Charakterisierung des humanen La-Proteins im zellulären RNA-Metabolismus: Modulation des Zellzyklus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von Julia Dittmann Hamburg 2005

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. WILL Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH

Tag der Disputation: 05. November 2004

Hamburg, den 10. Oktober 2004



Professor Dr. Arno Frühwald Dekan

1 EINLEITUNG	1
1.1 Das La-Protein: Aufbau und Vorkommen	1
1.2 Die Funktionen des La-Proteins	4
1.2.1 BINDUNG, PROZESSIERUNG UND STABILISIERUNG ZELLULÄRER UND VIRALER RNAS	5
1.2.2 DAS LA-PROTEIN UND SEINE FUNKTION BEI DER TRANSLATION VON MRNAS	8
1.3 Überblick über den eukaryotischen Zellzyklus	. 10
1.3.1 DIE G1-PHASE UND G1-ZYKLINE	. 12
1.3.2 DAS HUMANE LA-PROTEIN IM ZELLZYKLUS	. 15
1.4 RNA-Interferenz-Technik	. 16
1.5 AUFGABENSTELLUNG	. 19
2 MATERIAL	. 20
2.1 CHEMIKALIEN	. 20
2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	. 20
2.3 GEBRAUCHSFERTIGE LÖSUNGEN UND REAGENZIENSÄTZE (KITS)	. 21
2.4 Enzyme	. 21
2.5 GRÖßenstandards	. 22
2.6 Antikörper	. 22
2.7 Plasmide	. 22
2.8 BAKTERIENSTÄMME UND ZELLINIEN	. 23
2.9 Bakterien- und Zellkultur-Medien	. 23
2.10 Oligonukleotide	. 24
2.10.1 OLIGONUKLEOTIDE FÜR MUTATIONEN DER SIRNA-BINDESTELLE DER HLA-SEQUENZ	. 24
2.10.2 OLIGONUKLEOTIDE ZUR HERSTELLUNG DER PSUPER-VEKTOREN	. 25
2.10.3 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEMIQUANTITATIVE RT-PCR	. 25
2.10.4 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE GENERIERUNG VON VORLAGEN ZUR IN VITRO-TRANSKRIPTION	. 25
2.10.5 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE RNA-INTERFERENZ-TECHNIK	. 25
2.10.6 Oligonukleotide für die Herstellung von siRNAs mit Hilfe des <i>Silencer</i> TM siRNA	
KONSTRUKTIONS-KITS	. 26
2.10.7 IRD-OLIGONUKLEOTIDE FÜR DNA-SEQUENZIERUNGEN	. 26
2.11 Geräte	. 26
2.12 Herstellernachweis	. 27
3 METHODEN	. 28
3.1 Zellbiologische und mikrobiologische Methoden	. 28
3.1.1 Kulitivierung von <i>E. coli</i>	. 28
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl von Bakterienflüssigkulturen	. 28
3.1.3 VORBEREITUNG VON E. COLI-ZELLEN FÜR DIE CALCIUMTRANSFORMATION	. 28
3.1.4 EINBRINGEN VON PLASMID-DNA IN E. COLI DURCH CALCIUMTRANSFORMATION	. 29
3.1.5 AUFTAUEN VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN, ANSETZEN UND PASSAGIEREN EINER ZELLKULTUR	29
3.1.6 Einfrieren von Zellen	. 30

3.1.7 ZELLZÄHLUNG IN DER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	30
3.1.8 TRANSFEKTION VON PLASMID-DNA IN EUKARYOTISCHE ZELLEN	31
3.1.9 ANWENDUNG DER RNA-INTERFERENZ IN HUMANEN ZELLEN	31
3.1.10 Ethanol-Fixierung von Zellen für die Durchflusszytometrie (FACS)	33
3.1.11 PROPIDIUM-IODID-FÄRBUNG VON ZELLEN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	33
3.1.12 ZELLZYKLUS-MESSUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS-ANALYSE)	33
3.1.13 GIEMSA-Färbung zur Zellzahlbestimmung eukaryotischer Zellen	34
3.1.14 Zellzyklus-Synchronisation durch Serum-Entzug	34
3.1.15 SORTIERUNG VON ZELLEN NACH DER TRANSFEKTION VON GFP-PLASMIDEN	35
3.1.16 Luciferase-Assay zur Bestimmung der Promotor-Aktivität	35
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	36
3.2.1 Alkoholfällung von Nukleinsäuren	36
3.2.2 Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes	36
3.2.3 PLASMID-DNA-PRÄPARATION	37
3.2.4 Agarosegel zur Auftrennung von DNA	37
3.2.5 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN MIT QIAQUICK	38
3.2.6 ENZYMATISCHE SPALTUNG VON DNA (RESTRIKTION)	38
3.2.7 DEPHOSPHORYLIERUNG VON GESCHNITTENER PLASMID-DNA	38
3.2.8 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	39
3.2.9 EINFÜHRUNG VON PUNKTMUTATIONEN IN GFP-HLA-PLASMIDE MITTELS PCR	39
3.2.10 Klonierung der pSuper-Vektoren für die RNA-Interferenz gegen hLa oder	
LUCIFERASE	40
3.2.11 DNA-SEQUENZIERUNG	42
3.2.12 POLYACRYLAMID-HARNSTOFFGEL ZUR DNA-SEQUENZIERUNG	43
3.2.13 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	43
3.2.14 Semiquantitative RT-PCR	44
3.2.15 RNA-ISOLIERUNG AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN MITTELS TRIPURE REAGENZ	45
3.2.16 FORMALDEHYD-AGAROSEGEL ZUR AUFTRENNUNG VON RNA	46
3.2.17 Northern Blot-Analyse	47
3.2.18 Rehybridisierung einer Northern Blot-Membran	48
3.2.19 IN VITRO-TRANSKRIPTION VON RNA	48
3.2.20 Aufreinigung einer radioaktiv markierten Nukleinsäure über eine <i>ProbeQuant</i> -	
Säule	50
3.2.21 KONZENTRATIONSBERECHNUNG VON IN VITRO-TRANSKRIBIERTEN, RADIOAKTIVEN RNA-SON	DEN
	50
3.2.22 Herstellung von siRNA	51
3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	51
3.3.1 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	51
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	53
3.3.3 Western Blot-Analyse zum immunbiologischen Nachweis von Proteinen	53
3.3.4 FÄRBUNG VON PROTEINEN IN POLYACRYLAMIDGELEN MIT COOMASSIE-BRILLIANT-BLUE	55

3.3.5 Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenz	55
3.3.6 Immunfluoreszenz zur Untersuchung von fixierten Zellen	56
3.4 Sonstige Methoden	56
3.4.1 Autoradiographie	56
3.4.2 Phosphorimaging	56
3.4.3 HEMMUNG DER TRANSLATION MIT ZYKLOHEXIMID ZUR BESTIMMUNG DER PROTEINSTABIL	ltät 57
3.4.4 Sucrosegradient zur Untersuchung der polyribosomalen Assoziation von mRN	JAs . 57
4 ERGEBNISSE	60
4.1 Anwendung der RNA-Interferenz gegen das hLa-Protein in humanen Zellen	60
4.1.1 Anwendung der RNA-Interferenz in Huh7-Zellen	61
4.1.2 Anwendung der RNA-Interferenz in Hep G2 2.15-Zellen	67
4.1.3 Anwendung der RNA-Interferenz in U2OS-Zellen	69
4.1.4 Anwendung der RNA-Interferenz in HeLa-Zellen	
4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DES HUMANEN LA-PROTEINS IM ZELLZYKLUS	74
4.2.1 DIE REDUKTION DES HLA-PROTEINSPIEGELS FÜHRT ZU EINER VERMINDERTEN ZELLVERME	HRUNG
VON U2OS-ZELLEN	75
4.2.2 DIE REDUKTION DES HLA-PROTEINSPIEGELS VERURSACHT EINE VERMINDERTE ZELLVERME	EHRUNG
VON HELA-ZELLEN	78
4.2.3 Untersuchung von Zellzyklusveränderungen nach Reduktion des hLa-	
PROTEINSPIEGELS DURCH FACS-ANALYSEN	80
4.2.4 Die Senkung des HLa-Proteinspiegels bewirkt eine Erhöhung der G1-Population	I IN
U2OS-Zellen	81
4.2.5 Die Senkung des La-Proteinspiegels bewirkt keine messbare Veränderung der	
ZELLZYKLUSVERTEILUNG IN HELA-ZELLEN	84
4.2.6 EINFLUSS DER VERMINDERTEN LA-PROTEINEXPRESSION AUF DEN PROTEINSPIEGEL VON	
Zellzyklus-modulierenden Proteinen	89
4.2.7 DER PROTEINSPIEGEL VON ZYKLIN E IST IN U2OS-ZELLEN MIT HLA-DEFIZIT TRANSIENT	
REDUZIERT	89
4.2.8 Der Proteinspiegel von Zyklin D1 ist durch die Erniedrigung des hLa-Proteinsp	IEGELS
IN HELA-ZELLEN KONSTANT VERMINDERT	92
4.3 Untersuchungen zur Spezifität der RNA-Interferenz: Aufhebung der Effekte des	s La-
MANGELS DURCH ÜBEREXPRESSION VON GFP-HLA	98
4.3.1 DIE ÜBEREXPRESSION VON GFP-HLA VERMINDERT DIE AUSWIRKUNGEN DES DEFIZITS AN	
ENDOGENEM HLA-PROTEIN	99
4.3.2 VOREXPERIMENTE FÜR WEITERE FUNKTIONELLE STUDIEN	103
4.4 Studien zum molekularbiologischen Mechanismus der reduzierten Proteinspiege	L VON
ZYKLINEN NACH HLA-RNA-INTERFERENZ	106
4.4.1 Untersuchung der Zyklin E-Promotoraktivität nach der Verminderung des La	
PROTEINSPIEGELS IN U2OS-ZELLEN	106

4.4.2 NACHWEIS EINES UNVERÄNDERTEN ZYKLIN E-MRNA-SPIEGELS NACH HLA-RNA	A-INTERFERENZ IN
U2OS-ZELLEN	
4.4.3 NACHWEIS EINES UNVERÄNDERTEN ZYKLIN D1-MRNA-SPIEGELS NACH DER REI	DUKTION DES LA-
PROTEINSPIEGELS IN HELA-ZELLEN	
4.4.4 Untersuchung der Proteinstabilität von Zyklin D1 nach hLa-RNA-In	TERFERENZ IN
HELA-ZELLEN	111
4.4.5 UNTERSUCHUNG DER POLYSOMENASSOZIATION VON ZYKLIN D1-MRNA NACH H	LA-RNA-
INTERFERENZ IN HELA-ZELLEN	
4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS EINER VERMINDERTEN LA-PROTEINEXPRESSIO	N AUF DEN HBV-
RNA-Spiegel in Leberzellen	
5 DISKUSSION	121
5.1 ETABLIERUNG DER RNA-INTERFERENZ GEGEN DAS HUMANE LA-PROTEIN	
5.2 DIE REDUKTION HUMANER LA-PROTEINSPIEGEL MITTELS RNA-INTERFERENZ FÜH	IRT ZU
SCHWERWIEGENDEN STÖRUNGEN DER ZELLVERMEHRUNG	
5.3 UNTERSUCHUNG VON ZELLZYKLUSPHASEN UND ZYKLIN-PROTEINSPIEGELN NACH	DER
VERMINDERUNG DER HLA-PROTEINSPIEGEL	
5.4 NACHWEIS EINER SPEZIFISCHEN FUNKTION DES LA-PROTEINS FÜR DIE AUFRECHTI	ERHALTUNG DER
Zellvermehrung	
5.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE MECHANISMEN DES LA-PROTEINS ZUR REGULATION V	ON G1-ZYKLINEN
5.6 DAS HUMANE LA-PROTEIN ALS ESSENTIELLER FAKTOR HUMANER ZELLEN	
5.7 Weiterführende Experimente	
6 ZUSAMMENFASUNG	145
7 LITERATUR	147
8 ANHANG	
8.1 Abkürzungsverzeichnis	
8.2 PLASMIDKARTE DES PSUPER-PLASMIDS ZUR EXPRESSION VON SIRNAS	

1 Einleitung

1.1 Das La-Protein: Aufbau und Vorkommen

Das humane La-Protein (auch SS-B oder La-Autoantigen genannt) wurde erstmals als Autoantigen in Patienten mit rheumatischen Erkrankungen wie Sjögrens Syndrom oder systemischem Lupus erythematodes beschrieben (9, 116). Es handelt sich um ein 47 kDa großes Phosphoprotein, welches mit einer Molekülzahl von 2 x 10⁷ pro Zelle (64) in einer Größenordnung von ribosomalen Proteinen vorliegt. Seine Verteilung ist überwiegend nukleär (79, 184, 189), jedoch in Abhängigkeit vom Zellzyklus sowohl nukleolär als auch nukleoplasmatisch (siehe 1.3.2) (40, 79, 106). Grundsätzlich führt die hohe Mobilität des La-Proteins zu diffusionsähnlichen Bewegungen innerhalb des Zellkerns (85). Ein zytoplasmatisches Vorhandensein kann sowohl durch das Auslösen von Apoptose (150) als auch durch das Eintreten eines Virus initiiert werden (70, 119). In ersterem Fall wird das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) durch eine Caspase-3ähnliche Protease abgespalten (11). Des Weiteren wurde eine Abhängigkeit der Lokalisation von der Phosphorylierung des Proteins beschrieben. Während insgesamt etwa 80% des La-Proteins in phosphorylierter Form vorliegen, existiert auch eine Fraktion von nicht-phosphoryliertem La-Protein, die unter vitalen Bedingungen sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleolus vorzufinden ist (90).

Das humane La-Protein setzt sich aus 408 Aminosäuren (aa) zusammen, von welchen sich die N-terminalen Aminosäuren 1-~200 durch eine hohe Konservierung auszeichnen (91). Der C-terminale Bereich hingegen variiert stark in seiner Länge zwischen verschiedenen Spezies. Im amino-terminalen (N-terminalen) Bereich findet sich demzufolge auch ein hochkonserviertes, ca. 60 aa großes Motiv, das sogenannte La-Motiv (aa. 16-75). Dieses Motiv trägt vermutlich zur RNA-bindenden Funktion des La-Proteins bei und wurde auch in nicht verwandten Proteinen beschrieben (109, 184). Generell wurde ein La-Protein oder ein La-Homolog u.a. in Ciliaten (2), Trypanosomen (183), Hefen (189, 190), Insekten (12), Amphibien (155) und Säugetieren (116, 175) identifiziert. Unterschiede in Größe und Aufbau zwischen den La-Proteinen verschiedener Spezies werden in Abb. 2 anhand einer Gegenüberstellung des humanen La-Proteins (siehe Abb. 1) und des in der Hefe Saccharomyces cerevisiae vorkommenden Homologs Lhp1p sowie des La-Proteins Sla1p von Saccharomyces pombe dargestellt.



Abb. 1: Aufbau des humanen La-Proteins: Das hLa-Protein besteht aus 408 aa (Größenstandard über der Struktur). Vom N-terminalen zum C-terminalen Ende finden sich folgende Motive und Domänen: La-Motiv (gelb), RRM-1/2 (<u>RNA recognition motif</u> - RNA-Erkennungs-Motiv) (rosa), Dimer - Dimerisierungs-Domäne (dunkelblau); NRE – <u>Nuclear retention signal</u> (hellgrün); NoLS - <u>Nukleolus-Lokalisierungs-Signal</u> (lila); WAM – <u>Walker-A-Motiv</u> (rot); NLS - <u>Nukleus-Lokalisierungs-Signal</u> (hellblau). Die jeweiligen Funktionen sind in der Einleitung behandelt.



Abb. 2: Schematischer Vergleich zwischen dem humanen La-Protein und den Homologen der Hefe (in Anlehnung an Übersichtsartikel (184)): hLa – humanes La-Protein, Lhp1p – La-Homolog aus *S. cerevisiae*, Sla1p- La-Homolog aus *S. pombe*. Die Anzahl der Aminosäuren unterscheidet sich zwischen hLa (408 aa), Lhp1p (275 aa) und Sla1p (298 aa). Die Unterschiede sind vor allem auf eine Verkürzung des C-Terminus zurückzuführen.

Das humane La-Protein ist im Vergleich mit den Hefe-Homologen im C-terminalen Bereich deutlich länger. Viele Veröffentlichungen zu Funktionen des La-Proteins beruhen auf Experimenten mit Hefe-La. So wird berichtet, dass in *S. cerevisiae* eine fehlende Expression von Lhp1p nur in Zusammenhang mit Mutationen in der Proteingruppe der Lsm-Proteine (für <u>Like Sm</u>) zu bedeutenden funktionellen Störungen des Zellwachstums führt (132). Eine generelle Entbehrlichkeit von Lhp1p für das Zellwachstum der Hefe wird deklariert (189), während für das humane La-Protein bislang keine veröffentlichten Daten bezüglich dessen Notwendigkeit für das Zellwachstum vorliegen. Aufgrund der Unterschiede in der C-terminalen Länge wird eine Assoziation dieses Bereichs mit zusätzlichen Funktionen diskutiert (149). Für diese These sprechen u. a. Unterschiede beim Kernimport des humanem La-Proteins und des Hefe-La, die durch unterschiedliche Domänen der Kernlokalisations-Signale evolutionär begründet sein könnten (149). Auffallend ist zudem das Fehlen des RRM-2 in Hefen, Ciliaten und Trypanosomen, welches hingegen unter Vertebraten hoch konserviert ist (diskutiert in (109). Insgesamt finden sich jedoch selbst zwischen hLa und mLa (La-Protein der Maus) trotz einer Homologie von 76,6% beinahe alle Sequenzunterschiede im Cterminalen Bereich des Proteins (175), wodurch die geringere Konservierung dieses Bereichs deutlich wird.

Die Struktur des humanen La-Proteins (siehe Abb. 1) wird von verschiedenen Domänen bestimmt, wobei die RNA-Erkennungsmotive eine besondere Stellung einnehmen. Mit einer Länge von etwa 100 Aminosäuren und dem Besitz zweier Ribonukleoprotein-Konsensus-Sequenzen (RNPs) stellen sie die funktionellen Bestandteile für die RNA-Bindung dar, einer der Hauptfunktionen des La-Proteins. Die für die RNA-Bindung essentiellen RNPs zeigen eine Hexamer- (RNP-2) und eine Oktamer-Gestalt (RNP-1) und sind durch 30 aa voneinander getrennt (62). Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Struktur von hLa lieferte die Veröffentlichung der Strukturanalyse des RRM-2 von hLa (91). Nachdem es 2004 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander gelang, mittels Röntgenkristallographie (43) bzw. NMR-Analyse (5) auch das La-Motiv und das RRM-1 des humanen La-Proteins darzustellen, konnte ein vertiefender Einblick in den Aufbau dieser Motive gewonnen werden. Obwohl somit alle bekannten RNAbindenden Motive einzeln strukturell aufgeklärt sind, fehlt die Strukturanalyse des gesamten La-Proteins in Assoziation mit einem RNA-Molekül, welche das genaue Zusammenspiel der unterschiedlichen Motive beleuchten könnte. Die Strukturanalyse des La-Motivs, welches in früheren Studien fälschlicherweise als RRM-1 oder La-Domäne bezeichnet wurde, offenbarte einen vom zentralen RRM-1 abweichenden Aufbau, der sich in einer sogenannten Winged-Helix-Turn-Helix-Faltung widerspiegelt. Diese besteht aus sechs α -Helices und einem fünfsträngigen β -Faltblatt (5). Während sich das RRM-1 durch eine klassische β 1- α 1- β 2- β 3- α 2- β 4-Struktur auszeichnet, wie sie auch in anderen RNA-bindenden Proteinen vorhanden ist (23, 125), unterscheidet sich das RRM-2 durch das Aufweisen eines fünfsträngigen anstelle eines viersträngigen β-Faltblatts von typischen RRMs (91).

