 kann an die DNA binden und reguliert so die Transkription verschiedener Gene (Bode and Dong 2007). Der Leucinzipper ist für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004). Dabei handelt es sich um Gene, die in die Entzündungsreaktion, Proliferation und Apoptose involviert sind. In der Haut ist AP-1 an der Karzinogenese, der Reaktion auf UV-Licht, Wundheilung, UV-induzierte Hautalterung und Keratinozytendifferenzierung beteiligt. AP-1 spielt eine wichtige

Rolle in der Transformation neoplastischer Zellen und ist beteiligt an Tumorpromotion, Progression und Metastasierung. Die Blockierung der AP-1-Aktivität inhibiert die neoplastische Transformation. Jedoch hat AP-1 ebenfalls anti-karzinogene Effekte, welche wahrscheinlich durch die Zusammensetzung aus verschiedenen Proteinfamilien bedingt ist. Die AP-1-Aktivierung wird durch die Phosphorylierung von c-Jun durch JNK direkt erhöht und führt zu Stabilisierung und Transkriptionsaktivität (Bode and Dong 2007).

c-Jun ist essenziell für den Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. Ein Mangel an c-Jun führt zu Proliferationsdefekten, einer kritischen Beeinträchtigung des Zellwachstums und zum Zelltod (Bode and Dong 2007).

### 1.2.3 p38

p38 ist wie JNK eine stressaktivierte Proteinkinase (Vlahopoulos and Zoumpourlis 2004), die auch als CSBP, mHOG1, RK oder SAPK2 bezeichnet wird. In Säugetierzellen umfasst dieser MAP-Kinase-*pathway* verschiedene MAPKKK wie MEKK1-4, DLK, ASK1, Tpl2 und TAK1 sowie die MAPKK MEK3 (MKK3) und MEK6 (MKK6) und die vier p38-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Die p38-Isoformen werden vor allem durch Umweltstress, verschiedene physikalische und chemische Reize wie oxidativen Stress, UV-Licht, Hypoxie, Ischämie und inflammatorische Zytokine (IL-1, TNF $\alpha$ ), jedoch kaum durch mitogene Stimuli, aktiviert. Die meisten p38-aktivierenden Stimuli führen ebenfalls zu einem Anstieg der JNK-Aktivität (Roux and Blenis 2004).

TAK1 und MEKK1 stellen wie für JNK ebenfalls gut charakterisierte *upstream*-Aktivatoren für p38 dar (McDermott and O'Neill 2002; Roux and Blenis 2004).

p38 reguliert die Expression vieler Zytokine, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren der Zelloberfläche (Roux and Blenis 2004). Ein p38-*knockout* ist für Mausembryonen letal (Sebolt-Leopold 2000). Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von p38 entscheidend für die physiologische Immunantwort ist. p38 wird in Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten durch Zytokine, Chemokine und bakterielle Lipopolysaccharide aktiviert und ist somit an Reaktionen der Entzündung, beispielsweise Chemotaxis und Exozytose der neutrophilen Granulozyten, beteiligt. Weiterhin vermittelt diese MAP-Kinase die Differenzierung und Apoptose von T-Zellen durch

Regulation der  $\gamma$ -Interferon-Produktion und stabilisiert in die Immunantwort involvierte mRNAs (Roux and Blenis 2004).

#### **1.2.4 Bedeutung der MAP-Kinasen für die Therapie neoplastischer Erkrankungen**

Ein Ungleichgewicht zwischen Zellwachstum und Apoptose kann eine Tumorgenese auslösen. Somit ist die Manipulation von Signalwegen, die den Zelltod kontrollieren, ein wichtiger Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Medikamente für die antineoplastische Therapie. Die meisten klassischen Chemotherapeutika, wie Cisplatin, Etoposid und Adriamycin funktionieren über die Induktion der Apoptose in behandelten Zellen (Sánchez-Pérez and Perona 1999; Osborn and Chambers 1996).

Cisplatin ist ein Zytostatikum, welches zu Therapie diverser Neoplasien eingesetzt wird. Es findet vor allem in Kombinationstherapien der medikamentösen Behandlung von Ovarial-, Harnblasen- und Zervixkarzinomen sowie bei Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich Verwendung (Sánchez-Pérez et al. 1998). Platinhaltige Chemotherapeutika hemmen die DNA-Replikation durch Quervernetzung. Cisplatin aktiviert p38, ERK und JNK in verschiedenen Zelllinien (Sebolt-Leopold 2000; Ramesh and Reeves 2005; Sánchez-Pérez 1998). Vorzugsweise wird p38 in Kombination mit ERK oder JNK aktiviert. Die Blockierung von p38 führt zur Erhöhung der Resistenz gegen Cisplatin-induzierte Apoptose in Ovarialkarzinomzellen. Somit scheint die Aktivierung von p38 für den Zelltod durch Cisplatin essenziell zu sein (Ramesh and Reeves 2005). c-Jun ist das wichtigste Substrat von JNK und es wurde gezeigt, dass es ebenfalls wichtig für die Cisplatin-vermittelte Apoptose ist. Mausfibroblasten mit c-Jun-Mangel zeigen im Vergleich zu normalen Zellen eine höhere Resistenz gegenüber Cisplatin (Sánchez-Pérez and Perona 1999).

Das Zytostatikum Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthracycline, welche in die DNA interkalieren, Strangabbrüche induzieren und die DNA-Biosynthese durch die Topoisomerase II inhibieren (Kim and Freeman 2003; Niiya et al. 2004). In MCF-7-Brustkrebszellen löst die Behandlung mit Doxorubicin eine Phosphorylierung der MAP-Kinase JNK aus. Durch Inhibierung von JNK oder dessen Substrat c-Jun wird die Doxorubicin-induzierte Apoptose signifikant supprimiert. Somit scheint JNK essenziell für die apoptotische Wirkung dieses Zytostatikums zu sein (Kim and Freeman 2003).

Das Vincaalkaloid Vinblastin ist ein wichtiges Chemotherapeutikum unter anderem in der Therapie des Hodenkrebses, dem Hodgkin-Lymphom, der Non-Hodgkin-Lymphome und in Kombinationstherapie bei Bronchial- und Harnblasenkarzinomen. Vinblastin bindet an Tubulin und führt so zum Mitosearrest und zur Apoptose (Kolomeichuk, Bene et al. 2008). Im Gegensatz zu Cisplatin und Doxorubicin schädigt Vinblastin die DNA nicht direkt (Osborn and Chambers 1996). Vinblastin aktiviert JNK, die Expression und Phosphorylierung von c-Jun und die AP-1-Aktivierung in KB-3-Karzinomzellen. Die c-Jun-Expression kann durch den JNK-Inhibitor SP600125 blockiert werden, daher geht man davon aus, dass die Induktion von c-Jun über einen JNK-abhängigen Signalweg vermittelt wird (Kolomeichuk, Bene et al. 2008). Somit aktivieren alle drei vorgestellten Zytostatika die MAP-Kinase JNK. Die Arbeitsgruppe Kracht hat Ago2 als einen Interaktionspartner von JNK identifiziert. JNK phosphoryliert Ago2 nicht direkt, jedoch kommt es zu einer Kolo-kalisation in den *P-bodies*. Eine interessante Frage zur möglichen (patho)physiologischen Relevanz dieser Beobachtung ist daher, ob eine Behandlung mit verschiedenen Zytostatika einen Einfluss auf die Aktivität von Ago2 hat.

### 1.3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Beeinflussung der Enzymaktivität von Argonaut 2 durch verschiedene Stimuli zu untersuchen.

Zunächst sollte ein *in vitro* RISC-Assay, dessen Grundgerüst bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch die Arbeitsgruppe Kracht etabliert wurde, optimiert werden. Hierzu sollte die optimal einzusetzende GST-Ago2-Menge sowie die optimale Inkubationszeit nach Zugabe der mRNA bestimmt werden. Im Anschluss sollten HEK293IL-1R-Zellen mit verschiedenen JNK-aktivierenden Stimuli behandelt und die Enzymaktivität dann mithilfe des RISC-Assays gemessen werden. Hierzu sollten die Lysate der stimulierten Zellen mit rekombinantem GST-Ago2 inkubiert werden. Im Folgenden sollte GST-Ago2 mithilfe des GSH-beads Assay aus dem Gemisch isoliert und in den RISC-Assay eingesetzt werden. Weiterhin sollte mit Hilfe eines Luziferase-Reporterassays ein möglicher Effekt verschiedener Stimuli auf die Aktivität von endogenem Argonaut 2 in intakten Zellen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verbrauchsmaterial

Plastikwaren, Einwegmaterial und Ähnliches wurden von den Firmen Eppendorf, Starlab, Sarstedt, Omnilab, Roth GmbH, Greiner, Neolab, Nunc und Brand bezogen.

### 2.2 Geräte

#### Elektrophorese-, Western Blot- und Fotografiesysteme

- Biometra BioDoc Analyze UV-Transilluminator
- Biotec Fisher PHERO-STAB 0632 Spannungsgerät
- Hoefer Mighty Small, SE250/260 Gelelektrophorese-Apparatur
- Schleicher&Schuell SemiDryBlotter
- Sigma Vertikale duale Elektrophoresekammer
- BioRAD 170-4469XTU Wide Mini-Sub Cell GT System

#### Mikroskope und Photometer

- Eppendorf BioPhotometer
- Leitz Diavert
- Leitz Laborlux 11
- MR6500 Dynatech Mikrottestplattenleser
- Shimadzu Spektralfotometer UV-160A
- Zeiss Axiovert 200M
- Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer
- Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies

#### Verschiedenes

- Biometra Geltrockner
- B. Braun Biotech International Certomat H Inkubator
- EG&G Berthold Lumat LB 9507 Luminometer
- Eppendorf Thermomixer 5436
- Heidolph Vortex

- Landgraf Thermocycler
- MWG Biotech Primus Thermocycler
- Lauda C6 CS Wasserbad
- Perkin Elmer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (DNA-Sequenzier)
- 7500 Fast Real Time PCR System, Applied Biosystems
- Protec Optimax Filmentwicklermaschine
- Affymetrix Array scanner 428

#### Waagen

- Chyo Electronic Balance MP-3000
- Sartorius Analytic

#### Zellkultur

- GFL Wasserbad
- Heraeus Brutschrank CO<sub>2</sub> Autozero
- Heraeus Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472

#### Zentrifugen

- Beckmann J2-21 Centrifuge
- Eppendorf Concentrator 5301
- Heraeus Biofuge Fresco
- Heraeus Biofuge Pico
- Sorvall RT6000 Refrigerated Centrifuge (DuPont)
- Sigma 4K15
- Sigma 6K10

### **2.3 Chemikalien**

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Serva, Sigma, Merck, Fluka, Roth GmbH, Promega und Pharmacia bezogen (Qualitätsstufe „p.a.“, „Für die Molekularbiologie“ oder „*cell culture grade*“).

**2.4 Lösungen und Puffer**

Coomassie Brilliant Blue-Lösung

0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue G250
50 % (v/v)	Methanol
20 % (v/v)	Essigsäure

2xHeBS (sterilfiltriert)

0,28 mol/l	NaCl
0,05 mol/l	HEPES
1,5 mmol/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Der pH-Wert wurde mit 5 mol/l NaOH auf 7,05 eingestellt.

10x Laemmli-Laufpuffer

0,5 mol/l	Tris
1,92 mol/l	Glycin
0,5 % (w/v)	SDS

4x Laemmli-Auftragspuffer

100 mmol/l	Tris (pH 8,8)
8 % (w/v)	SDS
24 % (v/v)	Glycin
16 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
ad 25 ml ddH <sub>2</sub> O	

Luziferase-Reagenz

200 mmol/l	Tricin
10,7 mmol/l	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> *5H <sub>2</sub> O
26,7 mmol/l	MgSO <sub>4</sub>
333 mmol/l	DTT
10 mg	Coenzym A
5,931 mg	Na-Luziferin
5,3 mmol/l	ATP

PBS

137 mmol/l	NaCl
2,7 mmol/l	KCl
4,3 mmol/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,4 mmol/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Sammelgelpuffer

1 mol/l Tris (pH 6,8)

10x Semi Dry Blotpuffer

25 mmol/l Tris  
192 mmol/l Glycin  
20 % (v/v) Methanol

TAE-Puffer

4 mmol/l Tris  
0,11 % (v/v) Essigsäure  
1 mmol/l EDTA

TBS-Puffer (pH 7,4)

10 mmol/l Tris  
1,54 mol/l NaCl

TBST-Puffer

TBS-Puffer mit 0,05 % (v/v) Tween 20

Trenngelpuffer

1 mol/l Tris (pH 8,8)

ATP-Puffer

150 mM Tris  
30 mM  $MgCl_2 \times 6 H_2O$

Milch

5 % (w/v) Trockenmilchpulver  
in TBST-Puffer

Bohmann-Lysepuffer

50 mM HEPES  
63,4 mM NaCl  
4 % Tween-20  
2,5 mM EGTA  
1 mM EDTA  
1 mM NaF  
10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat  
0,1 mM  $Na_3VO_4$

$\beta$ -Galaktosidase-Lysepuffer

8,5 mM  $KH_2PO_4$   
91,5 mM  $K_2HPO_4$   
0,2 % Triton X-100  
ad 100 ml  $H_2O$   
es wurde frisch dazugegeben:  
1 mM DTT  
1  $\mu g/ml$  Pepstatin  
10  $\mu g/ml$  Leupeptin  
1 mM PMSF

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,4 eingestellt, ad 500 ml  $H_2O$ .

4x Ganzzelllysepuffer

40 mM	Tris pH7,05
120 mM	NaPPi
200 mM	NaCl
4 %	Triton-x-100
8 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>3</sub>
200 mM	NaF
80 mM	β-Glycerophosphat
Es wurde frisch dazugegeben:	
1 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Leupeptin
1 mM	PMSF
1 µM	Microcystin

4x TAP-Lysepuffer

40 mM	Tris pH8
1200 mM	NaCl
0,4 %	NP40
80 mM	β-Glycerophosphat
0,4 mM	EDTA
40 mM	NaF
Es wurde frisch dazugegeben:	
40 µM	DTT
40 mg/ml	Pepstatin
20 µg/ml	Leupeptin
8 mM	PMSF

10x Reaktionspuffer für den RISC-Assay

100 mM	Tris pH7,5
50 mM	MgCl <sub>2</sub>
1000 mM	KCl
Es wurde frisch dazugegeben:	
1 mM	ATP
60 U	RiboLock™ Ribonucle- aseinhibitor (40U/µl)

Immunpräzitationspuffer

1xTBS	5 ml 10x Tris
	Buffered Saline
1 % Triton-x-100	0,5 ml 100%
1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,5 ml 100mM
2 mM DTT	100 µl 1M
50 mM NaF	2,5 ml 1M
ad 50 ml Aqua bidest	

**2.5 Zelllinie**

HEK293IL-1R

humane, adenovirustransformierte, embryonale Nierenzelle, stabil transfiziert mit dem Typ I IL-1 Rezeptor, Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan

## 2.6 Medien

<u>DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)</u>		<u>LB-Medium</u>	
mit folgenden Zusätzen:		10 g	BactoTrypton
10 % (v/v)	FKS	10 g	NaCl
100 µg/ml	Streptomycin	5 g	Hefeextrakt
100 U/ml	Penicillin	ad 1 l ddH <sub>2</sub> O	
2 mmol/l	L-Glutamin	autoklavieren	

## 2.7 Enzyme und Enzympuffer

Sämtliche Enzyme wurden von den Firmen Invitrogen, MBI Fermentas, Stratagene, Bioline und Amersham Biosciences bezogen und in den entsprechenden Puffern eingesetzt.

## 2.8 Antikörper

### Eingesetzte Primärantikörper

- **anti-Tubulin-Antikörper**  
(TU-02); (Santa Cruz, Bestellnummer: #sc8035)  
monoklonaler Antikörper aus der Maus, Immunisierung erfolgte mit den Aminosäuren 1-451 des Schweines
- **anti-Ago2-Antikörper**  
(Abnova, Bestellnummer: #H00027161)  
monoklonaler Antikörper gegen EIF2C2, Klon 2E12-1C9 (H00027161-M01)
- **anti-JNK-Antikörper**  
(Cell Signaling Technology, Bestellnummer: #9252)  
polyklonaler Antikörper, Immunisierung erfolgte mit GST/humanem JNK2-Fusionsprotein
- **anti-phospho-JNK-Antikörper**  
(Thr183/ Tyr185); (Cell Signaling Technology, Bestellnummer: #9251)  
polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen phospho-Thr183/ Tyr185-Peptid, welches zusätzlich die

Thr183/ Tyr185-umgebenen Aminosäuren von humanem p54/ JNK enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A

- **anti-c-JUN-Antikörper**

(H-79); (Santa Cruz, Bestellnummer: #sc1694)

polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit den Aminosäuren 1-79 von humanem c-JUN

- **anti-phospho-c-JUN-Antikörper**

(Ser63); (Cell Signaling Technology, Bestellnummer: #9261)

polyklonaler, affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit einem synthetischen phospho-Ser63-Peptid, welches zusätzlich die Ser63 umgebenen Aminosäuren von humanem c-JUN enthält, Antikörper aufgereinigt an Protein A

- **anti-p38-Antikörper**

(SAK-7); (Prof. Saklatvala, London, UK)

Antiserum aus Kaninchen, polyklonal (nicht aufgereinigt), immunisierendes Peptid vom C-Terminus von p38MAPK alpha abgeleitet

- **anti-phospho-p38-MAPK-Antikörper** [pTpY<sup>180/182</sup>]

(Invitrogen, Bestellnummer: #36-8500)

polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, spezifisch für 39kDa phospho-p38-MAP-Kinase, phosphoryliert an Thr180/Tyr182

- **anti-GFP-Antikörper**

(Roche, Bestellnummer: #11 814 460 001)

Mischung aus zwei monoklonalen Antikörpern aus Maus gegen GFP; Immunisierung von Mäusen mit partiell gereinigtem rekombinantem *Aequorea victoria* GFP als Immunogen.

- **anti-TAK1-Antikörper**

(M579); (Santa Cruz, Bestellnummer: #sc7162 )

polyklonaler affinitätsaufgereinigter Antikörper aus Kaninchen, Immunisierung erfolgte mit rekombinantem vollständigem murinem TAK1 (Aminosäure 1-579)

Eingesetzte Sekundärantikörper, verknüpft mit HRP (*horseradish peroxidase*)

α-Kaninchen Esel, Verdünnung 1:3000, (DAKO, Bestellnummer: #P0448)

α-Maus Schaf, Verdünnung 1:2000, (DAKO, Bestellnummer: #P0447)

**2.9 Rekombinante Proteine**

GST-Ago2	L. Joshua-Tor, Ph.D., Cold Spring Harbor, NY, USA
humanes, rekombinantes IL-1	Prof. Dr. Saklatvala, London, England
humanes, rekombinantes TNF $\alpha$	ImmunoTools (Bestellnummer: #11343018)

**2.10 Zytostatika**

	Lösungsmittel	stock solution	
Cisplatin	H <sub>2</sub> O	2 mg/ml	ALEXIS Biochemicals
Doxorubicin	H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	AppliChem
Vinblastin	H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	Sigma-Aldrich

**2.11 Antibiotika**

Anisomycin	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Roth
Kanamycin	MP Biomedicals

**2.12 Vektoren**

pCDNA3.1	Invitrogen
pSV- $\beta$ -Gal	Promega
pGL2Control	Promega
pQBI-MEKK1(998-2743)-BFP	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen, Deutschland
pCDNA3.1TAB1 <sub>kd</sub> -TAK1 <sub>ad</sub>	Prof. Dr. H. Sakurai, Toyama, Japan
pEBGT7-Ago2	L. Joshua-Tor, Ph.D., Cold Spring Harbor, NY, USA

### 2.13 Standards

GeneRuler 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)

1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp, 80 bp

Niedermolekularer Proteinstandard (Low Molecular Weight Calibration Set for SDS Electrophoresis) (Amersham Biosciences)

97 kDa (Phosphorylase B), 66 kDa (Albumin), 45 kDa (Ovalbumin), 30 kDa (Carboanhydrase), 20 kDa (Trypsininhibitor), 14 kDa ( $\alpha$ -Lactalbumin)

### 2.14 Bakterienstämme

E.coli-Stamm BL 21 RIPL Cells

pGEX4T1-Ago2, pET28a-HSP90

E.coli-Stamm TOP1

F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

E.coli-Stamm XL1-Blue

$\lambda$ -F<sup>'</sup>:: Tn10 (Tet<sup>r</sup>) *proA+B+* *lacI<sup>q</sup>*  $\Delta$ (*lacZ*)M15 *recA1* *gyrA96* (Nal<sup>r</sup>) *thi-1* *hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>*) *glnV44* *relA1* *lac*

### 2.15 Sonstige Materialien, Reagenzien und Kits

- *GFX Micro Plasmid Prep Kit*, Amersham Biosciences
- *QIAGEN Plasmid Maxi Kit*, Qiagen
- *RNeasy Mini Kit*, Qiagen
- *QIAshredder*, Qiagen
- *RNase-Free DNase Set*, Qiagen
- *QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen
- *QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen
- Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1), Roth GmbH
- *Dicer siRNA Generation Kit*, Peqlab
- *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit*, Invitrogen

- *ABI PRISM BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, Applied Biosystems
- *cDNA Synthesis System*, Roche
- *MEGAscript T7 Kit*, Ambion
- *Amino Allyl Message™ aRNA Amplification Kit*, Ambion
- *High Pure RNA Tissue Kit*, Roche
- *Micocon concentrators*, Amicon
- *FluoroLink Cy3-UTP 4 reactions*, Amersham Biosciences
- *RNA 6000 Nano Chip*, Agilent Technologies
- *Denhardts Lösung*, Sigma
- *dNTP Set*, Roth GmbH
- *pd(N)<sub>6</sub> Random Hexamer*, Amersham Biosciences
- *TaqMan Universal PCR Master Mix*, No AmpErase® UNG, Applied Biosystems
- *Optical Adhesive Covers*, Applied Biosystems
- *Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plates*, Applied Biosystems
- *Medium und Zusätze (Zellkultur)*, GibcoBRL
- *Bradford-Kit: Roti-Quant*, Roth GmbH
- *PVDF-Membran*, Millipore
- *ECL Westernblotting detection reagent RPN2106*, Amersham Biosciences
- *Röntgenfilme Biomax-ML, Biomax-MR, Kodak*
- *RayBio® Human Cytokine Antibody Array VI, VII*, RayBiotech
- *DuoSet® ELISA Development System Human IL-8, Human IL-6*, R&D Systems
- *Substrate Reagent Pack*, R&D Systems
- *Luminescent β-Galactosidase Detection Kit II*, BD Biosciences Clontech

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifikation, Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Die DNA-Fragmente werden ihrer Größe nach getrennt. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente von ihrer Konformation und Größe sowie von der Dichte des Gels und der angelegten Spannung ab. Die DNA wandert aufgrund der negativen Phosphatgruppen zur Anode hin. Durch den Einsatz von DNA-Standards kann die Größe und die Konzentration der Fragmente abgeschätzt werden. Die DNA-Fragmente werden durch Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel oder durch Anfärben des Gels in einem Ethidiumbromidbad nach der Elektrophorese sichtbar gemacht. Das Ethidiumbromid interkaliert aufgrund seiner planaren Struktur in die DNA. Es kann mit UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert dann Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Die Fluoreszenz wird durch die Bindung an die DNA verstärkt, sodass die DNA auch bei freiem Ethidiumbromid im Gel gut zu erkennen ist.

Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurde 1 g Agarose durch mehrmaliges kurzes Aufkochen im Mikrowellenherd in 100 ml 1×TAE-Puffer gelöst. Verdampftes Wasser wurde wieder hinzugefügt. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurden zum Gel 10 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) gegeben. Anschließend wurde das Gel in die vorbereitete Gelelektrophoresekammer gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit TAE-Puffer überschichtet, und die zuvor mit 10×Auftragspuffer versetzten Proben und 5 µl eines DNA-Standards wurden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte so lange bei ca. 100 V bis das im Auftragspuffer vorhandene Bromphenolblau die gewünschte Strecke durchlaufen hatte. Die anschließende Detektion der Banden fand am *Bio-Doc-Analyzer* der Firma Biometra statt.

### 2.2.1.2 DNA-Gelextraktion mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit*

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen durchgeführt.

Die entsprechende Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten, gewogen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgte genau nach Herstellerangaben. Die Aufreinigung beruht auf der selektiven Bindung der DNA an Kieselgelkugeln (*silicagel*) bei hohen Salzkonzentrationen. Die bei den hohen Salzkonzentrationen gebundene DNA kann dann mit Puffern niedriger Salzkonzentrationen oder bidestilliertem Wasser von der Säule eluiert werden.

Die DNA wurde, abhängig von der Stärke der Bande im Gel, mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.3 *in vitro* Transkription mit dem *MEGAscript Kit*

Das *MEGAscript Kit* der Firma Ambion wurde zur Transkription der für den RISC-Assay benötigten mRNA genutzt. Die Durchführung fand nach Angaben des Herstellers statt. Dazu wurde ein Ansatz aus den vier Nukleotiden ATP, CTP, GTP und UTP, *10xreaction buffer*, *enzyme mix*, nukleasefreiem Wasser und dem DNA-Template für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die transkribierte mRNA wurde dann mithilfe des *mirVana miRNA Isolation Kits* aufkonzentriert und aufgereinigt. Hier wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

### 2.2.1.4 Bestimmung der DNA-Konzentration mit der NanoDrop™1000

Die Absorption durch Nukleinsäuren ist auf die aromatischen Ringe der Basen zurückzuführen. Das Absorptionsmaximum befindet sich bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit der NanoDrop™1000 bestimmt. Dieses Gerät ermöglicht eine fotometrische Konzentrations- und Qualitätsmessung ohne Verdünnung von DNA, RNA, Oligonukleotiden und PCR-Produkten in einem Messbereich von 2-3700 ng/µl.

**2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuren durch thermostabile DNA-Polymerasen *in vitro*. Dazu wird die DNA zunächst hitzedenaturiert. Anschließend binden zwei Oligonukleotide als Startermoleküle (*primer*), die komplementär zu den 3'-Enden des Zielsegments sind, bei niedriger Temperatur an die einzelsträngige DNA (*annealing*). Bei einer Temperatur, die zwischen der zur Denaturierung und der für das *annealing* verwendeten Temperatur liegt, werden die *primer* verlängert (Extension) und das zwischen den Primer liegende DNA-Fragment wird gebildet. Die Abfolge aus Denaturierung, *annealing* und Extension wird als Zyklus bezeichnet. Durch mehrmalige Wiederholung eines solchen Zyklus wird das gewünschte DNA-Fragment vervielfältigt.

Es wurden PCRs mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Diese weist neben der 5'-3'-Polymerisationsaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität (*proof-reading*-Aktivität) auf.