Ferner weist das humane La-Protein ein im C-terminalen Bereich liegendes NLS auf, welches für die subzelluläre Lokalisation im Zellkern notwendig ist und aus aa 383-400 besteht (163). Des Weiteren konnte ein nukleoläres Lokalisations-Signal (aa-323-354) identifiziert werden (85) sowie zwei unterschiedliche Bereiche, die vermutlich notwendig sind, um das La-Protein im Zellkern zurückzuhalten (Nuclear Retention Elements - NREs) (90, 163). Auch das Vorhandensein einer Multimerisierungsdomäne wird für zwei unterschiedliche Bereiche beschrieben (aa 298-348 bzw. aa 274-291) (36, 84). Andere Studien zeigen jedoch, dass das La-Protein in Lösung keine **Dimere**/ Multimere bildet (91) und auch in lebenden Zellen eine Dimerisierung/ Multimerisierung nicht auftritt (unveröffentlichte Daten, G. Tettweiler & T. Heise, 2004). Über die Existenz eines Kernexportsignals (89) sowie eines potentiellen Walker-A-Motivs (ATPase-Motiv) wird diskutiert (175). Des Weiteren wurden mehrere Phosphorylierungsstellen beschrieben, von denen die Hauptphosphorylierungsstelle das Serin an Position 366 darstellt (21). Die Phosphorylierung erfolgt durch die Caseinkinase II und resultiert in einer Verschiebung des pH-Wertes vom basischen in den sauren Bereich (50).

1.2 Die Funktionen des La-Proteins

Während der letzten drei Dekaden wurden bereits verschiedene funktionelle Eigenschaften des La-Proteins deklariert, bewiesen oder widerlegt. Über einzelne herrscht Uneinigkeit, andere hingegen werden übereinstimmend anerkannt. So wurde die bekannteste Funktion des La-Proteins bei der Bindung und Stabilisierung von Polymerase III-Transkripten sowohl für das humane La-Protein als auch für Homologe anderer Spezies eingehend beschrieben (24, 51, 61, 88, 111, 131, 179, 189, 190). Eine der ersten vermuteten Funktionen des La-Proteins war eine Beteiligung an der Transkriptionstermination und Reinitierung der Polymerase III (50, 60, 61, 63), was im Widerspruch zu dem Befund steht, dass die Transkriptionseffizienz der Polymerase III *in vitro* nicht vom La-Protein beeinflusst wird (182).

Von potentiell großer therapeutischer Bedeutung ist der Zusammenhang des La-Proteins mit verschiedenen viralen Infektionen. Die detaillierte Aufklärung aller zellulären Funktionen des La-Proteins ist daher notwendig, bevor dieses als therapeutische Zielstruktur neuer Medikamente in Erwägung gezogen werden kann. Die Funktion des La-Proteins bei verschiedenen viralen Erkrankungen liegt nach derzeitiger Kenntnis in erster Linie in der Stabilisierung von Virus-RNA oder in der Translationskontrolle begründet. Letztere ist eine in den letzten Jahren zunehmend erwähnte, wichtige Funktion von hLa, die nicht nur für virale (35, 119), sondern auch für zelluläre RNAs (37, 81, 176) gezeigt werden konnte. Die RNA-Bindung und Stabilisierung sowie die Translationskontrolle werden in den nachfolgenden Abschnitten **1.2.1** und **1.2.2** detaillierter erklärt.

1.2.1 Bindung, Prozessierung und Stabilisierung zellulärer und viraler RNAs

Die Rolle des La-Proteins als RNA-bindendes und stabilisierendes Protein konnte in der Vergangenheit für etliche zelluläre und virale RNAs gezeigt werden. So fungiert das La-Protein in verschiedenen Spezies z.B. auch als RNA-Chaperon (RNA-bindendes "Schutzprotein") für reifende Pol III-Vorläufer-RNAs in der Zeit zwischen Synthese und Reifung als ein Bindeglied zwischen der Pol III-Termination und der posttranskriptionellen Prozessierung (109, 110, 184). Die Funktion des La-Proteins im zellulären RNA-Metabolismus besteht vornehmlich im Schutz der RNAs vor unspezifischem und verfrühtem Abbau durch Exonukleasen (98, 111). Im Kontext der RNA-Bindung spielen z.B. zelluläre RNAs wie prä-5S rRNA (147), U6 snRNA (146), Telomerase-RNA (53) und Histon-mRNA (118) eine Rolle. Es handelt sich bei den zellulären RNAs, an die das La-Protein bindet, vorwiegend um Pol III-Transkripte, die im gemeinsamen Besitz eines 3'-(UUU-OH)-Terminus sind (79, 114, 142, 147, 169), welcher eine Schlüsselrolle bei der RNA-Bindung spielt. So wurde gezeigt, dass eine aus drei oder vier Uridinen bestehende Sequenz zu einer stabileren Bindung führt als das Vorhandensein von zwei Uridinen oder einem Uridin (169). Doch auch die OH-Gruppe scheint für die RNA-Bindung wichtig zu sein, da der Austausch gegen einen Phosphatrest die Interaktion in Hefen minimiert (174, 189). Prä-tRNAs nehmen aufgrund der umfassenden Erforschung der Interaktion in diesem Zusammenhang eine hervorgehobene Position ein (51, 88, 147, 190). So konnte für verschiedene Spezies dargestellt werden, dass das La-Protein an das 3'-Ende der Vorläufer-tRNA bindet und dieses so lange vor unspezifischer Degradierung schützt, bis das 5'-Ende entfernt wurde, wodurch es zur Reifung der tRNA beiträgt (50, 51, 61, 88, 104, 190). Für das Hefe-Homolog konnte zudem gezeigt werden, dass es für eine effiziente Faltung der

prä-tRNA notwendig ist und dieser dadurch Schutz vor vorzeitigem Abbau durch RNasen verleiht (30, 190).

In der Hefe wurden zudem auch für mehrere Pol II-Produkte, prä-U1- bis U5-snRNAs sowie prä-U3-sno-RNA, Interaktionen mit dem La-Protein bestätigt (98, 187). In diesen Publikationen wurde gezeigt, dass die 3'-Enden dieser Vorläufer-RNAs nach RNase III-Verdau ebenfalls polyuridiniert sind. Durch die Bindung des La-Proteins wird in diesem Fall die Reifung der Vorläufer-RNAs verlangsamt. Es wird diskutiert, dass dieser Vorgang somit der Kontrolle der Qualität dient (98).

Des Weiteren tritt das La-Protein als ein Faktor auf, der RNAs in einer bestimmten Struktur hält, um sie so für weitere Prozessierungen zugänglich zu machen (51, 131). Auch das Zurückhalten von RNAs im Kern wurde beschrieben, welches entweder ebenfalls dazu beiträgt, den Fortlauf der Prozessierung zu garantieren und die RNA für den Weitertransport in andere Zellregionen bereitzustellen (18, 65, 66, 164) oder einen Einfluss auf die Bildung von Ribonukleoproteinkomplexen ausübt (131).

Die bereits erwähnte Bindung von Polymerase III-Transkripten wird durch das La-Motiv und das RRM-1 des La-Proteins vermittelt. Das La-Motiv allein ist jedoch für die Stärke der Bindung nicht ausreichend (61), scheint aber für die Erkennung des 3'-(UUU-OH)-Motivs wichtig zu sein (51, 61), sowie die Spezifität der Bindung zu erhöhen (109). Hingegen ist das RNP-2 des RRM1 essentiell für die RNA-Bindung, so dass eine Deletion von nur 6 Aminosäuren bereits zum vollständigen Verlust der Bindefähigkeit führt (85). Die Faltung des La-Motivs und des RRM-1 erfolgt unabhängig voneinander. Eine Interaktion beider Domänen ist in Abwesenheit einer RNA nicht nachweisbar. Im Falle einer RNA-Bindung könnten beide Domänen jedoch eine Tasche bilden, in welcher die Bindeoberflächen in Kontakt mit den jeweils gegenüberliegenden Seiten der Uridin-Sequenz stehen (5, 43). Die Rolle des Cterminalen RRM-2 ist nicht vollständig geklärt, eine Modulierung der RNA-Bindung wird allerdings vermutet, da das Anfügen dieses RRMs an das La-Motiv die Bindung des La-Proteins an Polyuridin verringert (128).

Neben 3'-(UUU-OH)-Transkripten werden jedoch auch RNAs vom La-Protein gebunden und stabilisiert, die diese Uridin-Sequenz nicht enthalten (65). Unter diesen bilden v.a. virale RNAs eine große Gruppe. Bei den ersten viralen RNAs, für die eine Bindung mit La beobachtet wurde, handelt es sich um die sog. EBER-RNAs des Epstein-Barr Virus (EBV) (102). Jedoch konnten Interaktionen in den folgenden Jahren für eine Vielzahl viraler RNAs nachgewiesen werden. So konnte z.B. für die

Vermehrung des Hepatitis B Virus das La-Protein als beteiligtes Protein identifiziert werden. Diese Erkenntnis beruht auf der Entwicklung eines Hepatitis B Virus (HBV)transgenen Mausmodells, welches Viruspartikel produziert (33). So wurde in weiterführenden Studien mit dem Ziel der Untersuchung der Immunpathogenese gezeigt, dass durch die Injektion von zytotoxischen T-Lymphozyten, die HBV-Oberflächenantigene spezifisch erkennen, die HBV-Genexpression und Replikation inhibiert wurde (68, 69), wobei es sich um einen nicht-toxischen, Zytokin-vermittelten Prozess handelt, der von der Sekretion von γ-Interferon und Tumor-Nekrose-Faktor α abhängt (69). Dadurch wurde ein post-transkriptioneller Mechanismus aktiviert, der zum Abbau der viralen RNA führte (67, 177). Eine Beteiligung zellulärer Faktoren wurde vermutet und führte nach weiteren Untersuchungen in Maus-Kernextrakten zur Identifikation des La-Proteins als HBV-RNA-bindendes Protein (77, 78). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass mit der induzierten Verminderung der Virus-RNA das Auftreten kleinerer mLa-Fragmente sowie eine erhöhte endoribonukleolytische Aktivität einhergingen (77, 78), wodurch die Annahme gestützt wurde, dass das La-Protein durch die Bindung an die HBV-RNA diese stabilisiert. Des Weiteren konnte die Region bestimmt werden, in der das La-Protein an die HBV-RNA bindet. Die computergestützte Strukturvorhersage ergab eine Haarnadelschleife im Bereich der La-Bindungsstelle (78). Es konnte gezeigt werden, dass die endoribonukleolytische Spaltung der HBV-RNA in der Nähe der La-Bindungsstelle erfolgt, weshalb angenommen wird, dass das La-Protein die HBV-RNA schützt, indem es durch seine Bindung Spaltstellen "maskiert". Für die Bindung der HBV-RNA ist insbesondere das bereits erwähnte RNP-2 des RRM1 notwendig, dessen Deletion zum Verlust der Bindung führt (84). Neueste Arbeiten lieferten zudem den Beweis einer direkten Interaktion zwischen hLa und HBV-RNA in humanen Hepatomazellen, welche wahrscheinlich die Stabilität der HBV-RNA positiv reguliert, da die Mutation der La-Bindestelle in der HBV-RNA zu einer deutlich verkürzten Halbwertszeit führt (46). Auch wurde vermutet, dass möglicherweise weitere zelluläre Faktoren eine Bindung des La-Proteins an die HBV-RNA modulieren. So konnte mit PSF (PTB-assoziierter Spleiß-Faktor) ein neuer Interaktionspartner des humanen La-Proteins identifiziert werden, der möglicherweise um die Bindungsstelle konkurriert (unveröffentlichte Daten, G. Tettweiler & T. Heise, 2004).

1.2.2 Das La-Protein und seine Funktion bei der Translation von mRNAs

Eine Vielzahl von Studien schreibt dem La-Protein eine Rolle bei der Translation verschiedener viraler und zellulärer RNAs zu. Die erste Beschreibung dieser Funktion erfolgte aufgrund des Befundes, dass hLa durch UV-Crosslink-Experimente an ein Fragment der 5'-nichttranslatierten Region der Poliovirus-RNA bindet (119). In diesem Fall wird die Translationskontrolle über die Bindung von hLa an ein sogenanntes IRES-Element (internal ribosome entry site) der Virus-RNA ausgeübt (170). Bei der IRESvermittelten Translationskontrolle Hilfe La-Proteins wird mit des die Translationsmaschinerie zum internen Initiationscodon der mRNA rekrutiert, wodurch die Proteinsynthese stattfinden kann (112). So spielt das La-Protein in der Poliovirus-Infektion eine Rolle, indem es an das IRES-Element des Poliovirus bindet und dadurch die Translation der Virus-RNA verstärkt (119, 170). Umgekehrt resultiert die Depletion des La-Proteins sogar in einer dramatischen Verringerung der Poliovirus-Translation (35). Eine weitere IRES-abhängige Translationskontrolle liegt im Fall des Hepatitis C Virus (HCV) vor. Hier wurde zunächst eine Interaktion mit der 5'-nichttranslatierten Region der Virus-RNA beschrieben, die zu einer Stimulation der Translation führt (6, 7, 35, 137). Eine Ausweitung der Bedeutung von hLa für die HCV-Infektion erfolgte zudem, als gezeigt wurde, dass es zusätzlich an die 3'-nichttranslatierte Region der Virus-RNA bindet und diese stabilisiert (167). Zudem wurde aufgrund eines Phagen-Displays eine Protein-Protein-Interaktion zwischen hLa und dem viralen Protein NS5A von HCV beschrieben (86).

Auch für das Humane Immundefizienz Virus (HIV) wurde ein Einfluss des La-Proteins auf translationeller Ebene beschrieben. Dieser wird durch das Binden von hLa an eine Struktur im 5'-Ende der mRNA induziert. Diese Struktur, das sog. TAR-Element (TAR – <u>trans activation response</u>), welches allen HIV-Transkripten gemein ist, besteht aus 111 nt, die eine Translations-inhibierende Sekundärstruktur aufweisen (135). Zudem besitzt es eine hochaffine Bindungsstelle für das La-Protein. Durch die Bindung des La-Proteins wird dessen Sekundärstruktur verändert und somit die Translation der nachfolgenden Leseraster erleichtert (31).

Generell kann dem La-Protein bei einer Vielzahl verschiedener viraler Erkrankungen eine dem Virus zuträgliche Position zugesprochen werden. Es trägt dabei entweder durch RNA-Stabilisierung oder Translationskontrolle zur Aufrechterhaltung von Virus-Infektionen bei. Offensichtlich sind die Funktionen des La-Proteins von seiner Lokalisation abhängig. Da die Translation im Zytoplasma stattfindet und eine Rolle des La-Proteins bei der Translation somit eine zytoplasmatische Fraktion erfordert, ist es nicht verwunderlich, dass es in Polio-Virus-infizierten Zellen, ausgelöst durch eine Virus-kodierte Protease, zu einer (verstärkten) zytoplasmatischen Lokalisation von hLa kommt (119, 162).

Ein weiterer Mechanismus der Translationskontrolle durch das La-Protein konnte im Zusammenhang mit einer Gruppe zellulärer mRNAs, sog. 5'-TOP-mRNAs (mRNAs mit einer terminalen Oligopyrimidinsequenz am 5'-Ende), beschrieben werden. Diese mRNAs kodieren für ribosomale und andere Proteine, die für den Translationsapparat wichtig sind. Sie werden in Abhängigkeit vom Zellwachstum auf der translationellen Ebene reguliert und zeigen in Zellzyklus-arretierten Zellen eine verminderte Assoziation mit Polyribosomen ((10), Übersichtsartikel (121)). Initial konnte in *Xenopus*-Extrakten eine Bindung des La-Homologs an die 5'-Top-Region der mRNA des ribosomalen Proteins L4 gezeigt werden, die in Interaktion mit dem Ro60 Autoantigen stattfindet (138). Zwei Jahre später gelang es der gleichen Forschergruppe, die *in vitro*-Experimente *in vivo* zu bestätigen (37). Die beschriebene Interaktion wird von nicht-phosphoryliertem La-Protein eingegangen, welches im Zytoplasma lokalisiert ist (90).

Des Weiteren unterstützt das La-Protein die Translation der *Mdm2*-mRNA in Assoziation mit dem Fortschritt der chronischen myelogenen Leukämie (CML). MdM2, eine Ubiquitinligase, die den Abbau des Tumorsuppressors p53 bewirken kann (82), wird hier durch das Binden des La-Proteins an eine 27 nt lange Sequenz in einer interzistronischen Region der mRNA translationell hochreguliert. Zudem konnte in diesen Zellen ein erhöhter hLa-Proteinspiegel im Zusammenhang mit der Überexpression von MDM2 und der Expression von BCR/ABL-Onkoproteinen detektiert werden (176). Dieser Befund stellt insofern eine Besonderheit dar, da es sich um die erste zelluläre RNA in Zusammenhang mit der Translationskontrolle durch das La-Protein handelt, die sich weder durch den Besitz eines IRES-Elements, noch einer terminalen Oligopyrimidin-Sequenz auszeichnet.

Ein weiteres Beispiel einer zellulären RNA, deren Translation durch das La-Protein moduliert wird, konnte erbracht werden, indem gezeigt wurde, dass das La-Protein die Translation der XIAP-mRNA (<u>X-linked inhibitor of apoptosis</u>) fördert (81). Diese Stimulation erfolgt ebenso wie bei der Polio-Virus-RNA und anderen viralen RNAs über die Bindung des La-Proteins an ein IRES-Element. Da das La-Protein während der

Apoptose durch Abspaltung des Kernlokalisierungssignals im Zytoplasma relokalisiert (150), erscheint ein Bezug zur Regulation der Translation in diesem Zusammenhang naheliegend.

Ebenfalls von Interesse im Kontext der Translationsregulation ist der Befund, dass die mRNA des La-Proteins selbst ein funktionelles IRES-Element aufweist. So konnten alternative Isoformen der La-mRNA in humanen Lymphozyten beschrieben werden, die exprimiert werden, wenn eine *Cap*-abhängige Translation unmöglich ist (*Cap* - 5'-*Cap*-7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende) (28). Es wird daher in Betracht gezogen, dass die Translation des La-Proteins unter bestimmten schädlichen Bedingungen wie Virusinfektion, Entzündung oder Apoptose einer Autoregulation unterliegen könnte (28).

Die Frage nach einer generellen Rolle des La-Proteins bei der Translation hingegen scheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht eindeutig zu beantworten (diskutiert in (184)). Während in den letzten Jahren zunehmend Nachweise für eine translationsfördernde Funktion des La-Proteins bezüglich spezifischer viraler und zellulärer RNAs erbracht wurden, akkumulierten im erweiterten Zusammenhang teilweise konträre Ergebnisse. Einerseits wurde gezeigt, dass das La-Protein mit den ribosomalen 40S Untereinheiten sedimentiert, an 18S rRNA bindet (136) und durch UV-Crosslink an das Startcodon AUG in einer umgebenden Kozak-Sequenz gebunden wird (117). Andererseits konnte jedoch in Kaninchen-Reticulozyten-Lysaten keine Startcodon-Auswahl bestätigt werden (117). Auch die Beobachtung einer verringerten Translation von 5'-*Cap*-mRNAs nach Zugabe großer Mengen von La oder PTB (Pyrimidin-<u>T</u>rakt-<u>B</u>indeprotein) zu Retikulozyten-Lysaten (171) spricht gegen eine allgemeine Funktion. Andererseits wird die Wahrscheinlichkeit einer generellen Funktion durch die Interaktion des La-Proteins mit der 5'-TOP-Region des eukaryotischen Elongationsfaktors 1- α sowie ribosomaler Proteine erhöht (26, 37).

1.3 Überblick über den eukaryotischen Zellzyklus

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Verminderung des hLa-Proteinspiegels durch den Einsatz der RNA-Interferenz zu Zelldefekten führt. Daher wurden die Auswirkungen einer Reduktion des hLa-Proteinspiegels auf die Überlebensund Wachstumsfähigkeit humaner Zellen untersucht. An dieser Stelle soll daher zum besseren Verständnis ein Überblick über den eukaryotischen Zellzyklus gegeben



werden. Eine Übersicht über die verschiedenen Zellzyklusphasen wird in Abb. 3 dargestellt.

Abb. 3: Schematische Darstellung des eukaryotischen Zellzyklus: Der Wachstumszyklus von eukaryotischen Zellen wird in die Interphase und die Mitose unterteilt. Die Interphase setzt sich aus der G1-Phase, der S-Phase (DNA-Synthese) und der G2-Phase zusammen. Die Mitose wird in eine Kernteilungsphase und eine Zytoplasmateilungsphase untergliedert.

Zellen entstehen in einem zyklischen Prozess von Wachstum und Teilung. Grundsätzlich kann der Zellzyklus in zwei Hauptphasen eingeteilt werden: Die Interphase und die M-Phase (Teilungsphase). Die Interphase besteht aus der G1-Phase (*Gap*1-Phase), der S-Phase und der G2-Phase (*Gap*2-Phase), während die M-Phase sich aus einer Kernteilungs- und einer Zytoplasmateilungsphase zusammensetzt. Die Dauer der einzelnen Phasen variiert je nach Zellinie stark. Zellen, die nicht aktiv proliferieren, aber das Potential zur Zellteilung besitzen, verharren in einer konstanten G1-ähnlichen Phase, der sog. G0-Phase (siehe Übersichtsartikel (154)). Aus dieser können sie bei entsprechender Stimulation wieder austreten und damit den Zellzyklus erneut begehen. Ob eine Zelle proliferiert oder den Zellzyklus verlässt, entscheidet sich am Restriktionspunkt, einem von mehreren Kontrollpunkten des Zellzyklus, der zeitlich einen Punkt der späten G1-Phase beschreibt (74, 134). Die Entscheidung wird überwiegend durch extrazelluläre Signale bestimmt, die in der G1-Phase auf die Zelle einwirken (siehe Übersichtsartikel (133)). Kontrovers dazu ist jedoch die Meinung, dass die Existenz eines Restriktionspunkts im Zellzyklus nicht eindeutig belegbar ist und Termini wie "G1-Arrest" oder "G0-Phase" häufig falsch angewendet werden, da Zellen mit einem G1-Phasen-DNA-Gehalt hinsichtlich anderer Parameter dennoch große Unterschiede zeigen können und nicht zwangsläufig synchron den Zellzyklus beschreiten (34).

1.3.1 Die G1-Phase und G1-Zykline

Der gesamte Zellzyklus wird von einer Vielzahl verschiedener Regulatoren gesteuert, welche zusammen das Zellzyklus-Kontrollsystem bilden. Ein zentraler Bestandteil dieses Systems sind die Zykline und Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdks- <u>Cyclin-dependent kinases</u>) (siehe Übersichtsartikel (123, 133, 154, 160, 161)). Ihr Name ist auf den Befund ihrer zyklischen Expression während des Zellzyklus zurückzuführen (139). Sie sind essentiell für die Aktivierung der Cdks, da sie mit ihnen Komplexe eingehen und dadurch einen aktivierten Status vermitteln. Aufgrund der zyklischen Expression der jeweiligen Zykline ist die Aktivierung der verschiedenen Cdks nur zu definierten Zeitpunkten während des Zellzyklus möglich. Die Katalyse der Zellteilung erfolgt durch die Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten durch aktivierte Cdks (zusammengefasst in (123, 154, 160, 161). Neben Zyklinen und Zyklin-abhängigen Kinasen gehören jedoch diverse andere Proteinfamilien zu den Kontrollbestandteilen des Zellzyklus, von denen einigen zudem eine hohe Relevanz in der Onkologie zugesprochen wird, wie z.B. dem Retinoblastoma-Protein (pRb), dem Tumorsuppressor p53 und Mdm2.

Innerhalb der verschiedenen Zellzyklusphasen spielen unterschiedliche Zykline eine Rolle. So sind D-Typ-Zykline (D1-D3) und E-Typ-Zykline (E und E2) mit der G1-Phase assoziiert (96, 103, 122, 161, 186, 192), wobei Zyklin D1 und Zyklin E hervorgehobene Rollen spielen. Während Zyklin D1 für das Fortschreiten der G1-Phase sorgt, unterstützt Zyklin E den Eintritt in die S-Phase und wird somit beiden Phasen zugeordnet. Zyklin A hingegen wird vom Beginn der S-Phase bis zur frühen Kernteilungsphase benötigt. Zyklin B ist vor allem während der Kernteilungsphase notwendig (siehe Übersichtsartikel (154)). Während in embryonalen Zellen die DNA-Replikation direkt nach dem Verlassen der Kernteilung (Mitose) beginnt, tritt in postembryonalen Zellen die G1-Phase dazwischen. Diese könnte entstanden sein, um den rapiden Fortschritt des Zellzyklus aufzuhalten. G1-Zykline wären demzufolge notwendig, um die daraus resultierende Inhibition wiederum zu überwinden (diskutiert in (123)). D-Typ-Zykline dienen als Sensoren für Wachstumsfaktoren (Mitogene) und sind demnach in Mitogen-unabhängigen Zellzyklen wie der Embryogenese von *Xenopus* und *Drosophila* nicht vorzufinden. Die Synthese von Zyklin D1 erfolgt transkriptionell über Wachstumssignal-Kaskaden wie Ras/ Raf, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen und extrazelluläre Signal-regulierte Proteinkinasen (4, 32, 115, 181). Der proteolytische Abbau von Zyklin D1 erfolgt bei einer Halbwertszeit von ~30 min sehr schnell (20, 42). Die zyklische Expression von Zyklin D1 und infolgedessen Zyklin E geht mit einer transkriptionellen Regulation und einem regulierten Abbau einher, der in Abhänigigkeit vom Ubiquitinylierungsstatus geschieht (38, 123).

Worin besteht nun der Zusammenhang zwischen Zyklin D1 und Zyklin E sowie dem Fortschreiten des Zellzyklus? Um einen besseren Überblick über die komplexen Zusammenhänge zu erreichen, soll an dieser Stelle ein vereinfachtes Schema des Zyklin D1/ pRb-Weges gezeigt werden, der den Übergang von der G1- in die S-Phase einleitet (siehe **Abb. 4**).



Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung des G1/S-Übergangs (in Anlehnung an (123, 156)): Durch Mitogen-Stimulation erfolgt durch transkriptionelle Regulation die Synthese von Zyklin D1. Es kommt zur Komplexbildung mit Cdk4, was die Phosphorylierung von Rb zur Folge hat. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor E2F aktiviert, Zyklin E und Zyklin A werden synthetisiert und bilden Komplexe mit Cdk2. Der Eintritt in die S-Phase wird durch das Ablesen entprechender S-Phase-Gene initiiert, es kommt zur DNA-Replikation. Eine Regulation erfolgt desweiteren über Cip/Kip-Proteine (Cip – <u>Cyclin inhibitor protein</u>, Kip – <u>Kinase inhibitor protein</u>. Der Zyklin E/Cdk2-Komplex trägt ebenfalls zur weiteren Phosphorylierung von Rb bei.

Nach der Synthese von Zyklin D1 durch Mitogen-Stimulation erfolgt die Komplexbildung mit den Zyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (siehe Übersichtsartikel (159)). Die Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins, welches seine wachstumshemmende Funktion dadurch verliert (49, 93, 115). Nicht phophoryliertes Rb blockiert die Transkription von Genen durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Durch die Phosphorylierung werden diese Interaktionen zerstört und die E2F-Proteine können ihre Funktion als transkriptionelle Aktivatoren ausüben (73). Zu den Genprodukten der E2F-Familie gehört u. a. Zyklin E (55), welches im Komplex mit der zugehörigen Kinase Cdk2 (97) seinerseits in Kollaboration mit Zyklin D1/Cdk4/6 zur weiteren Rb-Phosphorylierung beiträgt (76,

107). Daraufhin beginnt der Übergang in die S-Phase, Zyklin E wird degradiert und durch Zyklin A ersetzt.

Ein wichtiger Zusammenhang besteht zudem zwischen G1-Zyklinen und der Entstehung von Tumoren. So konnten verschiedene Defekte bezüglich des G1/S-Übergangs in Verbindung mit Tumorgenese und Malignität entarteter Zellen gebracht werden (14, 58, 95). Eine Überexpression von Zyklin E wurde z.B. mit dem Auftreten von Tumoren in Brust, Darm, Blase, Haut u.v.a. assoziiert (94, 145, 172, 188). Das Zyklin D1 kodierende Gen *PRAD1* wurde sogar explizit im Zusammenhang mit Parathyroidtumoren aufgefunden (122). Auch hier wurde in diversen Tumorgeweben von einer Überexpression berichtet (3, 54, 113, 127, 193). Somit sind Zyklin E und Zyklin D1 nicht nur für das normale Fortschreiten des Zellzyklus wichtig, sondern verfügen auch über eine hohe onkologische Relevanz.

1.3.2 Das humane La-Protein im Zellzyklus

Zwar wurde bislang keine eindeutige Funktion des humanen La-Proteins in der Zellvermehrung humaner Zellen gezeigt, doch gibt es Hinweise, die einen Zusammenhang zwischen dem La-Protein und einer Zellzyklusregulation implizieren. So wurde beispielsweise von einer Zellzyklusphasen-abhängigen, subzellulären Lokalisation berichtet. Demnach ist in synchronisierten Zellen eine nukleoplasmatische Lokalisation in der G0-Phase, der späten S-Phase, der G2- und der M-Phase zu beobachten, während eine nukleoläre Akkumulation in der späten G1- und/oder der frühen S-Phase festgestellt werden kann (40). Da folglich die Lokalisation des La-Proteins zeyllzyklusabhängig ist, wäre es auch vorstellbar, dass umgekehrt bestimmte Aspekte des Zellzyklus vom La-Protein und/ oder dessen Lokalisation abhängig sind.

Ein weiterer Zusammenhang wurde mit dem Befund hergestellt, dass die Überexpression des humanen La-Proteins die Länge von Telomeren *in vivo* verkürzt (53). Telomere (Chromosomen-Enden bestehend aus kurzen repetitiven DNA-Sequenzen) werden in gesunden, nicht transformierten Säugetier-Zellen mit jeder Zellteilung verkürzt (180), bis bei einer bestimmten Länge ein Signal für einen Wachstumsarrest aktiviert und die Zellteilung unterbunden wird (8, 185).

Ein weiterer für den Zellzyklus relevanter Zusammenhang besteht in der Interaktion des La-Proteins mit 5'-TOP-mRNAs (siehe **1.2.2**). Hier erleichtert es durch die Bindung an eine terminale Oligopyrimidinsequenz die Initiation der Translation (26, 37). Diese

RNA-Gruppe kodiert vor allem für ribosomale und für die Translation relevante Proteine wie Elongationsfaktoren und wird selbst translationell in Abhängigkeit vom Zellwachstum reguliert, indem durch Wachstumsstimuli eine erhöhte Syntheserate beobachtet wird, während eine translationelle Verminderung durch Wachstumsarrest ausgelöst wird ((10) u. Übersichtsartikel (121)).

1.4 RNA-Interferenz-Technik

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) als grundlegendes Element zur Untersuchung angewandt wurde, wird an dieser Stelle eine Einführung in den Mechanismus und die Etablierung der Methode gegeben.

Es handelt sich bei der RNA-Interferenz um einen post-transkriptionellen Mechanismus auf der Ebene der Genrepression, der sowohl natürlicherweise vorkommt als auch in den letzten Jahren verstärkte Anwendung in der Forschung gefunden hat. Die natürliche Funktion des Mechanismus besteht vermutlich im Schutz des Genoms gegen mobile genetische Elemente wie Viren, Transposons etc. (siehe Übersichtsartikel (1, 16, 158)). Die zufällige Entdeckung des Mechanismus basiert auf einem Versuch zur Herstellung transgener Pflanzen (Petunien), bei dem ein Genexpressions-Verlust bemerkt wurde (126). Dieser Mechanismus wird in Pflanzen als PTGS (posttranscriptional gene silencing) bezeichnet. In tierischen Organismen konnte die RNA-Interferenz zuerst in C. elegans nachgewiesen werden (52), wurde aber später in vielen anderen Spezies erfolgreich angewandt. Ihr Einsatz in Säugetierzellen, speziell in humanen Zellen, wurde 2001 erstmals durchgeführt (72). Revolutionär daran war, dass durch das Verwenden kurzer dsRNAs die Interferon-Antwort in Säugetierzellen vermieden wurde (168), die beim Einbringen längerer dsRNAs (über 30 nt) normalerweise ausgelöst wird. Allerdings gibt es inzwischen Hinweise, dass auch kürzere dsRNAs unspezifische Effekte auslösen können (165). Obwohl in den letzten Jahren dank dieser Technik revolutionäre Fortschritte in der funktionellen Genforschung erzielt werden konnten, muss die Interpretation der Daten stets durch gezielte Kontrollen überprüft werden. Besondere Vorsicht ist demzufolge bei der Vorbereitung einer therapeutischen Anwendung geboten, wie z.B. der Unterdrückung viraler Infektionen (59, 92).

Bei der Anwendung der RNA-Interferenz (RNAi) in der Säugetierzellkultur werden 21-22 nt lange *small interfering* RNAs (siRNAs), deren 3'-Enden einen Überhang aus 2 nt aufweisen und deren Sequenz einer Region von 19 nt der mRNA des zu reprimierenden Proteins homolog ist, in Zellen eingebracht (48). Normalerweise erfordert die Prozessierung längerer dsRNAs zu siRNAs zunächst die Beteiligung einer RNAse IIIähnlichen Endonuklease, des *Dicer*-Enzyms (15, 124, 140). Daraufhin wird ein aktiver RNAi-spezifischer Proteinkomplex gebildet (RISC – <u>RNA induced silencing complex</u>), der in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert wird und den *antisense*-Strang der siRNA exponiert ((71, 191) u. diskutiert in (1, 29)) Durch die Anlagerung der siRNA des Komplexes an eine komplementäre mRNA-Sequenz wird die mRNA geschnitten und wahrscheinlich durch Exoribonukleasen degradiert. Es existieren verschiedene Modelle über die exakten molekularen Vorgänge der RNA-Interferenz. Ein vereinfachtes Modell der RNA-Interferenz ist in **Abb. 5** dargestellt.



Abb. 5: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (in Anlehnung an (1)): Die doppelsträngige RNA wird in der Zelle mit Hilfe von Dicer zu 21-22 nt langen siRNA-Molekülen umgewandelt, die sich durch 3'-Desoxy-Überhänge und 5'-Phosphatgruppen auszeichnen. Es wird eine Bindung mit einem Nuklease-Komplex (RISC) eingegangen. Unter ATP-Verbrauch wird ein aktiver siRNP-Komplex gebildet, der den *antisense*-Strang der siRNA exponiert, die Rolle des *sense*-Strangs ist unklar. Durch Anlagerung an die entsprechende mRNA-Sequenz wird die endonukleolytische Spaltung initiert. Vermutlich kommt es danach zu weiteren exonukleolytischen Spaltungen. In der Zellkultur kann die Erkennung durch den RISC-Komplex von der Prozessierung der dsRNA entkoppelt werden, indem 21-22 nt lange siRNAs verwendet werden (48).

1.5 Aufgabenstellung

Das La-Protein ist durch seine Funktion als RNA-Wechselwirkungspartner an einer großen Anzahl zellulärer Prozesse beteiligt und interagiert zudem mit verschiedenen viralen RNAs, wie z.B. der des Hepatitis B Virus. Um das La-Protein als möglichen Ansatzpunkt zur Etablierung antiviraler Strategien verwenden zu können, ist es notwendig, dessen zelluläre Funktionen detailliert zu verstehen. Bislang wurden keine Daten veröffentlicht, die die Frage klären, ob das humane La-Protein zur Aufrechterhaltung der Zellvermehrung und der Viabilität humaner Zellen benötigt wird. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Auswirkungen ein Defizit oder das vollständige Fehlen des humanen La-Proteins in humanen Zellkulturen hat. Zu diesem Zweck sollte experimentell erforscht werden, ob die Methode der RNA-Interferenz zur nachweislichen Reduktion der La-Proteinspiegel in humanen Zellen führt. In diesem Zusammenhang sollten verschiedene Zellinien mittels RNA-Interferenz-Technik behandelt werden und bezüglich der Wachstums- und Überlebensfähigkeit in Abhängigkeit von der La-Proteinexpression untersucht werden. Die eventuell beobachteten Effekte auf die Zelle sollten weiterführend durch geeignete zellbiologische Methoden untersucht werden, um eine potentielle Rolle des La-Proteins für die Zellvermehrung zu erkennen. Die Erforschung der molekularen Ereignisse nach der Reduktion der La-Proteinexpression sollte zudem Erkenntnisse liefern, auf welcher Ebene das La-Protein gegebenenfalls in den Zellzyklus eingreifen könnte. Zusätzlich sollte die Spezifität der beobachteten Mechanismen sichergestellt werden. Dafür sollte ein La-Protein exprimiert werden, welches aufgrund von stillen Mutationen der kodierenden Plasmid-Sequenz nicht von der Reduktion durch RNA-Interferenz betroffen wird. Dieses sollte in Zellen mit verminderten endogenen La-Proteinspiegeln eingebracht werden, um zu untersuchen, ob eventuell beobachtete Zellzyklus-abhängige Effekte dadurch vollständig oder partiell aufgehoben werden können.

Um die Rolle des humanen La-Proteins für die Stabilisierung der HBV-RNA zu untersuchen, sollte die Methode der RNA-Interferenz in humanen Leberzellen, die das Virus synthetisieren, angewandt werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob die Reduktion humaner La-Proteinspiegel zu einem verminderten RNA-Spiegel der HBV-Transkripte führt.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) Aceton Agarose Ammoniumperoxodisulfat (APS) Ampicillin-NaCl Arginin Bactoagar Bromphenolblau Zykloheximid DEPC Dimethylsulfoxid (DMSO) DMEM Ethidiumbromid FCS (fötales Kälberserum) Guanidinium-Chlorid Glutamin Kanamycin-Sulfat Mineralöl MOPS Moviol Natriumdodecylsulfat (SDS) Neomycin (G418) NP-40 Penicillin/Streptomycin Phenol Poinceau S Protease-Inhibitor Complete [™] Pyruvat	Biozym Merck Difco Merck Serva Sigma Difco Merck Merck Serva Sigma Gibco Roche Gibco Serva Gibco Serva Gibco Serva Sigma Biometra Sigma Biometra Sigma Serva Gibco Sigma Gibco Serva Gibco Serva Gibco Serva Gibco Serva Gibco Serva Sigma Biometra Sigma Biometra Sigma Biometra Sigma Gibco Sigma Serva Sigma Serva Sigma Serva Sigma Serva Sigma Serva Sigma Serva Sigma Sigma Serva Serva Se
Penicillin/Streptomycin	Gibco; Biochrom AG
Poinceau S	Fluka
Protease-Inhibitor Complete [™] Pyruvat Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Boehringer/Roche Gibco Sigma
Sequagel-XR, Puffer & Acrylamidlösung TEMED Tris	National Diagnostics Serva ICN
Triton X-100 Tween-20-Lösung	Serva Serva
Xylencyanol	Fluka

2.2 Verbrauchsmaterialien

96-well-Reaktionsplatten Blottingpapier Cryoröhrchen Eppendorf-Reaktionsgefäße G25/50-spin columns GF/C-Rundfilter Falcon BioRad Nunc Eppendorf Amersham-Pharmacia Whatman Hybond-N+ Nylon-Transfer-Membran Kanülen Nitrozellulosemembran Protran BA Objektträger und Deckgläser Röntgenfilm, Medical X-Ray-Film Spritzen Ultrazentrifugenröhrchen Whatman-Papier Zellkultur-Flaschen, 250ml / 75 cm2 Zellkultur-Platten (*well plates*) Amersham-Pharmacia Braun Schleicher & Schuell Elka Fuji Braun Beckman Whatman Greiner Greiner

2.3 Gebrauchsfertige Lösungen und Reagenziensätze (Kits)

BioRad
Qiagen
Promega
Roche
Merck
Invitrogen
Gibco
Qiagen
Qiagen
Roche
Promega
MWG Biotech
Ambion
Pierce
Roche
Roche