Die PCR wurde zur Herstellung einer Luziferase-cDNA genutzt und nach folgendem Protokoll und unter Benutzung des folgenden Programms durchgeführt:

500 ng	1,6 µl	pGL2Control 1:10 (Template)
	10 µl	10xPuffer+MgSO <sub>4</sub>
	0,72 µl	T7-Luzi 323-341 <i>sense primer</i> (1 µg)
	1,57 µl	Luzi 1026-1046 <i>antisense primer</i> (1 µg)
	2 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase
	1 µl	dNTP
	83,11 µl	H <sub>2</sub> O
	100 µl	

PCR-Programm		35x
94°C	3'	
94°C	30''	
57°C	30''	
68°C	120''	
68°C	5'	
10°C	∞	

Das PCR-Produkt (300 µl aus 3 Ansätzen) wurde nun mit einem Auftragspuffer (6xOrange) versetzt und auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.1.6 Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem GST-Ago2

Es wurde eine Übernachtskultur mit *E.coli*-Bakterien des Stammes BL21-RIPL-NT9 angeimpft. Diese Bakterien tragen das Plasmid für GST-Ago2 und ein Hitzeschockprotein (HSP 90). Es wurde bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6-0,8 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion mit Isopropyl-β-Thiogalactosid (IPTG). Die Bakterienzellen wurden durch Zugabe von NP40 und Lysozym und durch Sonifizieren lysiert. Nach Ultrazentrifugation wurde GST-Ago2 mithilfe von GSH-beads isoliert und viermal gewaschen. Daraufhin erfolgte das Entfernen der GSH-beads mittels Elution und die Aufreinigung durch Dialyse. Das Produkt wurde mittels Polyacrylamidgel und Western Blot überprüft.

### 2.2.1.7 RNA-induced silencing complex Assay (RISC-Assay)

Der RISC-Assay ist eine Methode zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Argonaut 2. Dazu wird *in vitro* ein minimaler RISC gebildet. Dieser besteht aus Argonaut 2 und siRNA. Der minimale RISC ist in der Lage, zur siRNA komplementäre mRNA zu spalten. Es wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

Ansatz	1	2	3	4
GST-Ago2 1 µg	1 µl	1 µl	-	-
RNase H (40U/µl)	-	-	0,5 µl	0.5 µl
Oligo 1:10	-	-	-	1 µl
Pss siRNA Luziferase (final 30 pmol)	-	3 µl	-	-
10xReaction-Buffer +DTT	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
ATP (final 0,25 mM)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Ribo lock (final 20U)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl	ad 20 µl
30 Minuten, 37°C				
mRNA Luziferase	3 µg	3 µg	3 µg	3 µg
	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
30 Minuten, 37°C				

Während der ersten Inkubationszeit (30 Minuten, 37°C) wurde der minimale RISC gebildet. Danach wurden 3 µg der zur siRNA komplementären mRNA zu jedem Ansatz pipettiert und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dieser zweiten Inkubation fand die Spaltung der mRNA statt. Die Ansätze 3 und 4 dienten zur Kontrolle. Hier fand eine Oligonukleotid-abhängige Spaltung der mRNA durch die RNaseH statt. Im Anschluss wurde die RNA mithilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung aufgereinigt und dann mit dem Agilent 2100 Bioanalyser gemessen.

#### **2.2.1.8 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung**

Diese Methode dient dazu, Nukleinsäuren aus Lösungen zu isolieren und Verunreinigungen zu entfernen.

Zunächst wurde die DNA- bzw. RNA-enhaltene Lösung mit 10 Volumen 0,3 M Natriumacetat und 5 Volumen Phenol-Chloroform versetzt, 60 Sekunden gevortext und für 5 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und weiterverwendet. Dann erfolgte die Zugabe von 2 Volumen 100 % Ethanol, 1:25 Glykogen und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat. Im Anschluss wurde für 1 Stunde bei -20°C inkubiert und für 30 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Dann erfolgte die Ethanolfällung durch Zugabe von 400 µl 70 % Ethanol und einer weiteren Zentrifugation von 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C. Das Ethanol wurde abgenommen, das Pellet getrocknet und in 3 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.1.9 Agilent RNA 6000 Nano Assay**

Der Agilent 2100 Bioanalyser erlaubt eine schnelle und sensitive Untersuchung von Nukleinsäuren. Hierzu stehen *LabChips* zur Verfügung. Diese bestehen aus einem System von Mikrokanälen und Wells, die in einen Kunststoffchip eingebracht sind. In diesem System findet eine elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren statt. Es sind nur geringe Probenmengen nötig. Zur Bestimmung der mRNA-Spaltung im RISC-Assay wurde 1 µl der Probe eingesetzt.

Die in der Probe enthaltene RNA wurde für 2 Minuten bei 70°C denaturiert und dann gemeinsam mit dem *ladder* nach Herstellerangaben auf den Chip gebracht. Dann wurde für 1 Minute bei 2400 rpm gevortext und der Chip mittels Agilent 2100 Bioanalyzer analysiert.

#### **2.2.1.10 GSH-beads Assay**

Im *GSH-beads* Assay wird das Lysat aus stimulierten Zellen mit rekombinantem GST-Ago2 inkubiert. Mittels Glutathion-Sepharose-*beads* wird GST-Ago2 danach aus dem Ansatz isoliert und in den RISC-Assay eingesetzt.

Dazu wurden zunächst 50 µg Ganzzelllysat mit GST-Ago und ATP-Mix für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen erfolgte das Äquilibrieren der Glutathion-Sepharose-*beads* in Ganzzellysepuffer (mit 1 mM DTT). Die Ansätze wurden dann zu den *beads* pipettiert und für 30 Minuten bei 30°C und 500 rpm inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der *beads* in Ganzzellysepuffer (mit 1 mM DTT) wurde zu den *beads* der RISC-Assay-Master-Mix pipettiert.

#### **2.2.1.11 Immunpräzipitation**

Bei der Immunpräzipitation werden aus einem Gesamtproteinextrakt über einen Antikörper, der an eine feste Matrix gebunden ist, spezifisch Proteine und deren Bindungspartner aufgereinigt.

Zunächst erfolgte die Bindung des anti-GFP Antikörpers an die Protein-G-Sepharose. Für jeden Ansatz wurden 20 µl Protein-G-Sepharose (in 20 % Ethanol) eingesetzt. Die Protein-G-Sepharose wurde zweimal in 1 ml Zellysepuffer ohne Proteaseinhibitoren gewaschen, in 500 µl Zellysepuffer aufgenommen und mit 1 µg anti-GFP pro Ansatz versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für zwei Stunden. Anschließend wurde der Antikörper, gebunden an die Protein-G-Sepharose, mit 1 ml Zellysepuffer gewaschen und in 10 µl Zellysepuffer pro Ansatz aufgenommen.

Für die GFP-Immunpräzipitation wurde ein 300-1500 µg Protein enthaltendes Volumen mit 20 µl des mit Protein-G-Sepharose voräquilibrierten Antikörpers versetzt und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit je 1 ml Zellysepuffer bevor das Sediment in

80 µl Laemmli-Puffer (mit 100 mM DTT) aufgenommen wurde. Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

In einem Polyacrylamidgel werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Gesamtladung und ihrer Größe aufgetrennt. Wird der Größenunterschied verschiedener Proteine durch die Ladung ausgeglichen, so können sich diese mit gleicher Geschwindigkeit auf die Anode zubewegen. Es wurde SDS (Natriumdodecylsulfat) verwendet, welches alle nicht kovalenten Bindungen innerhalb eines Proteins zerstört, das Protein dadurch denaturiert und negative Ladungen in die denaturierte Polypeptidkette einführt. Die Beweglichkeit der Proteine stellt somit eine Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte dar, sodass die Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Es wurden abhängig von der Größe der aufzutrennenden Proteine 7,5 %ige oder 10 %ige Trenngelle sowie 5 %ige Sammelgelle verwendet. Die Herstellung der Gelle erfolgte nach dem folgenden Schema, wobei exemplarisch nur die Zusammensetzung für ein 10 %iges Trenngel gezeigt ist. Bei dem 7,5 %igem Gel wurde die Menge der eingesetzten Acrylamid-Stammlösung entsprechend angepasst.

Das Trenngel und das Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung:

	Sammelgel [5 %]	Trenngel [10 %]
ddH <sub>2</sub> O [ml]	5,61	3,32
50 % Glycerol [ml]	0,9	2,16
Sammelgel Puffer pH 6,8 [ml]	1,26	-
Trenngel Puffer pH 8,8 [ml]	-	9,2
30 % AA [ml]	1,68	8
2 % SDS [ml]	0,5	1,2
40 % APS [ml]	0,03	0,072
TEMED [ml]	0,02	0,048
Gesamt [ml]	10	24

Die in der Tabelle angegebenen Mengen wurden zur Herstellung eines großen Gels verwendet. Für ein kleines Gel wurden entsprechend kleinere Volumina der einzelnen Bestandteile in demselben Verhältnis zueinander eingesetzt.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, welches nach dem Auspolymerisieren mit dem Sammelgel überschichtet wurde. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge an 4×Laemmli-Auftragspuffer versetzt, zur Denaturierung der Proteine 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht, kurz an zentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Es wurden je nach Experiment 50, 100 oder 200 µg Protein aufgetragen. Vom *Prestained Marker* wurden 10 µl eingesetzt. Die für die Auftrennung der Proteine angelegte Spannung lag pro Gel abhängig von der Gelgröße zwischen 39-50 mA. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald der in dem 4×Laemmli-Auftragspuffer vorhandene Farbstoff Bromphenolblau aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde dann je nach Verwendung entweder direkt mit dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt und getrocknet oder für einen Western Blot eingesetzt.

#### **2.2.2.2 Färbung von Polyacrylamidgelen mit *Coomassie Brilliant Blue***

Der Bestandteil der *Coomassie Brilliant Blue* Lösung welcher für das Anfärben der Proteine verantwortlich ist, ist das *Coomassie Brilliant Blue G250*. Hierbei handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff. Diesem wird unter anderem Essigsäure zugesetzt, welche die Proteine fixiert. Mit dieser Methode können 100 ng bis 1 µg Protein nachgewiesen werden. Die Gele wurden für 20 Minuten mit der *Coomassie Brilliant Blue* Lösung angefärbt und dann über Nacht unter Schütteln mit einer Entfärberlösung (*destain*-Lösung) inkubiert, um die Hintergrundfärbung zu entfernen und die Proteinbanden sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Gele auf einem Gelrockner getrocknet.

#### **2.2.2.3 Western Blot und Immunodetektion mittels ECL**

Beim Western Blot handelt es sich um eine analytische, immunologische Methode, die dem spezifischen Nachweis geringer Proteinmengen aus einem komplexen Gemisch dient.

Der Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran erfolgte im *semi-dry*-Verfahren. Die vier auf die Größe des Gels zugeschnittenen Filterpapiere wurden für 2 Minuten im Blotpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung kurz in 100 % Methanol eingelegt, mit bidestilliertem Wasser abgespült und ebenfalls zum Äquilibrieren in den Blotpuffer gegeben. Das Gel und die verwendete Membran wurden in ein möglichst homogenes elektrisches Feld gebracht und befanden sich zwischen den puffergetränkten Filterpapieren. Beim Aufbauen des Blots wurde vor allem darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen bilden, welche den Transfer vom Gel auf die Membran behindern. Es wurde für 2 Stunden bei  $0,75 \text{ mA/cm}^2$  Gel geblottet. Nach dem Western Blot wurde die Membran mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt und zur Dokumentation fotografiert. Die Entfärbung erfolgte mit 100 % Methanol. Anschließend wurde die Membran kurz mit bidestilliertem Wasser abgespült und für 5 Minuten in TBST inkubiert. Um die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran zu besetzen, wurde der Blot für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch, angesetzt in TBST, geblockt. Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte mithilfe zweier Antikörper. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Antigen. Er wurde über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in einer Verdünnung (1:500 bis 1:10000) in 5 % Magermilch in TBST oder in 5 % BSA in TBST, je nach Antikörper, auf die Membran gegeben. Anschließend wurde der Blot zuerst zweimal kurz mit TBST gespült und dann viermal für je 5 Minuten in TBST gewaschen, um den nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Dann wurde der Blot mit dem zweiten Antikörper für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde zuvor 1:3000 in 2 % oder 5 % Magermilch in TBST verdünnt. Der Sekundärantikörper besitzt Spezies- oder Subklassen-Immunglobulinspezifität für den Primärantikörper. Außerdem ist an den zweiten Antikörper eine HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt, welche die Umsetzung des ECL-Reagenzes katalysiert. Die bei dieser Reaktion frei werdende Energie wird in Form von Licht abgegeben.

Überschüssiger Antikörper wurde erneut durch viermaliges Waschen mit TBST entfernt. Die Immunodetektion erfolgte anhand der Chemilumineszenz, die durch die Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz entstand, das nach den Angaben des Herstellers eingesetzt wurde. Das Verfahren basiert auf der Abspaltung von reaktivem Sauerstoff aus Persäure durch die Peroxidase, der dann Luminol oxidiert. Unter Stickstoffabspaltung und Lichtemission entsteht Aminophthalsäure. Durch Zugabe eines chemischen Verstärkers wird

die Lichtintensität erhöht und kann auf einem Film (Biomax ML, Kodak) sichtbar gemacht werden. Für eine erneute Detektion mit einem anderen Antikörper wurde die Membran kurz in Methanol gewaschen (zur Inaktivierung des Sekundärantikörpers), in TBST äquilibriert und erneut mit Trockenmilch geblockt.

### **2.2.3 Zellkulturtechniken**

#### **2.2.3.1 Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden zuerst im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde daraufhin in 10 ml Medium überführt und zur Entfernung des im Einfriermedium vorhandenen DMSO bei 1000×g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml Medium resuspendiert und in die gewünschte Zellkulturflasche überführt, in der frisches Medium vorgelegt wurde.

#### **2.2.3.2 Kultivieren und Passagieren adhärent wachsender Zellen**

Es wurde nur mit HEK293 IL-1R gearbeitet. Diese Zelllinie ist adhärent und wurde in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer wassergesättigten Atmosphäre in DMEM-Vollmedium (10 % (v/v) FKS, 2 mmol/l L-Glutamin, 1 mmol/l Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

Die Passage der Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage, sobald die Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen bildeten. Zu diesem Zweck wurde das Medium dekantiert, die Zellen mit Trypsin/EDTA (TE) vom Untergrund gelöst, neues Medium zugefügt und resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Kulturflasche, in die frisches Medium vorgelegt wurde, überführt.

#### **2.2.3.3 Stimulation und Ernten von Zellen**

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit IL-1, Cisplatin (250 µM; 37,5 µl der stock solution auf 1 ml Medium), Doxorubicin (500 ng/ml; stock solution wurde 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt, 0,5 µl der Verdünnung auf 1 ml Medium) und Vinblastin (22 nM; stock solution wurde 1:1000 in H<sub>2</sub>O verdünnt, 2 µl auf 1 ml Medium). Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen

und durch frisches Medium ersetzt. Auf die Zellen wurden daraufhin die Stimulanzen in verschiedenen Konzentrationen gegeben und anschließend bei 37°C kultiviert. Je nach Experiment wurden die Zellen dann nach verschiedenen Inkubationszeiten geerntet. Der 0 h-Zeitpunkt wurde jeweils am Ende des Experimentes geerntet. Anschließend wurden die Zellen direkt lysiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.3.4 Zellzählung**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in einem Hämocytometer (Neubauer Zählkammer), indem die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau (0,8 % (v/v) in PBS) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage Trypanblau aktiv auszuscheiden, während tote oder geschädigte Zellen dies nicht mehr vermögen und blau angefärbt werden. In den vier Großquadranten wurden die lebenden Zellen gezählt und anschließend wurde die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

$(\text{Summe der Zellen aller Großquadrate}/4) \times 10000 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellen/ml}$

#### **2.2.3.5 Transiente Transfektion mit Calciumphosphat**

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen. Man unterscheidet zwischen einer transienten Transfektion, bei der das Plasmid in den Zellkern gelangt und für einige Tage das gewünschte Gen exprimiert wird und einer stabilen Transfektion, bei der das eingeschleuste Expressionsplasmid in die chromosomale DNA integriert wird. Es gibt verschiedene Transfektionsmethoden wie die DEAE-Dextran-Technik, die Elektroporation, die Liposomen-vermittelte Transfektion oder die hier verwendete Calciumphosphat-Methode. Hierbei wird die DNA mit einer phosphathaltigen Pufferlösung und Calciumchlorid gemischt. Es bilden sich feine Calciumphosphatkristalle aus, die sich auf der Oberfläche der Zellen niederschlagen mit denen sie in Kontakt kommen. Über Endocytose gelangen die Kristalle dann in die Zelle.

Die folgenden Angaben gelten für jeweils ein Well einer 6-Well-Platte. Erfolgte die Transfektion der Zellen in anderen Kulturgefäßen, wurden die einzelnen Volumina der Kulturfläche angepasst.

Am Vortag der Transfektion wurden pro Well  $4 \times 10^5$  Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Für jedes Well wurden 225  $\mu$ l 2xHEBS, 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und die gewünschte Menge DNA gemischt, die Bildung der Präzipitate erfolgte durch vorsichtige Zugabe von 31,5  $\mu$ l einer kalten 2 mol/l CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Die Suspension wurde auf die Zellen pipettiert und diese dann für mindestens 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zum Entfernen der Präzipitate wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 2 ml frischem Medium versehen und für weitere 24-48 Stunden kultiviert.

### **2.2.3.6 Herstellung von Zelllysaten**

#### **2.2.3.6.1 Zelllyse mit Ganzzelllysepuffer**

Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann in PBS abgeschrappt. Dann erfolgte das Pelletieren der Zellen durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13.000 rpm und 4°C und das qualitative Abnehmen des Überstandes. Das Pellet wurde in 80  $\mu$ l Ganzzelllysepuffer resuspendiert, gevortext und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Ganzzelllysat erhielt man durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 10.600 rpm und 4°C.

#### **2.2.3.6.2 Zelllyse mit $\beta$ -Galaktosidase-Puffer**

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und pro 6-Well in 300  $\mu$ l PBS suspendiert. Dann wurden die Zellen bei 13.000 rpm und 4°C für 1 Minute pelletiert und der Überstand qualitativ abgenommen. Nun erfolgte eine Resuspension in 100  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Lysepuffer, vortexen und eine Inkubation von 15 Minuten auf Eis. Nach einer Zentrifugation von 15 Minuten bei 10.600 rpm und 4°C erhielt man als Überstand das  $\beta$ -Gal-Lysat.

#### **2.2.3.6.3 Zelllyse mit TAP-Lysepuffer**

Wie bei den vorangegangenen Zelllysen wurden auch hier die Zellen gewaschen und pelletiert. Die Resuspension erfolgte in 60  $\mu$ l 5mmol/l Tris pH 8,0 mit nachfolgender Inkubation für 15 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l 4xTAP-Lysepuffer wurde für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zum vollständigen Aufschluss wurden die Lysate dann

viermal durch eine 20 Gauge-Nadel und dann viermal durch eine 25 Gauge-Nadel gepresst. Letzte Zellfragmente wurden dann durch für 20 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert.

#### **2.2.3.6.4 Zelllyse mit Bohmann-Lysepuffer**

Auch hier erfolgte zunächst das Waschen und Pelletieren der Zellen wie in den vorherigen Zelllysen. Die Resuspension erfolgte in 80 µl Bohmann-Lysepuffer. Danach wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert und für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

#### **2.2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode, die auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue* G-250 an Proteine in saurer Lösung beruht. Dieses Reagenz bindet am stärksten an Arginin-Reste aber nur schwach an Histidin-, Lysin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalaninreste. Bei der Bindung erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Das Reagenz wurde aus einer Mischung des Farbstoffkonzentrats *Roti Quant* 40 % (v/v) und ddH<sub>2</sub>O 60 % (v/v) hergestellt. In einer 96-Well-Platte wurden 100 µl der zu messenden Probe und einer BSA (*bovine serum albumin*)-Standardreihenlösung (0-35 mg/ml in PBS) als Dreifachwerte vorgelegt und mit 100 µl der Farbstofflösung versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm in einem *ELISA Reader*. Die Konzentration der Probe wurde anhand der Standardreihe bestimmt.

#### **2.2.3.8 Luziferase-Reportergenassay**

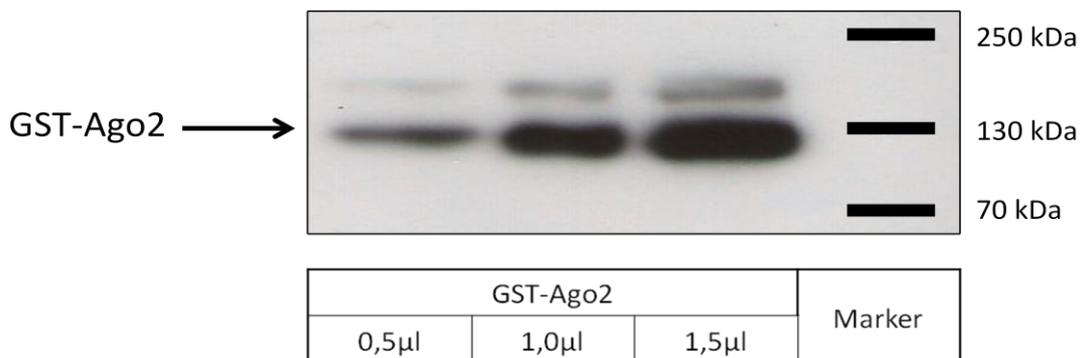
Luziferase setzt unter ATP-Verbrauch mit Coenzym A den Farbstoff Luziferin um, wobei es durch Chemilumineszenz zur Aussendung von Licht kommt. Die Bestimmung der Luziferaseaktivität erfolgte als Doppelwert. Dazu wurden 10 µl Lysat in einem Messröhrchen vorgelegt und in das Luminometer gestellt. Nach Injektion von 100 µl des Luziferase-Reagenzes durch das Gerät erfolgte 5 Sekunden später die Messung der Chemilumineszenz für 10 Sekunden.

### 2.2.3.9 $\beta$ -Galaktosidase-Messung

Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pSV- $\beta$ -Gal kotransfiziert. Dabei handelt es sich um ein bakterielles  $\beta$ -Galaktosidasegen, welches unter der Kontrolle eines SV40-Promotors exprimiert wird. Die Galaktosidaseaktivität wurde durch Messung der Chemilumineszenz eines umgesetzten Substrates bestimmt. Zur Inaktivierung der endogenen  $\beta$ -Galaktosidase wurden 25  $\mu$ l Lysat 1 Stunde bei 50°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und wieder auf Raumtemperatur erwärmt. Im Versuchssystem der Firma Clontech wandelt die  $\beta$ -Galaktosidase ein nicht näher von der Firma beschriebenes Substrat um. Zur Messung wurden 10  $\mu$ l Lysat in einem Luminatorröhrchen vorgelegt und mit 25  $\mu$ l eines  $\beta$ -Galaktosidasepuffer-Substratgemisches (pro 10  $\mu$ l Lysat: 25  $\mu$ l Reaktionspuffer + 0,5  $\mu$ l Substratlösung) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte direkt im Anschluss für 10 Sekunden. Jede Probe wurde als Doppelwert gemessen.



Abbildung 5 zeigt zwei SDS-Polyacrylamidgele. Aufgetragen wurde der Überstand nach Lyse der Bakterienzellen und Ultrazentrifugation, die vereinigten Waschschriffe, die Eluate, die GSH-*beads* nach Elution, die vereinigten Eluate vor und nach Dialyse und das Endprodukt nach der Aufkonzentrierung. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde ein Proteinstandard (Marker) mitgeführt. GST-Ago2 hat eine Molekulargröße von ca. 130 kDa. Um die gewonnene Menge an GST-Ago2 bestimmen zu können, wurde BSA (*bovine serum albumin*) als Referenz aufgetragen. Die Gele zeigen, dass während der Prozedur nur wenig GST-Ago2 verloren ging. Nach der Elution war nur noch eine sehr geringe Restmenge an die *beads* gebunden und bei der Aufkonzentrierung durch die Microcon-Säule ging kein GST-Ago2 verloren (vgl. Durchfluss in Abbildung 5). Die Waschschriffe, Elution und Aufkonzentrierung waren effektiv. Die Konzentration von GST-Ago2 wurde im Vergleich zur bekannten Menge an BSA im hier gezeigten Beispiel mit 0,5 µg/µl bestimmt. Um zu bestätigen, dass das Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa, welches auf den Gelen zu sehen ist, das hergestellte GST-Ago2 ist, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dieser wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Ago2 inkubiert. Das Ergebnis dieses Western Blots zeigt Abbildung 6. Es wurden 0,5 µl, 1 µl und 2 µl des hergestellten Proteins aufgetragen. Das Ergebnis bestätigt, dass GST-Ago2 isoliert wurde.



**Abbildung 6: Überprüfung des aufgereinigten GST-Ago2 mittels Western Blot:** Um zu bestätigen, dass es sich bei dem rekombinant hergestellten Protein um GST-Ago2 handelte, wurde das Produkt mittels Western Blot identifiziert.

### 3.1.2 *in vitro* Transkription einer Luziferase-RNA und anschließende Überprüfung der Integrität

Neben GST-Ago2 wurde eine mRNA sowie eine dazu komplementäre siRNA benötigt um den minimalen RISC zu bilden.

Die mRNA wurde mittels *in vitro* Transkription hergestellt. Dazu wurde zunächst mittels PCR mit pGL2Control als Ausgangsplasmid ein DNA-*template* generiert. Amplifiziert wurde eine T7 Luziferase cDNA. Das PCR-Produkt wurde dann auf ein Agarose-Gel aufgetragen, das unter UV-Licht sichtbare DNA-Fragment (ca. 700 bp) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels Gel-Extraktion isoliert. Dann folgte die *in vitro* Transkription zu Herstellung der gewünschten Luziferase-mRNA nach Vorlage des DNA-*templates*. Die Gewinnung der so produzierten mRNA erfolgte mit Hilfe des *miRNA Isolation Kits*. Die für den Assay ebenfalls benötigte phosphorylierte siRNA wurde käuflich erworben.