2.4 Enzyme

DNase, RNase-frei	Promega
DNA-Ligase	Roche
Lysozym	Serva
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Pwo DNA-Polymerase	Roche
Restriktionsenzym DpnI	New England Biolabs
Restriktionsenzym EcoRI	Amersham Pharmacia
Restriktionsenzym HindIII	MBI
Restriktionsenzym Sall	MBI
Restriktionsenzym XhoI	New England Biolabs
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega
RNase A	Promega
Shrimps alkalische Phosphatase	Roche
T4 Polynukleotid-Kinase	Roche
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
T7 RNA-Polymerase	Promega
•	-

2.5 Größenstandards

DNA Größenstandard Smart Prestained Proteinmarker broad-range	Eurogentec New England Biolabs
2.6 Antikörper	
Primäre Antikörper:	
α-Zyklin A-Antikörper, monoklonal α-Zyklin D1-Antikörper, monoklonal	BD, PharMingen Santa Cruz Biotechnologies, Sigma
 α-Zyklin E-Antikörper, monoklonal α -hLa-Antikörper 3B9 (Maus Hybridoma, IgG-2A), monoklonal 	Santa Cruz Biotechnologies s.u.
α -hLa-Antikörper SW5 (Maus Hybridoma, IgG-2A), monoklonal	Freundlichst zur Verfügung gestellt durch M. Bachmann, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA
α-PhoH3-Antikörper (Mitosemarker), polyklonal α-Tubulin α-Antikörper, monoklonal	Upstate Signal Solutions Sigma
Sekundäre Antikörper:	
DAPI Kernfärbung FITC-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Maus,	Hoechst Molecular Probes
Meerettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper, Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova
Meerettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper, Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Dianova
Rhodamin-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Maus, Alexa-Fluor 594	Molecular Probes

2.7 Plasmide

Clontech, BD Biosciences
Clontech, BD Biosciences
freundlichst zur Verfügung
gestellt durch T.R.
Brummelkamp, The
Netherlands Cancer Insitute,
Amsterdam, Niederlande
freundlichst zur Verfügung
gestellt durch R. Weinberg,

	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA USA
pEGFP-C1-hLa-WT	in der Arbeitsgruppe vorhanden
pEGFP-C1-hLa-Del.2	in der Arbeitsgruppe vorhanden
pEGFP-C1-hLa-Del.6	in der Arbeitsgruppe vorhanden
pEGFP-C1-hLa-Del.6.3	in der Arbeitsgruppe vorhanden
pEGFP-C1-hLa-Del.7	in der Arbeitsgruppe vorhanden
pBSK-GAPDH	in der Arbeitsgruppe vorhanden

2.8 Bakterienstämme und Zellinien

Bakterienstamm zur Transformation
humane Hepatoma-Linie, stabil mit
HBV transfiziert, Neomycin-
resistent (157)
humane Hepatoma-Linie
humane Osteosarkoma-Linie
humane Cervix-Karzinoma-Linie

2.9 Bakterien- und Zellkultur-Medien

StandardI-Medium (E. coli):	6 g NaCl
	15 g Pepton
	3 g Hefeextrakt
	1 g D(+)-Glucose
	ad 1000 ml H ₂ O

autoklavieren

StI-Agarplatten (E. coli):

StI-Medium mit 1,5% (w/v) Bacto Agar

autoklavieren

Vor dem Gießen der Platten wurde das Medium auf etwa 40°C abgekühlt und das Antibiotikum (wenn nötig) hinzugefügt. Die Antibiotika wurden für Nährböden und Flüssigkulturen in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml Ampicillin bzw. 30 μ g/ml Kanamycin für die Anzucht resistenter Bakterien-Stämme eingesetzt. Agarplatten wurden im Dunkeln bei 4°C gelagert.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) für eukaryotische Zellkulturen (complete):	10% FCS 1 mM Pyruvat 3,5 mM L-Arginin 2 mM L-Glutamin 100 IE Penicillin 100 IE Streptomycin 10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) für eukaryotische Zellkulturen (0,1% FCS):	0,1% FCS 1 mM Pyruvat 3,5 mM L-Arginin 2 mM L-Glutamin 25 mg Penicillin 25 mg Streptomycin 10 ml/l nicht-essentielle Aminosäuren

Für das Ansetzen des Zellkulturmediums wurden 0,3 g L-Arginin mit 5 ml nichtessentiellen Aminosäuren und 5 ml Pyruvat gemischt, steriflitriert und zum DMEM gegeben. 5 ml Penicillin/Streptomycin (wenn verwendet, 10000 μ g/ml) und 5 ml 200 mM Glutamin-Lösung wurden dazugefügt. Das fötale Kälberserum (FCS) wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren 30 min bei 56°C im Wasserbad erhitzt, aliquotiert und bei –20°C gelagert. Für 500 ml DMEM wurden 50 ml 100%-iges FCS zugefügt. Fertiges Medium wurde bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf RT erwärmt.

Trypsin-EDTA zur Ablösung adhärenter	0,125% Trypsin
eukaryontischer Zellen:	0,1% EDTA
	in 1x PBS Puffer
	sterilfiltriert

2.10 Oligonukleotide

2.10.1 Oligonukleotide für Mutationen der siRNA-Bindestelle der hLa-Sequenz

sense-primer La-M48S: 5'-CCA GAA GTA CAA AGA AAC <u>C</u>GA <u>T</u>CT GCT <u>G</u>AT ACT TTT CAA GG-3' antisense-primer La-M49AS: 5'-CCT TGA AAA GTA T<u>C</u>A GCA G<u>A</u>T C<u>G</u>G TTT CTT TGT ACT TCT GG-3' Die im Vergleich mit der hLa-Sequenz veränderten Nukleotide sind kursiv und unterstrichen dargestellt.

2.10.2 Oligonukleotide zur Herstellung der pSuper-Vektoren

sense-primer RNA-La-S1: 5'-GAT CCC CGA AAC AGA CCT GCT AAT ACT TCA AGA GAG TAT TAG CAG GTC TGT TTC TTT TTG GAA A-3' antisense-primer RNA-LaAS1: 5'-AGC TTT TCC AAA AAG AAA CAG ACC TGC TAA TAC TCT CTT GAA GTA TTA GCA GGT CTG TTT CGG G-3' sense-primer Luci-si1S: 5'-GAT CCC CCG TAC GCG GAA TAC TTC GAT TCA AGA GAT CGA AGT ATT CCG CGT ACG TTT TTG GAA A-3' antisense-primer Luci-si2AS: 5'-AGC TTT TCC AAA AAC GTA CGC GGA ATA CTT CGA TCT CTT GAA TCG AAG TAT TCC GCG TAC GGG G-3'

2.10.3 Oligonukleotide für die semiquantitative RT-PCR

sense-primer β -Actin-S1: 5'-GTC GAC AAC GGC TCC GGC AT-3' antisense-primer β -Actin-AS1: 5'-GAA GGT GTG GTG CCA GAT TT-3' sense-primer CYCE-S1: 5'-GCA CCA GTT TGC GTA TGT-3' antisense-primer CYCE-AS1: 5'-GCC CTG TTT GAT GCC-3' sense-primer CYCD1-S1: 5'-AGA GGC GGA GGA GAA CAA ACA G-3' antisense-primer CYCD1-AS1: 5'-AGA GAT GGA AGG GGG AAA GAG C-3'

2.10.4 Oligonukleotide für die Generierung von Vorlagen zur *in vitro*-Transkription

sense-primer β -Actin-S1: 5'-GTC GAC AAC GGC TCC GGC AT-3' antisense-primer β -Actin-T7-AS1: 5'-GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAA GGT GTG GTG CCA GAT TT-3' sense-primer CYCD1-S1: 5'-AGA GGC GGA GGA GAA CAA ACA G-3' antisense-primer CYCD1-T7-AS1: 5'-GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG ATG GAA GGG GGA AAG AGC-3'

2.10.5 Oligonukleotide für die RNA-Interferenz-Technik

siRNA hLa: sense-siRNA: 5'-GAA ACA GAC CUG CUA AUA CdTdT-3' antisense-siRNA: 5'-GUA UUA GCA GGU CUG UUU CdTdT-3' siRNA Luciferase: sense-siRNA: 5'-CGU ACG CGG AAU ACU UCG AdTdT-3' antisense-siRNA: 5'-UCG AAG UAU UCC GCG UAC GdTdT-3'

Die anti-hLa-siRNA wurde von der Firma IBA Nucleic Acid Synthesis, Göttingen, hergestellt und war von PAGE-gereinigter Qualität sowie *sense* und *antisense* bereits zusammengelagert und in Lösung. Die anti-Luciferase-siRNA wurde sowohl mittels des Ambion *Silencer*TM siRNA Construction Kits hergestellt als auch in PAGE-gereinigter Qualität durch die Firma IBA bezogen.

2.10.6 Oligonukleotide für die Herstellung von siRNAs mit Hilfe des *Silencer*[™] siRNA Konstruktions-Kits

THLuciS: 5′ - AAC GTA CGC GGA ATA CTT CGA CCT GTC TC -3′ *THLuciAS*: 5′ - AAT CGA AGT ATT CCG CGT ACG CCT GTC TC -3′

2.10.7 IRD-Oligonukleotide für DNA-Sequenzierungen

IRD-TH-La-711(-): 5'-AGC TCT TAA TTT AGC TTC CAC-3'

Die Synthese des Fluoreszenz-markierten Oligonukleotides erfolgte durch MWG Biotech.

2.11 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern Easy Cast	0
Bakterieninkubator	Ν
Brutschränke	Ν
ELISA Reader	Μ
FACS Coulter Epics XL	В
FACS Aria	В
Fluor-S MultiImager System	В
GSA-Rotor	В
MicroLumat LB 96 P	E
Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Μ
PCR-Gerät RoboCycler Gradient 96	St
PCR-Gerät ThermoCycler	Μ
Phosphorimager Bildplatte Fuji-BAS-2000	Fı
Phosphorimager Gerät FujiX-Bas 2000	Fı
Photometer Ultraspec 3000pro	Α
Röntgenfilmentwickler Agfa Curix-60	Α
Scintillations-Zähler Liquid Scintillation Counter 1409	W
Sorvall RC5B+ Zentrifuge	В
Sorvall Ultrazentrifuge	В
SS34 Rotor	В
SW41 Rotor	В
Stratalinker 1800	St
Thermomixer	E
Tischzentrifuge 5417C	E
Trans-Blot-Semi-Dry-Transfer-Cell	В
Ultraschall-Behandlung	В
Western Blot Trans Blot Kammer	В
Zeiss Axiophot Mikroskop	Z

WL Scientific, Inc. lew Brunswick Scientific ew Brunswick Scientific **IWG Biotech** eckman **D** Biosciences ioRad eckmann G&G Berthold Iarienfeld tratagene **AWG Biotech** uji uji mersham Pharmacia gfa /alac eckman eckman eckman eckman tratagene ppendorf ppendorf ioRad ranson Sonic ioRad eiss

2.12 Herstellernachweis

Agfa, D-50670 Köln Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg Applied Biosystems, D-64293 Darmstadt Beckman Instruments GmbH, D-80807 München BioRad Laboratories GmbH, D-80939 München Biozym Diagnostik GmbH, D-31883 Hessisch Oldendorf Clontech, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg EG&G Berthold, Victoria, Australia Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg Eurogentec, D-50667 Köln Dianova, D-20148 Hamburg Gibco BRL / Life Technologies GmbH, D-76339 Eggenstein Greiner, D-72636 Frickenhausen Heraeus Instruments GmbH, D-63450 Hanau Hartmann Analytics, D-38124 Braunschweig IBA GmbH, D-37079 Göttingen Invitrogen, San Diego, CA, USA MBI Fermentas, D-68789 St.Leon-Rot Merck KGaA, D-64271 Darmstadt MWG-Biotech AG, D-85560 Ebersberg New England Biolabs, D-65926 Frankfurt am Main New Brunswick Scientific, NJ, USA Nunc GmbH & Co.KG, Postfach 120543, D-65083 Wiesbaden PharMingen, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg Promega GmbH, High-Tech-Park, D-68199 Mannheim Qiagen GmbH, D-40724 Hilden Roche, D-69112 Heidelberg Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, D-37586 Dassel/Relliehausen Serva Feinbiochemica & Co. KG, D-69042 Heidelberg Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82039 Deisenhofen Stratagene GmbH, D-69000 Heidelberg Whatman, Springfield Mill, UK Zeiss, D-07745 Jena

3 Methoden

3.1 Zellbiologische und mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kulitivierung von E. coli

E. coli wurde in StI-Flüssigmedium bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) über Nacht kultiviert, nachdem mit Hilfe einer Impföse von einem einzigen Klon angeimpft wurde. Das Zusetzen entsprechender Antibiotika verhinderte, dass Zellen mit einer plasmidgekoppelten Resistenz durch das Fehlen des nötigen Selektionsdruckes das Plasmid verloren.

Zum Anlegen einer Plattenkultur konnten die Bakterien mittels Impföse oder Drigalskispatels auf StI-Agarplatten (gegebenenfalls mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl von Bakterienflüssigkulturen

Die Gesamtzellzahl einer Bakterienkultur lässt sich aus der photometrischen Messung der optischen Dichte bei einer geeigneten Wellenlänge errechnen. Im Falle von *E. coli* entspricht 1 $OD_{600} = 5 \times 10^8$ Zellen/ml. Nicht berücksichtigt wird bei dieser Methode das Vorhandensein toter Zellen, die ebenfalls zur optischen Dichte der Probe beitragen, so dass die bestimmte Gesamtzellzahl nicht zwangsläufig auf die Lebendzellzahl rückschließen lässt.

3.1.3 Vorbereitung von E. coli-Zellen für die Calciumtransformation

Um fremde Plasmid-DNA in *E. coli* einbringen zu können, werden speziell behandelte Zellen, sog. "kompetente" Zellen, benötigt. Eine Methode hierfür stellt die Calciumchloridtransformation dar, bei der durch die Behandlung mit Calcium-Ionen und Aufbewahrung in der Kälte die Zellen veranlasst werden, doppelsträngige DNA aufzunehmen.

Zur Herstellung calciumkompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine mit 1 ml Vorkultur angeimpfte 100 ml-Kultur bis zu einer OD_{600} von ca. 0,4-0,5 bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Eine Zentrifugation für 12 min bei 4000 g und 4°C schloss sich an. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Sedimentes mit 40 ml eiskaltem

Hanahan-I wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, jedoch nur für 8 min. Das erhaltene Bakterienzentrifugat wurde nach Entfernen des Überstandes in 4 ml Hanahan-II aufgenommen und in Eppendorfgefäßen aliquotiert, welche schockgefroren und bei –70°C gelagert wurden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden verschiedene Verdünnungen ausplattiert und die Zellen ausgezählt. Folgende Lösungen wurden verwendet:

Hanahan-I:	1,5 g Kaliumacetat (30 mM) 5 g Magnesiumchlorid-4-Hydrat (50 mM) 0,7 g Calciumchlorid (10 mM) 3,7 g Kaliumchlorid (100 mM) 86,2 ml Glycerin (15% v/v) ad 500 ml ddH ₂ O, sterilfiltrieren
Hanahan-II:	0,2 g MOPS (10 mM) 1,1 g Calciumchlorid (75 mM) 0,07 g Kaliumchlorid (10 mM) 17,2 ml Glycerin (15% v/v) ad 100 ml ddH ₂ O, mit NaOH auf pH 7 einstellen, sterilfiltrieren

3.1.4 Einbringen von Plasmid-DNA in E. coli durch Calciumtransformation

Um fremde Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen zu exprimieren, musste diese zunächst in die Zellen eingebracht werden. Dies erfolgte, indem von den nach **3.1.3** vorbereiteten Zellen 100 μ l pro Transformationsansatz aufgetaut und mit etwa 10 ng Plasmid-DNA gemischt wurden. Die Mischung wurde daraufhin 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden ein Inkubationsschritt bei 37°C für 5 min und eine Inkubation auf Eis für 2 min durchgeführt. Nach der Zugabe von 400 μ l StI-Medium (ohne Antibiotikum) wuchsen die Zellen für 1 h bei 37°C und konnten nach dieser Zeit in angemessenen Verdünnungen auf geeigneten Platten verteilt werden. Agarplatten mit *E. coli* wurden in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.5 Auftauen von eukaryotischen Zellen, Ansetzen und Passagieren einer Zellkultur

Um eine Zellinie in Kultur zu nehmen, wurden 1 ml tiefgefrorene Zellen auf Eis aufgetaut. Die Zellsuspension wurde zum Entfernen des DMSO in 10 ml DMEM aufgenommen und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment in 5 ml DMEM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einer 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät.

Zum Passagieren ("Splitten") adhärenter Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Ablösung der Zellen durch die Zugabe von 1,5 ml Trypsin/ EDTA veranlasst. Die enzymatische Reaktion des Trypsin/ EDTA wurde durch die Zugabe von 8,5 ml serum-haltigem DMEM neutralisiert. Die erhaltene Zellsuspension konnte nun in entsprechender Verdünnung auf neue Kulturflaschen verteilt werden. Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

3.1.6 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen wie bereits unter **3.1.5** beschrieben mit Trypsin/EDTA gelöst. Nach dem Aufnehmen in 8,5 ml serum-haltigem DMEM, schloss sich eine Zentrifugation für 5 min bei 300 g an. Das Pellet wurde daraufhin in 10 ml "Einfriermedium" aufgenommen. Um die Zellen während des Einfrierens vor der Zerstörung durch Eiskristalle zu schützen, wurde dem "Einfriermedium" DMSO (Dimethylsulfoxazol) zugegeben. Dieser Gefrierschutz bewirkt die Ausbildung kleiner Kristalle, die die Zellwand nicht durchbohren. Da DMSO bei Erwärmung über etwa 10°C giftig wird, mussten die Präparate während des Einfriervorganges immer gut gekühlt werden. Die Zellsuspension wurde auf spezielle Reaktionsgefäße (Cryoröhrchen) verteilt, für 30 min auf Eis, für 30 min bei -20°C und über Nacht bei -70°C gelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Tanks mit flüssigem Stickstoff verwendet.

"Einfriermedium":	8,5 ml DMEM (ohne Zusätze)
	0,5 ml FCS
	1 ml DMSO

3.1.7 Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer

Eukaryotische Zellen wurden in den jeweilig erforderlichen Zellkulturschalen oder -platten am Tag vor einer Transfektion ausplattiert. Zunächst wurde das Medium aus der konfluenten Zellkultur-Flasche mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, anschließend wurden zur Ablösung der adhärenten Zellen 1,5 ml Trypsin-EDTA für wenige Minuten zugegeben. Das Trypsin bewirkte eine enzymatische Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche, welche durch Zugabe von 8,5 ml serum-
haltigem Medium neutralisiert wurde. Die Suspension wurde daraufhin in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Spritze (Durchmesser der Kanülen: 0,9 bzw. 0,4 mm) vereinzelt, was dem Auflösen von Zellverbänden diente. Ausgezählt wurden die Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer, wofür ein Tropfen der Zell-Lösung verwendet wurde. Durch Auszählen von vier Großquadraten konnte ein Durchschnittswert errechnet werden, der mit dem Faktor 10000 multipliziert wurde und die Anzahl der Zellen/ ml ergab. In 24-well-Platten wurden 3-3,5 x 10⁴ Zellen in 500 µl Medium und in 12-well-Platten 0,9-1,4 x 10^5 Zellen in 1 ml Medium ausgesät. Am Transfektionstag sollte die Zellkonfluenz für Plasmid-Transfektionen zwischen 60 und 70% liegen, für die RNA-Interferenz wurde eine Konfluenz von 30-50% angestrebt.

3.1.8 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen je nach Zellinie so ausgesät, dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 60-70% erreicht wurde. Für ein 12-*well* wurden etwa 1,4 x 10^5 U2OS-Zellen, 1,4 x 10^5 Huh7-Zellen oder 1,1 x 10^5 HeLa-Zellen benötigt. Die Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte, nachdem 2 h zuvor das Medium der zu transfizierenden Zellen gewechselt wurde. Es wurden je nach Experiment zwischen 0,5 und 1,5 µg Gesamt-DNA transfiziert. Als Transfektions-Reagenz diente FuGene-6. Ein typischer Transfektionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Transfektionsansatz:	100 µl serum-freies Medium
	3 μl FuGene-6 pro μg DNA

Die Mischung inkubierte 5 min bei RT, anschließend wurde die DNA hinzugefügt und erneut inkubiert (15 min bei RT). Der gesamte Transfektionsansatz wurde ins Medium der Zellen pipettiert und verteilt. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank gelagert und das Medium am folgenden Morgen gewechselt. Je nach Experiment wurden die Zellen zu einem definierten Zeitpunkt geerntet oder fixiert.

3.1.9 Anwendung der RNA-Interferenz in humanen Zellen

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) handelt es sich um eine Methode, bei welcher 21-23 nt lange siRNAs in Zellen eingebracht werden, was eine selektive Repression bestimmter Gene zur Folge hat. Die Sequenz der ausgewählten siRNA muss einer Stelle der mRNA des zu reprimierenden Proteins entsprechen. Durch die Anlagerung der siRNAs an eine komplementäre mRNA-Sequenz wird der Abbau dieser mRNA in der Zelle induziert (siehe **1.4**).

Bei den benutzten siRNAs handelte es sich einerseits um käufliche synthetische RNAs (hergestellt durch IBA GmbH Göttingen) oder um Synthesen, welche mit Hilfe des *SilencerTM siRNA Construction Kits* durchgeführt wurden. Als Zielsequenz wurde ein Bereich des humanen La-Proteins (aa 207-213) ausgewählt (siehe **4.1**), während als Kontroll-siRNA ein Sequenzbereich des nicht in humanen Zellen vorhandenen Luciferase-Gens verwendet wurde. Nicht durch die IBA GmbH synthetisierte siRNA wurde nach dem unter **3.2.22** aufgeführten Protokoll hergestellt.

Die siRNA-Behandlung wurde in 24-*well-plates*, 12-*well-plates*, 6-*well-plates* oder 6 cm-Kulturschalen durchgeführt. Danach richtete sich die Anzahl der am Vortag ausplattierten Zellen, da stets eine Konfluenz von 30–50% am Transfektionstag angestrebt wurde. Entsprechend wurden pro 12-*well* etwa 1,1 x 10^5 U2OS-Zellen, 1,1 x 10^5 Huh7-Zellen oder 0,9 x 10^5 HeLa-Zellen ausgesät. Für die Transfektion eines 12-*wells* mit siRNA wurden folgende Ansätze zusammenpipettiert:

opti-MEM siRNA bzw. 120 pmol siRNA

Ansatz B:

24 μl Opti-MEM 6 μl Oligofectamine

Die Ansätze wurden 7-10 min bei RT inkubiert und anschließend vereinigt, woraufhin sich eine weitere Inkubation von 20-25 min bei RT anschloß, die der Komplexbildung aus Lipidmolekülen und siRNA diente. Nach Auffüllen ad 200 µl mit Opti-MEM (zur Vereinfachung der Pipettiermengen) wurde die Mischung gleichmäßig in das 2 Stunden zuvor gewechselte antibiotikafreie Medium der Zellen pipettiert. Für die Behandlung eines 24-*wells* wurde der Ansatz halbiert, für ein 6-*well* verdoppelt und für eine 6 cm-Schale vervierfacht, so dass sich stets eine Endkonzentration von 100 nM im Medium ergab. Ein Mediumwechsel (mit Antibiotika) am Folgetag war nicht unbedingt erforderlich, wurde aber meist durchgeführt. Nach den Erfordernissen des jeweiligen Experimentes wurden die Zellen zum gewünschten Zeitpunkt entweder mit *TriPure* Reagenz zur RNA-Isolierung oder SDS-Lysepuffer geerntet oder für die Durchflusszytometrie fixiert.

3.1.10 Ethanol-Fixierung von Zellen für die Durchflusszytometrie (FACS)

Zellen, die für die Durchflusszytometrie bestimmt waren, wurden zunächst trypsiniert und in 10 ml PBS mit 0,1% EDTA aufgenommen. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 300 g für 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl PBS mit 0,1% EDTA resuspendiert. Unter leichtem Mischen wurden daraufhin 5 ml eiskalter 80% Ethanol zugetropft. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis konnten die Zellen anschließend für max. mehrere Monate bei -20°C gelagert werden, sollten jedoch nicht vor Ablauf von 48 h weiterbehandelt werden.

PBS-Puffer

8 g NaCl (137 mM), 0,223 g KCl (3 mM), 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, ad 1 l ddH₂O pH 7,4

3.1.11 Propidium-lodid-Färbung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Die Propidium-Iodid-Färbung der DNA der zu analysierenden Zellen wurde mind. 2 h und max. einen Tag vor der Durchflusszytometrie durchgeführt. Die fixierten und bei -20°C gelagerten Zellen wurden 5 min bei RT erwärmt und anschließend 5 min bei 4°C und 300 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde nach Entfernen des Überstandes mit 5 ml PBS mit 0,1% EDTA gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes konnte die Färbung durch die Zugabe von 0,5-1,5 ml (je nach Zellmenge) initiiert werden. Diese fand im Dunkeln bei 37°C statt, anschließend wurden die Zellen langsam auf RT gekühlt und bis zur weiteren Analyse im Dunkeln gelagert, um ein Ausbleichen des Propidiumiodids zu vermeiden.

Propidium-Iodid-Lösung:	PI (0,5 mg/ml) 1:15
	RNase A (10 mg/ml, hitzeinaktiviert) 1:30
	in 1 x PBS

3.1.12 Zellzyklus-Messung mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Verteilung einer Zellpopulation bezüglich der verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt werden. Dies beinhaltet in der vorliegenden Arbeit die Propidium-Iodid-Färbung der Zell-DNA. Die Zellen wurden wie unter **3.1.11** beschrieben behandelt und anschließend in einem FACS-Gerät Coulter Epics XL der Firma Beckman gemessen. Dabei wurde zunächst ein sog. *Gate* gesetzt, das die Unterscheidung verschiedener Subpopulationen von Zellen erlaubte. Die aus der

Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wurden anschließend mit Hilfe der Software ExpoTM 32 ADC der Firma Beckman ausgewertet.

3.1.13 GIEMSA-Färbung zur Zellzahlbestimmung eukaryotischer Zellen

Diese Methode wurde angewandt, um die Zellzahl von Zellen auf einer 10 cm-Platte nach bestimmten Versuchsbedingungen zu ermitteln. Für das Experiment wurden Zellen zunächst entsprechend den Versuchserfordernissen behandelt und anschließend 0,25-0,5 x 10⁵ Zellen in gleicher Anzahl pro Experiment für einen Zeitraum von drei Tagen auf 10 cm-Kulturschalen übertragen. Nach drei Tagen erfolgte die Färbung mit GIEMSA-Lösung. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 5 min bei RT mit 4 ml Methanol fixiert. Anschließend wurde die Färbung mit 10 ml GIEMSA-Lösung für 2 min durchgeführt und mit demineralisiertem H₂O gewaschen. Nach dem Trocknen konnten die Zellen mit Hilfe der Funktion *Colony Counting* des BioRad *Multiimagers* gezählt werden oder unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Bei der Verwendung des BioRad *Imagers* war zu beachten, dass die Empfindlichkeit verschiedener Zählungen auf das gleiche Niveau eingestellt werden musste. Zusätzlich wurde die Zellzahl mittels Phasenkontrastmikroskopie bestimmt und dokumentiert.

3.1.14 Zellzyklus-Synchronisation durch Serum-Entzug

Da eukaryotische Zellen in einer Zellkultur im Normalfall nicht synchron wachsen, es aber für bestimmte Experimente notwendig war, mit größtenteils synchron wachsenden Zellen zu arbeiten, wurden Zellen synchronisiert. Unter verschiedenen Methoden zur Zellsynchronisation, die meist auf der Zugabe von Drogen basieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode des Serum-Entzugs gewählt. Bei dieser Methode handelt es sich um ein verhältnismäßig schonendes Verfahren, welches zur Folge hat, dass die Zellen aufgrund des fehlenden Serums in der G1- bzw. G0-Phase stehen bleiben und erst nach der Zugabe von Serum-haltigem Medium weiter wachsen. Die Wirksamkeit der Methode hält sich jedoch in Grenzen, da eine vollständige Synchronisation je nach Zellinie oft nicht erreicht werden kann. In dieser Arbeit wurden U2OS-Zellen und HeLa-Zellen durch Medium mit 0,1% FCS-Gehalt für 3-7 Tage behandelt. Diese Methode wurde in Kombination mit der RNA-Interferenz angewandt, um eine mögliche Zellzyklusverschiebung nach Reduktion der La-Proteinexpression mit Hilfe der Durchflusszytometrie besser wahrnehmen zu können.

3.1.15 Sortierung von Zellen nach der Transfektion von GFP-Plasmiden

Für bestimmte Experimente, wie z.B. die Untersuchung der Wirkung von GFP-hLa-Mutanten auf den Zellzyklus, war es notwendig, nicht-transfizierte Zellen von transfizierten Zellen zu trennen. Dies konnte aufgrund des GFP-Signals, welches durch die Plasmide vermittelt wurde, mit Hilfe eines FACS Aria Cell Sorters der Firma BD Biosciences durchgeführt werden. Die Zellen wurden dafür am vorgesehenen Tag trypsiniert, in PBS aufgenommen und zum Sortieren weggegeben.

3.1.16 Luciferase-Assay zur Bestimmung der Promotor-Aktivität

Um die Aktivität eines bestimmten Promotors zu messen, kann dieser mit dem Luciferase-Gen aus Vertretern der Familie *Coleoptera* gekoppelt werden. Dafür wird ein Plasmid benötigt, in dem der zu untersuchende Promotor *upstream* des Luciferase-Gens kloniert vorliegt. Bei der Transkription wird die Kopienzahl der *Luciferase-*mRNA in Abhängigkeit der Promotoraktivität synthetisiert, das Luciferase-Protein wird translatiert. Durch die spezifische Umsetzung eines zugegebenen Substrates entsteht eine Lumineszenzreaktion, die in Proportionalität zur Promotoraktivität steht.

Der Luciferase-Assay wurde mit Hilfe des Luciferase-Assay-Systems der Firma Promega durchgeführt. Es wurden U2OS-Zellen in 12-*wells* oder 6-*wells* ausgesät und am Folgetag mit Plasmid-DNA transfiziert. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit 200-300 µl 1 x Reporter Lysis Buffer + 5% Proteaseinhibitor lysiert, indem die Platten kurz schockgefroren wurden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen abgelöst, mit der Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Nach kurzem Vortexen (15 sek) wurde für 15 sek bei 12000 g zentrifugiert. Die Lysate wurden entweder sofort gemessen oder bis zur Messung bei -70°C gelagert. Die Messung erfolgte in dem Plattenluminometer MicroLumat LB 96 P (EG&G Berthold). Dafür wurden je 50 µl der Zell-Lysate in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Zugabe des Luciferase-Assay-Reagenz (hergestellt aus dem lyophilisierten Luciferase-Assay-Substrat, gelöst in Luciferase-Assay-Puffer) geschah automatisch vor der Messung. Als Anwendersoftware diente das Programm *WinGlow*.

3.2 Molekularbiologische Techniken

3.2.1 Alkoholfällung von Nukleinsäuren

Eine Fällung von Nukleinsäuren (DNA, RNA) kann durch die Zugabe von Alkohol und einwertigen Kationen erreicht werden, da durch die Absättigung der negativ geladenen Phosphatgruppen die Löslichkeit herabgesetzt wird und somit die Nukleinsäuren aggregieren, während Oligonukleotide und Nukleotide in Lösung bleiben. Folgende Alkohole können zur Fällung verwendet werden:

Ethanol-Präzipitation:

Der zu fällenden Probe wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,5 und das 2,5-fache Volumen an eiskaltem 95% Ethanol zugegeben. Nach Durchmischen wurde der Ansatz für 2 h bei –20°C gelagert und anschließend für 20 min bei 20000 g in einer Eppendorftischzentrifuge 5417C zentrifugiert. Diese Zentrifuge wurde standardmäßig verwendet, wenn in den nachfolgenden Abschnitten keine weitere Information angegeben wurde. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das entstandene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Eine erneute Zentrifugation für 2 min bei 20000 g schloss sich an, nach welcher der Alkohol abgenommen wurde und die Nukleinsäuren getrocknet wurden.

Isopropanolfällung:

Die Fällung durch Isopropanol bot sich bei Nukleinsäuren an, die in großen Flüssigkeitsvolumina vorlagen, da dem Ansatz statt der 2,5-fachen Menge lediglich die 0,7-fache Menge an Alkohol beigefügt wurde. Das Aufsalzen erfolgte entsprechend der Ethanolpräzipitation. Nach dem Durchmischen konnte sofort bei RT und 20000 g für 15 min abzentrifugiert werden, bevor der Alkohol entfernt und das Präzipitat getrocknet wurde. Diese Fällung ist qualitativ schlechter als die Ethanolfällung, da größere Mengen an Salz mitgefällt werden.

3.2.2 Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes

Die photometrische Quantifizierung erfolgte in einer bekannten Verdünnung bei 260 nm. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu der bei 280 nm (*Ratio*) gibt die Reinheit der Nukleinsäurelösung an. Optimalerweise entspricht es bei DNA 1,8, bei RNA 2 und bei Oligonukleotiden 1,5.

Für die Konzentrationsbestimmung gilt (A₂₆₀= Adsorption bei 260 nm):

dsDNA	$1 \text{ A}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$
ssDNA	$1 \text{ A}_{260} = 30 \mu\text{g/ml}$
RNA	$1 \text{ A}_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$
Oligonukleotide	$1 \text{ A}_{260} = 20 \mu\text{g/ml}$

3.2.3 Plasmid-DNA-Präparation

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit Hilfe des Qiagen-Maxi-Präparations-Kits und des Mini Prep Wizard-Plus-Kit (Promega, Deutschland) nach den Angaben der Hersteller. Diese Präparationssysteme beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, etabliert von Birnboim und Doly (17). Der Aufschluß von Bakterien wurde durch den basischen pH-Wert erreicht, SDS/ NaOH wirkten denaturierend auf die Proteine, die chromosomale DNA und die Plasmid-DNA. Die anschließende Neutralisation führte zu einer Renaturierung der Plasmid-DNA, nicht aber der Proteine und der chromosomalen DNA. Letztere fielen daher zusammen mit den Zelltrümmern aus, so dass die Plasmid-DNA aus dem klaren Überstand über im Lieferungsumfang enthaltene Säulen gereinigt werden konnte. Nach der Präparation wurde die Konzentration des Plasmids photometrisch bestimmt (siehe **3.2.2**) und die Qualität der Präparation in einem analytischen Agarose-Gel kontrolliert (siehe **3.2.4**).

3.2.4 Agarosegel zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 200 bp und 12 kb wurden Agarosegele verwendet (45), welche je nach gewünschter Auftrennung in ihrer Agarose-Konzentration variierten (0,6 bis 2,0% ($^{W}/_{v}$)). Die benötigte Menge Agarose wurde in 1 x TAE durch mehrmaliges Aufkochen gelöst und in einen Flachbettschlitten gegossen. Zur Herstellung der Geltaschen wurde in das noch nicht ausgehärtete Gel ein Kamm eingefügt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 5 mA/ cm Gellänge in 1 x TAE-Puffer. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (3 µg/ml) gefärbt und unter dem UV-Licht bei 254 nm photographiert, wobei die DNA als fluoreszierende Bande sichtbar wurde.

DNA-Probenpuffer:

0,01% Bromphenolblau 40% Glycerin in 1 x TAE-Puffer 40 x TAE-Puffer

242,4 g Tris (0,5 M), 108,8 g Natriumacetat-Trihydrat (0,2 M), 29,6 g EDTA (0,02 M), ad 1 l ddH2O, pH 7,4

3.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit QIAquick

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraktions Kit der Firma QIAGEN verwendet. Das Prinzip dieses Extraktionsverfahrens besteht in der irreversiblen Verflüssigung der Agarose und der Bindung der im Gel befindlichen DNA an die Membran der mit dem Kit gelieferten Säulen.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das zu extrahierende DNA-Fragment unter der UV-Lampe bei niedriger UV-Intensität mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und gewogen. Die weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Reinigung konnte die DNA für weiterführende Experimente verwendet werden.

3.2.6 Enzymatische Spaltung von DNA (Restriktion)

Restriktionsendonukleasen erkennen kurze, spezifische, oftmals palindromische Nukleotidfolgen (meist 4-6 nt) innerhalb der DNA und spalten diese so, dass entweder glatte Enden (sog. *blunt ends*) oder Überhänge am 3'-oder 5'-Ende (sog. *sticky ends*) entstehen.

Die Restriktion wurde den Empfehlungen der Hersteller entsprechend durchgeführt, wobei genaue Angaben bezüglich des geeigneten Puffers und der Restriktionstemperatur etc. eingehalten wurden. Einige Restriktionsendonukleasen verlangten eine Inaktivierung durch Erhitzen des Restriktionsansatzes, bevor mit dem Ansatz weitergearbeitet wurde, da sich das enthaltene Enzym andernfalls bei weiteren Experimenten störend hätte auswirken können. Die Restriktion wurde in einem analytischen Agarosegel überprüft.

3.2.7 Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA

Vor einer Ligation wurde üblicherweise der gelgereinigte, geschnittene Vektor dephosphoryliert, um ein Ligieren der Vektorenden ohne Einfügen des *Inserts* zu

verhindern. Ein typischer Ansatz setzte sich wie im Folgenden beschrieben aus Komponenten der Firma Roche zusammen:

Dephosphoylierungsansatz: 1 µl 10 x Dephosphorylierungspuffer 300 ng Plasmid-DNA 1 µl Shrimp Alkalische Phophatase ad 10 µl ddH₂O

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen dienen dem Einfügen eines DNA-Fragmentes (*Insert*) in einen Vektor oder der Ringschließung eines solchen durch Knüpfung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxyl-Gruppe zweier DNA-Enden.

Die in dieser Arbeit verwendete T4-DNA-Ligase entstammt dem Bacteriophagen T4 und benötigt zur Katalyse der Reaktion gleich den eukaryotischen DNA-Ligasen ATP als Cofaktor, während bakterielle DNA-Ligase NAD verwendet.

Für die im Rahmen dieser Arbeit erforderlichen Ligationen wurde das *Rapid* DNA Ligations Kit der Firma Roche verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie nachfolgend beschrieben zusammen:

Ligationsansatz:

0,05 pmol Vektor-DNA und 0,5 pmol Insert-DNA in 4 µl 5 x Dilution Buffer 10 µl 2 x Ligationspuffer 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U) ad 20 µl ddH₂O

Die Ligation erfolgte bei RT für 5-15 min. Nach der Ligation wurden 10 μ l oder 20 μ l des Ansatzes in *E. coli* DH5 α transformiert (siehe **3.1.4**).

3.2.9 Einführung von Punktmutationen in GFP-hLa-Plasmide mittels PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des humanen La-Proteins durch RNA-Interferenz untersucht. Um zu analysieren, welche Regionen des humanen La-Proteins für die Aufrechterhaltung normaler zellulärer Funktionen notwendig sind, sollten sog. *Rescue*-Experimente mit verschiedenen La-Mutationen durchgeführt werden. In diese sollten drei stille Mutationen in der siRNA-Binderegion eingeführt werden, um nicht von der RNA-Interferenz betroffen zu werden. Bei den gewählten Mutationen handelte es sich um interne Deletionen, die bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden waren. Die drei Punktmutationen wurden durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in das Expressionsplasmid eingefügt. Zu diesem Zweck wurden ein *sense* und ein *antisense* Oligonukleotid ausgewählt, welche beide die gewünschten Punktmutationen enthielten und über der zu mutierenden siRNA-Erkennungsstelle lagen.

Reaktionsansatz:

μl Pfu Turbo Polymerase (2,5 U)
 μl PCR-Puffer 10 x
 μl dNTPs (10 mM)
 μl je Oligonukleotid (10 pmol/μl)
 10 ng Matrizen-DNA
 ad 50 μl, mit Mineralöl überschichten

PCR-Reaktionsprofil: 1 Zyklus 30 sek 95°C 15 Zyklen 30 sek 95°C, 1 min 54°C, 15min 72°C

Der Ablauf der PCR erfolgte in einem 1-Block-PCR-System (ThermoZykler).