A **Luziferase cDNA 323-498**

T7-Promotor

---

3' **CGGTAATACGACTCACTATAGGGAGA**ATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCA

TAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGA

TGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAATACTTCGAAATGTCCGT

TCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGA 5'

B **Luziferase mRNA**

5' AUGGAACCGCUGGAGAGCAACUGCAUAAGGCUAUGAAGAGAU

CGCCUGGUUCCUGGAACAAUUGCUUUUACAGAUGCACAUUCGAGGUGAACAU

CA **CGUACGCGGAUACUUCGA**AAUGUCCGUUCGGUUGGCAGAAGCUAUGAAACG

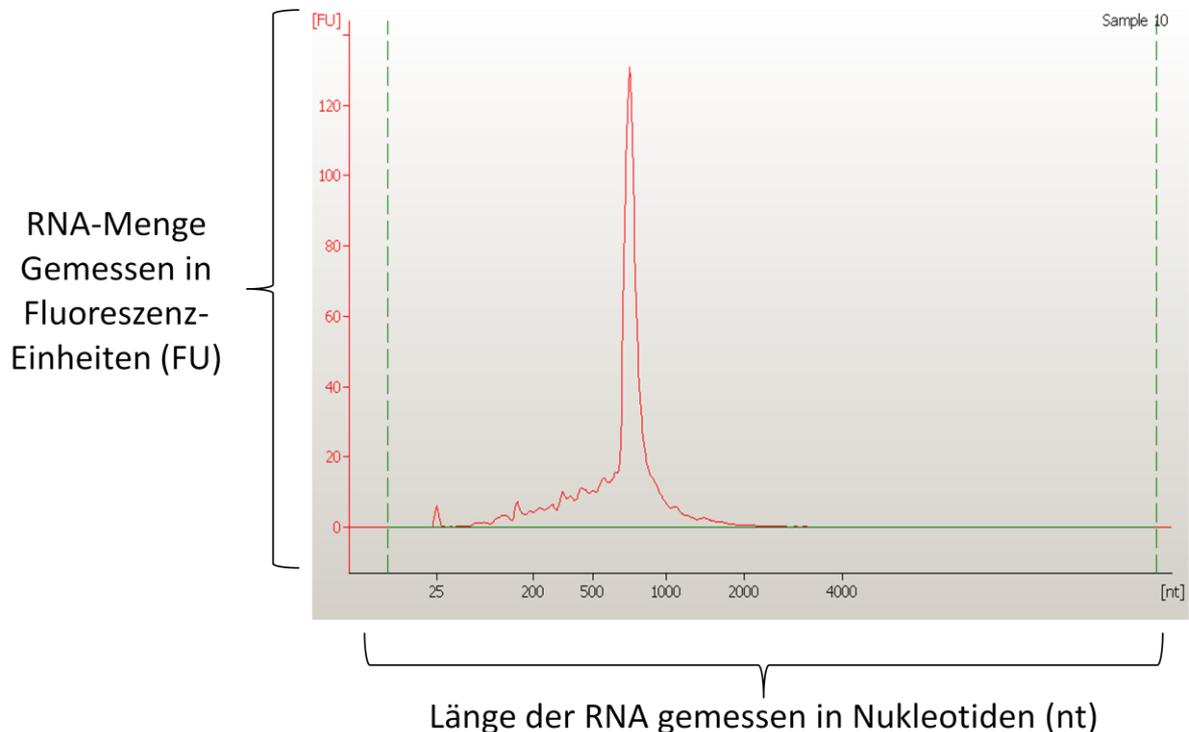
Luziferase siRNA-Sequenz

↓ RISC-Schnittstelle

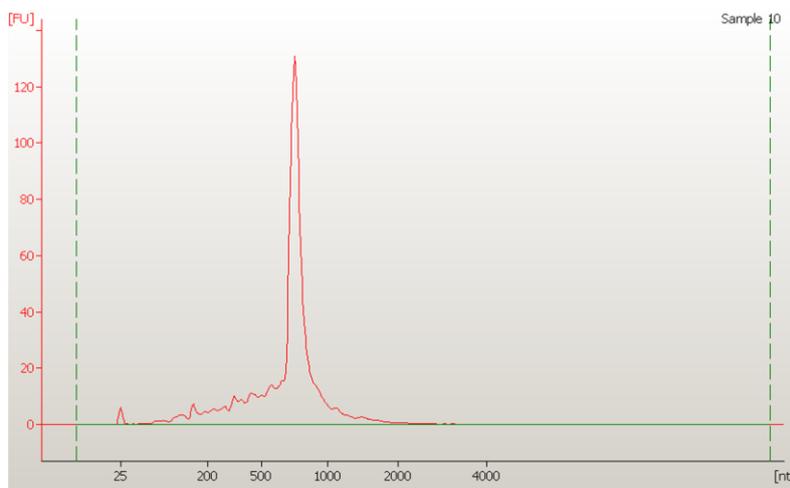
AUAUGGGCUGAAUACAAAUCACAGA 3'

**Abbildung 7: A: T7 Luziferase cDNA:** Mittels PCR wurde eine T7 Luziferase cDNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zur Herstellung der Luziferase mRNA mittels *in vitro* Transkription verwendet. **B: Luziferase mRNA mit der Luziferase siRNA-Sequenz und der Schnittstelle des RISC:** Bei der Luziferase siRNA (grün dargestellt) handelt es sich um ein einsträngiges Oligonukleotid, welches am 5'-Ende phosphoryliert ist. Kommt es zur komplementären Bindung zwischen mRNA und siRNA wird das Hybrid durch den RISC an der dargestellten Stelle geschnitten.

Die Überprüfung der RNAs erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyser. Mit Hilfe dieses Systems ist es möglich, per Kapillarelektrophorese im Chipformat ein Elektropherogramm zu erstellen. Hier werden die Quantität, die Qualität und die Größe der RNA dargestellt.



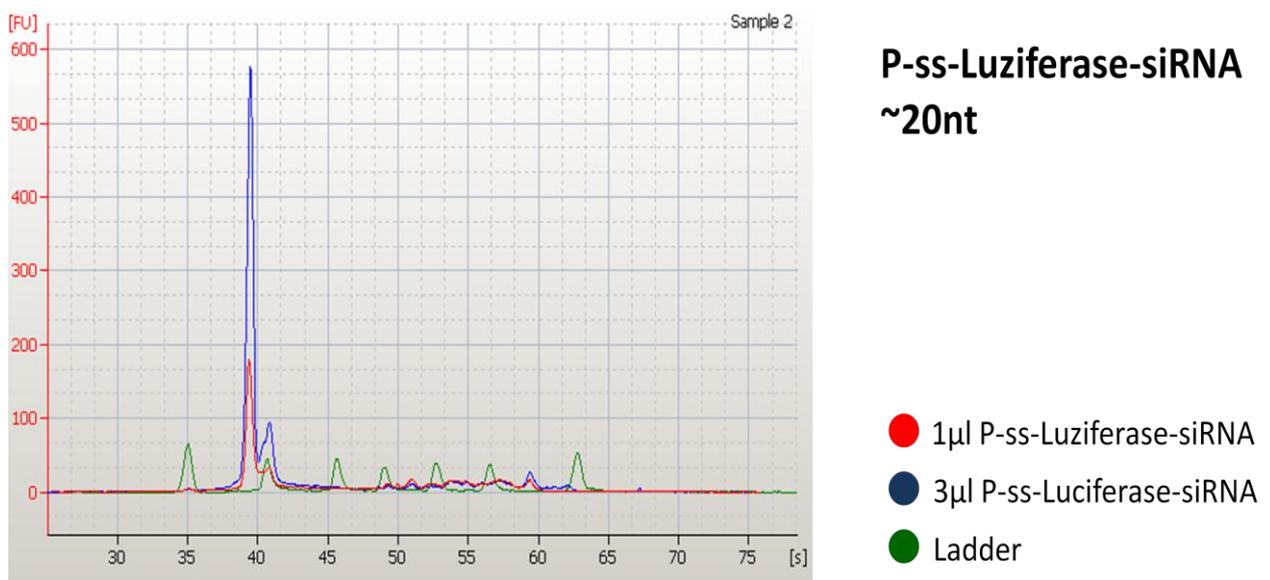
**Abbildung 8: Mittels Agilent 2100 Bioanalyser erstelltes Elektropherogramm:** Der Agilent Bioanalyser ist ein System zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA, RNA und Proteinen im Chip-Format. Die Abbildung zeigt die grafische Darstellung eines Elektropherogramms der Luziferase RNA. Auf der Ordinate wird die RNA quantitativ, in Fluoreszenzeinheiten gemessen, dargestellt. Die Abszisse zeigt die Länge der RNA-Fragmente gemessen in Nukleotiden. Alternativ kann die RNA-Größe auch in Sekunden (s) angegeben werden.



**Luziferase-mRNA**  
**~ 700nt**

**Abbildung 9: Überprüfung der Luziferase-mRNA mittels Agilent 2100 Bioanalyser:** Auf der Abszisse ist die Länge der RNA in Nukleotiden aufgetragen, die Ordinate zeigt die RNA-Menge gemessen in Fluoreszenz-Einheiten (*fluorescence units*, FU).

Abbildung 9 zeigt das mittels Agilent 2100 Bioanalyser dargestellte Muster der per *in vitro* Transkription hergestellten Luziferase-mRNA. Auf der Ordinate ist die Menge an RNA gemessen in Fluoreszenz-Einheiten (*fluorescence units*, FU) aufgetragen. Die Abszisse zeigt die Größe der RNA in Nukleotiden (nt). Der überwiegende Teil der in der hergestellten Lösung enthaltenen RNA war die gewünschte Luziferase-RNA mit einer Länge von ca. 700 Nukleotiden. Nicht zu verhindern ist das Auftreten von kürzeren RNA-Bruchstücken, die aber in diesem Fall einen vernachlässigbar kleinen Teil der Gesamt-RNA ausmachten. Somit wurde diese RNA in die folgenden RISC-Assays eingesetzt.



**Abbildung 10: Überprüfung der Luziferase-siRNA mittels Agilent 2100 Bioanalyser:** Hier ist die zur Luziferase-mRNA komplementäre einzelsträngige phosphorylierte siRNA dargestellt. Die Menge der RNA wurde ebenfalls in Fluoreszenz-Einheiten (*fluorescence units*, FU) gemessen, die Größe wurde in Sekunden (s) angegeben. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Größe der Nukleinsäure.

Abbildung 10 zeigt das Muster der siRNA, welche für den RISC-Assay verwendet wurde. Diese hat eine Länge von ca. 20 Nukleotiden und ist komplementär zur bereits erwähnten Luziferase-mRNA.

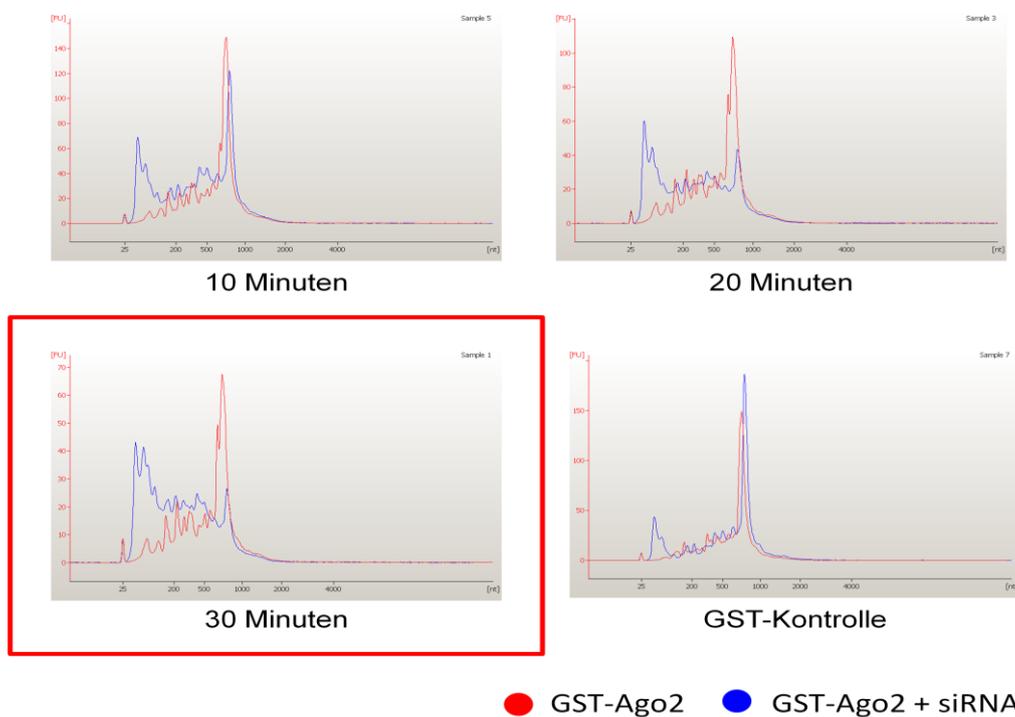
### 3.2 Optimierung des RISC-Assays

Frau Dr. Kettner-Buhrow aus der Arbeitsgruppe Kracht hatte das Grundgerüst des RISC-Assays bereits etabliert. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Inkubationszeit sowie die einzusetzende GST-Ago2-Menge optimiert.

### 3.2.1 Bestimmung der optimalen Inkubationszeit für den RISC-Assay

Der RISC-Assay beinhaltet zwei Inkubationszeiten bei 37°C. Während der ersten Inkubation formen GST-Ago2 und die siRNA einen Komplex, den sogenannten minimalen RISC. Die dazu benötigte Zeit war bereits auf 30 Minuten festgelegt. Es wurde 1 µg GST-Ago2 eingesetzt. Die weitaus kritischere und sensiblere Inkubationszeit ist die nach der Zugabe der zur siRNA komplementären Luziferase-mRNA. In dieser zweiten Inkubation findet die spezifische RNA-Spaltung durch den minimalen RISC statt. GST-Ago2, siRNA und mRNA sowie 10xReaction-Buffer+DTT, ATP (0,25 mM), Ribo lock (20 U) und H<sub>2</sub>O wurden für 10, 20 und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die spezifische Spaltung durch GST-Ago2 in Anwesenheit der siRNA zu zeigen wurden als negative Kontrolle eine Probe, die lediglich GST anstelle von GST-Ago2 enthielt, sowie jeweils ein Ansatz ohne siRNA mitgeführt. Das Ergebnis dieses Experiments wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyser gemessen.

Die Spaltung der mRNA stellt sich als Abnahme des *peaks* bei 700 nt dar. Dieses entspricht der Luziferase-mRNA und kann sowohl direkt als Anzahl der Nukleotide (nt) oder indirekt in Sekunden (s) angegeben werden.

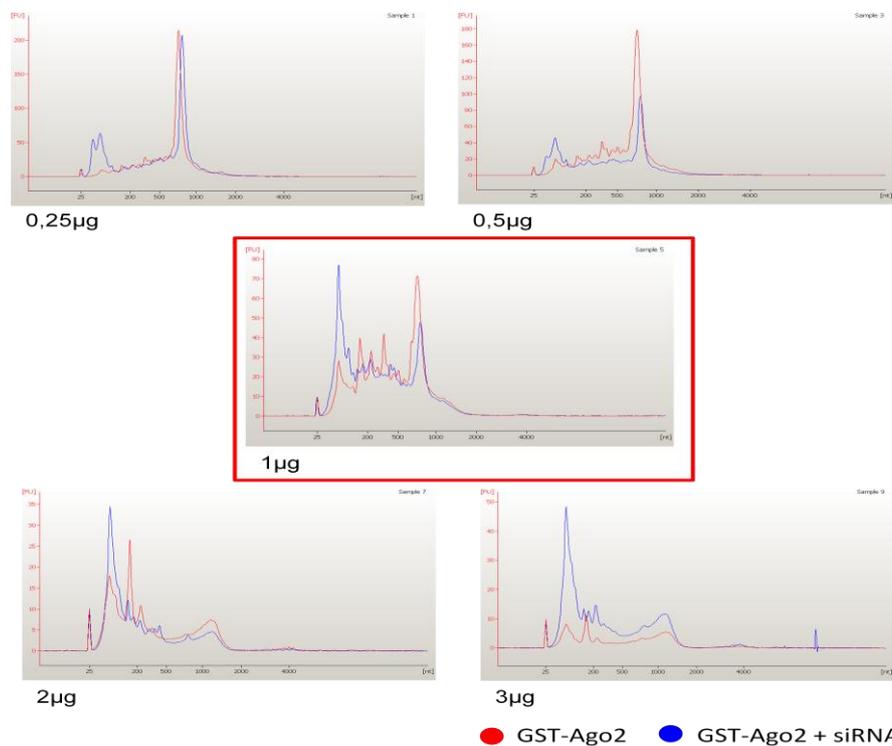


**Abbildung 11: Bestimmung der optimalen Inkubationszeit für den RISC-Assay:** Zur Bestimmung der optimalen Inkubationsdauer nach Zugabe der mRNA im RISC-Assay wurde das Reaktionsgemisch für 10, 20 und 30 min inkubiert. Die blaue Kurve zeigt durch das Auftreten von kleinen Fragmenten und das fast komplette Verschwinden des 700 nt *peaks* die Degradation der Luziferase mRNA an.

Abbildung 11 zeigt das durch den Agilent 2100 Bioanalytiker gemessene Ergebnis des RISC-Assays mit verschiedenen langen Inkubationszeiten nach Zugabe der mRNA. Die Negativ-Kontrolle belegen, dass nur in Anwesenheit von GST-Ago2 und siRNA eine spezifische RNA-Spaltung stattfindet. Somit konnte von einer spezifischen Degradierung der RNA durch den minimalen RISC ausgegangen werden. In den Ansätzen die für 10 bzw. 20 Minuten bei 37°C inkubiert wurden, zeigte sich bereits eine spezifische Spaltung der Luziferase-mRNA durch den minimalen RISC. Diese Degradierung stellte sich als deutliche Minderung des Luziferase-RNA-peaks bei 700 nt dar. Die RNA-Spaltung war jedoch nach einer Inkubation von 30 Minuten effektiver. Somit wurde die optimale Inkubationszeit im RISC-Assay nach Zugabe der Luziferase-mRNA auf 30 Minuten bei 37°C festgelegt.

### 3.2.2 Bestimmung der optimalen GST-Ago2-Menge für den RISC-Assay

Um die Optimierung des RISC-Assays abzuschließen, wurde die Menge an GST-Ago2 bestimmt, die eine optimale Spaltung der RNA herbeiführt. Hierzu wurden im folgenden Experiment 0,25 – 3 µg GST-Ago2 pro Ansatz eingesetzt.

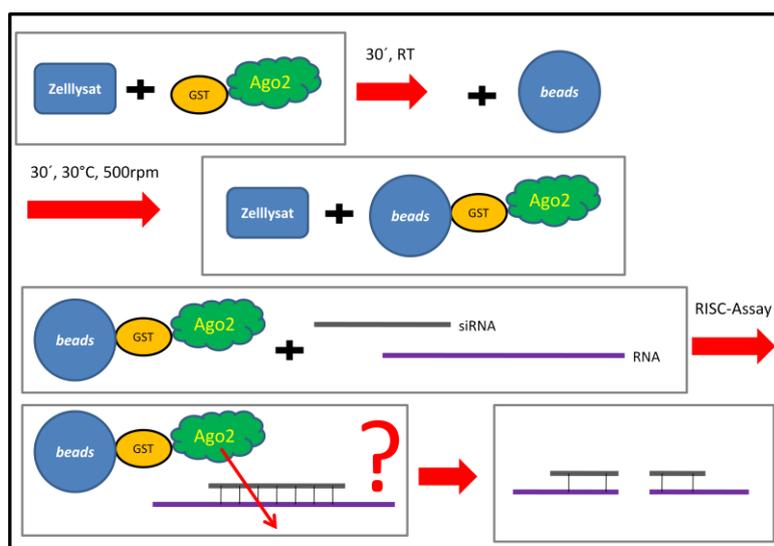


**Abbildung 12: Bestimmung der optimalen GST-Ago2-Menge für den RISC-Assay:** GST-Ago2 wurde in aufsteigenden Konzentrationen in den RISC-Assay eingesetzt um die optimale Menge, die eine Degradierung der RNA herbeiführt, zu bestimmen. Die Degradierung der RNA ist ab einer Menge von 0,5 µg GST-Ago2 effektiv. Bei Konzentrationen des Proteins >1 µg steigt der Anteil unspezifisch degradiertes RNA, sodass 1 µg GST-Ago2 als optimale einzusetzende Menge festgelegt wurde.

In Abbildung 12 ist zu sehen, dass 0,25 µg GST-Ago2 nicht ausreichen um eine messbare Spaltung der Luziferase-mRNA zu erreichen. Die Proben, die 2 µg und 3 µg GST-Ago2 enthielten, zeigten eine Spaltung der RNA ohne die Anwesenheit der komplementären siRNA. Dies ließ vermuten, dass in der GST-Ago2-Präparation unspezifische RNasen enthalten waren, welche nicht ausreichend durch den RNase-Inhibitor *Ribo lock* ausgeschaltet wurden. Bei diesen hohen Mengen dominierten somit die vermutlich vorhandenen unspezifischen RNasen. Alternativ ist eine unspezifische Degradierung der RNA durch hohe Mengen Ago2 möglich. Im Vergleich dazu zeigte der Ansatz mit 0,5 µg GST-Ago2 eine gut messbare und spezifische Spaltung der RNA, welche mit 1 µg GST-Ago2 noch gesteigert werden konnte. Somit wurde 1 µg GST-Ago2 als die optimal einzusetzende Konzentration für den RISC-Assay festgelegt.

### 3.3 Untersuchungen zur signalabhängigen Regulation der Ago2-Aktivität mittels GSH-beads Assay

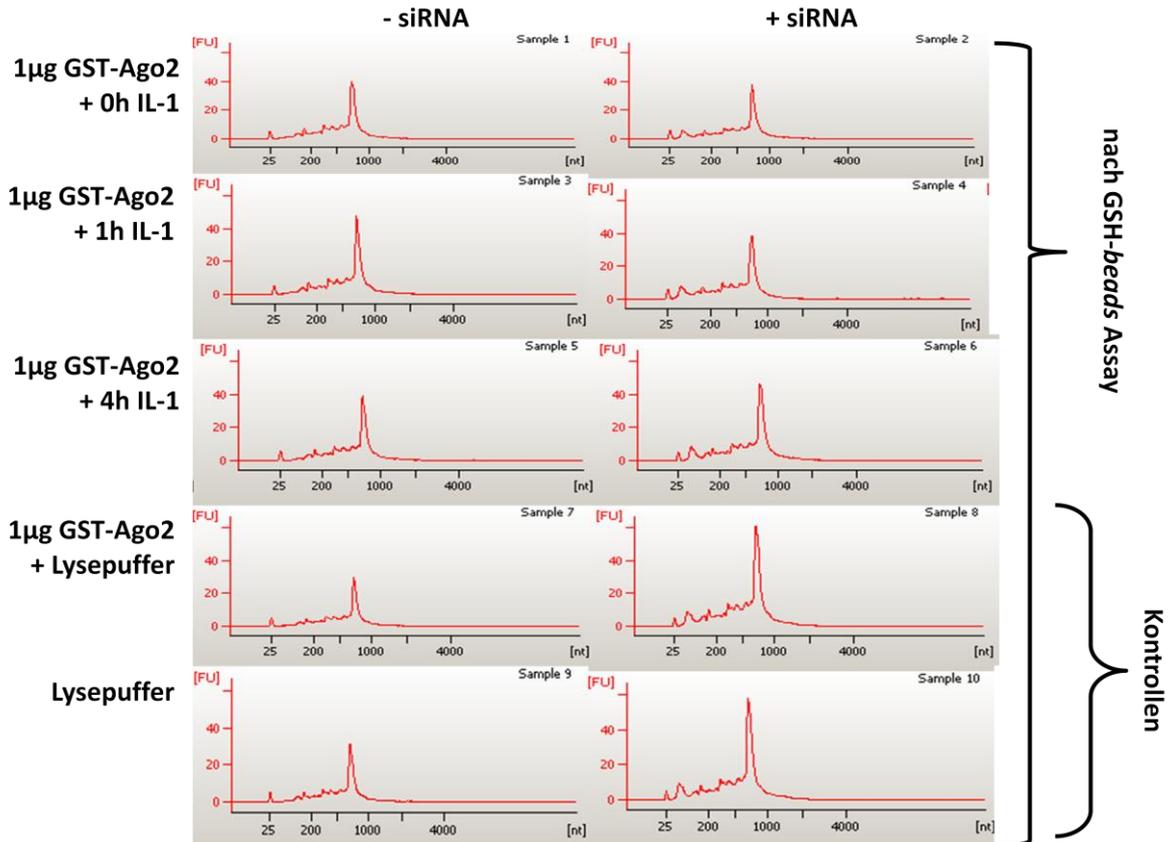
Um eine mögliche signalabhängige Regulation der Enzymaktivität von Argonaut 2 zu untersuchen, wurde 1 µg GST-Ago2 mit Zelllysaten von HEK293IL-1R-Zellen inkubiert, welche zuvor mit verschiedenen Stimuli behandelt wurden. Anschließend wurde GST-Ago2 mittels GSH-Sepharose aus dem Reaktionsgemisch entfernt und in den RISC-Assay eingesetzt. Abbildung 13 fasst den Versuchsablauf schematisch zusammen.



**Abbildung 13: Schema des GSH-beads Assays:** GST-Ago2 wurde mit Lysaten aus zuvor stimulierten HEK293IL-1R-Zellen inkubiert. Im Anschluss wurden Glutathion-Sepharose-beads, die an den GST-Teil binden, zu dieser Lösung gegeben um GST-Ago2 zu isolieren und im Folgenden in den RISC-Assay einzusetzen.

### 3.3.1 GSH-beads Assay mit IL-1-stimulierten HEK293IL-1R-Zellen

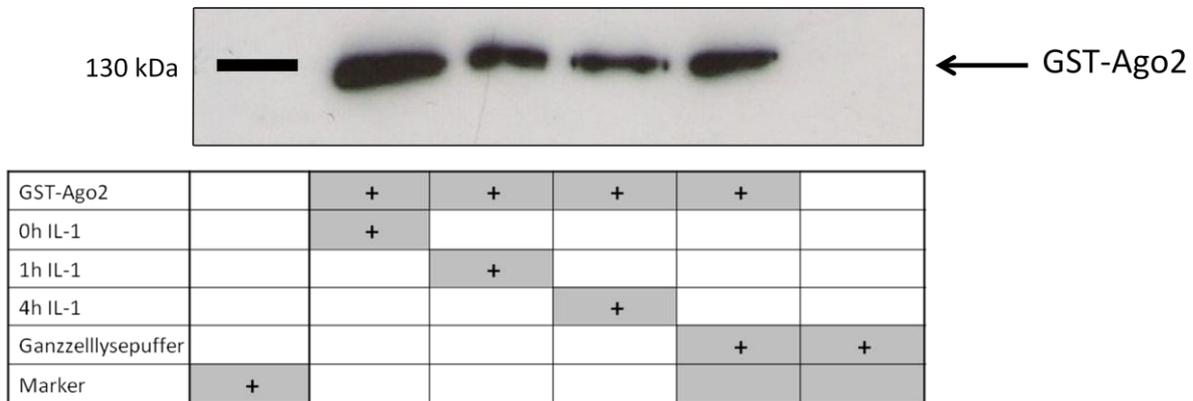
HEK293IL-1R-Zellen wurden unbehandelt gelassen bzw. für 1 und 4 Stunden mit IL-1 stimuliert und mittels Ganzzelllysepuffer lysiert. Anschließend wurde ein GSH-beads Assay wie oben dargestellt durchgeführt. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis des GSH-beads Assays.



**Abbildung 14: GSH-beads Assay nach IL-1-Stimulation:** HEK293IL-1R-Zellen wurden für 0, 1 oder 4 h mit IL-1 stimuliert und die hergestellten Ganzzelllysate mit 1 µg GST-Ago2 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Hilfe des GSH-beads Assays wurde GST-Ago2 aus dem Lysat isoliert und in den RISC-Assay eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde ein Ansatz mit unstimuliertem GST-Ago2, als Negativkontrolle ein Ansatz ohne GST-Ago2 sowie jeweils ein Ansatz ohne siRNA, mitgeführt.

Die Proben 1 und 2 zeigen das Ergebnis des RISC-Assays nach Inkubation von GST-Ago2 mit unstimulierten Zellextrakten. Die Proben 3 und 4 bzw. 5 und 6 enthielten GST-Ago2 das mit IL-1-stimulierten Zellextrakten für 1 bzw. 4 Stunden inkubiert wurde. Als Kontrollen wurden Ansätze mit GST-Ago2 und Ganzzelllysepuffer bzw. lediglich Ganzzelllysepuffer mitgeführt. Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass die positive Kontrolle (Probe 7 und 8) in der GST-Ago2 nur mit dem Lysepuffer und nicht mit Zellextrakten inkubiert wurde, negativ ausfiel. Es war keine Degradierung der Luziferase-mRNA messbar. Die Proben nach Inkubation mit IL-1-stimulierten Zellextrakten zeigten ebenfalls keine Spaltung der mRNA. Um sicher zu sein,

dass GST-Ago2 erfolgreich mittels des GSH-*beads* Assay isoliert und in den RISC-Assay eingesetzt wurde, wurde ein Western Blot durchgeführt.

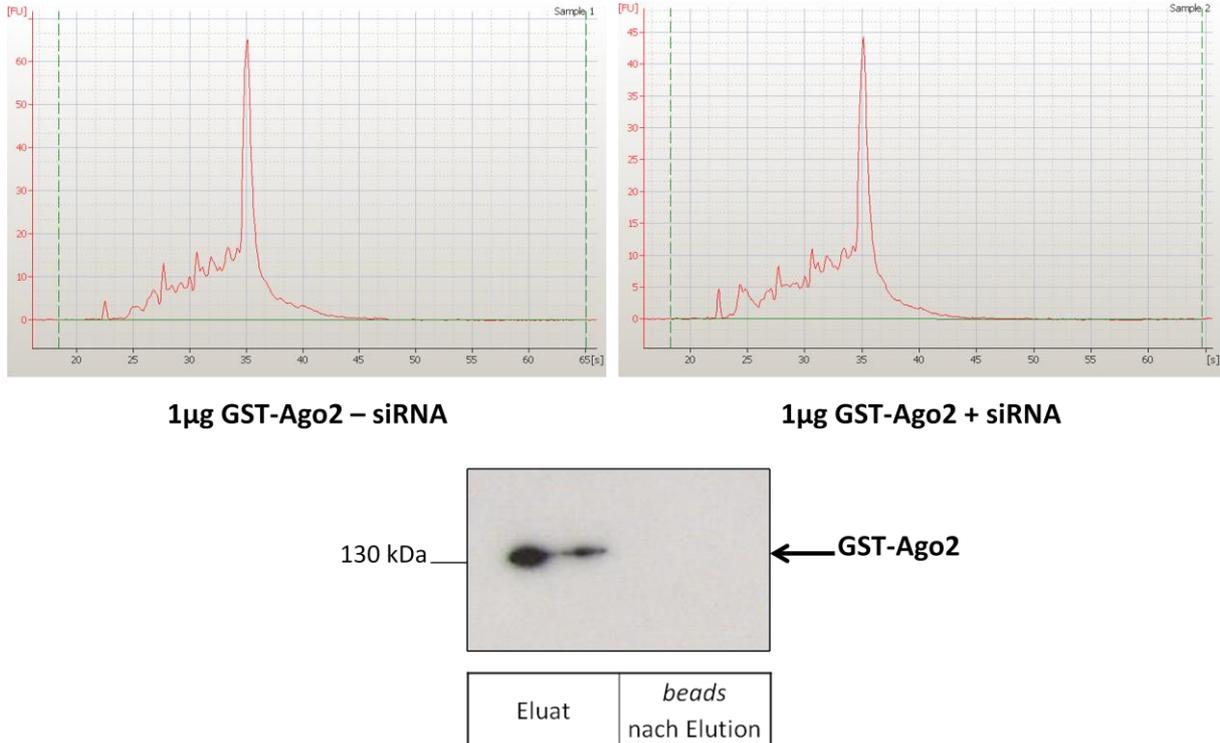


**Abbildung 15: Überprüfung der in den RISC-Assay eingesetzten GST-Ago2-Menge nach dem GSH-*beads* Assay mittels Western Blot:** Im Anschluss an den in Abbildung 14 dargestellten GSH-*beads* Assay wurde eine Western Blot durchgeführt, um sicherzustellen, dass GST-Ago2 in den RISC-Assay eingesetzt wurde. Es wurden parallel zum RISC-Assay identische Ansätze hergestellt, mittels Gelelektrophorese getrennt und durch Anti-Ago2-Antikörper im Western Blot detektiert.

Im Western Blot (siehe Abbildung 15) konnte GST-Ago2 eindeutig identifiziert werden. Somit war sichergestellt, dass dieses in den RISC-Assay eingesetzt wurde. Mögliche Gründe für das Fehlen der enzymatischen Aktivität sind einerseits die an GST-Ago2 gebundenen *beads*, welche eventuell die RNA-Spaltung stören. Weiterhin könnte während des GSH-*beads* Assays zu viel GST-Ago2 verlorengegangen sein oder durch die Inkubationen inaktiviert worden sein oder der verwendete Lysepuffer störte die enzymatische Reaktion.

### 3.3.2 GSH-*beads* Assay mit Elution

Zunächst wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die an GST-Ago2 gebundenen GSH-*beads* die Reaktionen im RISC-Assay stören. Um dieses zu untersuchen, wurden die *beads* mit Hilfe eines glutathionhaltigen Puffers vom GST-Ago2 eluiert und in den darauffolgenden RISC-Assay ungebundenes GST-Ago2 eingesetzt.

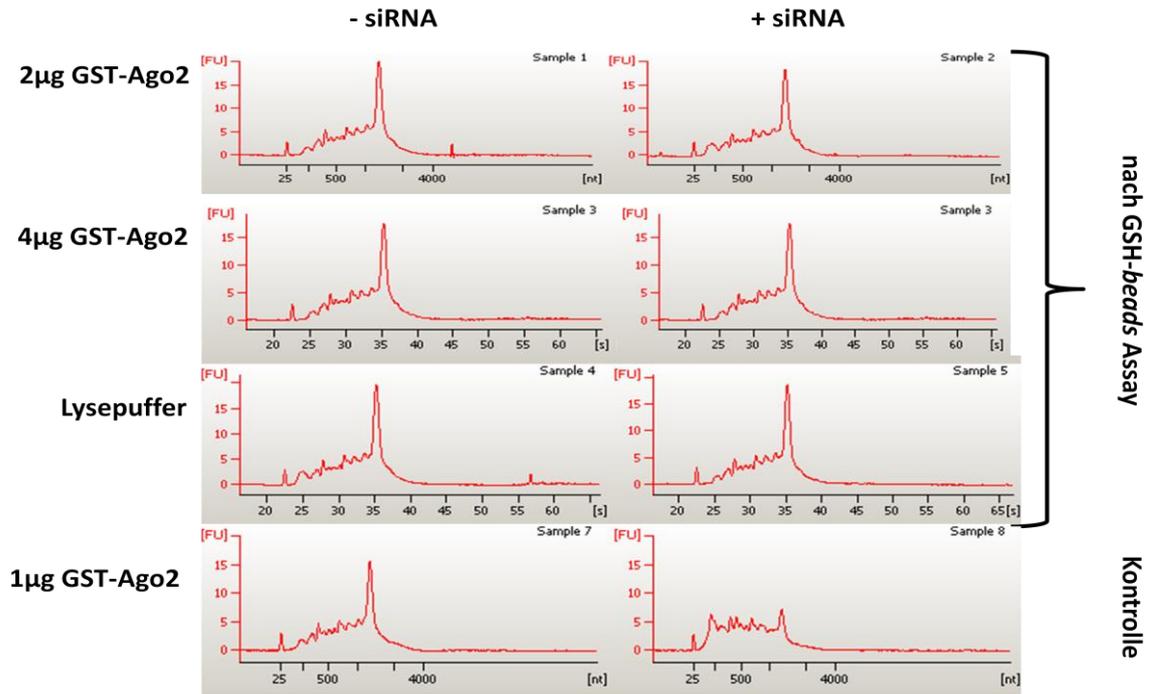


**Abbildung 16: GSH-*beads* Assay mit Elution und Western Blot:** Der GSH-*beads* Assay wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden die Glutathion-Sepharose-*beads* mit Hilfe eines glutathionhaltigen Puffers vor dem RISC-Assay eliminiert. Somit wurde GST-Ago2 ohne gebundene *beads* in den Assay eingesetzt. Nach der Elution war keine Degradierung der RNA messbar. Um sicherzustellen, dass GST-Ago2 in den RISC-Assay eingesetzt wurde, erfolgte der Nachweis mittels Western Blot.

Auch nach dem Entfernen der *beads* vom GST-Ago2 durch Elution wurde keine messbare Degradierung erreicht. Dies deutet darauf hin, dass die Ursache für das Fehlen der enzymatischen Aktivität von GST-Ago2 nicht die Kopplung an die *beads* war. Wie der in Abbildung 16 dargestellte Western Blot zeigt, enthielt das Eluat eine ausreichende Menge an GST-Ago2, welche in den RISC-Assay eingesetzt wurde.

### 3.3.3 GSH-*beads* Assay mit erhöhter GST-Ago2-Konzentration

Nun wurde überprüft, ob die Konzentration an GST-Ago2, die in den RISC-Assay eingesetzt wurde, eventuell nicht ausreichend war, um eine messbare Degradierung der RNA herbeizuführen. Möglicherweise ging im GSH-*beads* Assay ein Teil des Proteins verloren, sodass eine zu geringe Menge in den RISC-Assay gelangte. Hierzu wurde ein weiterer GSH-*beads* Assay mit erhöhten Mengen (2  $\mu$ g und 4  $\mu$ g GST-Ago2) durchgeführt. Die *beads* wurden vom GST-Ago2 durch Elution entfernt bevor es in den RISC-Assay eingesetzt wurde.



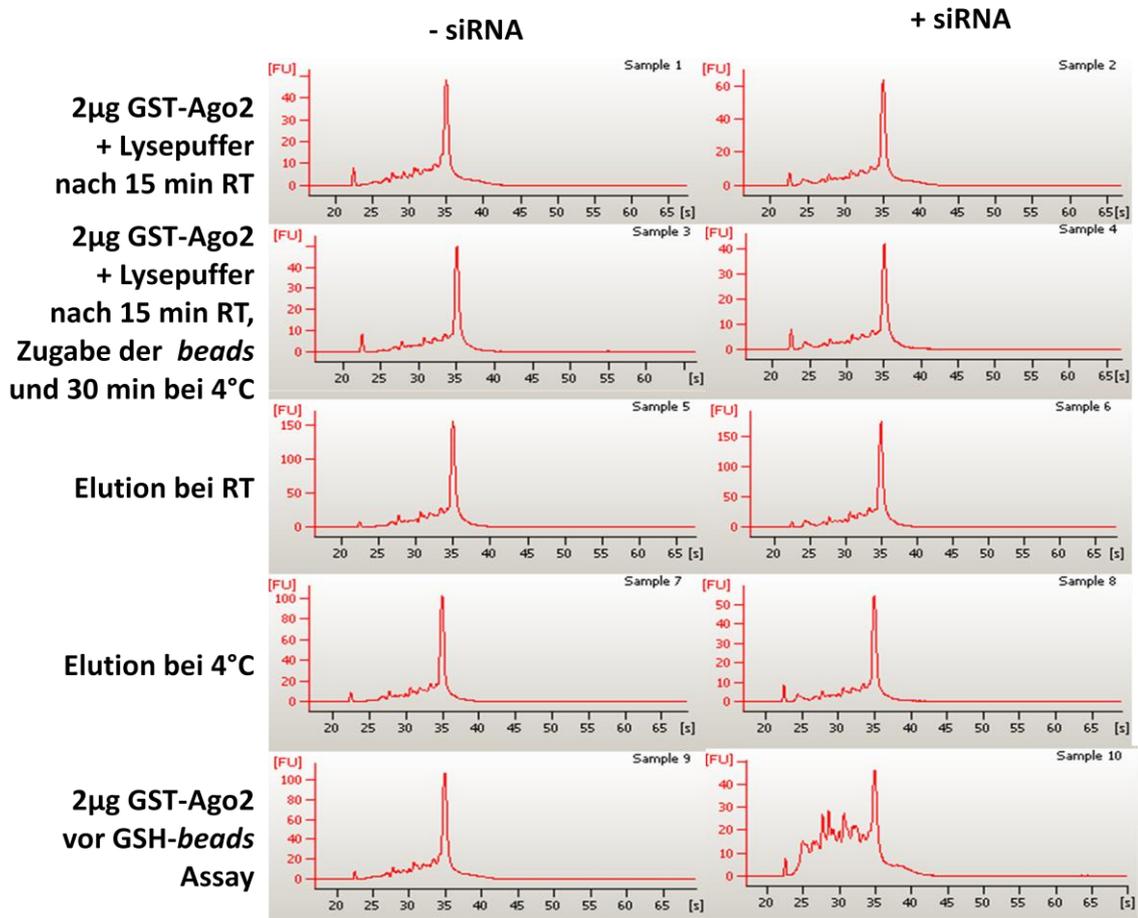
**Abbildung 17: GSH-beads Assay mit gesteigerter Menge an GST-Ago2:** Durchführung des GSH-beads Assays, wie oben beschrieben. Die eingesetzte Proteinmenge wurde von 1 µg auf 2 µg bzw. 4 µg erhöht. Als negative Kontrolle wurde ein Ansatz ohne GST-Ago2, als positive Kontrolle ein Ansatz mit unbehandeltem GST-Ago2 mitgeführt. Die positive Kontrolle funktionierte. Mit Lysepuffer bzw. Zelllysat behandeltes GST-Ago2 konnte keine RNA-Spaltung herbeiführen.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich wird, war GST-Ago2 trotz einer Verdoppelung bzw. Vervierfachung der eingesetzten Enzymmenge nicht in der Lage, die RNA zu spalten. In der positiven Kontrolle wurde die RNA durch GST-Ago2, welches nicht in den GSH-beads Assay eingesetzt wurde, gespalten. GST-Ago2 war somit vor dem GSH-beads Assay aktiv.

### 3.3.4 Einfluss der Inkubationszeit und -temperatur auf die Aktivität von GST-Ago2 im GSH-beads Assay

Bisher wurden die Experimente nach dem in Abbildung 13 dargestellten Schema durchgeführt. Da die Aktivität von GST-Ago2 trotz der zusätzlichen Elution und der Steigerung der eingesetzten Enzymmenge verloren ging, wurde die negative Beeinflussung der Enzymaktivität möglicherweise durch die Inkubationen herbeigeführt. Die erste Inkubationszeit wurde nun von 30 Minuten auf 15 Minuten reduziert und die Inkubationstemperatur der zweiten Inkubationszeit von 30°C auf 4°C gesenkt. GST-Ago2 wurde mit Ganzzelllysepuffer inkubiert. Sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Inkubation wurden Teile der Proben aus dem Experiment genommen um sie in den RISC-

Assay einzusetzen. Somit konnte der Zeitpunkt der Inaktivierung von GST-Ago2 bestimmt werden. Eine Hälfte der Proben wurde bei Raumtemperatur eluiert, die andere Hälfte bei 4°C.



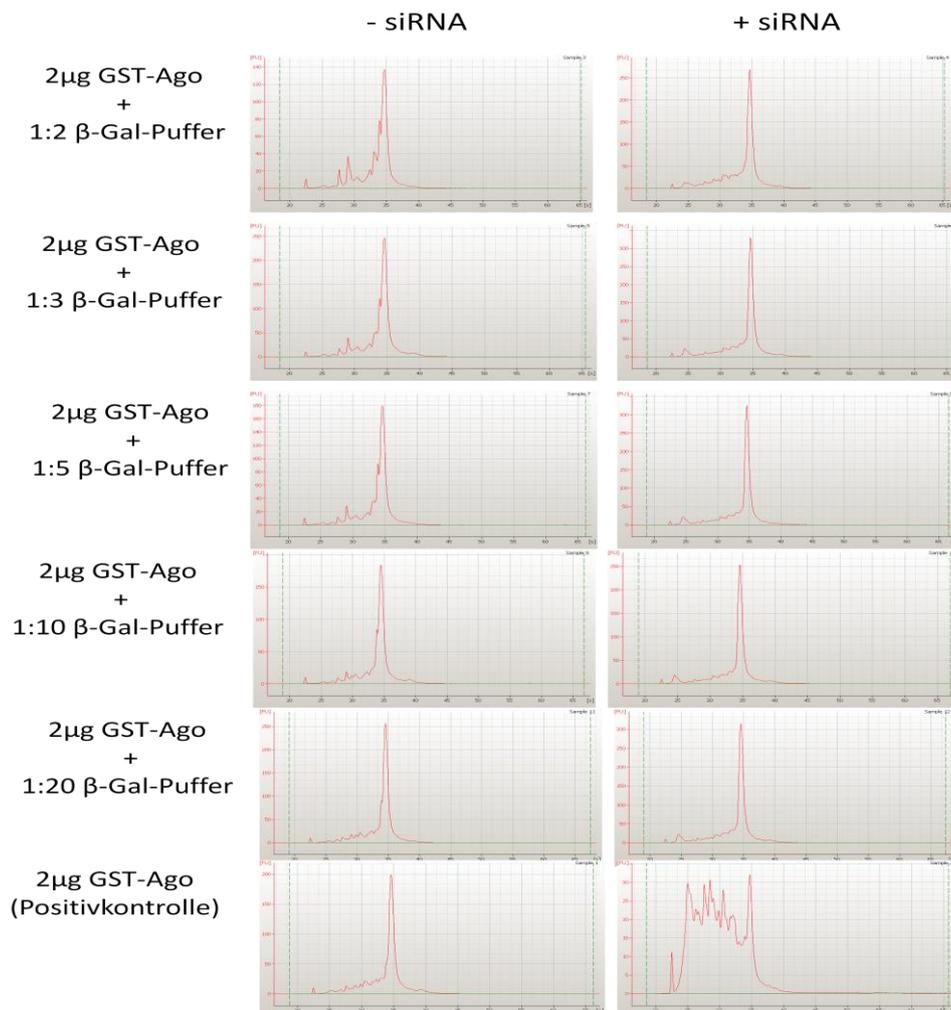
**Abbildung 18: GSH-beads Assay mit verringerter Inkubationszeit und Inkubationstemperatur:** Es wurden nach jeder Inkubationszeit Proben in den RISC-Assay eingesetzt, um zu eruieren, wann GST-Ago2 seine enzymatische Aktivität verliert. Probe 1 und 2 zeigen GST-Ago2, welches für 15 min bei RT mit Ganzzelllysepuffer inkubiert wurde. Probe 3 und 4 wurden zusätzlich für 30 min bei 4°C mit den GSH-beads inkubiert. Als Positivkontrolle wurde unbehandeltes GST-Ago2 in den RISC-Assay eingesetzt. Diese funktionierte. Nach einer Inkubation im Ganzzelllysepuffer für 15 min war GST-Ago2 nicht in der Lage, die RNA zu spalten.

Wie Abbildung 18 zu entnehmen, war nach einer Inkubation mit Ganzzelllysepuffer von 15 Minuten bei Raumtemperatur keine Degradierung der Luziferase-RNA durch GST-Ago2 messbar. Nach zusätzlicher Inkubation für 30 Minuten bei 4°C sowie nach Elution bei Raumtemperatur bzw. bei 4°C war ebenfalls keine Spaltung der RNA messbar. Nur das GST-Ago2, welches nicht in den GSH-beads Assay eingesetzt wurde, zeigte eine enzymatische Aktivität. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass bereits die Inkubation von GST-Ago2 mit dem Ganzzelllysepuffer dazu führte, dass das Protein seine Aktivität verlor. Im Folgenden wurden daher alternative Lysepuffer verwendet und ihre Wirkung auf die Aktivität von GST-

Ago2 untersucht. Ziel war es, einen Puffer zu finden, der die enzymatische Aktivität des Proteins nicht stört.

### 3.3.5 GSH-beads Assay mit $\beta$ -Galaktosidase-Puffer ( $\beta$ -Gal-Puffer)

Zunächst wurde der Ganzzelllysepuffer durch  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer, welcher Triton X-100,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{KHPO}_4$  enthält, ersetzt. Ein in dieser Arbeit nicht dargestelltes Experiment brachte ein fragliches Ergebnis. Somit wurde zur genaueren Untersuchung eine Verdünnungsreihe des Puffers hergestellt, um eine mögliche Toleranz des GST-Ago2 gegenüber kleinen Konzentrationen des Lysepuffers zu bestätigen. Abbildung 19 zeigt das durch den Agilent 2100 Bioanalytiker gemessene Ergebnis dieses Assays.

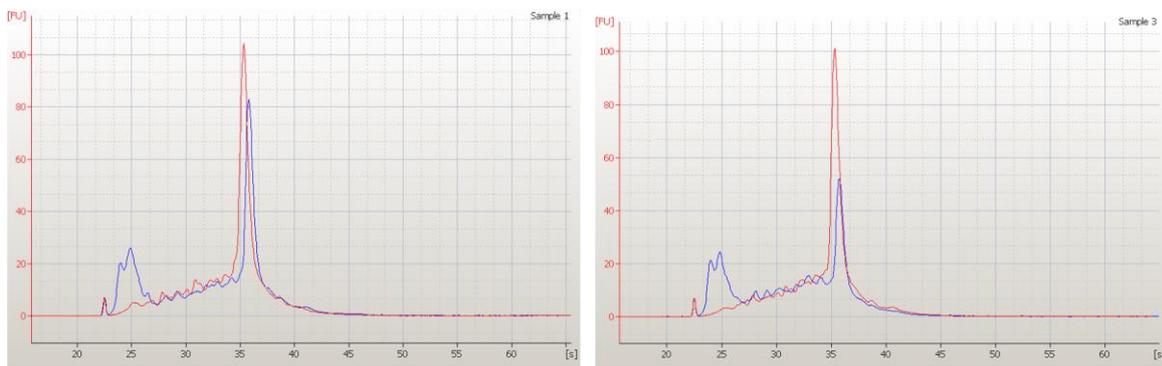


**Abbildung 19: GSH-beads Assay mit  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer ( $\beta$ -Gal-Puffer):** GST-Ago2 wurde für 15 min mit verschiedenen Verdünnungen des  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer inkubiert und im Anschluss in den RISC-Assay eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde unbehandeltes GST-Ago2 verwendet. Die positive Kontrolle funktionierte. Nach der Inkubation von GST-Ago2 im  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer war keine Degradierung der RNA messbar.

Wie Abbildung 19 zeigt, verlor das Protein bereits nach Inkubation mit 1:20 verdünntem  $\beta$ -Gal-Puffer seine Aktivität. Wohingegen GST-Ago2 ohne Inkubation mit  $\beta$ -Gal-Puffer in der Lage war, die RNA deutlich zu fragmentieren. Der  $\beta$ -Gal-Puffer war somit für den RISC-Assay nicht geeignet.

### 3.3.6 TAP-Lysepuffer

Als Nächstes wurde überprüft, ob Zelllysate, die mittels eines Tris und NP40 beinhaltenden Lysepuffers hergestellt wurden, einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von GST-Ago2 haben. Als positive Kontrolle wurde ein Ansatz hinzugefügt, der unbehandeltes GST-Ago2 enthielt. Wie aus Abbildung 20 zu entnehmen, ist GST-Ago2 nach Inkubation mit TAP-Lysaten in der Lage, die RNA zu degradieren. Dieser Puffer eignete sich daher prinzipiell für weitere Versuche mit aus Zelllysaten isoliertem GST-Ago2.



**GST-Ago2  
+/- siRNA**

**GST-Ago2 + TAP-Lysat  
+/- siRNA**

● GST-Ago2      ● GST-Ago2 + siRNA

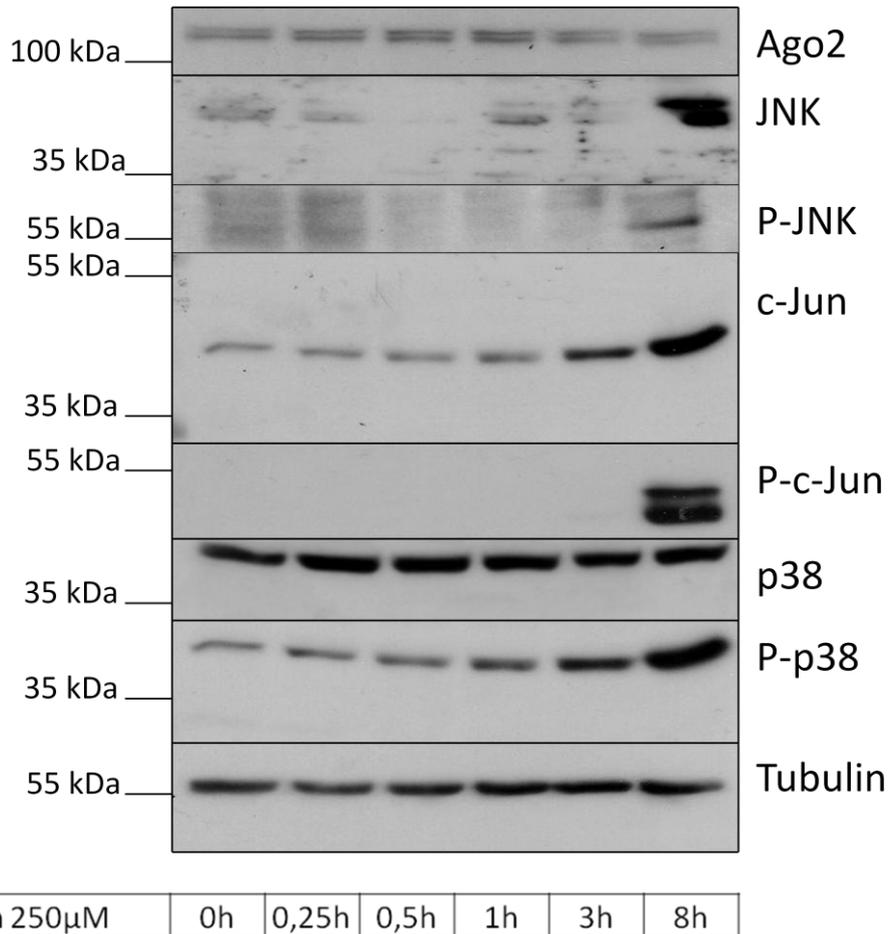
**Abbildung 20: GSH-beads Assay unter Verwendung eines TAP-Lysates:** GST-Ago2 wurde für 30 min bei RT mit einem TAP-Lysat inkubiert. Nach Zugabe der Glutathion-Sepharose-beads wurde für 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert und nach Elution der RISC-Assay durchgeführt. GST-Ago2 war nach Inkubation im TAP-Lysat in der Lage, die RNA spezifisch zu degradieren.

### **3.4 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Zytostatika auf ausgewählte MAP-Kinasen und Ago2**

Um einen möglichen Einfluss verschiedener Zytostatika auf die Aktivität von Ago2 und ausgewählte MAP-Kinasen zu untersuchen, wurden HEK293IL-1R-Zellen mit diesen stimuliert und zunächst die Aktivierung von Signalwegen durch die Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin mittels Western Blot untersucht. Es wurden HEK293IL-1R-Zellen unbehandelt gelassen und mit den verschiedenen Stimuli für 0,25, 0,5, 1, 3 und 8 Stunden behandelt. Nach der Lyse wurden Western Blots angefertigt. Um die intrazelluläre Ago2-Konzentration zu erhöhen und somit möglicherweise einen deutlicheren Effekt zu detektieren, wurde in einer weiteren Versuchsreihe pEBGT7-Ago transfiziert. Im Folgenden wurde ebenfalls mit Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin für 0,25 und 8 Stunden stimuliert sowie eine Stimulation für 24 Stunden hinzugefügt.

### 3.4.1 Cisplatin

HEK293IL-1R-Zellen wurden wie oben beschrieben mit 250  $\mu$ M Cisplatin behandelt und die in Abbildung 21 dargestellten Western Blots angefertigt.