Um die mutierte DNA von der Matrizen-DNA zu trennen, wurde ein spezifischer Restriktionsverdau mit dem Enzym *Dpn*I durchgeführt. Dieses Enzym erkennt die Methylierung der parentalen DNA, welche der neu amplifizierten DNA fehlt, so dass das *template* selektiv abgebaut wird. Der Verdau erfolgte mit 10 U *Dpn*I für 1 h bei 37° C. Nach dem Verdau wurde ein Aliqout der Amplifikate auf ihre richtige Größe in einem Agarosegel kontrolliert (siehe **3.2.4**). Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels des QIAquick PCR *Purification* Kits gereinigt. Die DNA konnte daraufhin in *E. coli* DH5 α transformiert werden (siehe **3.1.4**) und nach einer Plasmid-Minipräparation zur Kontrolle der eingeführten Mutationen sequenziert werden.

3.2.10 Klonierung der pSuper-Vektoren für die RNA-Interferenz gegen hLa oder Luciferase

Um RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein oder Luciferase (als Kontrolle) mit Hilfe eines Plasmides, welches über einen längeren Zeitraum siRNA transkribiert, zu vermitteln, wurden die entsprechenden Sequenzen in das Plasmid pSuper (zur Verfügung gestellt durch T. Brummelkamp) kloniert. Der Vorteil gegenüber der siRNA-Transfektion besteht darin, dass eine Kotransfektion mit einem zusätzlichen Plasmid durchgeführt werden kann und der Reduktionseffekt länger besteht. Eine dauerhafte Reduktion von Proteinspiegeln ist jedoch aufgrund einer nachlassenden Effizienz des Plasmides nicht gelungen. Der Nachteil des Systems liegt in der niedrigeren Transfektionseffizienz von Plasmid-DNA im Vergleich zu RNA-Oligonukleotiden und dem Nichtvorhandensein eines Selektionsmarkers. Daher musste zur Selektion ein resistenzgenhaltiges Plasmid kotransfiziert werden.

Für die Klonierung wurden die entsprechenden Oligonukleotide (siehe **2.10.2**) auf 0,05 μ M Konzentration eingestellt und je 1 μ l *sense* und *antisense* Oligonukleotid mit 48 μ l *Annealing* Puffer vermischt. Zunächst wurden die Ansätze 4 min bei 95°C denaturiert, anschließend 10 min bei 72°C aneinandergelagert und die Proben langsam auf 4°C gekühlt.

Annealing Puffer:

100 mM Kaliumacetat 30 mM HEPES-KOH pH 7,4 2 mM Mg-Acetat

Anschließend wurden die aneinandergelagerten Oligonukleotide unter Verwendung von Komponenten der Firma Roche folgendermaßen phosphoryliert:

Phosphorylierungsansatz:	2 µl aneinandergelagerte Olignonukleotide
1 1 1	1 µl T4-PNK Puffer 10 x
	$1 \mu l 1 mM rATP$
	$5 \mu l H_2O$
	$1 \mu 1 T - PNK$

Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

Für die weitere Klonierung wurden 3 µg pSuper-Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Hind*III geschnitten, über ein Agarosegel gereinigt, geleluiert und 5 von 50 µl vor der Ligation dephosphoryliert (siehe **3.2.7**). Für die Ligation wurden 2 µl der aneinandergelagerten, phosphorylierten Oligonukleotide und 1 µl (von 10 µl Endvolumen) geschnittenes, dephosphoryliertes pSuper-Plasmid eingesetzt (siehe **3.2.8**). Anschließend wurden die Ligationsansätze in *E. coli* DH5a transformiert. Für die Überprüfung möglicher positiver Klone wurden diese angezogen, und es wurde die Plasmid-DNA isoliert (Minipräparation, siehe **3.2.3**). Die Restriktion mit den Enzymen *Eco*RI und *Hind*III erlaubte die Bestimmung der Größe des ausfallenden Fragmentes und damit die Idenifikation positiver Klone. Positive Klone beinhalteten ein 360 bp-Fragment, während bei negativen Klonen ein 300 bp-Fragment herausgeschnitten wurde.

3.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des SequiTherm-Cycle-Sequenzier-Kits Li-Cor von MWG Biotech durchgeführt, welches auf der Didesoxyoder Kettenabbruchmethode nach Sanger basiert (151). Es handelt sich um eine Komplementärstrangsynthese mit gezielter statistischer Unterbrechung, bei der zu dem Gemisch normaler Desoxynukleotide (dNTPs) Didesoxynukleotide (ohne 3'-Hydroxygruppe, ddNTPs) zugegeben werden, so dass bei Einbau eines ddNTPs die wachsende DNA-Kette abbricht.

Zunächst mußte die zu sequenzierende DNA denaturiert werden, um in einzelsträngiger Form vorzuliegen. Ein spezifisches, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (s. **2.10.7**) diente der DNA-Polymerase nach Hybridisierung als *Primer* und bestimmte somit den Startpunkt der Gegenstrangsynthese. Die Detektion erfolgte durch den Laser des Sequenziergeräts, der die in dem Sequenziergel aufgetrennten DNA-Fragmente erkannte und die Informationen an die angeschlossene Software weitergab.

Die Sequenzier-PCR wurde in 96-well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Für jede Probe wurden je 2 μ l G-, A-, T- oder C-Long-Read-Termination-Mix (MWG) in 4 *wells* vorgelegt. Für den Sequenzier-Mix (MWG) wurden 9 μ l (oder 1 μ g ad 9 μ l) der DNA mit 2 μ l (1 pmol/ μ l) IRD-Oligonukleotid, 2,5 μ l 10 x-Sequenzier-Puffer, 2,5 μ l 10% DMSO und 1 μ l (5 U) Sequi-Therm-DNA-Polymerase (MWG) gemischt, und mit je 3,6 μ l auf die mit Termination-Mix befüllten *wells* verteilt. Nach Überschichtung des Reaktionsansatzes mit Mineralöl begann die PCR in einem ThermoZykler (MWG) nach folgendem Schema:

1 Zyklus 4 min 94°C

30 Zyklen 30 sek 94°C (Denaturierung der Doppelstränge), 1 min 55°C (Hybridisierung der *Primer*), 1 min 70°C (Synthese des Gegenstrangs)

Die Reaktion wurde mit je 4 μ l Sequenase-Stop-Lösung (MWG) angehalten und die Proben vor dem Auftragen auf das Gel für 2,5 min bei 85°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte mit je 1,6 μ l (G-,A-,T-,C-Mix) in einem 40 cm langen denaturierenden 7 M Urea/ 5% Polyacrylamid-Gel. Dieses sollte vor dem Auftragen der Proben für ca. 1 h bei 2000 V in 1x TBE-Puffer vorlaufen, bis es eine Temperatur von 45°C erreicht hatte. Die Sammlung und die Analyse der Daten erfolgten mit Hilfe der *BaseImage*IR-V2.3 Software (Li-Cor, MWG Biotech, Germany). TBE-Puffer, 40 x

871,92 g (1,8 M) Tris/HCl pH 8,5 1,8 M Borat 0,04 M ETDA

3.2.12 Polyacrylamid-Harnstoffgel zur DNA-Sequenzierung

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Sequenzierreaktionen wurden 6% Polyacrylamid/ 7 M Harnstoff-Gele verwendet. Durch ihre Stärke von 0,04 cm und Länge von 40 cm wurde eine hohe Auflösung gewährleistet, die zur präzisen Längenunterscheidung notwendig war. Die Gelplatten wurden vor dem Gießen des Gels gründlich gereinigt.

Zusammensetzung:	26,5 ml Sequenzgel-Verdünner
(Sequenzgelsystem, Roth)	9,5 ml Sequenzgel-Konzentrat
	4 ml Sequenzgel-Puffer
	500 μl 6% APS
	50 µl TEMED

Die Elektrophorese erfolgte bei 40 W für 1,5-3,5 h bei einer Lauftemperatur von 50°C mit 1 x TBE als Elektrodenpuffer. Für ein optimales Ergebnis sollte das Gel bis zum Erreichen einer Temperatur von 50°C ohne Proben vorlaufen.

3.2.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode, die der Amplifikation eines zwischen zwei gegenläufigen *Primern* (Oligonukleotiden) gelegenen DNA-Abschnittes dient. Oligonukleotide werden im Überschuß unter Hybridisierungsbedingungen (5-10°C unter der Schmelztemperatur des *Primers*) zu denaturierter Ausgangs-DNA gegeben und verhelfen zur Gegenstrangsynthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die so entstandenen DNA-Doppelstränge werden denaturiert und stellen die Ausgangsmoleküle für eine erneute Gegenstrangsynthese dar. Der beschriebene Zyklus der Doppelstrang-Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung *(Annealing)* und Gegenstrang-Synthese führt zu einer Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz. Durch die Wiederholung von 20-50 der beschriebenen Zyklen kommt es daher zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

Für die Durchführung einer erfolgreichen PCR sollten die Oligonukleotide mindestens 15 Nukleotide zur Ziel-Sequenz komplementär sein. Wird über die Sequenz der Primer eine neue Restriktionsschnittstelle eingefügt, sollte sich der Nukleotid-Austausch (der sog. *Mismatch*) am 5'-Ende des *Primers* befinden. Zur besseren Hybridisierung werden zusätzliche Nukleotide (C oder G) an das 5'-Ende des Olignukleotides angefügt.

Reaktionsansatz:1 μ l Ausgangs-DNA (1 μ g DNA)10 μ l 10 x Taq-Polymerase-Puffer6 μ l dNTPs, jedes 4 mM1 μ l 5'-Primer (100 pmol)1 μ l 3'-Primer (100 pmol)1 μ l Taq-Polymerase (2 U)ad 100 μ l ddH₂O

Programm für eine PCR-Standardreaktion:

1 Zyklus 3 min 96°C (Denaturierung der Ziel-DNA)
30 Zyklen 1 min 96°C (Denaturierung der Doppelstränge), 1 min 40-55°C (Hybridisierung der Primer), 30 sek 72°C (Synthese des Gegenstrangs)
1 Zyklus 5 min 72°C (Beendigung der DNA-Synthese)

Nach Ablauf der PCR wurde die Reaktion mit Hilfe des *PCR Purification Kits* der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers gereinigt und ein Teil des Ansatzes auf einem Agarosegel überprüft.

3.2.14 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion) dient der Quantifizierung des mRNA-Spiegels zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Methode basiert auf dem Umschreiben von mRNA in cDNA durch reverse Transkriptase. Anschließend wird die entstandene cDNA mittels PCR amplifiziert, so dass abhängig von der jeweiligen mRNA-Menge ein als semiquantitativ einzustufendes DNA-Produkt entsteht. Dieses wird in einem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und quantifiziert.

Die RT-PCR wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit mit dem *Titan One Tube* RT-PCR System der Firma Roche durchgeführt. Die verwendete RNA wurde entweder aus U2OS-Zellen isoliert, die zuvor den jeweiligen Versuchserfordernissen entsprechend mit RNAi behandelt wurden. Es wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA (siehe **3.2.15**) eingesetzt. Als *Primer* wurden die unter **2.10.3** aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Ein Standard-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

15.37 μl
2 µl
2.5 µl
0.13 µl
9 µl
10 µl
1 µl
1 μg in 2 μl
20 pmol in 2 µl
20 pmol in 2 µl
4 µl

Nach dem Zusammenpipettieren wurde das Reaktionsgemisch (50 µl Gesamtvolumen) für die reverse Transkription zunächst für 30 min bei 50°C inkubiert. Es folgte die PCR nach dem folgenden Reaktionsprofil, wobei die Schritte 2-4 zusammen in 40 Zyklen durchlaufen wurden:

- 1. 95°C 1 min 30 sek (1 Zyklus)
- 2. 95°C 30 sek
- 3. 58°C 45 sek
- 4. 68°C 1 min
- 5. 68°C 10 min (1 Zyklus)

Um eine semiquantitative Aussage über die Zeit treffen zu können, wurden nach Zyklus 30, 35 und 40 jeweils 10 µl entnommen.

3.2.15 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen mittels TriPure Reagenz

Um Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen, wurde das *TriPure Isolation* Reagenz der Firma Boehringer verwendet. Die in 6-*well*- oder 12-*well*-Platten ausgesäten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 1 ml der phenolhaltigen Lösung bedeckt. Nach 10-minütigem Schütteln bei 4°C wurde die zellhaltige Lösung in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 260 µl Chloroform versetzt. Die Gefäße wurden anschließend stark geschüttelt und 10 min bei RT belassen. Darauf folgte Zentrifugationsschritt bei 12000 g für 15 min, der die wässrige und die phenolische Phase trennte. Die obere, wässrige Phase wurde sorgfältig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe von 500 μ l Isopropanol und die anschließende Lagerung bei -20°C für mind. 2 h wurde die RNA gefällt. Durch eine Zentrifugation bei 20000 g für 30 min wurde ein RNA-Pellet sichtbar, welches nach Abnehmen des Überstandes zweimal mit 900 μ l 70% EtOH in DEPC-H₂0 gewaschen wurde. Das Pellet wurde für wenige min bei 55°C im Heizblock angetrocknet, anschließend in 50 μ l DEPC- H₂0 gelöst und für 10 min bei 55°C im Heizblock geschüttelt (1200 rpm). Ein Frier-Tau-Schritt schloss sich an, der eine bessere Löslichkeit der RNA bewirken sollte. Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde in der Verdünnung 1:50 im Spektrophotometer durchgeführt.

3.2.16 Formaldehyd-Agarosegel zur Auftrennung von RNA

RNA wurde in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, das sich wie folgt zusammensetzte:

4 g bzw. 4,8 g Agarose für 1%-iges
bzw. 1,2%-iges Gel
$300 \text{ ml } ddH_2O$
erhitzen
20 ml 20 x MOPS
23 ml Formaldehyd
57 ml ddH ₂ O

Das Gel wurde unter dem Abzug in eine 2,2 l-Gelkammer mit Flachbettschlitten gegossen. In das noch nicht ausgehärtete Gel wurde ein Kamm zum Erhalten der Geltaschen eingesteckt, der nach dem Erhärten gezogen werden konnte. Die RNA-Proben (5 oder 10 µg Gesamt-RNA) wurden mit 2 Vol. RNA-Ladepuffer versetzt und 15 min bei 68°C denaturiert. Nach einer weiteren Minute auf Eis konnten sie in die Geltaschen pipettiert werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte über Nacht bei 70 mA mit 2,2 l 1 x MOPS als Laufpuffer. An diese Methode schloss sich stets die *Northern Blot*-Analyse an (siehe **3.2.17**).

RNA-Ladepuffer:

2,88 ml deionisiertes Formamid 0,32 ml 20xMOPS 1 ml Formaldehyd 0,72 ml DEPC-H₂O 0,72 ml Glycerin 0,01% Bromphenolblau 0,01% Xylencyanol Deionisierung: 100 ml Formamid wurden mit 5 g Ionenaustauscher (BioRad 501-X8) 1h bei RT gerührt, steril filtriert, aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt.

3.2.17 Northern Blot-Analyse

Nach der Auftrennung der isolierten Gesamt-RNA über ein Formaldehyd-Agarosegel wurde dieses für 10-20 min in 2 x SSC bewegt. Danach erfolgte die Übertragung der im auf eine Nylonmembran, Gel befindlichen RNA was mit Hilfe eines Kapillarblotvorganges für 5h geschah. Der Aufbau bestand aus zunächst 4 Whatmanpapieren in 2 x SSC, darüber wurde das Gel gelegt, auf dieses die Membran, darüber wiederum 4 Whatmanpapiere und abschließend ca. 30 Einweghandtücher. Auf den erhaltenen Stapel wurde eine Glasplatte gelegt, die mit einer Literflasche Wasser beschwert wurde, wodurch die Kapillarsaugkraft erhöht wurde. Durch diese Wirkung wurde die RNA auf die Membran übertragen. Nach Beendigung des Transfers wurde die RNA im UV-Crosslinker (Stratagene) auf der Membran fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung der RNA auf der Membran mit Methylenblau-Lösung (siehe 2.11), die die rRNA sichtbar machte und somit anzeigte, ob der Transfer erfolgreich war. Die Entfärbung erfolgte durch Spülen mit dH₂O.

Methylenblau-Lösung	0,5 M Natriumacetat pH 5,2, 5% Essigsäure 0,04% Methylenblau
20 x SSC:	175,32 g NaCl (3 M) 88,23 g Na-Citrat (300 mM) ad 1 l ddH ₂ O, pH 7,0
20 x MOPS:	83,8 g MOPS (400 mM) 13,6 g Natriumacetat-Trihydrat (100 mM) 7,4 g EDTA (20 mM) ad 1 l ddH ₂ O, pH 7.0
10 x Blockinglösung:	10 g Blockingreagenz 10 ml 1M Maleinsäure pH 7.4 5 ml 3 M NaCl ad 100 ml ddH ₂ O 1h bei 50°C rühren, autoklavieren

Prähybridisierung für in vitro-Transkripte:

Durch die Prähybridisierung (mit Hybridisierungslösung ohne Sonde) sollte der unspezifischen Bindung der einzusetzenden radioaktiven Sonde vorgebeugt werden. Die Prähybridisierung wurde für mind. 2h bei 72°C in einem Hybridisierungsofen durchgeführt.

Hybridisierungslösung: 12,5 ml Formamid 6,25 ml 10 x Blockinglösung 6,25 ml 20 x SSC 50 µl 10% SDS 250 µl Natriumlaurylsacrosin

Hybridisierung für in vitro-Transkripte:

Die Hybridisierung erfolgte durch Einsatz einer spezifischen, radioaktiv markierten Sonde (meist 2-5 Mio. cpm). Diese wurde zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 72°C über Nacht in einem Hybridisierungsofen.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran 2 x mit 2 x SSC/ 0,1% SDS (vorgewärmt auf 72°C) gespült und 2 x 20 min mit 0,2 x SSC/ 0,1% SDS bei 72°C gewaschen, um die überschüssige, nicht hybridisierte Sonde zu entfernen. Die Membran wurde halbtrocken mit Folie bedeckt und auf einem *Phosphorimaging Screen* oder einem Autoradiogramm exponiert. Nach einer geeigneten Expositionszeit erfolgte die Auswertung mittels des *Phosphorimagers* oder die Entwicklung des Röntgenfilms. Zur weiteren Analyse wurde die Software TINA 2.09 verwendet.

3.2.18 Rehybridisierung einer Northern Blot-Membran

Um eine bereits hybridisierte *Northern Blot*-Membran mit einer anderen DNA-Sonde zu hybridisieren, wurde die vorherige Sonde durch zweimales 20-minütiges Waschen mit 0,1% SDS bei 95°C entfernt. Die anschließende Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte wie bereits beschrieben.

3.2.19 In vitro-Transkription von RNA

Diese Methode diente der *in vitro*-Herstellung von radioaktiv-markierten RNA-Sonden und wurde unter Verwendung des *RiboProbe in vitro*-Transkriptions Kits der Firma Promega durchgeführt. Das als Vorlage benötigte DNA-Fragment konnte z.B. in einem Expressionssvektor vorliegen, dessen *Polylinker*-Sequenz von einem T7-Promoter

flankiert wurde oder mittels einer PCR mit Hilfe eines sense-Primers und eines antisense-T7-Primers hergestellt wurde. Je nach gewünschter in vitro-Transkription wurde der Vektor mit dem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert, welches den Vektor so schnitt, dass der benötigte Promotor benutzt werden konnte. Für die *GAPDH*-mRNA (Glyerinaldehyd-3-phosphat-Herstellung der Sonde gegen Dehydrogenase) wurde der Vektor pBSK mit der gesamten humanen GAPDH-Sequenz, zur Verfügung gestellt durch T. Heise, verwendet (siehe 2.7). Die Sequenz wurde von einem T7-Pomotor flankiert, so dass nach Restriktion eine in vitro-Transkription durchgeführt werden konnte. PCR-Produkte, die als template in einer in vitro-Transkription eingesetzt wurden, besaßen einen über die Oligonukleotide eingefügten T7-Promotor. Dabei handelte es sich um Produkte zur Generierung von Sonden gegen β-Aktin-mRNA und Zvklin D1-mRNA. Die Vorlagen wurden mit Hilfe der unter 2.10.4 aufgeführten Oligonukleotide hergestellt, indem nach einer RT-PCR (siehe 3.2.14) mit dem entstandenen Produkt eine PCR unter Standardbedingungen (siehe 3.2.13) durchgeführt wurde.