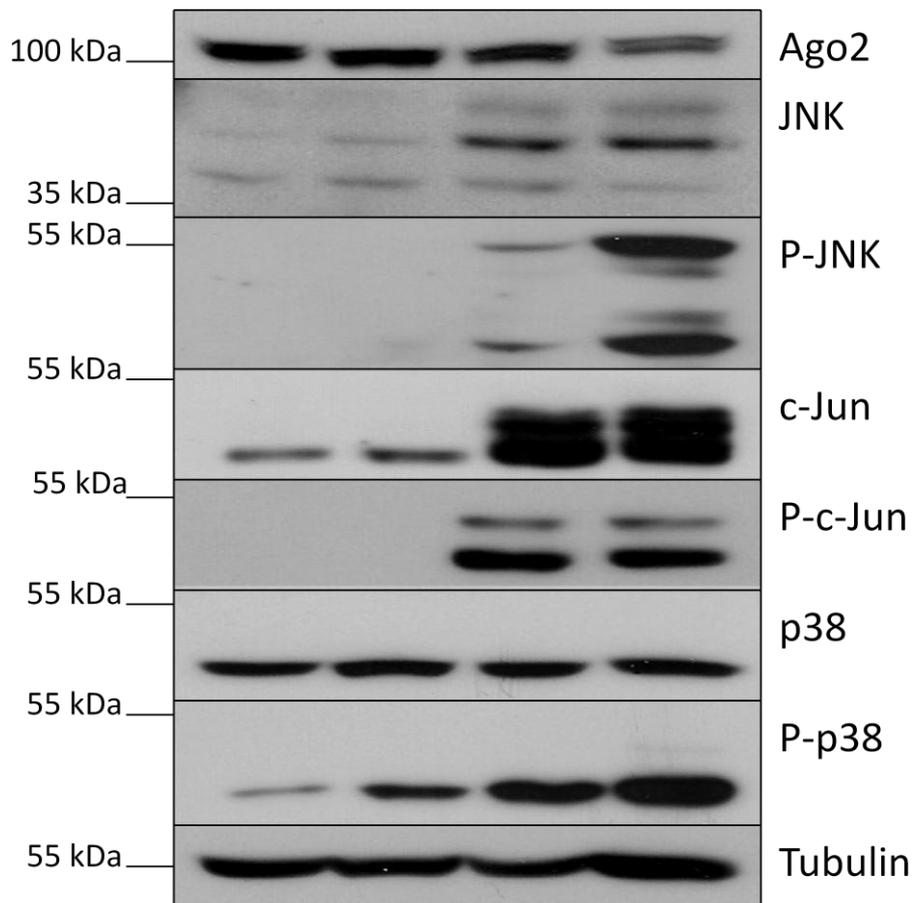


**Abbildung 21: Einfluss von Cisplatin auf Ago2 und verschiedene MAP-Kinasen:** HEK293IL-1R-Zellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) und für 0,25, 0,5, 1, 3 und 8 h mit Cisplatin in einer Konzentration von 250  $\mu$ M stimuliert und mittels Ganzzelllysepuffer lysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die MAP-Kinasen JNK, c-Jun und p38 in nativer und phosphorylierter Form sowie Ago2 und Tubulin mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert.

Nach 8-stündiger Stimulation zeigte sich eine deutliche Anhebung des JNK-Signals. Ebenfalls nahm die Phosphorylierung dieser MAP-Kinase mit zunehmender Stimulationsdauer zu. Das c-Jun-Signal ließ sich ebenfalls durch die Stimulation mit Cisplatin deutlich anheben. Nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden zeigte sich eine deutliche Phosphorylierung von c-Jun. Die Konzentration von p38 schien nicht beeinflusst zu werden. Jedoch fand sich eine zunehmende Phosphorylierung dieses Proteins. Eine Beeinflussung der intrazellulären Ago2-Menge war nicht nachweisbar.

### 3.4.1.1 Cisplatin mit Ago2-Überexpression

In einem weiteren Experiment wurde vor der Stimulation pEBGT7-Ago in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Somit wurde die intrazelluläre Ago2-Konzentration erhöht und ein möglicher Effekt der Stimulation auf die Aktivität des Proteins eventuell verstärkt. Zusätzlich wurde für 24 Stunden stimuliert, um einen möglicherweise deutlicheren Effekt zu detektieren.



Cisplatin 250µM	0h	0,25h	8h	24h
pEBGT7Ago	+	+	+	+

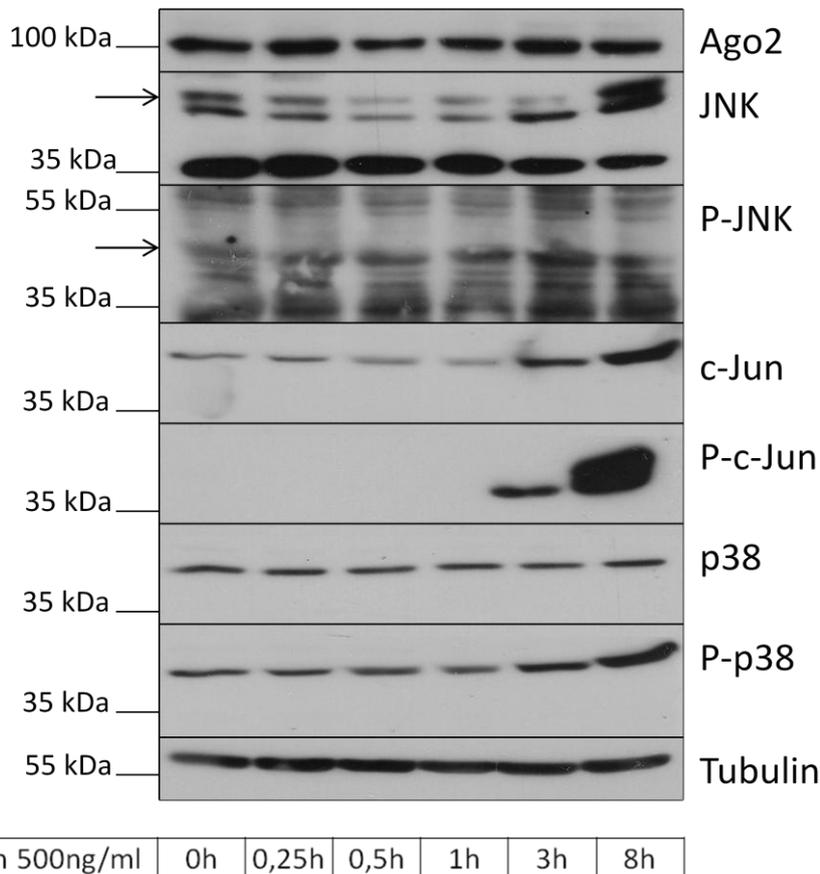
**Abbildung 22: Einfluss von Cisplatin auf Ago2 und verschiedene MAP-Kinasen bei Ago2-Überexpression:** pEBGT7-Ago wurde in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert und diese unbehandelt gelassen (0 h) bzw. für 0,25, 8 und 24 h mit Cisplatin in einer Konzentration von 250 µM stimuliert. Die Zellen wurden daraufhin mittels Ganzzelllysepuffer lysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die MAP-Kinasen JNK, c-Jun und p38 in nativer und phosphorylierter Form sowie Ago2 und Tubulin mittels spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert.

Dieses Experiment bestätigte die Ergebnisse der Stimulationsreihe ohne vorherige Transfektion von Ago2 (vgl. Abbildung 21). Es zeigte sich eine deutliche Zunahme des c-Jun-Signals nach Stimulation mit Cisplatin 250 µM für mindestens 8 Stunden. Des Weiteren war

auch ein erhöhtes Signal von P-JNK, P-c-Jun und P-p38 messbar. Die Konzentration des intrazellulären Ago2 schien bei zunehmender Stimulationsdauer leicht abzunehmen.

### 3.4.2 Doxorubicin

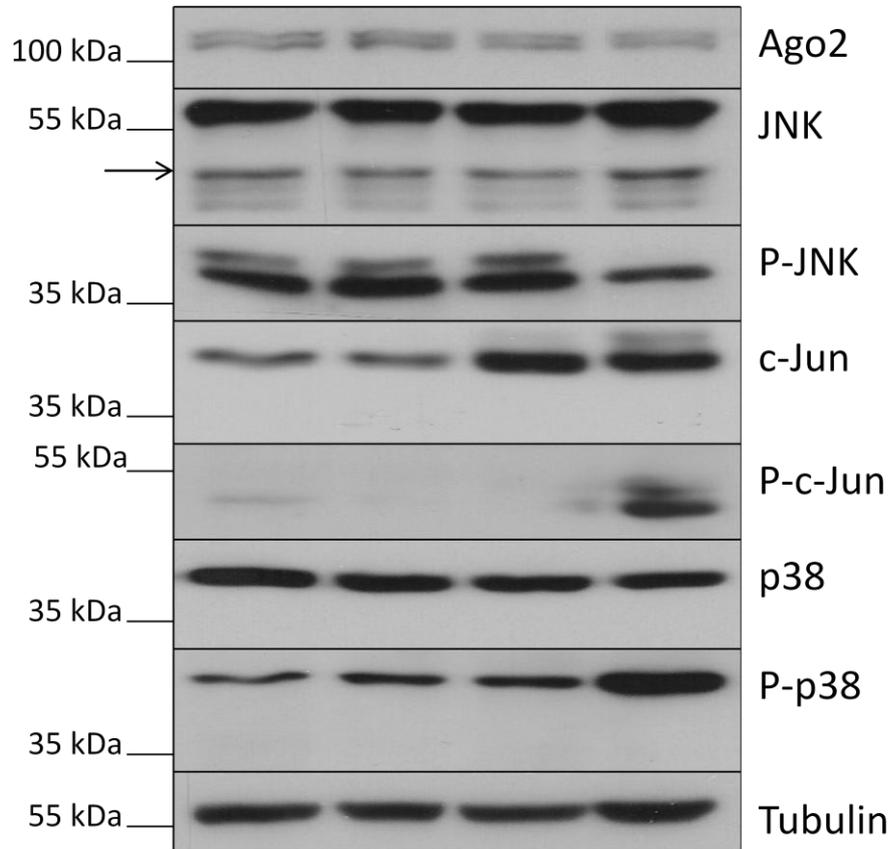
HEK293IL-1R-Zellen wurden mit 500 ng/ml Doxorubicin behandelt.



**Abbildung 23: Einfluss von Doxorubicin auf Ago2 und verschiedene MAP-Kinasen:** HEK293IL-1R-Zellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) bzw. für 0,25, 0,5, 1, 3 und 8 h mit Doxorubicin in einer Konzentration von 500 ng/ml stimuliert und mittels Ganzzelllysepuffer lysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die MAP-Kinasen JNK, c-Jun und p38 in nativer und phosphorylierter Form sowie Ago2 und Tubulin mittels spezifischer AK im Western Blot detektiert.

Bei gleichmäßiger Proteinbeladung fand sich eine deutliche Steigerung der intrazellulären Menge von JNK und c-Jun sowie eine Phosphorylierung von c-Jun und p38.

## 3.4.2.1 Doxorubicin mit Ago2-Überexpression



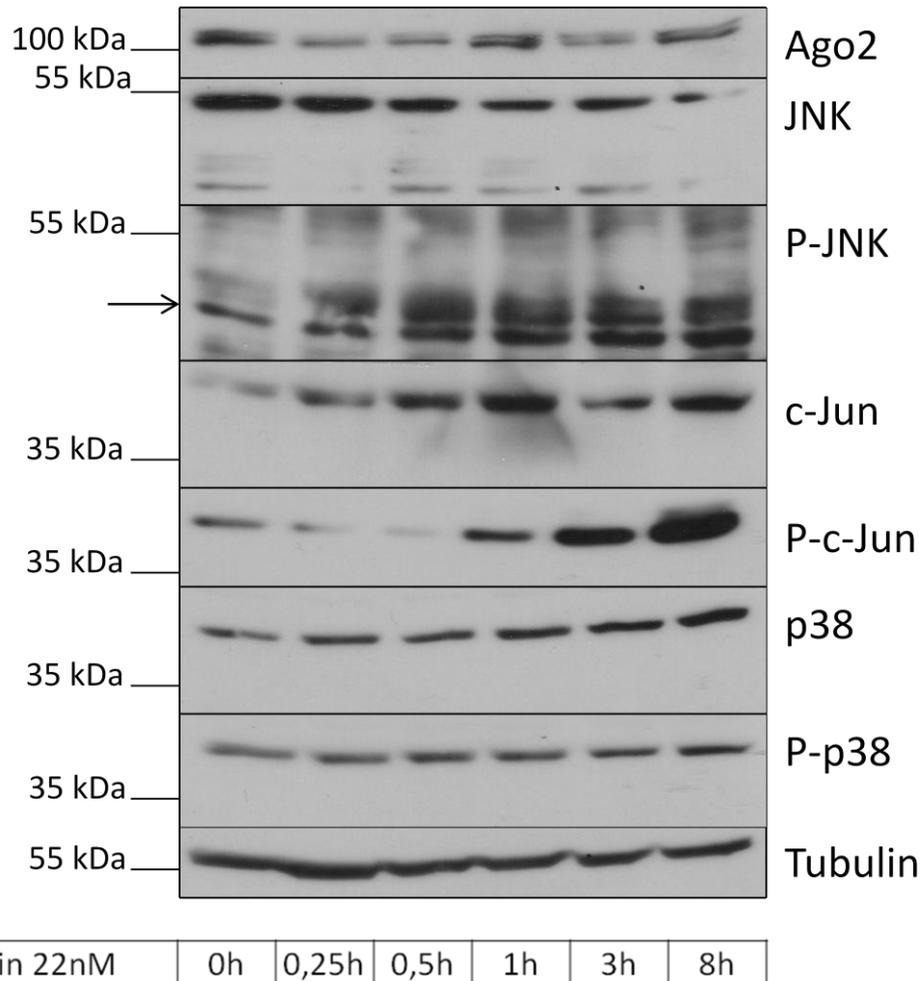
Doxorubicin 500ng/ml	0h	0,25h	8h	24h
pEBGT7Ago	+	+	+	+

**Abbildung 24: Einfluss von Doxorubicin auf Ago2 und verschiedene MAP-Kinasen bei Überexpression von Ago2:** pEBGT7-Ago wurde in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert und diese unbehandelt gelassen (0 h) bzw. für 0,25, 8 und 24 h mit Doxorubicin in einer Konzentration von 500 ng/ml stimuliert. Die Zellen wurden daraufhin mittels Ganzzelllysepuffer lysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die MAP-Kinasen JNK, c-Jun und p38 in nativer und phosphorylierter Form sowie Ago2 und Tubulin mittels spezifischer AK im Western Blot detektiert.

Wie im vorangegangenen Experiment wurde ebenfalls eine ausgeprägte Zunahme des Signals von c-Jun, phosphoryliertem c-Jun und phosphoryliertem p38 detektiert. Die JNK-Menge war bei Überexpression von Ago2 gleichbleibend. P-JNK nahm nach 24-stündiger Stimulation ab.

### 3.4.3 Vinblastin

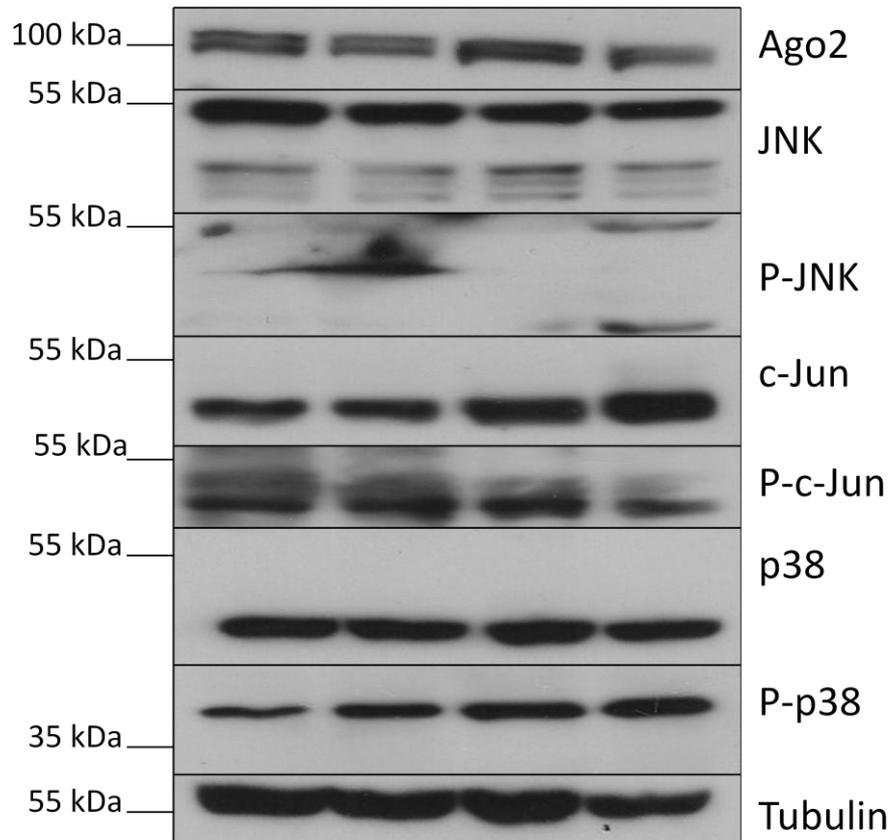
Hier wurde ebenfalls eine Stimulationsreihe mit HEK296IL-1R-Zellen mit und ohne vorherige Transfektion von pEBGT7-Ago durchgeführt.



**Abbildung 25: Einfluss von Vinblastin auf Ago2 und verschiedene MAP-Kinasen:** HEK293IL-1R-Zellen wurden unbehandelt gelassen (0 h) und für 0,25, 0,5, 1, 3 und 8 h mit 22 nM und mittels Ganzzelllysepuffer lysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die MAP-Kinasen JNK, c-Jun und p38 in nativer und phosphorylierter Form sowie Ago2 und Tubulin mittels spezifischer AK im Western Blot detektiert.

c-Jun und JNK wurden nach der Stimulation phosphoryliert. Weiterhin nahm die Konzentration und die Phosphorylierung von p38 mit zunehmender Stimulationsdauer zu.

## 3.4.3.1 Vinblastin mit Ago2-Überexpression



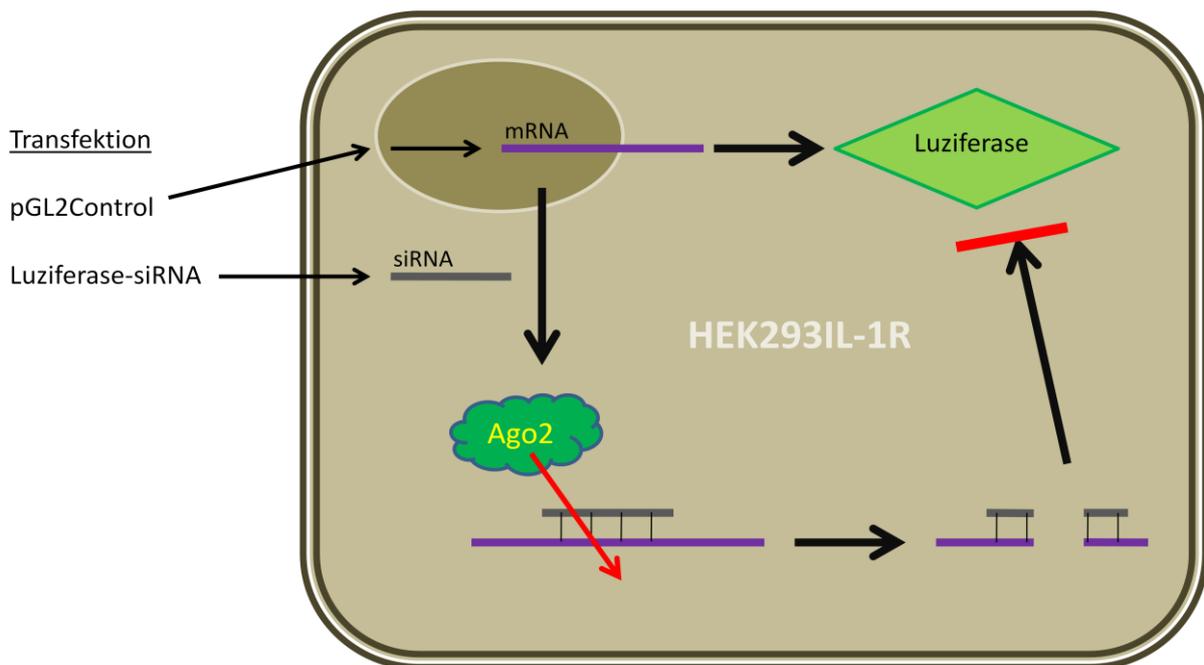
Vinblastin 22nM	0h	0,25h	8h	24h
pEBGT7Ago	+	+	+	+

**Abbildung 26: Einfluss von Vinblastin auf Ago2 und verschiedene MAP-Kinasen bei Überexpression von Ago2:** pEBGT7-Ago wurde in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert und diese unbehandelt gelassen (0 h) bzw. für 0,25, 8 und 24 h mit 22 nM Vinblastin. Die Zellen wurden daraufhin mittels Ganzzelllysepuffer lysiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die MAP-Kinasen JNK, c-Jun und p38 in nativer und phosphorylierter Form sowie Ago2 und Tubulin mittels spezifischer AK im Western Blot detektiert.

Vinblastin führte zu einer Phosphorylierung von JNK und p38.

### 3.5 Untersuchungen zur signalabhängigen Regulation der enzymatischen Aktivität von Argonaut 2 mittels Luziferase-Reporterassay

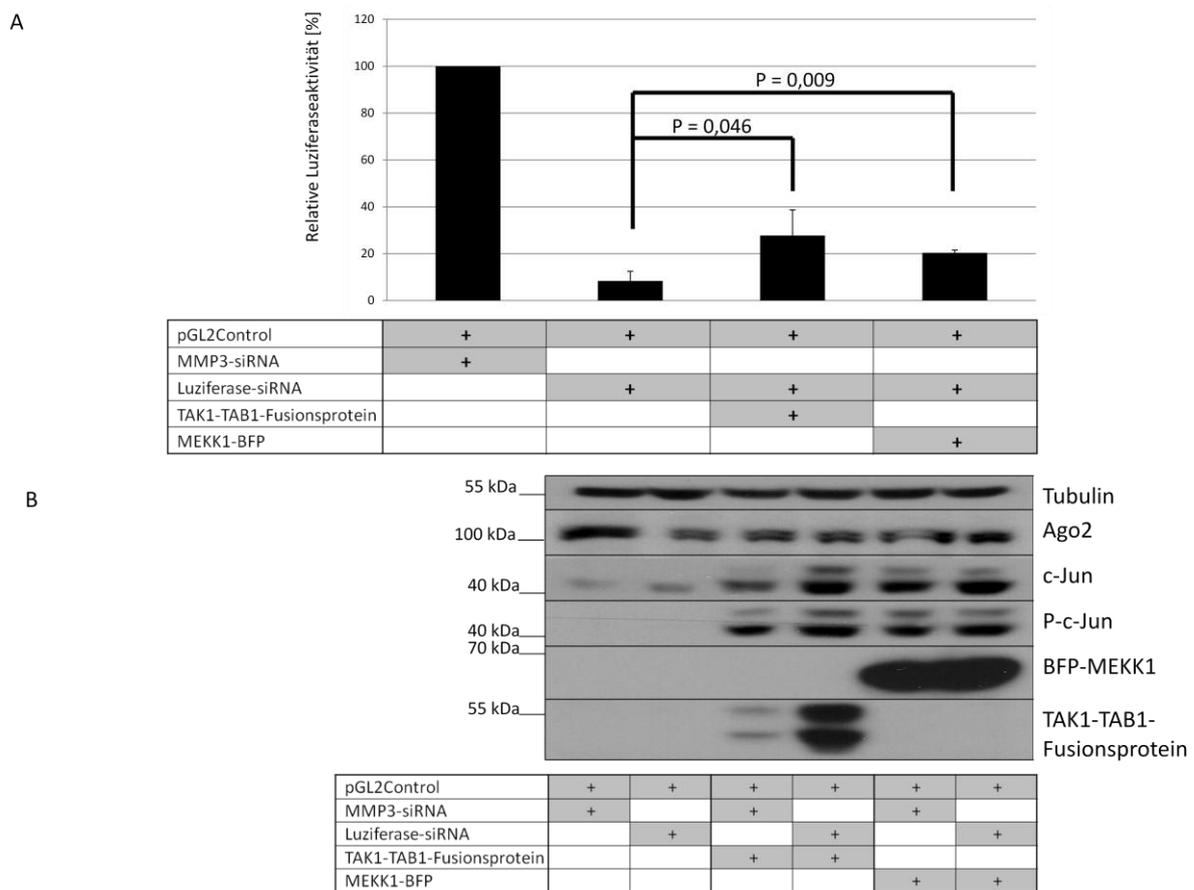
Mit Hilfe des Luziferase-Reporterassays ist es möglich, die Aktivität von endogenem Argonaut 2 unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu untersuchen. Dazu wurde der für Luziferase codierende Vektor pGL2Control sowie pSV $\beta$ Gal, pcDNA3 (Leervektor) und eine Luziferase-siRNA bzw. eine Kontroll-siRNA (MMP3-siRNA) in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Somit wurde die Luziferase-mRNA in den Zellen produziert. Mit Hilfe der komplementären Luziferase-siRNA ist das endogen vorhandene Ago2 in der Lage, die mRNA zu spalten. Je aktiver Ago2 ist, das heißt, je mehr mRNA gespalten wird, umso geringer ist im Folgenden die Aktivität der Luziferase. Die gemessene Luziferaseaktivität lässt somit auf die Aktivität des endogenen Ago2 schließen.



**Abbildung 27: Schema des Luziferase-Reporterassays:** Durch Einbringen des Vektors pGL2Control, welcher für Luziferase codiert, kommt es zur endogenen mRNA-Produktion und zur Translation des Proteins. Bei zusätzlichem Einbringen der Luziferase-siRNA in die HEK293IL-1R-Zelle spaltet das endogene Ago2 als Bestandteil des RISC das siRNA/mRNA-Hybrid. Je aktiver der endogene RISC ist, desto geringer ist somit die gemessene Luziferaseaktivität. Ein Anstieg der gemessenen Luziferaseaktivität zeigt eine direkte oder indirekte Hemmung des RISC an.

### 3.5.1 Luziferase-Reporterassay nach Transfektion von MEKK1 und TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein

Das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein und MEKK1 sind MAP3-Kinasen, die verschiedene Signalwege aktivieren. Die MAP-Kinase JNK wird sowohl durch das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein als auch durch MEKK1 aktiviert. Die Arbeitsgruppe Kracht fand eine Suppression der RISC-Aktivität durch JNK. Im Luziferase-Reporterassay zeigt sich diese als eine, im Vergleich zu einem Kontrollansatz ohne die JNK-Aktivatoren, höhere Luziferaseaktivität bei Kotransfektion von JNK-Aktivatoren.