Die *in vitro*-Trankription startete unter Verwendung der entsprechenden RNA-Polymerase am aufwärts des 5'-Endes gelegenen Promotors und endete am 3'-Ende der DNA. Durch Zugabe eines radioaktiven Ribonukleotids neben den üblichen rNTPs wurde das *in vitro*-Transkript markiert.

Reaktionsansatz:

4 μ l 5x-T7-Transkriptionspuffer 1 μ l 100 mM DTT, 0,5 μ l RNasin (20 U) 2,5 μ l rNTPs (je 2,5 mM rATP, rGTP und rCTP) 0,5 μ l 0,01 mM rUTP 7 μ l [α^{32} -P] UTP 2 μ l template 1 μ l T7-RNA-Polymerase (15 U) ad 20 μ l mit Nuklease-freiem H₂O

Der Ansatz wurde für ca. 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde ein DNase-Verdau (1 µl) für 15 min bei 37°C durchgeführt und das Volumen auf 50 µl mit 10 mM Tris/HCl pH 7,4 aufgefüllt. Danach erfolgte die Reinigung der Transkripte mit Hilfe einer G25/ G50-*spin column* (siehe **3.2.21**).

Um die Synthese der radioaktiven RNA-Sonde zu quantifizieren, wurde die Radioaktivität (in cpm) mit Hilfe eines Szintillations-Zählers gemessen und die Molarität der Sonde nach den sich anschließenden Formeln berechnet.

3.2.20 Aufreinigung einer radioaktiv markierten Nukleinsäure über eine *ProbeQuant-Säule*

Zur Durchführung dieser Aufreinigungsmethode wurden *ProbeQuant*TM G-25 oder G-50 *Micro Columns* der Firma Amersham Pharmacia verwendet. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden von einer markierten Sonde oder einem Primer abgetrennt und verblieben im Säulenmaterial. Zunächst wurde die *ProbeQuant*-Säule ohne die aufzureinigende Probe 1 min bei 735 g zentrifugiert und die darin enthaltene, vorher resuspendierte Flüssigkeit in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und verworfen. Die aufzutragende Probe wurde mit STE-Puffer auf ca. 60 µl Gesamtvolumen gebracht und vorsichtig auf das Säulenmaterial gegeben. Nach einer Zentrifugation bei 735 g für 2 min lag die radioaktive Nukleinsäure in gereinigter Form in einem Reaktionsgefäß vor.

3.2.21 Konzentrationsberechnung von *in vitro*-transkribierten, radioaktiven RNA-Sonden

Zur Bestimmung des Einbaus radioaktiv markierter UTPs und Quantifizierung der RNA-Synthese, wurde vor und nach der Abtrennung der freien Nukleotide durch die *Spin columns* (siehe **3.2.20**) je ein 2 μ l Aliquot von dem Transkriptionsansatz entnommen und 1:50 mit DEPC-H₂O verdünnt. Das vor der Säulenreinigung entnommene Aliquot wurde zur Ermittlung der Gesamt-cpm (Zerfälle pro Minute) verwendet, hiervon wurden 5 μ l der Verdünnung zu 3 ml Scintillations-Cocktail gegeben. Aus der zweiten Probe wurden zur Bestimmung der mit TCA fällbaren cpm 5 μ l der Verdünnung auf einen GF/C-Rundfilter aufgetragen, dieser etwa 3 bis 5 min bei RT getrocknet und anschließend für 15 min bei 4° C in 25 ml eiskalter TCA-Lösung inkubiert, um evtl. vorhandene freie Nukleotide zu fällen. Nach kurzem Abspülen mit 70% Ethanol und Trocknen für 5 min bei RT wurde der Filter zu 3 ml Scintillations-Cocktail in ein Scintillations-Röhrchen gegeben. Die beiden Proben wurden für 60 sek in einem Scintillations-Zähler gemessen. Anschließend erfolgte die Berechnung der synthetisierten RNA Menge anhand der cpm-Werte.

Die spezifische Radioaktivität der synthetisierten RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

1. (Gesamt-cpm im Ansatz) / (ng UTP im Ansatz x 4) = cpm / ng RNA

Ausgegangen wurde von einer molekularen Masse von 350 pro Nukleotid (nt) sowie einem Gehalt von 25% UTP je RNA-Molekül. Die im Säuleneluat enthaltene RNA-Konzentration wurde anhand der spezifischen Radioaktivität aus den gemessenen fällbaren TCA-cpm ermittelt:

2. $(TCA-cpm/\mu l Ansatz) / (cpm/ng RNA) = ng RNA/\mu l$

Aufgrund der bekannten Länge der synthetisierten RNA und der errechneten Synthesemenge konnte nun die Molarität der Sonde bestimmt werden:

c [RNA] in pmol/ μl = (ng RNA / μl) x 1000)/ (Anzahl nt x 350)
 TCA-Lösung: 10% Trichloressigsäure 1% Natrium-Pyrophosphat

3.2.22 Herstellung von siRNA

Für die RNA-Interferenz wurde die Kontroll-siRNA gegen Luciferase, sofern nicht durch die Firma IBA bezogen, teilweise selbst hergestellt. Hierfür wurde das *Silencer*TM siRNA Konstruktions Kit der Firma Ambion verwendet. Die unter **2.10.6** aufgeführten Oligonukleotide, die den Anforderungen des Kits für die siRNA-Herstellung entsprachen, wurden auf eine Konzentration von 100 μM eingestellt und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Das Prinzip der siRNA-Konstruktion beruhte auf der Hybridiserung der Olignukleotide an einen T7-Promotor-*Primer*, der mittels Klenow aufgefüllt wurde. Durch eine Transkription wurden die *sense-* und *antisense-*Stränge gebildet und anschließend aneinandergelagert. Abschließend wurde eine Reinigung der siRNA über eine mitgelieferte Säule durchgeführt und die Konzentration bestimmt. Die siRNA gegen Luciferase wurde als Kontroll-siRNA verwendet und in einer Endkonzentration von 100 nM bezogen auf die Menge des Wachstumsmediums der zu behandelnden Zellen eingesetzt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine werden durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgele im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt (178). Die Verwendung des Detergenz SDS bewirkt die Denaturierung und negative Ladung der Proteine, so dass diese im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Polyacrylamidmatrix dient hierbei als ein molekulares Sieb und trennt die Proteine nach Stokes-Radius auf. Ein SDS- Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die hier beschrieben SDS-PAGE wurde in einer Gelelektrophorese-Apparatur von Hoefer Biosystems durchgeführt.

Ein Trenngel (benötigte Menge 26 ml) setzte sich wie folgt zusammen:

12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%) 7,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 300 μl 10% SDS 9,54 ml H₂O 180 μl 10% APS 18 μl TEMED

Nach dem Gießen wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Gelfront zu erhalten. Das Auspolymerisieren benötigte ca. eine Stunde. Das polymerisierte Gel wurde vom Ethanol durch Abgießen befreit. Auf das Trenngel wurde anschließend das Sammelgel gegossen.

Ein Sammelgel (benötigte Menge 10 ml) wurde folgendermaßen zusammengestellt:

2 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%) 3 ml 0,5 M Tris/HCl pH 8,8 120 µl 10% SDS 6,75 ml H₂O 120 µl 10% APS 12 µl TEMED

Zur Herstellung der Geltaschen wurde ein Kamm in das gerade gegossene Gel gesteckt, welcher nach ca. 45 min Polymerisation gezogen werden konnte. Die Proteinproben wurden mit SDS-Lysepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und 3 min bei 95°C denaturiert, bevor sie in die Geltaschen pipettiert wurden. Die Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 180 V für 3-5 h oder bei 10-15 mA über Nacht.

SDS-Lysepuffer:	1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8
~ 1	2 ml 10% SDS
	1 ml Glycerin
	5,25 ml H ₂ O
	$0,5 \text{ ml }\beta$ -Mercaptoethanol
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
10 x SDS-Laufpuffer:	31 g Tris
1	144 g Glycin
	10 g SDS
	ad 1 1 H ₂ O
	10 g SDS ad 1 1 H ₂ O

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer zu analysierenden Probe wurde eine Messung in Anlehnung an die Methode nach Bradford durchgeführt (19). Die Methode basiert auf der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm verschiebt, so dass die Zunahme der Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentration der Lösung widerspiegelt. Je nach Proteinkonzentration wurden 1–5 μ l der Lösung in einer 96-*well* Mikrotiterplatte mit einem Gemisch aus Färbereagenz (1:5 (^v/_v) Färbelösung:Wasser) auf 200 μ l aufgefüllt. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT erfolgte die Bestimmung der OD₅₉₅ in einem ELISA-Reader.

Zusätzlich wurde bei jeder Bestimmung eine Eichkurve angefertigt, indem bekannte Mengen BSA (1 bis 5 μ g) mit der Reagenzlösung versetzt wurden und ebenfalls die OD₅₉₅ bestimmt wurde. Nach dem graphischen Auftragen der resultierenden optischen Dichten gegen die Proteinkonzentration konnte der Proteingehalt der zu analysierenden Proben aus dieser Kurve abgelesen werden.

3.3.3 *Western Blot*-Analyse zum immunbiologischen Nachweis von Proteinen

Diese Methode, deren Spezifität auf dem Erkennen von definierten Epitopen durch den eingesetzten Antikörper beruht, wurde für den Nachweis von Proteinen in Zellextrakten verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (siehe **3.3.1**) wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, welche zuvor für 10 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Dieses wurde beiderseits mit ebenfalls in Transferpuffer äquilibriertem Whatman-Papier bedeckt und in eine *Western-Blot* Transfer-Kammer (BioRad) eingespannt. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurden die partiell negativ geladenen Proteine auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer der Proteine erfolgte in auf 4°C vorgekühltem Transferpuffer bei 60 Volt für 90 min.

Um die Qualität des Transfers und die Quantität der transferierten Proteine zu überprüfen, wurde die Nitrozellulosemembran vor der weiteren Behandlung mit Antikörpern 5 min mit einer Ponceau-S Färbelösung angefärbt. Überschüssige Reste der Färbung wurden durch mehrmaliges Spülen mit demineralisiertem H₂O von der Membran entfernt, so dass anschließend nur die Proteinbanden sichtbar waren. Es

handelt sich bei dieser Färbung um eine recht ungenaue Methode, die sich nicht zur Quantifizierung der Proteinmengen eignet, sondern lediglich die Qualität des Transfers überprüft.

Die Membran wurde anschließend mit 20 ml 5% Milchpulver in TBS-Puffer für 1h bei Raumtemperatur unter Schütteln blockiert, was eine unspezifische Bindung des Antikörpers an die Membran verhindern sollte. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation unter Schütteln für mind. 1 h bei Raumtemperatur oder o/N bei 4°C mit einem der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper (siehe 2.6). Nach dreimaligem 10-minütigen Waschen der Membran mit 20ml TBS-Puffer schloß sich die Inkubation mit einem geeigneten sekundären Antikörper an (Zeiten wie für die primären Antikörper), der spezifisch an die IgG-Fraktionen der Erstantikörper band und zwecks Visualiserung an Meerrettich-Peroxidase konjugiert war. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:20000 in 20 ml 5% Milchlösung verwendet. Nach erneutem Waschen der Membran (3 x 10 min in je 20 ml TBS-Puffer) erfolgte die Visualisierung der Antikörper-detektierten Proteine durch 2 minütige Inkubation mit dem Super Signal Chemiluminescent Peroxidase Solution System (Pierce). Durch die Meerrettich-Peroxidase-Aktivität wurde das in der Lösung enthaltene Substrat in Chemilumineszenz umgesetzt, so dass ein Signal entstand. Dieses konnte durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden (bei niedriger Chemilumineszenz) oder im Fluor-S MultiImager System detektiert werden. Letzteres erlaubte die Quantifizierung der Signalintensität der Banden.

Western-Blot Transferpuffer:	25 mM Tris/ HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20% Ethanol
Ponceau-S Färbelösung:	0,5% (w/v) Ponceau-S 1% Essigsäure
TBS-Puffer	4,848 g Tris/HCl pH 7,6 (10 mM) 5,84 g NaCl (100 mM) 0,9 ml Tween-20 (0,9%) ad 1 l ddH ₂ O

Eine derartig behandelte Membran konnte anschließend mit einem anderen Antikörper inkubiert werden. Dafür wurde entweder eine Rehybridisierung für mind. 30 min bei 50°C mit einer Rehybridisierungslösung durchgeführt, oder dem nächstfolgenden primären Antikörper in Milchlösung wurde genügend Natriumazidlösung (10% NaN₃,

1:1000-1:250 versetzen) zur Vergiftung der Meerrettichperoxidase des ersten Zweitantikörpers zugegeben.

Rehybridisierungslösung (nach A. Lamond):

10 ml 10% SDS 6,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8 0,35 ml β-Mercaptoethanol ad 50 ml ddH₂O

3.3.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Brilliant-Blue

Nach Beendigung des Transfers (siehe **3.3.3**) wurde das SDS-Gel mit Coomassie-Färbelösung für mindestens 30 min unter Schütteln gefärbt. Anschließend wurde ebenfalls unter Schütteln so lange entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Gele wurden mit Hilfe des BioRad Imagers fotografiert. Die Entfärbelösung konnte mehrfach verwendet werden, indem diese nach Gebrauch in eine Flasche mit Aktivkohle gefüllt wurde. Nach Absetzen der Aktivkohle, welche den Farbstoff bindet, wurde die Lösung filtriert.

Coomassie-Färbelösung:	45% Methanol 44,8% ddH ₂ 0 10% Essigsäure 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250
Entfärber:	45% Methanol 45% dH ₂ 0 10% Essigsäure

3.3.5 Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenz

Für mikroskopische Untersuchungen, wie z.B. der Lokalisation von Proteinen in Zellen, war es notwendig, Zellen auf Glasplättchen zu fixieren und einer Antikörperbehandlung zu unterziehen. Dafür wurden Zellen auf Glasplättchen in 24-*wells* ausgesät und nach der versuchsbedingten Behandlung zu einem bestimmten Zeitpunkt fixiert. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eiskaltes Methanol für 3 min auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation mit eiskaltem Aceton für 30 sek, an die sich erneutes Spülen mit PBS anschloss. Die fixierten Zellen wurden nun entweder mit Antikörpern weiterbehandelt oder unter PBS bis zum weiteren Verfahren verwahrt.

3.3.6 Immunfluoreszenz zur Untersuchung von fixierten Zellen

Um Proteine in fixierten Zellen mittels Immunfluoreszenz sichtbar zu machen, wurde diese zunächst mit einem primären Antikörper (Verdünnung je nach Antikörper 1:100-1:4000) für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges zehnminütiges Waschen mit 1 x PBS, auf das eine weitere einstündige Inkubation mit einem geeigneten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:400) folgte. Danach wurde stets eine DAPI-Kernfärbung (Verdünnung 1:1000) für 1-5 min durchgeführt, nach welcher erneut dreimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen wurde. Die Zellpräparate wurden daraufhin getrocknet und mit der Zellseite nach unten auf Objektträgern in Moviol gebettet. Die mikroskopische Untersuchung konnte nach dem Trocknen des Moviols erfolgen, wobei je nach verwendetem Sekundärantikörper mit der entsprechenden Wellenlinie beleuchtet wurde.

3.4 Sonstige Methoden

3.4.1 Autoradiographie

Die Autoradiographie ermöglichte durch Auflegen und anschließendes Entwickeln eines Röntgenfilmes die Ermittlung von Chemilumineszenzsignalen oder radioaktiven Signalen. Die Expositionszeit richtete sich dabei nach der Intensität der Chemilumineszenz oder der Radioaktivität. Durch die Strahlungsenergie wurden die Silberhalogenidkristalle, die in die Festphase des Röntgenfilmes eingebettet sind, negativ geladen und zu metallischem Silber reduziert. Die Filmschwärzung ist innerhalb eines bestimmten Strahlungsbereiches proportional zur Menge der Strahlung, daher können Autoradiogramme quantitativ ausgewertet werden.

3.4.2 Phosphorimaging

Eine Möglichkeit, radioaktiv markierte Banden sichtbar zu machen, besteht in der Methode des *Phosphorimagings*. Es handelt sich um eine sehr sensitive Methode, da die Empfindlichkeit für ³²P hierbei 250 x höher gegenüber β -Strahlung ist als bei der Autoradiographie. Hybridisierte *Northern Blot*-Membranen wurden auf speziellen *Phosphorimaging Screens* exponiert, welche mit einer ca. 700 µm dicken BaFBrEu-Kristallphase beschichtet sind, die radioaktive Strahlung in Form von Elektronen speichern kann. Durch Ablesen der *Screens* in dem entsprechenden Gerät

(*Phosphorimager*) mittels eines Helium-Neon-Lasers (Rotlicht mit 600 nm) wurde die Veränderung des Ladungszustandes in Form von photostimulierter Lumineszenz (PSL) gemessen und durch entsprechende Computer-Software (TINA Version 2.09 der Firma Raytest, München) ausgewertet. Da die Menge an radioaktiver Strahlung bei diesem Verfahren proportional zu der gemessenen PSL ist, konnte die Bandenschwärzung quantitativ ausgewertet werden. Entwickelte Platten wurden mit Licht gelöscht und wieder verwendet.

3.4.3 Hemmung der Translation mit Zykloheximid zur Bestimmung der Proteinstabilität

Das Zykloalkanderivat Zykloheximid verhindert die Elongation bei der Translation von mRNA. Bereits synthetisierte Proteine werden nicht beeinflusst, so dass eine Untersuchung der Proteinstabilität ermöglicht wird. Die Menge des benötigten Zykloheximid ist von der Zellinie und -dichte abhängig. Die Zugabe von 150 µg/ ml Zykloheximid zu einer HeLa-Zellkultur von 50-60% Konfluenz legte den Zeitpunkt 0 min fest. Die Halbwertszeitbestimmung des zu untersuchenden Proteins erfolgte durch die Ernte von Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten neben dem Zeitpunkt 0 min (Zugabe des Zykloheximids). Die erhaltenen Zellextrakte konnten durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch eine anschließende *Western Blot*-Analyse war mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers eine Quantifizierung des Proteins durchführbar, so dass die Stabilität bestimmt werden konnte.

3.4.4 Sucrosegradient zur Untersuchung der polyribosomalen Assoziation von mRNAs

Um festzustellen, ob durch die RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein ein Effekt auf die Translation bestimmter mRNAs (wie z.B. *Zyklin D1*-mRNA) auftritt, wurde die Assoziation dieser mRNAs mit Polyribosomen untersucht. Normalerweise finden sich mRNAs, die translatiert werden, in Assoziation mit den sog. Polyribosomen, die aus mehreren Ribosomen bestehen und im Abstand von etwa 80 nt entlang der mRNA aneinandergereiht sind. Diese Komplexe haben den Vorteil, große Mengen des Proteins innerhalb geringstmöglicher Zeit zu synthetisieren, ohne dabei zur Neuinitiation der mRNA am Ribosom das Ende der Translation am vorhergehenden Ribosom abwarten zu müssen.