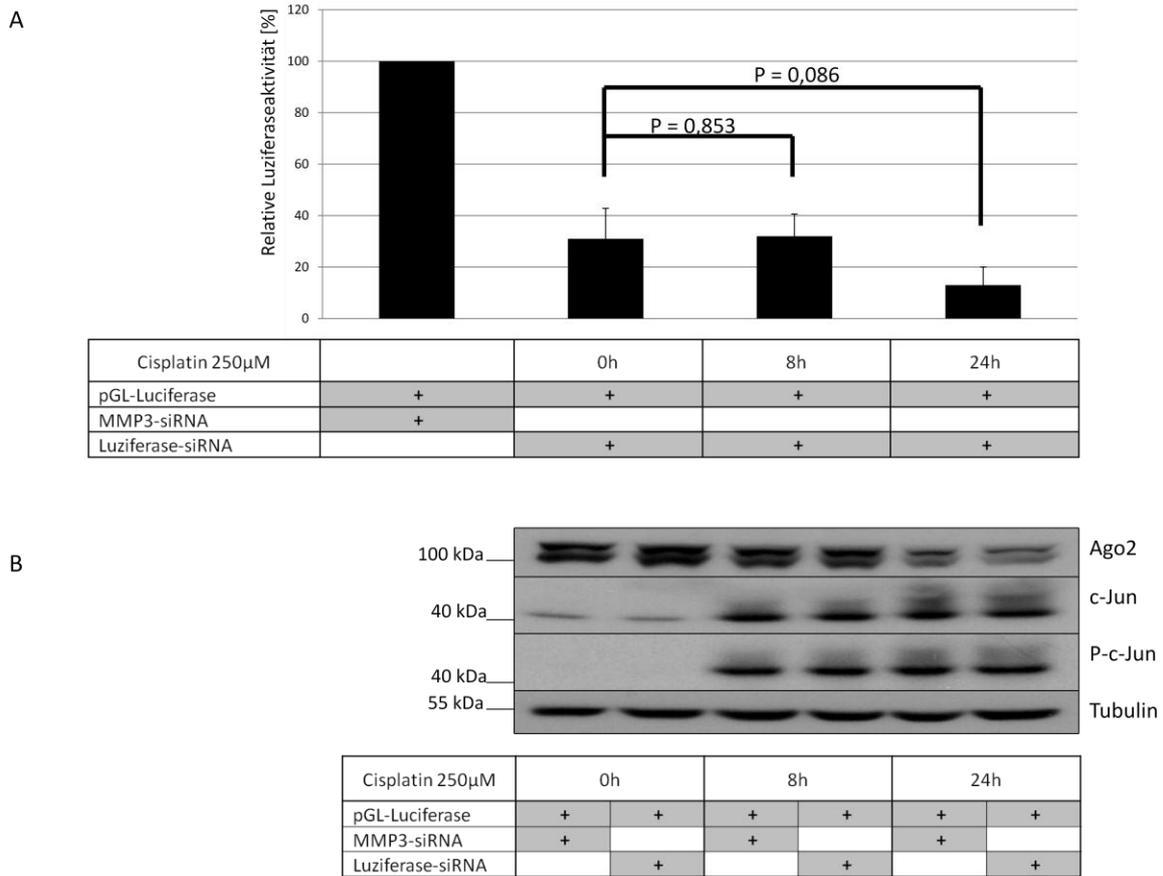
**Abbildung 28: Luziferase-Reporterassay nach Transfektion von MEKK-1 und TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein:** In HEK293IL-1R-Zellen wurden 1 µg pSVβGal, 0,5 µg pGL2Control sowie 0,5 µg MEKK1-BFP bzw. 3,5 µg des TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsproteins und die Luziferase-siRNA (10 nm final) transfiziert. Ein Ansatz mit Kontroll-siRNA (MMP3-siRNA, 10 nM final) wurde mitgeführt. Durch Zugabe eines Leervektors (PcDNA3) wurden identische DNA-Mengen in jedes 6-Well gegeben. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Nach der Zellyse mit β-Gal-Puffer wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Diese Werte wurden anhand der Proteinkonzentration normiert. Die Abbildung zeigt die relative Luziferaseaktivität aus drei unabhängigen Experimenten mit der Standardabweichung. Die Anwesenheit des TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsproteins führt zu einer ca. 3,3-fachen Inhibition des RISC. MEKK1 bewirkt eine ca. 2,4-fache Inhibition. Die Zellysate wurden auf ein 8 % Laemmli-Gel aufgetragen. Im Western Blot wurden mittels spezifischer Antikörper Tubulin, Argonaut 2, c-Jun, Phospho-c-Jun, BFP-MEKK1 und das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein detektiert.

In Abbildung 28 ist das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Es wurde pGL2Control als Luziferasecodierenden Vektor, pSV $\beta$ Gal und die MAP3-Kinasen MEKK1 oder das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein sowie die Luziferase-siRNA in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit einer Kontroll-siRNA (MMP3-siRNA) mitgeführt. Die Anwesenheit der spezifischen Luziferase-siRNA führt zu einer Abnahme der gemessenen Luziferaseaktivität. Bei JNK-Aktivierung durch das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein oder MEKK1 zeigt sich eine geringere Abnahme der Luziferaseaktivität. Das dargestellte Experiment zeigt eine, im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit der Luziferase siRNA, ca. 3,3-fache Inhibition des RISC durch das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein und eine ca. 2,4-fache Inhibition durch MEKK1. Die Zelllysate wurden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Western Blot mit spezifischen Antikörpern inkubiert. c-Jun ist ein Substrat von JNK. Die JNK-Aktivierung zeigt sich hier als Phosphorylierung von c-Jun. Des Weiteren belegt der dargestellte Western Blot die Anwesenheit des TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsproteins sowie von BFP-MEKK1 und in allen Ansätzen eine gleichmäßige Ago2-Expression. Die Konzentration des TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsproteins war bei Anwesenheit der Luziferase-siRNA bei identischer Transfektion deutlich höher. Sowohl MEKK1 als auch TAK1-TAB1 aktivieren, wie in Abb. 28 gezeigt, JNK aber auch p38, welche ebenfalls durch DNA-schädigende Agenzien aktiviert werden. Daher stellt sich die Frage, ob Zytostatika einen Einfluss auf die endogene RISC-Aktivität haben könnten.

### **3.5.2 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Zytostatika auf die Ago2-Aktivität mittels Luziferase-Reporterassay**

In den folgenden Experimenten wurde daher untersucht, ob Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin die RISC-Aktivität beeinflussen. Um den Einfluss auf die RISC-Aktivität zu untersuchen, wurden HEK293IL-1R-Zellen nach Transfektion von pGL2Control und Luziferase-siRNA bzw. Kontroll-siRNA mit den Zytostatika jeweils unbehandelt gelassen (0 Stunden) oder für 8 bzw. 24 Stunden stimuliert. Nach der Lyse der Zellen mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Puffer wurde die Luziferaseaktivität mittels Luziferase-Reporterassay detektiert. Des Weiteren wurden die Zelllysate im Western Blot untersucht.

## 3.5.2.1 Cisplatin

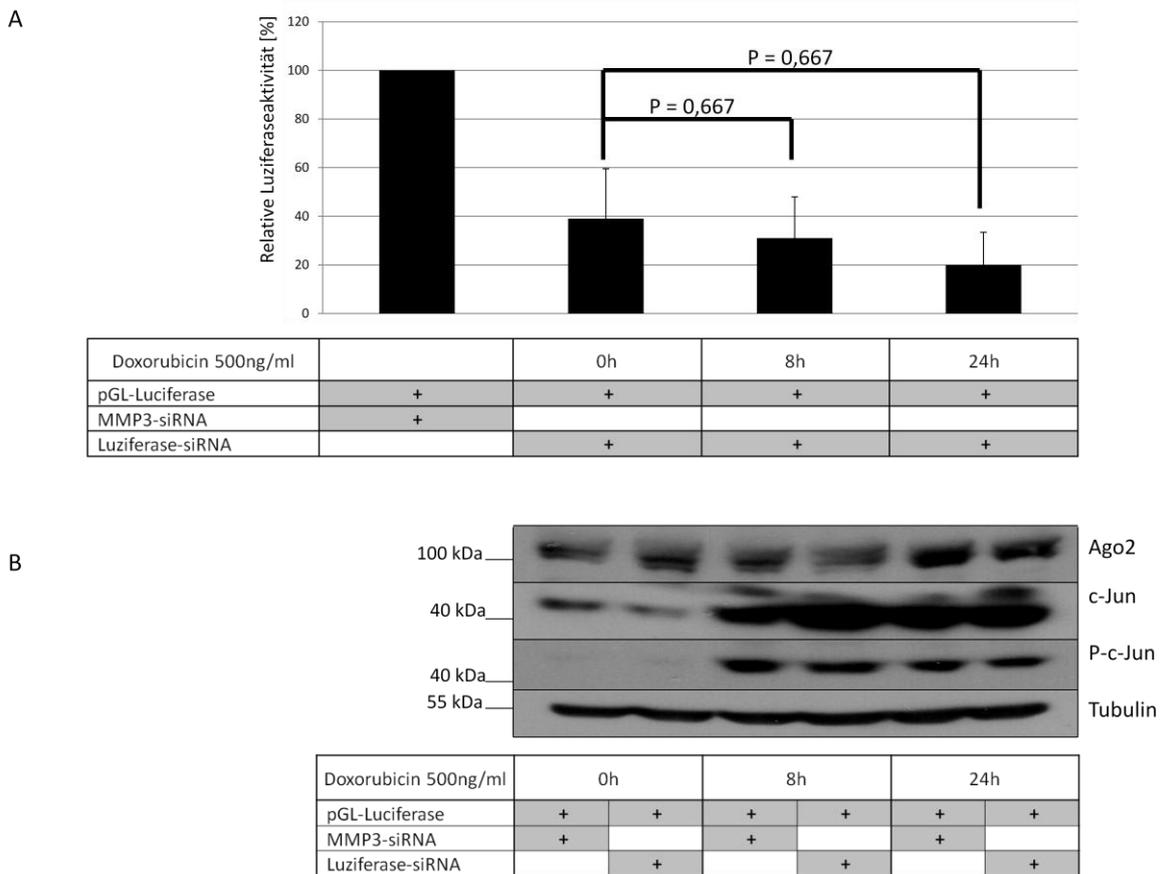


**Abbildung 29: Einfluss von Cisplatin auf die RISC-Aktivität:** In HEK293IL-1R-Zellen wurden 1 µg pSVβ-Gal und 0,5 µg pGL2Control sowie die Luziferase-siRNA (10 nM final) oder die Kontroll-siRNA (MMP3-siRNA, 10 nM final) transfiziert. Durch Zugabe eines Leervektors (PcDNA3) wurden identische DNA-Mengen in jedes 6-Well gegeben. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen unbehandelt gelassen (0 h) bzw. für 8 und 24 h mit 250 µM Cisplatin stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels β-Gal-Lysepuffer lysiert und die Luziferase-Aktivität detektiert. Die gemessenen Werte wurden anhand der β-Galaktosidasekonzentration normiert. In Abbildung 29 A ist die relative Luziferaseaktivität von drei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung dargestellt. Nach 8-stündiger Stimulation war die Abnahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zum unbehandelten Ansatz unverändert, nach 24-stündiger Stimulation 2,4-fach verstärkt. Die Proben wurden auf ein 8 % Laemmli-Gel aufgetragen und nach dem Western Blot mittels spezifischer Antikörper die Banden von Tubulin, Argonaut 2, c-Jun und Phospho-c-Jun detektiert.

In Abbildung 29 ist die Luziferase-Aktivität nach Stimulation mit 250 µM Cisplatin aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Anwesenheit einer spezifischen Luziferase-siRNA führt zu Supprimierung der Luziferaseaktivität um ca. 70 %. Diese ist als relative Abnahme im Vergleich zu einem Ansatz, der eine Kontroll-siRNA enthält, dargestellt. Nach 8-stündiger Stimulation mit Cisplatin bleibt dieser Effekt nahezu unverändert. Bei 24-stündiger Anwesenheit von Cisplatin verstärkt sich die Suppression der Luziferaseaktivität und somit die Aktivierung des RISC um das ca. 2,4-fache im Vergleich zum unstimulierten Ansatz trotz

abnehmender Ago2-Menge. Die Zellysate wurden im Anschluss im Western Blot untersucht. Die nahezu identisch starken Tubulin-Banden ließen auf eine gleichmäßig aufgetragene Proteinmenge schließen. Das Ago2-Signal nahm nach 24 Stunden ab. Die Stimulation mit Cisplatin führte zur Aktivierung der MAP-Kinase JNK, was an der Phosphorylierung von c-Jun zu erkennen ist.

### 3.5.2.2 Doxorubicin

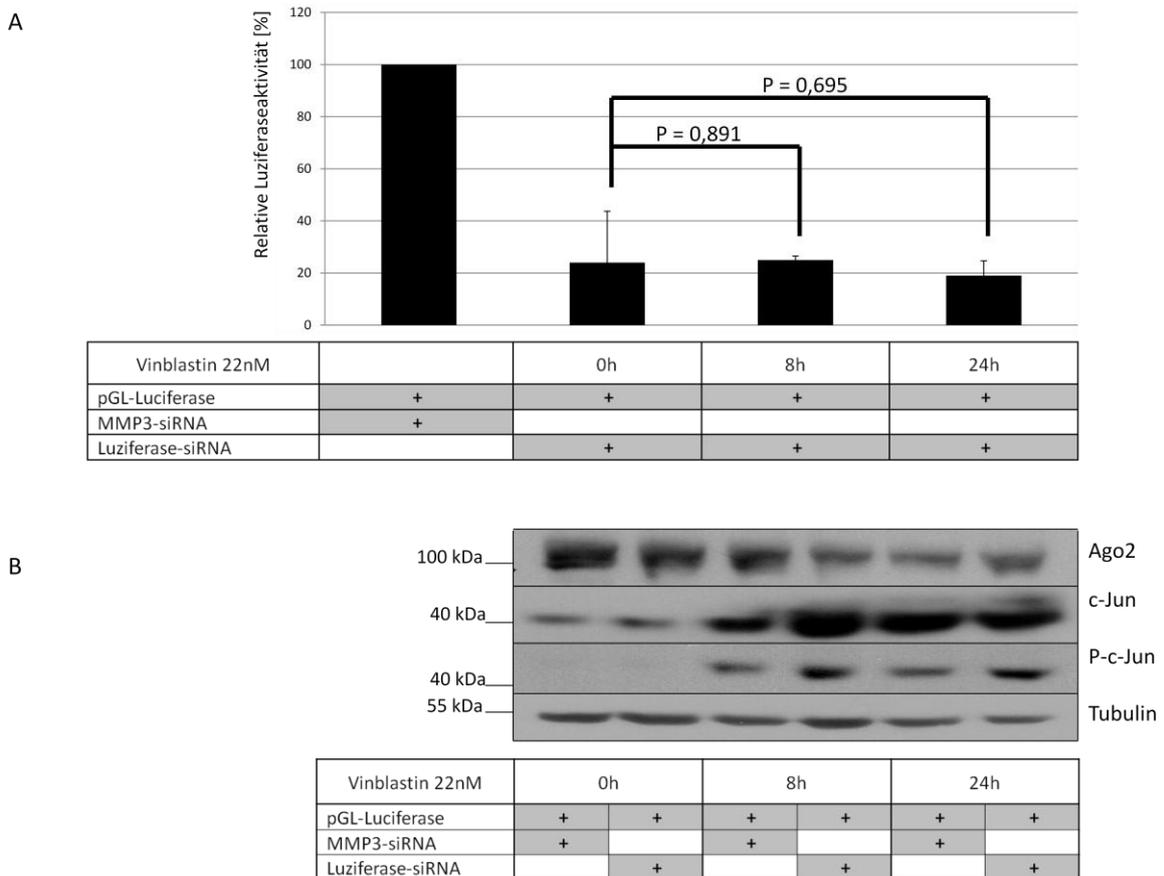


**Abbildung 30: Einfluss von Doxorubicin auf die RISC-Aktivität:** Dargestellt sind drei unabhängige Experimente. HEK293IL-1R-Zellen wurden unbehandelt gelassen bzw. für 8 und 24 h mit 500 ng/ml Doxorubicin stimuliert. Ansonsten war die Durchführung identisch zum in Abbildung 29 dargestellten Experiment. Die Luciferaseaktivität wurde anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase normiert. In Abbildung 30 A ist die relative Luciferaseaktivität von drei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung dargestellt. Nach 8-stündiger Stimulation war die Abnahme der Luciferaseaktivität im Vergleich zum unbehandelten Ansatz nahezu unverändert, nach 24-stündiger Stimulation ca. 2-fach verstärkt. Die Zellysate wurden mittels Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen Tubulin, Argonaut 2, c-Jun und Phospho-c-Jun inkubiert und die Banden mittels ECL detektiert.

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die HEK293IL-1R-Zellen wurden nach Transfektion von pGL2Control und Luziferase-siRNA bzw.

Kontroll-siRNA (MMP3-siRNA) mit 500 ng/ml Doxorubicin stimuliert. Relativ zum Ansatz mit Kontroll-siRNA fand sich bei Anwesenheit der Luziferase-siRNA eine Abnahme der Luziferase-Aktivität um 61 %. Wie auch die Stimulation mit Cisplatin im vorangegangenen Experiment, führte die Stimulation mit Doxorubicin zu einer tendenziellen Verstärkung dieses Effektes. Nach 8-stündiger Stimulation bleibt die Aktivierung des RISC nahezu unverändert. Bei einer Doxorubicinstimulation über 24 Stunden zeigte sich eine fast 2-fache Verstärkung der RISC-Aktivierung im Vergleich zum unbehandelten Ansatz. Auch hier wurden im Anschluss Western Blots, deren Ergebnisse Abbildung 30 zu entnehmen sind, angefertigt. Anhand gleichmäßiger Tubulin-Banden konnte von einer ausgeglichenen Proteinbeladung ausgegangen werden. Die JNK-Aktivierung durch Doxorubicin zeigt sich durch die dargestellte Phosphorylierung der MAP-Kinase c-Jun. Ago2 wurde gleichmäßig exprimiert.

### 3.5.2.3 Vinblastin



**Abbildung 31: Einfluss von Vinblastin auf die RISC-Aktivität:** Dargestellt sind drei unabhängige Experimente. HEK293IL-1R-Zellen wurden unbehandelt gelassen bzw. für 8 und 24 h mit 22 nM Vinblastin stimuliert. Ansonsten war die Durchführung identisch zum in Abbildung 29 dargestellten Experiment. Die Luziferaseaktivität wurde anhand der  $\beta$ -Galaktosidasekonzentration normiert. In

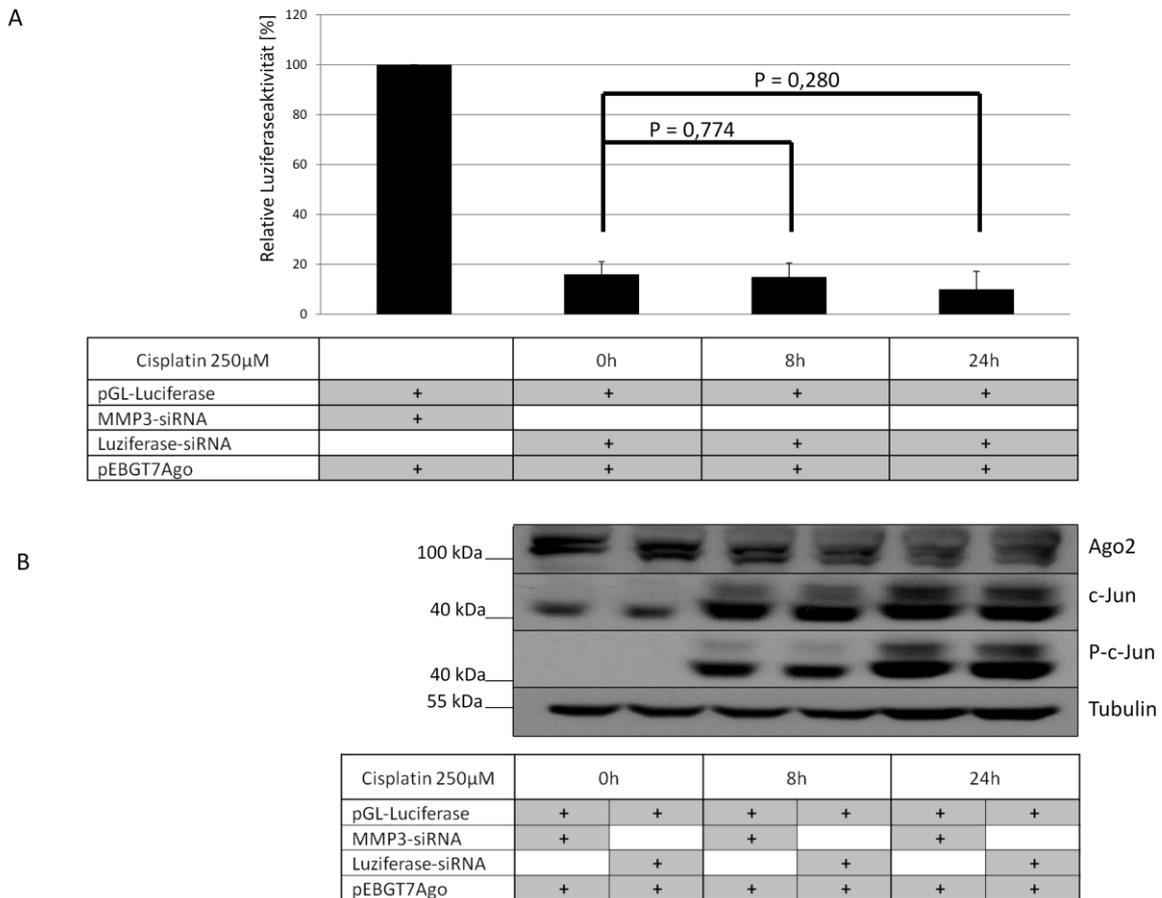
Abbildung 31 A ist die relative Luziferaseaktivität von drei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung dargestellt. Sowohl nach 8-stündiger als auch nach 24-stündiger Stimulation war die Abnahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zum unbehandelten Ansatz nahezu unverändert. Die Zellysate wurden mittels Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen Tubulin, Argonaut 2, c-Jun und Phospho-c-Jun inkubiert und die Banden mittels ECL detektiert.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des Zytostatikums Vinblastin auf die RISC-Aktivität untersucht. Auch hier wurden analog zu den beiden vorangegangenen Experimenten HEK293IL-1R-Zellen unbehandelt gelassen und für 8 bzw. 24 Stunden stimuliert. In Abbildung 31 sind drei unabhängige Experimente dargestellt. Die relative Abnahme bei Anwesenheit einer Luziferase-siRNA beträgt im Vergleich zu einem Ansatz, der die Kontroll-siRNA enthält, 76 %. Anders als die Stimulation mit Cisplatin und Doxorubicin führt Vinblastin zu keiner Abnahme der Luziferase-Aktivität. Nach 8-stündiger Stimulation fand sich eine Suppression um 75 %, nach 24 Stunden lag diese bei 81 %. Wie den Western Blots in Abbildung 31 zu entnehmen führt die Stimulation von HEK293IL-1R-Zellen mit Vinblastin ebenfalls zu einer Aktivierung der MAP-Kinase JNK.

### **3.5.3 Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Zytostatika auf die RISC-Aktivität nach Überexpression von Ago2 mittels Luziferase-Reporterassay**

Die bisher dargestellten Experimente zeigten einen diskreten Einfluss der Zytostatika Cisplatin und Doxorubicin auf die RISC-Aktivität. Um zu überprüfen, ob die bisher gefundenen Effekte durch Überexpression von Argonaut 2 möglicherweise verstärkt werden, wurde zusätzlich pEBGT7Ago in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert und diese wie in den vorangegangenen Experimenten mit Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin stimuliert.

## 3.5.3.1 Cisplatin

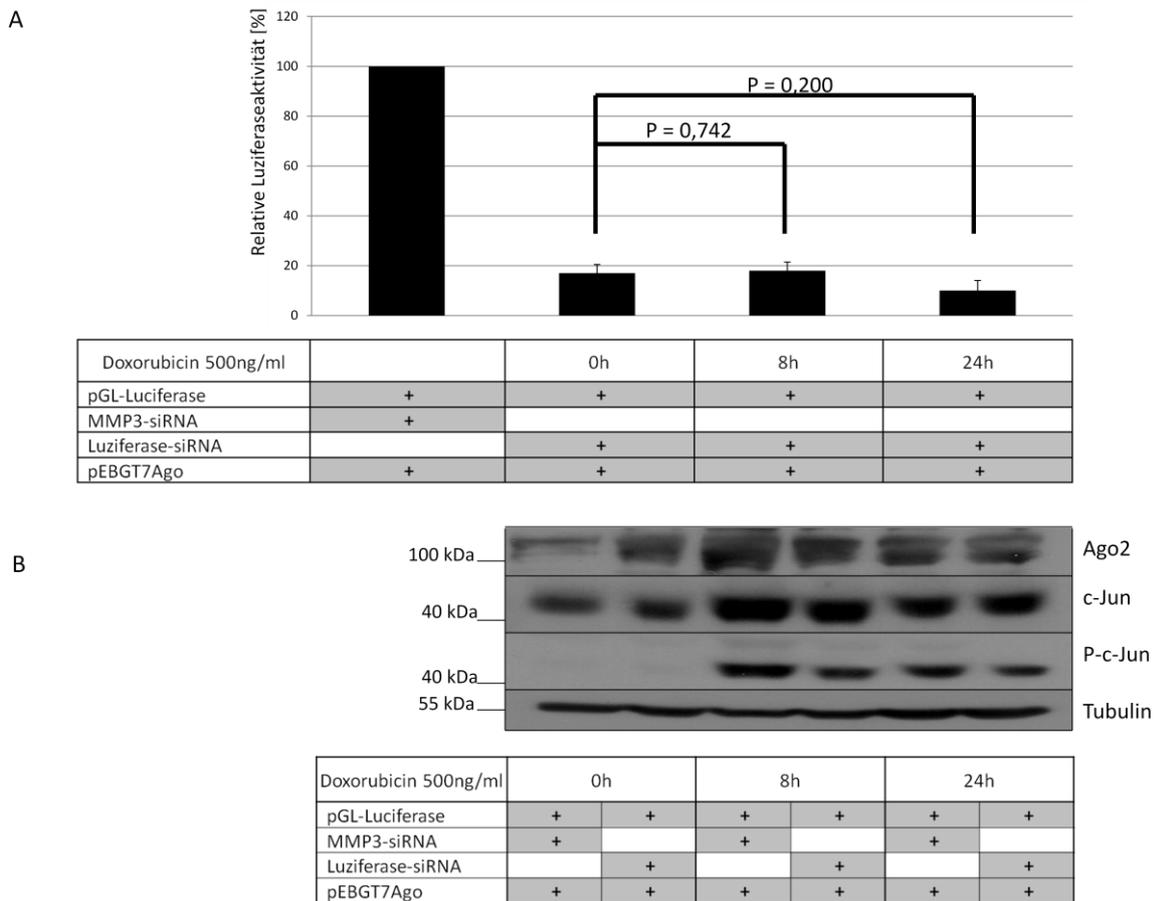


**Abbildung 32: Einfluss von Cisplatin auf die RISC-Aktivität bei Überexpression von Ago2:** Es wurden 1 µg pSVβ-Gal, 0,5 µg pGL2Control, 10 nM Luziferase-siRNA bzw. eine Kontroll-siRNA (10 nM MMP3-siRNA) sowie 3,5 µg pEBGT7Ago in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen unbehandelt gelassen (0 h) bzw. für 8 und 24 h mit 250 µM Cisplatin stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen mittels β-Gal-Lysepuffer lysiert und die Luziferase-Aktivität im Luziferase-Reporterassay bestimmt. Dargestellt ist die anhand der β-Galaktosidasekonzentration normierte relative Luziferaseaktivität aus drei unabhängigen Experimenten sowie die Standardabweichung. Nach 8-stündiger Stimulation war die Abnahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zum unbehandelten Ansatz nahezu unverändert, nach 24-stündiger Stimulation ca. 1,6-fach verstärkt. Die Zellysate wurden auf ein 8 % Laemmli-Gel aufgetragen. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen Tubulin, Argonaut 2, c-Jun und Phospho-c-Jun inkubiert und die Banden mittels ECL detektiert.

Abbildung 32 zeigt das Ergebnis dreier unabhängiger Luziferase-Reporterassays. Der für Luziferase codierende Vektor pGL2Control sowie pSVβGal und die Luziferase-siRNA bzw. die Kontroll-siRNA wurden in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde pEBGT7Ago in die Zellen transfiziert, um eine Überexpression von Argonaut 2 zu erreichen. Nach Stimulation mit Cisplatin wurden die Zellen mittels β-Gal-Puffer lysiert und die Luziferaseaktivität detektiert. Ohne Stimulation beträgt die relative Abnahme 84 %. Nach 8-

stündiger Cisplatin-Stimulation lag die Suppression bei 85 % und nach 24-stündiger Stimulation bei 90 %. Eine 8-stündige Stimulation zeigte somit keinen Effekt auf die RISC-Aktivität. Nach 24-stündiger Stimulation war eine diskrete Aktivierung des RISC detektierbar. Der Effekt konnte durch die Überexpression von Argonaut 2 nicht gesteigert werden. Im Anschluss wurden die Zelllysate auf ein 8 % Laemmli-Gel aufgetragen. Nach dem Western Blot wurden Tubulin, Argonaut 2, c-Jun und Phospho-c-Jun mittels spezifischer Antikörper detektiert. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis. Bei gleichmäßiger Proteinbeladung des Gels lässt sich die Aktivierung der MAP-Kinase JNK eindeutig feststellen.

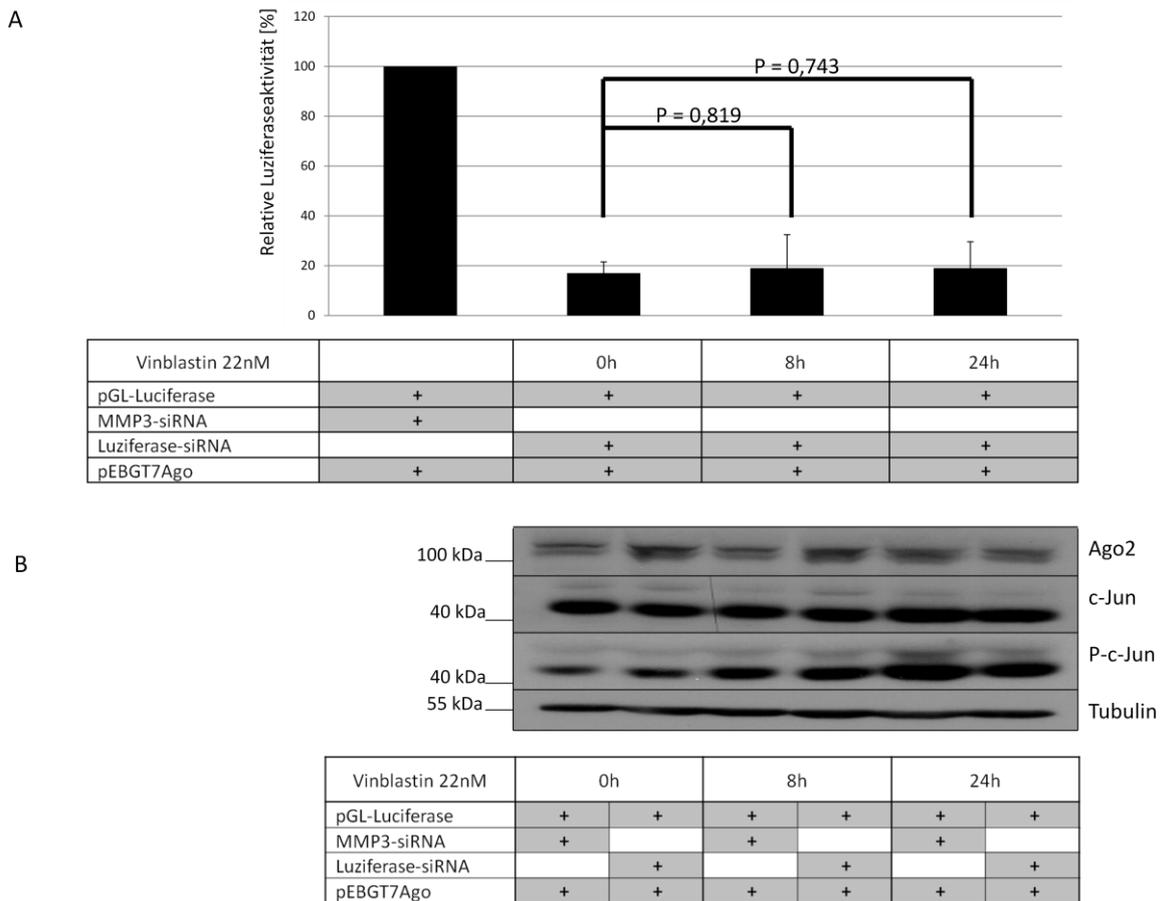
### 3.5.3.2 Doxorubicin



**Abbildung 33: Einfluss von Doxorubicin auf die RISC-Aktivität bei Überexpression von Ago2:** Es wurden HEK293IL-1R-Zellen mit 500 ng/ml Doxorubicin stimuliert. Das Vorgehen war identisch zu dem in Abbildung 32 dargestellten Experiment. Es ist die anhand der gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase normierte Luziferaseaktivität aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Nach 8-stündiger Stimulation war die Abnahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zum unbehandelten Ansatz nahezu unverändert, nach 24-stündiger Stimulation ca. 1,7-fach verstärkt. Die Zelllysate wurden auf ein 8 % Laemmli-Gel aufgetragen. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen Tubulin, Argonaut 2, c-Jun und Phospho-c-Jun inkubiert und die Banden mittels ECL detektiert.

Die Suppression der Luziferaseaktivität nach Stimulation mit Doxorubicin bei überexprimiertem Argonaut 2 beträgt nach einer Stimulationsdauer von 8 Stunden 82 % sowie 90 % nach 24 Stunden. Ohne Stimulation wurde die RISC-Aktivität um 83% gehemmt. Die Stimulation mit Doxorubicin für 8 Stunden hatte somit keinen Effekt. Eine 24-stündige Stimulation führte im Vergleich zur unbehandelten Probe zu einer leichten Aktivierung (1,7-fach) des RISC. Hier wurde der Effekt durch das zusätzliche Einbringen von Argonaut 2 in die Zellen ebenfalls nicht verstärkt. Im Western Blot wurde die Aktivierung von JNK durch die Zytostatikastimulation nachgewiesen.

### 3.5.3.3 Vinblastin



**Abbildung 34: Einfluss von Vinblastin auf die RISC-Aktivität bei Überexpression von Ago2:** Es wurden HEK293IL-1R-Zellen mit 22 nM Vinblastin stimuliert. Das Vorgehen war identisch zu dem in Abbildung 32 dargestellten Experiment. Es ist die mittels  $\beta$ -Galaktosidase normierte Luziferaseaktivität aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Nach 8-stündiger und 24-stündiger Stimulation war die Abnahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zum unbehandelten Ansatz unverändert. Die Zelllysate wurden auf ein 8 % Laemmli-Gel aufgetragen. Nach dem Western Blot wurden die Membranen mit spezifischen Antikörpern gegen Tubulin, Argonaut 2, c-Jun und Phospho-c-Jun inkubiert und die Banden mittels ECL detektiert.

Die Stimulation mit Vinblastin bei Überexpression von Argonaut 2 führt zu einer Suppression der gemessenen Luziferase um 81 % sowohl nach 8-stündiger Stimulation als auch nach 24 Stunden. Ohne Stimulation war die gemessene Luziferaseaktivität um 83% geringer als im Kontrollansatz. Es war somit auch bei Überexpression von Argonaut 2 kein Effekt von Vinblastin auf die RISC-Aktivität detektierbar. Der in Abbildung 34 dargestellte Western Blot zeigte eine gleichmäßige Proteinmenge und eine Phosphorylierung von c-Jun als Zeichen der JNK-Aktivierung durch Vinblastin.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in einem zellulären System untersucht werden, ob die Aktivität von Argonaut 2 durch verschiedene JNK-aktivierende Stressstimuli beeinflusst werden kann. Hierzu wurde ein *in vitro* RISC-Assay und ein Luziferase-Reportergenassay verwendet.

### 4.1 RISC-Assay

Zunächst wurde ein *in vitro* Assay zur Messung der RISC-Aktivität optimiert. Rivas, Tolia et al. zeigten 2005, dass es möglich ist, *in vitro* einen minimalen RISC aus Ago2 und siRNA zu formen. Die RNA-Spaltung wurde mittels <sup>32</sup>P-markierter siRNA gemessen (Rivas, Tolia et al. 2005). Miyoshi et al. beschrieben 2008 einen *in vitro* Slicer Assay, in dem sie endogene Argonautproteine aus tierischen Zellen oder rekombinantes Ago, welches in *E.coli*-Bakterien produziert wurde, nutzten. Um die RNA-Spaltung zu visualisieren, wurde eine am 5'-Ende radioaktiv markierte Ziel-mRNA verwendet (Miyoshi et al. 2008).

Mithilfe des hier vorgestellten RISC-Assays ist es dagegen möglich, die RNA-Spaltung ohne radioaktive Markierung zu messen. In der ersten Inkubationszeit, welche zu Beginn dieser Arbeit bereits auf 30 Minuten bei 37°C festgelegt war, formen ein rekombinant hergestelltes Ago2 und die siRNA den minimalen RISC. Anschließend wird die zur siRNA komplementäre Ziel-mRNA zugeführt. Argonaut 2 ist in der Lage, das siRNA/mRNA-Hybrid zu spalten. Um die optimale Dauer der Inkubation zu bestimmen, wurde nach mRNA-Zugabe für 10, 20 und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bereits nach 10 Minuten war eine Degradierung der RNA messbar. Somit war davon auszugehen, dass es umgehend nach mRNA-Zugabe zur Bildung des siRNA/mRNA-Hybrides kam und Argonaut 2 begann, dieses zu spalten. Der Anteil der degradierten RNA nahm mit zunehmender Inkubationsdauer zu und war nach 30 Minuten am höchsten. Somit wurde die optimale Inkubationszeit nach Zugabe der Ziel-mRNA auf 30 Minuten festgelegt.

Zur Bestimmung der optimalen Ago2-Konzentration für den RISC-Assay wurde ein Experiment mit abgestuften Mengen des Proteins durchgeführt. Bei Einsatz von 0,25 µg GST-Ago2 zeigt sich keine messbare RNA-Spaltung. Erst ab einer Konzentration von 0,5 µg GST-Ago2 wurde die RNA messbar fragmentiert. Die Degradierung war bei Einsatz von 1,0 µg des Proteins noch deutlicher. Wurden jedoch höhere Mengen Ago2 eingesetzt, kam es zu einer

Spaltung der RNA ohne dass die spezifische siRNA vorhanden war. Diese unspezifische Spaltung wurde möglicherweise durch RNasen, die bei hohen GST-Ago2-Mengen überwogen, hervorgerufen. Es besteht die Möglichkeit, dass dies durch eine höhere Konzentration des RNase-Inhibitors zu vermeiden gewesen wäre. Alternativ ist es möglich, dass GST-Ago2 in hohen Konzentrationen die RNA unspezifisch spaltet. Da die Degradierung der RNA bei Einsatz von 1 µg GST-Ago2 deutlich war und um eine unspezifische Spaltung zu vermeiden, wurde in den folgenden Experimenten 1 µg des Proteins pro Ansatz eingesetzt.

Nun wurde GST-Ago2 vor Einsatz in den RISC-Assay mit den Lysaten stimulierter Zellen inkubiert und im Anschluss mittels GSH-*beads* Assay isoliert. Nach Stimulation von HEK293IL-1R-Zellen mit IL-1 war keine Degradierung der RNA messbar. Möglicherweise blockierten die gebundenen *beads* das aktive Zentrum und störten so die enzymatische RNA-Spaltung. Im Folgenden wurden die *beads* vor dem RISC-Assays durch Elution von GST-Ago2 gelöst. Da ein Verlust von GST-Ago2 während des GSH-*beads* Assays in Betracht kam, wurde die Menge des eingesetzten Proteins verdoppelt bzw. vervierfacht. Auch hier kam es zu keiner Spaltung der RNA im RISC-Assay. Die positive Kontrolle, in der unbehandeltes GST-Ago2 eingesetzt wurde, funktionierte regelmäßig. GST-Ago2 hatte somit vor Einsatz in den GSH-*beads* Assay volle Funktion. Mittels Western Blot wurde sichergestellt, dass ausreichend GST-Ago2 in den RISC-Assay eingesetzt wurde. Die Ursache für den Verlust der enzymatischen Aktivität musste also im GSH-*beads* Assay liegen. Es wurden die Inkubationszeit und -temperatur des Assays verändert. Die erste Inkubationszeit, in der das Zelllysat mit GST-Ago2 inkubiert wurde, wurde von 30 auf 15 Minuten verkürzt und die Temperatur der zweiten Inkubation, nach Zugabe der Glutathion-Sepharose-*beads*, von 30°C auf 4°C gesenkt. GST-Ago2 verlor seine enzymatische Aktivität bereits nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur in Ganzzelllysepuffer. Somit musste davon ausgegangen werden, dass der Puffer die Ursache für den Aktivitätsverlust darstellt. Miyoshi et al. versuchten ebenfalls rekombinantes Ago2 in *E.coli*-Bakterien herzustellen. Sie nutzten einen Lysepuffer mit 1 % Triton X-100. Es gelang ihnen nicht, ein funktionsfähiges Protein herzustellen (Miyoshi et al. 2008).

Es wurden alternative Lysepuffer überprüft. Nach Inkubation im TAP-Lysepuffer behielt das Enzym seine Aktivität (vgl. Abbildung 20). Dieser Puffer enthielt NP40 in einer Konzentration von 0,1 %. Im Gegensatz dazu wiesen der Ganzzelllysepuffer (1 % Triton X-100) und der β-Galaktosidasepuffer (0,2 % Triton X-100) höhere Detergenzienkonzentrationen auf.

In einem weiteren Experiment nutzten Miyoshi et al. zur Isolierung eines endogenen humanen Ago2 aus HeLa-Zellen einen Lysepuffer der nur 0,1 % Nonidet P-40 enthielt. Dieses endogene Ago2 wies eine *slicer*-Aktivität auf (Miyoshi et al. 2008). Ago2 scheint somit nur bei Inkubation in Zelllysaten aus niedrigdosierten, nichtionischen, milden Lysepuffern seine enzymatische Aktivität beizubehalten.

Liu, Carmell et al. sowie Rivas, Tolia et al. führten ebenfalls erfolgreich mRNA *cleavage* Assays durch. Beide nutzten einen Lysepuffer, welcher 0,5 % NP40 enthielt (Liu, Carmell et al. 2004; Rivas, Tolia et al. 2005). Dies zeigt, dass Argonaut 2 auch höhere Konzentrationen eines Detergenz toleriert. In Zusammenschau weisen die vorgestellten Experimente darauf hin, dass Argonaut 2 bei Verwendung eines NP40 enthaltenen Lysepuffers seine Aktivität beibehält, jedoch nicht in Anwesenheit von Triton X-100 in einer Konzentration über 0,1 %. Es handelt sich bei beiden Stoffen um nichtionische Detergenzien. Möglicherweise führen bestimmte chemische Strukturen des Triton X-100 zu einer Beeinflussung des aktiven Zentrums, welche von Argonaut 2 nur in sehr geringer Konzentration toleriert wird.

Der RISC-Assay ist eine Methode, mit der es möglich ist, die endonucleolytische Aktivität von Ago2 zuverlässig zu messen. Jedoch führten zusätzlich eingebrachte Zelllysate zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität von Ago2. Dies machte es schwierig, die signalabhängige Regulation von Ago2 mithilfe des RISC-Assay zu bestimmen. Es war erforderlich, einen Zelllysepuffer zu finden, der die enzymatische Aktivität des Proteins nicht stört. Der TAP-Lysepuffer schien diese Voraussetzung zu erfüllen.

Im Anschluss war es jedoch nicht mehr möglich, ein verwendbares GST-Ago2 herzustellen. Die genutzten Dialyseschläuche wurden nicht mehr hergestellt, sodass das Produkt eines anderen Herstellers genutzt werden musste. Mit diesen Dialyseschläuchen konnte das rekombinante GST-Ago2 nicht ausreichend von RNasen gereinigt werden. Die RNA wurde ohne die Anwesenheit einer siRNA unspezifisch degradiert (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde GST-Ago2 mittels Immunpräzipitation aufgereinigt. Diese wurde in verschiedenen Puffern durchgeführt. Um eine Inaktivierung von Ago2 durch den verwendeten Puffer auszuschließen wurde unter anderem eine Immunpräzipitation im RISC-Assay-Puffer durchgeführt. Mittels Polyacrylamidgel wurde sichergestellt, dass ausreichend GST-Ago2 in den folgenden RISC-Assay eingesetzt wurde. Es kam zu keiner unspezifischen Spaltung. Jedoch war das Protein nicht in der Lage, die RNA zu degradieren (Daten nicht gezeigt). Es war davon auszugehen, dass eine verwendete Komponente der Immunpräzipitation die

Funktion von Ago2 stört. Trotz verschiedener Modifikationen in der Herstellung des rekombinanten GST-Ago2 konnte kein geeignetes Protein hergestellt werden. In einem weiteren Experiment wurde versucht, endogenes Ago2 zu nutzen. Ago2 und eine doppelsträngige Luziferase-siRNA wurden in HEK193IL-1R-Zellen transfiziert. Es sollte *in vivo* ein minimaler RISC gebildet werden, welcher im anschließenden RISC-Assay mit der komplementären Luziferase-mRNA inkubiert wurde. Auch hier fand sich keine Degradierung der RNA (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnte ein nicht radioaktiver *in vitro* RISC-Assay etabliert werden. Unter optimalen Bedingungen kam es zu einer spezifischen Degradierung der RNA durch GST-Ago2, sodass dieser Assay gut zu kontrollieren war. Jedoch stellte sich heraus, dass die Herstellung des rekombinanten GST-Ago2 sehr fragil ist und nur unter Verwendung optimaler Arbeitsmaterialien ein funktionsfähiges Protein generiert werden kann. Weiterhin zeigte sich das rekombinant hergestellte GST-Ago2 sehr störanfällig gegenüber nicht näher bekannten Pufferbestandteilen.

Zurzeit arbeitet die Arbeitsgruppe Kracht an einer Aufreinigung von rekombinantem GST-Ago2 mittels Säulenchromatografie. Wenn ein enzymatisch aktives und RNase-freies Protein vorliegt, kann der Einfluss verschiedener Stimuli auf die Aktivität von GST-Ago2 mithilfe des GSH-*beads* Assays unter Verwendung von TAP-Lysaten und folgendem RISC-Assay bestimmt werden.

#### **4.2 Luziferase-Reporterassay**

Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit als Alternative zum RISC-Assay die Aktivität des *RNA-induced silencing complex* (RISC) mithilfe eines Luziferase-Reporterassays bestimmt. Hierbei wurde zunächst ein für Luziferase codierendes Plasmid und eine dazu komplementäre siRNA in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Die Luziferase-siRNA kann an die Luziferase-mRNA binden und das endogene Ago2 dieses Hybrid spalten. Die im Luziferase-Reporterassay gemessene Luziferase-Aktivität ist demnach umgekehrt proportional zur RISC-Aktivität.

Katharina Porada (ehemals Rzeczkowski) aus der Arbeitsgruppe Kracht identifizierte Ago2 als einen Interaktionspartner von JNK (Rzeczkowski et al. 2011). Es wurde gezeigt, dass Ago2 an JNK bindet, jedoch nicht dessen Substrat ist. Der Effekt dieser Interaktion ist bisher noch

nicht ausreichend charakterisiert. Weiterhin wurde in der Arbeitsgruppe Kracht unter anderem gezeigt, dass die Aktivierung von JNK zur Abnahme bestimmter miRNAs im RISC führt. Ebenfalls konnte demonstriert werden, dass die Transfektion der MAP3-Kinase MEKK1 in HEK293IL-1R-Zellen die RISC-Aktivität hemmt. Dies wurde in dieser Arbeit bestätigt. In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsproteins auf die RISC-Aktivität in HEK293IL-1R-Zellen untersucht. Hierbei handelt es sich um die Kinasedomäne der MAP3-Kinase TAK1 (*TGF-beta activated kinase 1*), welche mit der TAK1-Aktivierungsdomäne von TAB1 (*TAK-1-binding protein*) fusioniert ist (Sakurai et al. 2002). Ebenso wie MEKK1 supprimierte das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein, in geringerer Ausprägung, die Aktivität des RISC (vgl. Abbildung 28). Ein gemeinsamer Effekt der beiden untersuchten MAP3-Kinasen ist die Aktivierung der MAP-Kinase JNK (vgl. Abbildung 28). Die Tatsache, dass zwei unabhängige JNK-Aktivatoren die RISC-Aktivität hemmen und JNK als Interaktionspartner von Ago2 identifiziert wurde, machen es sehr wahrscheinlich, dass eine JNK-Aktivierung einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des *RNA-induced silencing complex* ausübt. Jedoch gibt es eine Reihe weiterer Signalwege, über die die gezeigten Effekte vermittelt werden könnten. Beispielsweise aktiviert TAK1 den *I-kappa β kinase complex* (IKK) (Adhikari, Xu et al. 2007) und die MAP-Kinasen MKK3, MKK4 und MKK6, welche zur Aktivierung von JNK führen, sowie die MAP-Kinase p38 (Arsura, Panta et al. 2003). MEKK1 aktiviert p38 (Inoue, Tateno et al. 2001) sowie *I-kappa α* und *I-kappa β* (Inoue, Tateno et al. 2001).

Um sicherzustellen, dass die Hemmung des RISC JNK-vermittelt ist, wäre es sinnvoll, zusätzlich einen JNK-Inhibitor zu verabreichen. SP600125 inhibiert JNK und damit die Phosphorylierung von c-Jun sehr effektiv (Holzberg, Knight et al. 2003). Es handelt sich jedoch um einen relativ unspezifischen Inhibitor. Es werden diverse weitere Kinasen gehemmt. Beispielsweise SGK (*serum- and glucocorticoid-induced kinase*), S6K1 (*p70 ribosomal protein S6 kinase*), AMPK (*activated protein kinase*), CDK2 (*cyclin dependent kinase 2*), CK1d (*casein kinase 1d*) und DYRK1A (*tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A*) (Bain et al. 2003). Könnten die gezeigten Effekte durch SP600125 blockiert werden, wäre dies ein eindeutiges Zeichen für die Beteiligung von JNK an der Hemmung der RISC-Aktivität. Ebenso möglich wäre die Durchführung der gezeigten Experimente mit JNK-*knockout*-Zellen. Hier wäre eine deutlich geringere oder gar eine ausbleibende Suppression der RISC-Aktivität durch MEKK1 und das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein zu erwarten.

Weiterhin zeigte sich bei Kotransfektion der Luziferase-siRNA im Gegensatz zur Anwesenheit der Kontroll-siRNA eine Steigerung der intrazellulären Menge des TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsproteins. Dies ist möglicherweise dadurch begründet, dass die Luziferase-siRNA an weitere mRNAs bindet, welche für Proteine codieren, die die Stabilität des TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsproteins oder seine Expression beeinflussen, in diesem Fall normalerweise inhibieren.

In dieser Arbeit sollte ein möglicher Einfluss dreier Zytostatika auf die RISC-Aktivität untersucht werden. Cisplatin (cis-Diaminedichloroplatinum (II); cis-DDP) verursacht eine Quervernetzung der DNA und wird als Chemotherapeutikum in der Behandlung einer Vielzahl humaner Malignome eingesetzt. Cisplatin führt zu einer JNK-Aktivierung, welche den Zelltod induziert. (Sánchez-Perez et al. 1998).

Doxorubicin interkaliert in die DNA und induziert Strangabbrüche. Weiterhin werden die DNA-Synthese und die Topoisomerase-II-Aktivität inhibiert sowie freie Radikale produziert. Für die durch Doxorubicin induzierte Apoptose ist eine Aktivierung von JNK nötig (Kim and Freeman 2003).

Vinblastin ist ein Mikrotubuliinhibitor (Osborn and Chambers 1996). Es bindet Tubulinuntereinheiten, inhibiert die Tubulinpolymerisierung und zerstört die Mikrotubulidynamik (Fan et al. 2000). Vinblastin aktiviert JNK und führt zu einer Steigerung der c-Jun-Phosphorylierung (Osborn and Chambers 1996).

Die JNK-Aktivierung ist somit eine wichtige Komponente der zellulären Antwort auf diverse Chemotherapeutika (Osborn and Chambers 1996). Es stellte sich die Frage, ob eine JNK-Aktivierung als Antwort auf eine Behandlung mit Zytostatika ebenfalls einen hemmenden Effekt auf die RISC-Aktivität ausübt. Es wurden Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin bezüglich dieser Fragestellung untersucht. Der für Luziferase codierenden Vektor pGL2Control sowie eine zur Luziferase-mRNA komplementäre siRNA bzw. eine Kontroll-siRNA wurden in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit den Zytostatika stimuliert.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen fand sich nach 24-stündiger Behandlung mit Cisplatin und Doxorubicin eine Steigerung der RISC-Aktivität. Dieser Effekt war mit einer 2,4-fachen Steigerung um bei Behandlung mit Cisplatin deutlicher als bei Behandlung mit Doxorubicin, welches die RISC-Aktivität ca. 2-fach anhob. Mithilfe des Western Blots (vgl. Abbildung 29 und 30) wurde die Aktivierung von JNK anhand der deutlichen Phosphorylierung von c-Jun

gezeigt. Cisplatin und Doxorubicin führten somit wie die Überexpression von MEKK1 bzw. dem TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein zu einer Aktivierung von JNK, jedoch zu einem entgegengesetzten Einfluss auf die RISC-Aktivität. Bei JNK-Aktivierung durch MEKK1 bzw. das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein wurde die RISC-Aktivität inhibiert, bei JNK-Aktivierung durch Cisplatin und Doxorubicin kam es zu einer Steigerung der RISC-Aktivität. Eine Aktivierung von JNK durch MEKK1 oder das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein führt zu einer Aktivierung der gesamten MAP-Kaskade. Auch als Reaktion auf Stressoren, beispielsweise UV-Licht, wird die gesamte MAP-Kaskade aktiviert. Diese JNK-Aktivierung ist schnell und transient (Sánchez-Perez et al. 1998). Im Gegensatz dazu findet die JNK-Aktivierung durch Cisplatin verspätet statt und ist persistent. Es kommt zu einer deutlichen Phosphorylierung von c-Jun, jedoch nicht zu einem Anstieg der JNK-Menge. Weiterhin aktiviert Cisplatin die MAP-Kaskade nur schwach (Sánchez-Perez et al. 1998). Dies bedeutet, dass JNK-aktivierende MAP3-Kinasen sowie Cisplatin und Doxorubicin letztendlich zu einer Aktivierung von JNK führen, diese jedoch auf unterschiedliche Weise vermitteln. Hier könnte die Erklärung für den gegensätzlichen Einfluss auf die RISC-Aktivität zu finden sein. Es sind jedoch die oben genannten weiteren Signalwege, die durch MEKK1 und das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein in Gang gesetzt werden, zu berücksichtigen.

Vinblastin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die RISC-Aktivität (vgl. Abbildung 31).

Cisplatin entfaltet seine zytostatische Wirkung über eine Quervernetzung der DNA (Sánchez-Perez et al. 1998). Doxorubicin gehört zu den Anthracyclinen, welche in die DNA interkalieren (Kim and Freeman 2003). Diese beiden Wirkstoffe zeigen somit eine Wirkung direkt an der DNA. Vinblastin, ein Vincaalkaloid, hingegen ist ein Mikrotubuliinhibitor. Durch Bindung an Tubulin kommt es zur Mitosehemmung (Osborn and Chambers 1996; Fan et al. 2000). Das heißt, Vinblastin greift nicht die DNA direkt an. Möglicherweise unterscheidet sich Vinblastin auch in der Art der JNK-Aktivierung von den beiden anderen genannten Zytostatika was die gezeigten Ergebnisse erklären könnte.

Zusätzlich wurde der Einfluss von Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin unter Überexpression von Ago2 untersucht. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Experimenten ohne Überexpression festgestellt werden. Nach Behandlung mit Cisplatin bzw. Doxorubicin war eine Steigerung der RISC-Aktivität messbar. Das Ausmaß war im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Ago2-Überexpression nicht signifikant verändert. Eine höhere Menge an Ago2 führte somit zu keinem stärkeren Effekt der Zytostatika. Dies deutet daraufhin, dass

Ago2 nicht direkt durch Cisplatin und Doxorubicin beeinflusst wird. Es scheinen vorgeschaltete Signalwege zu existieren die den Effekt der Zytostatika limitieren und dazu führen, dass ein höheres Angebot an Ago2 keinen Einfluss auf das Ausmaß der Zytostatikawirkung hat. Durch Vinblastin konnte auch bei Überexpression von Ago2 kein Einfluss auf die RISC-Aktivität detektiert werden.

Argonaut 2 wird posttranslational modifiziert. Hank et al. zeigten 2008, dass hier die Typ-I-Kollagen-Prolyl-4-Hydroxylase (C-P4H) eine wichtige Rolle spielt. Die Hydroxylierung von Kollagen durch C-P4H ist essenziell für die Faltung zum funktionsfähigen Protein und dessen Stabilität. Ago2 wird durch C-P4H an Prolin-700 hydroxyliert. Ein Mangel an diesem Enzym supprimiert die Ago2-Stabilität sowie die RISC-Aktivität (Qi et al. 2008). Möglicherweise werden durch MEKK1 und das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein Mechanismen in Gang gesetzt, die die posttranslationale Modifikation von Ago2 stören und zu einer geminderten Hydroxylierung durch C-P4H führen was die festgestellte Verminderung der RISC-Aktivität in Anwesenheit von MEKK1 und dem TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein erklären könnte.

Zeng et al. beschrieben 2008, dass Ago2 durch Phosphorylierung an Serin-387 reguliert werden kann. Diese Phosphorylierung wird durch die MAP-Kinase p38 vermittelt (Zeng et al. 2008). Humanes Ago2 wird durch Stressmechanismen durch die MAPKAPK2 (MAP *kinase-activated protein kinase 2*) unter Beteiligung von p38 an Serin-387 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist an der Lokalisation von Ago2 in *processing bodies* (*P-bodies*) beteiligt (Yan Zeng 2008). Ein Einfluss auf die RISC-Aktivität wurde nicht gezeigt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kim und Freeman, die eine Abnahme von Phospho-p38 in MCF-7- (*Michigan Cancer Foundation-7*-) Zellen nach zweistündiger Doxorubicineinwirkung beschrieben (Kim and Freeman 2003), kam es zu einer Zunahme der Phosphorylierung dieser MAP-Kinase nach einer Stimulation von HEK293IL-1R-Zellen mit Doxorubicin für mindestens drei Stunden. Eine Abnahme von Phospho-p38 wurde nicht detektiert (vgl. Abbildung 23 und 24). Ebenso wurde p38 durch Behandlung mit Cisplatin und Vinblastin aktiviert (vgl. Abbildung 21, 22 und 25, 26). Möglicherweise ist dieser Effekt durch die unterschiedlichen Zellsysteme begründet. Eine abnehmende Phosphorylierung von p38 in Brustkrebszellen und eine gesteigerte Phosphorylierung in humanen embryonalen Nierenzellen durch Doxorubicin könnte für eine unterschiedliche Wirkung dieses Zytostatikums auf verschiedene Organe sprechen. Möglicherweise kommt es durch die Aktivierung von p38 zu einer Phosphorylierung von Ago2 an Serin-387. Cisplatin und Doxorubicin führen zu einer Steigerung der RISC-Aktivität.

Vinblastin scheint diese nicht zu beeinflussen. Weiterhin aktivieren auch MEKK1 und das TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein p38 (Inoue, Tateno et al. 2001; Arsura, Panta et al. 2003) und führen zu einer Suppression der RISC-Aktivität. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse gegen die p38-Aktivierung als Ursache für die gezeigten Effekte oder es sind noch zusätzliche Mechanismen nötig, um die RISC-Aktivität zu beeinflussen.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Experimente, dass die enzymatische Aktivität von Ago2 und somit die RISC-Aktivität, durch die untersuchten Zytostatika Cisplatin und Doxorubicin gesteigert wurde. Die MAP-Kinase JNK spielt vermutlich eine bedeutende Rolle. Dies könnte durch Experimente mit zusätzlicher Überprüfung der Effekte bei Behandlung mit einem JNK-Inhibitor (z.B. SP600125) oder in JNK-*knockout*-Zellen gesichert werden. Vinblastin scheint keinen Einfluss auf die RISC-Aktivität zu haben. Die genauen Mechanismen der enzymatischen Regulation von Ago2 sollten in Zukunft weiter untersucht werden. Insbesondere die posttranslationale Modifikation von Ago2 und deren genaue Auswirkungen haben vermutlich eine entscheidende Bedeutung für das Verständnis der Regulation der RNA-Interferenz.

Ein Verlust reifer miRNAs führt zu einer gesteigerten Schädigung der DNA. Eine Eigenschaft von Tumorzellen könnte die Vermeidung der Genregulation durch miRNAs sein. Suzuki et al. zeigten 2009, dass p53, ein Tumorsuppressor, die posttranskriptionelle Reifung verschiedener miRNAs als Antwort auf DNA-Schäden steigert. Doxorubicin induziert p53 (Suzuki et al. 2009). Möglicherweise führt diese Induktion zu einer Steigerung der intrazellulären miRNA-Menge welche wiederum eine gesteigerte RISC-Aktivität zur Folge hat. Cisplatin und Doxorubicin steigern die RISC-Aktivität. Im Folgenden kommt es zu einem verstärkten Abbau bestimmter mRNAs. Das mRNA-Expressionsmuster wird verschoben. Dies führt zu einem Eingriff in physiologische Prozesse. Abhängig von der mRNA-Spezies, welche verstärkt abgebaut wird, kann es zu einer unerwünschten Wirkung kommen. Um die Wirkung vorherzusagen, müsste man, möglicherweise mittels Micorarrays, bestimmen, welche RNAs betroffen sind. Es ist ebenfalls möglich, dass die Zytostatikawirkung positiv unterstützt wird, wenn durch die verstärkte RISC-Aktivität mRNAs abgebaut werden, die für Proteine codieren, welche die Zellteilung unterstützen.

**5 Zusammenfassung**

Argonaut 2 (Ago2) ist das katalytische Zentrum des RNA-induced silencing complex (RISC). Dieses Protein besitzt eine Endonukleaseaktivität und spaltet siRNA/mRNA- oder miRNA/mRNA-Hybride. Es kommt zu einer sequenzspezifischen posttranskriptionellen Genstilllegung (*silencing*), welche wichtig für die Regulation der Genexpression in nahezu allen Lebewesen ist. Dieser Prozess wird als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet.

Die Arbeitsgruppe Kracht identifizierte Ago2 als einen Interaktionspartner der MAP-Kinase JNK. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin, welche als gemeinsames Merkmal die Aktivierung von JNK haben, auf die Ago2 Aktivität untersucht. Hierzu wurde zunächst ein *in vitro* RISC-Assay etabliert. Mit diesem ist es möglich, die Aktivitätsänderungen eines rekombinanten GST-Ago2 in der An- oder Abwesenheit von Zellextrakten zu erfassen. Bisher war hierzu der Einsatz radioaktiv markierter RNAs nötig. Es wurde ein nicht-radioaktiver *in vitro* RISC-Assay etabliert und die Bedingungen zur Durchführung dieses Assays systematisch ausgetestet. Weiterhin wurde der Einfluss der Zytostatika auf die RISC-Aktivität in intakten Zellen mit Hilfe eines Luziferase-Reporterassays bestimmt. Hierzu wurden in HEK293IL-1R-Zellen ein für Luziferase codierendes Plasmid und eine Luziferase-siRNA transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin stimuliert und die Luziferaseaktivität gemessen. Es zeigte sich eine Aktivierung des RISC durch Cisplatin und Doxorubicin. Vinblastin hatte keinen Einfluss auf die RISC-Aktivität. Eine Überexpression von Ago2 führte zu keiner signifikanten Steigerung des Einflusses von Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin auf die Aktivität des RISC. Im Gegensatz zu den Zytostatika führten die JNK-Aktivatoren MEKK1 und ein TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub>-Fusionsprotein in dem gleichen Assay zu einer Hemmung der RISC-Aktivität. Zusammenfassend konnte somit in dieser Arbeit Befunde erhoben werden, die daraufhin deuten, dass die Aktivität von RNAsen aus dem RISC Komplex durch Stresssignalwege moduliert werden. Diese Beobachtungen könnten für das Verständnis der vielfältigen molekularen Wirkungen von zellschädigenden Zytostatika relevant sein.

## 5.1 Abstract

Argonaute 2 (Ago2) is the catalytic core of the RNA-induced silencing complex (RISC). The protein contains an endonuclease activity and cleaves siRNA/mRNA or miRNA/mRNA hybrids. This leads to a sequence specific post-transcriptional silencing, which is important for the regulation of gene expression in most species. This process is called RNA-interference (RNAi).

The study group of Prof. Kracht identified Ago2 as a protein which interacts with the MAP kinase JNK. In this dissertation the influence of the JNK-activating cytostatic drugs cisplatin, doxorubicin and vinblastine on Ago2 activity was examined. First, an in vitro RISC assay was established. With this RISC assay it was possible to assess changes in activity of a recombinant GST-Ago2 in the presence or absence of cell extract proteins. So far, such assays required radioactively labeled RNAs. A non-radioactive in vitro RISC assay was established and assay conditions were systematically validated. Furthermore, the influence of cytostatic drugs on the RISC activity in intact cells was determined by a luciferase reporter gene assay. HEK293IL-1R cells were transfected with a plasmid encoding luciferase as well as a luciferase siRNA. Thereafter, cells were stimulated with cisplatin, doxorubicin or vinblastine and activity of luciferase was determined. There was an activation of RISC by cisplatin and doxorubicin. Vinblastine had no influence on RISC activity. Overexpression of Ago2 caused no significant changes in the effects of the cytostatic drugs on intracellular RISC activity. In contrast, the JNK activators MEKK1 and a TAK1<sub>kd</sub>-TAB1<sub>ad</sub> fusion protein inhibited RISC activity. In summary, the findings indicate that the activity of RNases of the RISC are modulated by stress signaling pathways. These results may be relevant for the understanding of the molecular effects of cytostatic drugs.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
µg	Mikrogramm	U	Enzymeinheiten
µl	Mikroliter	V	Volt
µmol/l	Mikromol pro Liter	vol	Volumenanteil
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid	vgl.	vergleiche
AK	Antikörper	v/v	Volumen pro Volumen
AP	Auftragspuffer	w/v	Gewicht pro Volumen
ATP	Adenosintriphosphat		
bp	Basenpaare		
BSA	Rinder-Serumalbumin		
bzw.	beziehungsweise		
cDNA	komplementäre DNA		
ca.	circa		
d/dd vor Nukleotiden:	desoxy/didesoxy		
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser		
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat		
dsDNA	doppelsträngige DNA		
dsRNA	doppelsträngige RNA		
DTT	Dithiothreitol		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
FKS	Fetales Kälberserum		
g	Gramm		
GSH	Glutathion		
GST	Glutathion-S-Transferase		
h	Stunden		
IL	Interleukin		
kb	Kilobasen		
LB	Lauria Bertoni		
LMW	<i>low molecular weight</i> (Abkürzung für Proteinstandard)		
M	Mol pro Liter		
mg	Milligramm		
min	Minuten		
ml	Milliliter		
mmol/l	Millimol pro Liter		
mRNA	Boten-RNA		
ng	Nanogramm		
nm	Nanometer		
OD	optische Dichte (Absorption)		
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>		
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunden		
ssRNA	einzelsträngige RNA		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TE	Trypsin-EDTA		
TNF	Tumor Nekrose Faktor		

7 **Abbildungsverzeichnis**

<b>ABBILDUNG 1:</b>	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER RNA-INTERFERENZ-ABHÄNGIGEN ZELLULÄREN PROZESSE.....	1
<b>ABBILDUNG 2:</b>	BIOGENESE UND WIRKUNGSMECHANISMUS DER HAUPTKLASSEN KLEINER REGULATORISCHER RNAS.....	7
<b>ABBILDUNG 3:</b>	KRISTALLSTRUKTUR DES <i>PYROCOCCUS FURIOSUS</i> ARGONAUT (AGO), DOMÄNENSTRUKTUR EINES AGO-PROTEINS UND SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN AGO UND DER KLEINEN RNA.....	10
<b>ABBILDUNG 4:</b>	INTRAZELLULÄRE MAPK-KASKADE.....	17
<b>ABBILDUNG 5:</b>	ÜBERPRÜFUNG VON REKOMBINANTEM GST-AGO2.....	48
<b>ABBILDUNG 6:</b>	ÜBERPRÜFUNG DES AUFGEREINIGTEN GST-AGO2 MITTELS WESTERN-BLOT..	49
<b>ABBILDUNG 7:</b>	A: T7 LUZIFERASE CDNA B: LUZIFERASE MRNA MIT DER LUZIFERASE SIRNA-SEQUENZ UND DER SCHNITTSTELLE DES RISC.....	50
<b>ABBILDUNG 8:</b>	MITTELS AGILENT 2100 BIOANALYZER ERSTELLTES ELEKTROPHEROGRAMM...	51
<b>ABBILDUNG 9:</b>	ÜBERPRÜFUNG DER LUZIFERASE-MRNA MITTELS AGILENT 2100 BIOANALYZER.....	51
<b>ABBILDUNG 10:</b>	ÜBERPRÜFUNG DER LUZIFERASE-SIRNA MITTELS AGILENT 2100 BIOANALYZER.....	52
<b>ABBILDUNG 11:</b>	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN INKUBATIONSZEIT FÜR DEN RISC-ASSAY.....	53
<b>ABBILDUNG 12:</b>	BESTIMMUNG DER OPTIMALEN GST-AGO2-MENGE FÜR DEN RISC-ASSAY.....	54
<b>ABBILDUNG 13:</b>	SCHEMA DES GSH-BEADS-ASSAYS.....	55
<b>ABBILDUNG 14:</b>	GSH-BEADS ASSAY NACH IL-1-STIMULATION.....	56
<b>ABBILDUNG 15:</b>	ÜBERPRÜFUNG DER IN DEN RISC-ASSAY EINGESETZTEN GST-AGO2-MENGE NACH DEM GSH-BEADS ASSAY MITTELS WESTERN-BLOT.....	57
<b>ABBILDUNG 16:</b>	GSH-BEADS-ASSAY MIT ELUTION UND WESTERN-BLOT.....	58
<b>ABBILDUNG 17:</b>	GSH-BEADS-ASSAY MIT GESTEIGERTER MENGE AN GST-AGO2.....	59
<b>ABBILDUNG 18:</b>	GSH-BEADS-ASSAY MIT VERRINGERTER INKUBATIONSZEIT UND INKUBATIONSTEMPERATUR.....	60
<b>ABBILDUNG 19:</b>	GSH-BEADS-ASSAY MIT $\beta$ -GALAKTOSIDASE-PUFFER.....	61
<b>ABBILDUNG 20:</b>	GSH-BEADS-ASSAY UNTER VERWENDUNG EINES TAP-LYSATES.....	62
<b>ABBILDUNG 21:</b>	EINFLUSS VON CISPLATIN AUF AGO2 UND VERSCHIEDENE MAP-KINASEN.....	64
<b>ABBILDUNG 22:</b>	EINFLUSS VON CISPLATIN AUF AGO2 UND VERSCHIEDENE MAP-KINASEN BEI AGO2-ÜBEREXPRESSION.....	65
<b>ABBILDUNG 23:</b>	EINFLUSS VON DOXORUBICIN AUF AGO2 UND VERSCHIEDENE MAP-KINASEN..	66
<b>ABBILDUNG 24:</b>	EINFLUSS VON DOXORUBICIN AUF AGO2 UND VERSCHIEDENE MAP-KINASEN BEI ÜBEREXPRESSION VON AGO2.....	67
<b>ABBILDUNG 25:</b>	EINFLUSS VON VINBLASTIN AUF AGO2 UND VERSCHIEDENE MAP-KINASEN.....	68
<b>ABBILDUNG 26:</b>	EINFLUSS VON VINBLASTIN AUF AGO2 UND VERSCHIEDENE MAP-KINASEN BEI ÜBEREXPRESSION VON AGO2.....	69
<b>ABBILDUNG 27:</b>	SCHEMA DES LUZIFERASE-REPORTERGENASSAYS.....	70
<b>ABBILDUNG 28:</b>	LUZIFERASE-REPORTERGENASSAY NACH TRANSFEKTION VON MEKK1 UND TAK1 <sub>KD</sub> -TAB1 <sub>AD</sub> -FUSIONSPROTEIN.....	71
<b>ABBILDUNG 29:</b>	EINFLUSS VON CISPLATIN AUF DIE RISC-AKTIVITÄT.....	73
<b>ABBILDUNG 30:</b>	EINFLUSS VON DOXORUBICIN AUF DIE RISC-AKTIVITÄT.....	74
<b>ABBILDUNG 31:</b>	EINFLUSS VON VINBLASTIN AUF DIE RISC-AKTIVITÄT.....	75
<b>ABBILDUNG 32:</b>	EINFLUSS VON CISPLATIN AUF DIE RISC-AKTIVITÄT BEI ÜBEREXPRESSION VON GST-AGO2.....	77
<b>ABBILDUNG 33:</b>	EINFLUSS VON DOXORUBICIN AUF DIE RISC-AKTIVITÄT BEI ÜBEREXPRESSION VON AGO2.....	78
<b>ABBILDUNG 34:</b>	EINFLUSS VON VINBLASTIN AUF DIE RISC-AKTIVITÄT BEI ÜBEREXPRESSION VON AGO2.....	79

**8 Literaturverzeichnis**

Adhikari, A., and Xu, M., Chen, Z. J. (2007). "Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK." *Oncogene* 26, 3214-3226.

Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." *Nature* 431, 350-355.

Arsura, M., Panta, G. R., Bilyeu, J. D., Cavin, L. G., Sovak, M. A., Oliver, A. A., Factor, V., Heuchel, R., Mercurio, F., Thorgeirsson, S. S., and Sonenshein, G. E. (2003). "Transient activation of NF- $\kappa$ B through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF- $\beta$ 1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation." *Oncogene* 22, 412-425.

Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., and Cohen, P. (2003). "The specificities of protein kinase inhibitors: an update." *Biochem. J.* 371, 199-204.

Beitzinger, M., Peters, L., Zhu, J. Y., Kremmer, E., and Meister, G. (2007). "Identification of Human microRNA Targets From Isolated Argonaute Protein Complexes." *RNA Biology* 4, 76-84.

Bhattacharyya, S. N., and Filipowicz, W. (2007). "Argonautes and Company: Sailing against the Wind." *Cell* 128, 1027-1028.

Bode, A. M., and Dong, Z. (2007). "The Functional Contrariety of JNK." *Molecular Carcinogenesis* 46, 591-598.

Chambers, J. W., and LoGrasso, P. V. (2011). "Mitochondrial c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling Initiates Physiological Changes Resulting in Amplification of Reactive Oxygen Species Generation." *Journal of Biological Chemistry* 286, 16052-16062.

Diederichs, S., and Haber, D. A. (2007). "Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression." *Cell* 131, 1097-1108.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411, 494-498.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes & Development* 15, 188-200.

Fan, M., Goodwin, M., Vu, T., Brantley-Finley, C., Gaarde, W. A., and Chambers, T. C. (2000). "Vinblastine-induced Phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL Is Mediated by JNK and Occurs in Parallel with Inactivation of the Raf-1/MEK/ERK Cascade." *The Journal Of Biological Chemistry* 275, 29980-29985.

- 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, 806-811.
- Golden, D. E., Gerbasi, V. R., and Sontheimer, E. J. (2008). "An Inside Job for siRNAs." *Molecular Cell* 31, 309-312
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., and Hannon, G. J. (2001). "Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi." *Science* 293, 1146-1150.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* 418, 244-251.
- Hendrickson, D. G., Hogan, D. J., Herschlag, D., Ferrell, J. E., and Brown, P. O. (2008). "Systematic Identification of mRNAs Recruited to Argonaute 2 by Specific microRNAs and Corresponding Changes in Transcript Abundance." *PLoS ONE* 3, e2126.
- Holzberg, D., Knight, C. G., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Dörrie, A., Hoffmann, E., Resch, K., and Kracht, M. (2003). "Disruption of the c-JUN-JNK Complex by a Cell-permeable Peptide Containing the c-JUN  $\delta$  Domain Induces Apoptosis and Affects a Distinct Set of Interleukin-1-induced Inflammatory Genes." *Journal of Biological Chemistry* 278, 40213-40223.
- Inoue, H., Tateno, M., Fujimura-Kamada, K., Takaesu, G., Adachi-Yamada, T., Ninomiya-Tsuji, J, Irie, K., Nishida, Y., and Matsumoto, K. (2001). "A Drosophila MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK." *The EMBO Journal* 20, 5421-5430.
- Jinek, M., and Doudna, J. A. (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." *Nature* 457, 405-412.
- Kim, V. N. (2008). "Sorting out small RNAs." *Cell* 133(1), 25-26.
- Kim, J., and Freeman, M. R. (2003). "JNK/SAPK mediates doxorubicin-induced differentiation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells." *Breast Cancer Research and Treatment* 79, 321-328.
- Kolomeichuk, S. N., Bene, A., Upreti, M., Dennis, R. A., Lyle, C. S., Rajasekaran, M., and Chambers, T. C. (2008). "Induction of Apoptosis by Vinblastine via c-Jun Autoamplification and p53-Independent Down-Regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>." *Molecular Pharmacology* 73, 128-136.
- Kulkarni, M., Ozgur, S., and Stoecklin, (2010). "On track with P-bodies." *Biochemical Society Transactions* 38, 242-251.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001). "Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation." *Physiological Reviews* 81, 807-869.

- Landi, D., Gemignani, F., and Landi, S. (2012). "Role of variations within microRNA-binding sites in cancer." *Mutagenesis* 27, 205–210.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J. (2004). "Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi." *Science* 305, 1437-1441.
- Ma, J.-B., Yuan, Y.-R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein." *Nature* 434, 666-670.
- MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V., and Doudna, J. (2008). "In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 512-517.
- McDermott, E. P., and O'Neill, L. A. J. (2002). "Ras Participates in the Activation of p38 MAPK by Interleukin-1 by Associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1." *The Journal of Biological Chemistry* 277, 7808–7815.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs." *Mol Cell*. 15, 185-197.
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004). "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA." *Nature* 431, 343-349.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen., S., Hannon, G. J., and Qi, Y. (2008). "Sorting of Small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes Is Directed by the 50 Terminal Nucleotide." *Cell* 133, 116-127.
- Miyoshi, K., Uejima, H., Nagami-Okada, T., Siomi, H., and Siomi, M. C. (2008). "*In vitro* RNA Cleavage Assay for Argonaute-Family Proteins." *Methods Mol. Biol.* 442, 29-43.
- Mokhtari, D., Myers, J. W., and Welsh, N. (2008). "MAPK Kinase Kinase-1 Is Essential for Cytokine-Induced c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase and Nuclear Factor-κB Activation in Human Pancreatic Islet Cells." *Diabetes* 57, 1896-1904.
- Niiya, M., Niiya, K., Shibakura, M., Asami, N., Yoshida, C., Shinagawa, K., Teshima, T., Ishimaru, F., Ikeda, K., and Tanimoto, M. (2004). "Involvement of ERK1/2 and p38 MAP Kinase in Doxorubicin-Induced uPA Expression in Human RC-K8 Lymphoma and NCI-H69 Small Cell Lung Carcinoma Cells." *Oncology* 67, 310-319.
- Osborn, M. T., and Chambers, T. C. (1996). "Role of the Stress-activated/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Protein Kinase Pathway in the Cellular Response to Adriamycin and Other Chemotherapeutic Drugs." *Journal of Biological Chemistry* 271, 30950-30955.

- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001). "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions." *Endocrine Reviews* 22, 153-183.
- Peters, L., and Meister, G. (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." *Mol Cell* 26, 611-623.
- Qi, H. H., Ongusaha, P. P., Myllyharju, J., Cheng, D., Pakkanen, O., Shi, Y., Lee, S. W., Peng, J., and Shi, Y. (2008). "Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability." *Nature* 455, 421-425.
- Ramesh, G., and Reeves, W. B. (2005). "p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice." *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 289, F166-F174.
- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J.-J., Aragon, J. P., Lui, J., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2005). "Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC." *Nat Struct Biol.* 12, 340-349.
- Roux, P. P., and Blenis, J. (2004). "ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions." *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 320-44.
- Rüdel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Körner, R., Hsiao, H.-H., Urlaub, H., Patel, D., and Meister, G. (2011). "Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding." *Nucleic Acids Research* 39, 2330-2343.
- Rybak, A., Fuchs, H., Kamyar, H., Smirnova, L., Wulczyn, E. A., Geert, M., Nitsch, R., Krappmann, D., and Wulczyn, F. G. (2009). "The let-7 target gene mouse *lin-41* is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2." *nature cell biology* 11, 1411-1420.
- Rzeczowski, K., Beuerlein, K., Müller, H., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Kettner-Buhrow, D., Holtmann, H., and Kracht, M. (2011). "c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies." *J. Cell Biol.* 194, 581-596
- Sakurai, H., Nishi, A., Naoya, S., Mizukami, J., Hidetaka, M., and Sugita, T. (2002). "TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase kinase that stimulates AP-1 and NF- $\kappa$ B signaling pathways." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297, 1277-1281.
- Sánchez-Pérez, I., and Perona, R. (1999). "Lack of c-Jun activity increases survival to cisplatin." *FEBS Letters* 453, 151-158.
- Sánchez-Perez, I., Ramón, M., and Perona, (1998). "Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death." *Oncogene* 16, 533-540.
- Sebolt-Leopold, J. S. (2000). "Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway." *Oncogene* 19, 6594-6599.

- Shafer, O. T., and Taghert, P. H. (2009). "RNA-Interference Knockdown of *Drosophila* Pigment Dispersing Factor in Neuronal Subsets: The Anatomical Basis of a Neuropeptide's Circadian Functions" *PLoS ONE* 4, e8298.
- Siomi, H., and Siomi, M. C. (2009). "On the road to reading the RNA-interference code." *Nature* 457, 396-404.
- Song, J.-J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2003). "The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes." *Nat Struct Biol* 10, 1026-32.
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). "Modulation of microRNA processing by p53." *Nature* 460, 529-534.
- Tuschl, T. (2001). "RNA Interference and Small Interfering RNAs." *ChemBiochem* 2, 239-245.
- Vlahopoulos, S., and Zoumpourlis, V. C. (2004) "JNK: A Key Modulator of Intracellular Signaling."
- Waetzig, V., and Herdegen, T. (2005). "Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage." *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 455-461.
- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G. S., Tuschl, T., and Patel, D. J. (2009). "Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes." *Nature* 461, 754-762.
- Zamore, P. D. (2006). "RNA Interference: Big Applause for Silencing in Stockholm." *Cell* 127, 1083-1086.
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., and Graves, P. R. (2008). "Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies." *Biochem J* 413, 429-436.

**9 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, 25.01.2013

Bianca Günther

**10 Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. Michael Kracht für die Überlassung eines interessanten Themas und die Unterstützung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Weiterhin danke ich Frau Dr. Daniela Kettner-Buhrow für die gute Betreuung.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Kracht, ganz besonders Kathi und Dori, für die schöne Zusammenarbeit.

Besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung danken.



*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: 978-3-8359-6106-7



9 783835 961067