Da es sich bei Polyribosomen um Multiproteinkomplexe handelt und diese sich in der Ultrazentrifugation entsprechend ihres Molekulargewichts verhalten, kann eine Auftrennung mittels eines Sucrosegradienten erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese nach dem von Sarnow und Johannes (152) etablierten Protokoll durchgeführt. Die auf 10 cm-Platten max. 50-60% konfluent gewachsenen und entsprechend den Versuchsanforderungen behandelten Zellen wurden für 3 min bei 37°C mit 0,1 mg/ml Medium Zykloheximid inkubiert. Anschließend wurden 10 ml eiskaltes PBS mit 0,1 mg/ml Zykloheximid auf die Zellen gegeben und die Platten auf Eis gestellt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach zweimalem Waschen der Zellen mit PBS mit 0,1 mg/ml Zykloheximid wurden die Zellen mit 400-600 µl (je nach Zelldichte) Polysomenextraktionspuffer lysiert. Die Extrakte wurden in Eppendorfgefäße überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung der Extrakte von Zelltrümmern und -kernen schloss sich eine Zentrifugation bei 4°C und 12000 g für 10 min an. Nach dem Überführen der Überstände wurden diese auf die nachfolgend beschriebenen Sucrosegradienten gegeben. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 190 min in einem SW41-Rotor bei 4°C und 35000 rpm. Diese wurden anschließend vorsichtig von oben beginnend in 1 ml- oder 1,2 ml-Fraktionen (letzteres nur beim Vorexperiment) unterteilt. Nach der Messung bei 254 nm im Photometer wurden die Fraktionen mit DEPC-H₂O auf 2 ml aufgefüllt. Durch die Zugabe von 3 ml kaltem 8 M Guanidin-HCl und 2-minütigem Vortexen wurde die RNA isoliert. Die Proben wurden mit 5 ml abs. Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Durch eine Zentrifugation bei 20000 g für 25 min entstanden Nukleinsäurepräzipitate, die mit 70%-igem Ethanol gewaschen wurden. Diese wurden in 400 µl DEPC-H₂O gelöst und mit 40 µl 3M Natriumacetat und 1 ml abs. Ethanol erneut gefällt. Danach wurden die Proben 25 min bei 20000 g zentrifugiert und die Präzipitate gewaschen, getrocknet und in 60 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Auftrennung der RNA erfolgte mittels eines unter 3.2.16 beschriebenen 1%-igen Formaldehyd-Agarosegels, wobei jeweils 30 µl der Fraktionen aufgetrennt wurden. Anschließend wurde die RNA nach der unter 3.2.17 beschriebenen Methode auf eine Membran übertragen. Die verwendeten Sonden zum Markieren der zu untersuchenden mRNA-Spezies wurden den unter 3.2.19 bis 3.2.21 beschriebenen Methoden folgend hergestellt und eingesetzt. Wurde eine Membran mehrfach mit verschiedenen radioaktiven Sonden hybridisiert, so wurde die zuvor verwendete Sonde wie unter **3.2.18** beschrieben entfernt.

Polysomenextraktionspuffer:

1,5 ml 1 M Tris-Cl pH 7,4 (15 mM) 1,52 g MgCl₂ (15 mM) bzw. 2,2 g EDTA (15 mM) 8,77 g NaCl (0,3 M) 1% Triton-X-100 50 mg Zykloheximid 500 mg Heparin ad 500 ml ddH₂O

Für die Sucrosegradienten wurde der Polysomenextraktionspuffer ohne Triton-X-100 mit 10%, 20%, 30%, 40% und 50% ($^{w}/_{v}$) Sucrose versetzt. Je 2 ml der einzelnen Konzentrationen wurden in Ultrazentrifugenröhrchen von unten nach oben in absteigender Konzentration vorsichtig geschichtet und über Nacht bei 4°C verwahrt.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des humanen La-Proteins im zellulären und viralen RNA-Metabolismus unter Anwendung der RNA-Interferenz-Technik untersucht werden. Da das La-Protein vermutlich bei der Hepatitis B Virus-Infektion die virale RNA bindet und diese somit vor Degradation schützt, sollte untersucht werden, wie sich die Reduktion des hLa-Proteinspiegels auf die Virus-RNA von HBV auswirkt. Von großer Bedeutung im Kontext dieser Arbeit war es, die Funktion des La-Proteins hinsichtlich der Wachstums- und Überlebensfähigkeit humaner Zellen zu entschlüsseln, um zu klären, ob das La-Protein als Ansatzpunkt für antivirale Therapien nutzbar ist.

4.1 Anwendung der RNA-Interferenz gegen das hLa-Protein in humanen Zellen

Um einen elementaren Ansatzpunkt für weiterführende Analysen zur Bedeutung des La-Proteins höherer Eukaryoten zu etablieren, wurden zunächst verschiedene humane Zellinien auf ihre Nutzbarkeit hinsichtlich der Methode der RNA-Interferenz (RNAi) gegen das hLa-Protein geprüft. Bei den getesteten Zellinien handelte es sich um die unter 2.8 aufgeführten Krebszellinien. Da zu Beginn der Studie keine veröffentlichten Ergebnisse zur Anwendung der RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein vorlagen, stand die Untersuchung der Wirksamkeit sowie der Reaktion der Zellen im Hinblick auf ihre Überlebensfähigkeit im Vordergrund. Um eine möglichst effiziente Reduktion des La-Proteinspiegels zu erzielen, wurde eine geeignete siRNA-Zielsequenz gewählt, die sich etwa in der Mitte der Protein-kodierenden hLa-mRNA-Sequenz (aa 207-213, siehe Abb. 6) befand. Diese Sequenz beinhaltete die Nukleotide 619-637 und wurde in 5'-Richtung von AA und in 3'-Richtung von TT (AA(N19)TT) flankiert. Daher konnten die entsprechenden siRNA-Moleküle so konstruiert werden, dass sie jeweils aus 21 nt bestanden und in 3'-Richtung einen dTdT-Überhand aufwiesen, wie es für die Wirksamkeit der Technik notwendig ist (72). Anhand eines Datenbankabgleichs (BLAST-Search) mit allen zu dem gegebenen Zeitpunkt verfügbaren humanen mRNA-Sequenzen wurde die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung minimiert, da keine Homologien gefunden werden konnten.

Die Technik der RNA-Interferenz wurde wie unter **3.1.9** beschrieben angewandt. Bei den Versuchen erfolgte zunächst eine Fokussierung auf Leberkarzinomzellen, da diese für weiterführende Analysen hinsichtlich der Rolle des La-Proteins für die HBV-RNA

von Nutzen sein sollten. Parallel wurden nicht der Leber entstammende Zellinien verwendet, die Aufschluss über die generelle Reaktion humaner Zellen auf die La-RNAi geben sollten. Es wurden zunächst verschiedene Zeitpunkte nach der RNAi-Anwendung getestet, um den optimalen Zeitpunkt für eine effiziente Reduktion von hLa festzustellen. Zudem wurden unterschiedliche Konzentrationen der siRNA getestet. Als ausreichend wurde eine Endkonzentration von 100 nM siRNA im Medium ermittelt (Daten nur teilweise gezeigt, siehe **Abb. 13**), so dass diese standardmäßig verwendet wurde.



Abb. 6: Vergrößerter Ausschnitt des ausgewählten siRNA-Motivs in der Sequenz des humanen La-Proteins: Die Abbildung zeigt die Sequenz von hLa zwischen den Nukleotiden (nt) 617 und 639. Das entsprechende doppelsträngige RNA-Molekül (siRNA) für die Anwendung der RNA-Interferenz entsprach dem abgebildeten Ausschnitt, jedoch mit Überhängen aus Desoxynukleotiden (dTdT statt UU).

4.1.1 Anwendung der RNA-Interferenz in Huh7-Zellen

Um die Effizienz der RNA-Interferenz in der humanen Hepatoma-Zellinie Huh7 zu untersuchen, wurden zunächst Einfachbehandlungen mit 100 nM Endkonzentration siRNA durchgeführt (siehe **3.1.9**). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit SDS-Lysepuffer lysiert. Nach dem Auftragen gleicher Volumina wurden die Gesamtproteine mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe **3.3.1**) aufgetrennt. Durch die *Western Blot*-Analyse (siehe **3.3.3**) konnten anschließend die Spiegel des vorhandenen La-Proteins bestimmt und mit Hilfe von α -Tubulin als Kontrollprotein standardisiert werden, da angenommen werden kann, dass sich die hLa-RNAi nicht unspezifisch auf dessen Expression auswirkt.



Abb. 7: Reduktion der hLa-Proteinspiegel in Huh7-Zellen nach Einfachbehandlung mit siRNA: Huh7-Zellen wurden mit hLa- und Luci-siRNA (Endkonz. 100 nM) transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Gezeigt ist eine *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen das hLa-Protein (monoklonaler Antikörper SW5, Verd. 1:500) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000). Die Auftrennung erfolgte mittels einer 12,5%-igen SDS-PAGE. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe eines vorgefärbten Proteinmarkers bestimmt. Die hLa-Signale wurden quantifiziert und gegen die Tubulinsignale korrigiert.

Das abgebildete Experiment (siehe Abb. 7) zeigt eine eindeutige Reduktion nach Einfachbehandlung mit siRNA, die in drei von sechs Experimenten reproduziert werden konnte. Eine sehr starke Reduktion des hLa-Proteinspiegels auf 6,2% konnte nach 48h erreicht werden. Zum Zeitpunkt 24h war die Menge von hLa in La-siRNA-behandelten Zellen auf 78,7% reduziert, während es 36h nach siRNA bereits auf 28,8% erniedrigt war. Die Reduktion war aufgrund der Instabilität der siRNA-Moleküle transient, weshalb der Proteinspiegel von hLa nach etwa 6 Tagen wieder anzusteigen begann (Daten nicht abgebildet). Die erreichte Reduktion war in dieser Zellinie in hohem Maße von der Transfektionseffizienz des jeweiligen Experimentes abhängig. Mit der Transfektionsreagenz Oligofectamine ist es prinzipiell möglich, eine Effizienz von etwa 90% zu erreichen ((47) und eigene Ergebnisse durch Immunfluoreszenzen (s. Abb. 39 A)). In Huh7-Zellen war die Verminderung des La-Proteinspiegels nicht in jedem

Experiment reproduzierbar effizient. Um einen längerfristigen Effekt von stärkerer Reproduzierbarkeit zu erzielen, wurde daher ein Experiment mit siRNA-Doppelbehandlungen im Abstand von drei Tagen durchgeführt. Dafür wurden Huh7-Zellen zwei Tage nach der ersten Behandlung erneut so ausgesät, dass am Tag 3 eine Konfluenz von 30-50% erreicht wurde und eine weitere RNAi-Behandlung durchgeführt werden konnte.



Abb. 8: Reduktion des hLa-Proteinspiegels in Huh7-Zellen nach Zweifachbehandlung mit siRNA: Huh7-Zellen wurden im Abstand von drei Tagen zweimal mit La- und Luci-siRNA behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweiten RNAi-Behandlung analysiert. Abgebildet ist eine *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen das hLa-Protein (monoklonaler Antikörper SW5, Verd. 1:500) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000). Die Auftrennung erfolgte mittels einer 12,5%-igen SDS-PAGE. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Molekulargewicht wurde mit Hilfe eines vorgefärbten Proteinmarkers bestimmt. Die hLa-Signale wurden quantifiziert und gegen die Tubulinsignale korrigiert.

Ein deutlicher Reduktions-Effekt auf 8,8% war bereits 12h nach der zweiten siRNA-Behandlung zu verzeichnen, dieser schwankte jedoch im weiteren Zeitverlauf nach der zweiten Behandlung stark (30,6% nach 24h, 15,5% nach 36h, 73% nach 48h, 65,5% nach 72h und 44,6% nach 96h). Bei dem in **Abb. 8** dargestellten Versuch handelt es sich um ein Einzelexperiment. Eine weiteres siRNA-Doppelbehandlungsexperiment, welches jedoch nur 48h nach der zweiten RNAi-Behandlung analysiert wurde, verstärkte die Annahme, dass in Huh7-Zellen mit diesem Verfahren nicht der gewünschte Erfolg einer längerfristigen, hoch effizienten und reproduzierbaren Verminderung des La-Proteinspiegels erzielt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Auslösung einer spezifischen RNA-Interferenz-Wirkung besteht in der Transfektion von entsprechenden Plasmiden, die in der Zelle siRNAs exprimieren. Diese Methode bot sich besonders an, da für die Untersuchungen bezüglich der HBV-RNA-Stabilität die Kotransfektion eines HBV-Plasmides erforderlich war (siehe **4.5**) und aus Vorexperimenten hervorging, dass die gleichzeitige Transfektion von siRNA-Molekülen und DNA-Plasmiden mit Hilfe von Oligofectamine nicht optimal war (Daten nicht abgebildet). Das sog. pSuper-Plasmid (22) wurde entsprechend **3.2.10** für hLa und Luciferase (als Kontrolle) kloniert. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen des Plasmides in die Zellen eingebracht (1 μ g-2,5 μ g/12-well, Daten nicht abgebildet). Da kein signifikanter Unterschied in der Reduktion des hLa-Proteinspiegels auftrat, wurde eine Konzentration von 1 μ g pro 12-*well* mit 1,2 x 10⁵ Zellen als ausreichend erachtet. Die folgende Abbildung (siehe **Abb. 9**) zeigt ein Experiment, bei dem für die Transfektion je 1 μ g pSuperLa bzw. pSuperLuci in 12-*wells* eingesetzt wurde.



Abb. 9: Reduktion des hLa-Proteinspiegels in Huh7-Zellen nach pSuperLa-Transfektion mit Selektion: Huh7-Zellen wurden mit 1 µg pSuperLa/Luci transfiziert, über ein kotransfiziertes Plasmid selektioniert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die *Western Blot*-Analyse erfolgte mit Antikörpern gegen hLa (mAb SW5, Verd. 1:500) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000), aufgetrennt in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Ein Proteinmarker zur Bestimmung des Molekulargewichts lief mit. Die graphische Darstellung gibt die quantifizierten und gegen Tubulin korrigierten hLa-Signale wieder.

Die Reduktion des La-Proteinspiegels durch pSuperLa-Transfektion mit gleichzeitiger Selektion über ein kotransfiziertes Plasmid wurde in vier unabhängigen Experimenten in Huh7-Zellen überprüft. Bei dem kontransfizierten Plasmid handelte es sich um ein GFP-N1-Plasmid (siehe 2.7), welches die Selektion über eine Resistenz gegen Neomycin erlaubte. Das in Abb. 9 abgebildete Experiment stellt eine effiziente Reduktion dar, wie sie in zwei von vier Experimenten erzielt werden konnte. Die Menge des La-Proteins war im dargestellten Experiment 48h nach der Transfektion auf 35,6% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die mäßige Reproduzierbarkeit ließ sich vermutlich trotz Selektion auf die initiale Transfektionseffizienz oder die unterschiedliche Reinheit verschiedener Plasmid-Präparationen zurückführen.

Um weiterführende Experimente bezüglich des Einflusses einer langfristigen Reduktion des hLa-Proteinspiegels auf die Zelle durchführen zu können, sollte eine stabil transfizierte Zellinie hergestellt werden. Die Etablierung scheiterte jedoch, da nach etwa vier Wochen Selektion ein verminderter Proteinspiegels nicht mehr nachweisbar war (siehe **5.1**). Generell kann festgestellt werden, dass die unterschiedlichen Anwendungen

der RNA-Interferenz gegen das La-Protein in Huh7-Zellen im Rahmen dieser Arbeit verhältnismäßig starken Schwankungen unterworfen waren.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass in Huh7-Zellen mit siRNA-Einfach- und Doppelbehandlungen zwar teilweise sehr gute Reduktionen des La-Proteinspiegels erreicht werden konnten, die jedoch nur zu etwa 50% reproduzierbar waren. Doppelbehandlungen mit siRNA erwiesen sich unter den untersuchten Bedingungen nicht als effizienter als Einfachbehandlungen, wobei zu klären bleibt, ob mit einer Veränderung der Behandlungsabstände eventuell größere Erfolge erzielt werden können. Transfektionen mit pSuperLa zeigten in dieser Zellinie eine etwas weniger effiziente Reduktion des La-Proteinspiegels als in U2OS-Zellen (siehe Abb. 15). Auch hier lag die Reproduzierbarkeit leider nur bei 50%.
4.1.2 Anwendung der RNA-Interferenz in Hep G2 2.15-Zellen

Da in der vorliegenden Arbeit unter anderem untersucht werden sollte, inwiefern sich eine Reduktion des hLa-Proteinspiegels auf die Stabilität der HBV-RNA auswirkt, wurden RNAi-Experimente in der Hepatoma-Zellinie Hep G2 2.15 durchgeführt. Bei dieser Zellinie handelt es sich um eine stabil mit einem HBV-Vektor transfizierte Linie, die infektiöse Viruspartikel bildet (157).



Abb. 10: Reduktion des hLa-Proteinspiegels in Hep G2 2.15-Zellen durch Einfachbehandlung mit siRNA: Hep G2 2.15-Zellen wurden mit hLa- und Luci-siRNA transfiziert (Endkonz. 100 nM) und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die *Western Blot*-Analyse wurde mit Antikörpern gegen hLa (mAb SW5, Verd. 1:500) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) durchgeführt, die Auftrennung erfolgte in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Ein Proteinmarker zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde verwendet. Die graphische Darstellung zeigt die quantifizierten und mit den Tubulinsignalen abgeglichenen hLa-Signale.

Auch in Hep G2 2.15-Zellen konnte eine Reduktion des hLa-Proteinspiegels gezeigt werden. Diese lag im abgebildeten Versuch mit 48,5% nach 24h und 37% nach 48h für diese Zellinie im relativ effizienten Bereich und war dennoch deutlich geringer als in Huh7-Zellen. Der hLa-Proteinspiegel wurde in dieser Zellinie in zwei unabhängigen Experimenten mit siRNA-Einfachbehandlung und einem Experiment mit siRNA-Doppelbehandlung mittels *Western Blot*-Analyse überprüft. Eine für diese Zellinie effiziente Reduktion, wie sie in Abb. 10 dargestellt ist, konnte nur in einem von zwei siRNA-Einfachbehandlungen gezeigt werden. Mit Hilfe der siRNA-Doppelbehandlung

in zwei Experimenten konnte insgesamt keine stärkere Reduktion als im abgebildeten Einfachbehandlungs-Experiment erreicht werden (Daten nicht abgebildet). Die geringe Reproduzierbarkeit war vermutlich auf eine schlechtere Transfektionsfähigkeit von Leberzellen, insbesondere Hep G2 2.15-Zellen, gegenüber anderen Geweben und Organen entstammenden Zellinien zurückzuführen. Eine Anwendung von pSuper-Plasmiden wurde nicht durchgeführt, da keine stärkere Reduktion von höherer Reproduzierbarkeit erwartet wurde. Durch die geringe Reduktionseffizienz und Reproduzierbarkeit traten im Zusammenhang mit der Untersuchung der HBV-RNA-Spiegel Probleme auf, die unter **4.5** detaillierter beleuchtet werden.

Hep G2 2.15-Zellen wurden nur in insgesamt vier Experimenten zur Etablierung der RNA-Interferenz verwendet. Tendenziell erschien diese Zellinie als die ungeeignetste der vier in dieser Arbeit verwendeten Zellinien, jedoch könnte auch hier die Effizienz der RNA-Interferenz durch Variation zusätzlicher Parameter möglicherweise verbessert werden. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der zur Verfügung stehenden Zeit leider nicht evaluiert werden.

4.1.3 Anwendung der RNA-Interferenz in U2OS-Zellen

Um Untersuchungen bezüglich des generellen Effekts der RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein auf die Zelle durchzuführen, wurde die Osteosarkoma-Zellinie U2OS gewählt. Diese zeichnet sich durch eine gute Transfizierbarkeit aus und schien daher geeignet. Zunächst wurden unterschiedliche Experimente mit siRNA-Einfachbehandlungen durchgeführt, bei denen die Endkonzentration der siRNA im Medium 100 nM entsprach.



Abb. 11: Reduktion des hLa-Proteinspiegels in U2OS-Zellen durch Einfachbehandlung mit siRNA: U2OS-Zellen wurden mit La- und Luci-siRNA behandelt (Endkonz. 100 nM) und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen hLa (mAB SW5, Ver. 1:500) und α -Tubulin (mAB, Verd. 1:4000) erfolgte nach der Auftrennung der Proteine in einer 12,5%-igen SDS-PAGE und der Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mit einem Proteinmarker. Die dargestellte Quantifizierung zeigt die hLa-Signale nach Korrektur gegen die Tubulinsignale.

Eine sichtbare Reduktion des hLa-Proteinspiegels auf 25,5% konnte bereits mit einer siRNA-Einfachbehandlung nach 36h detektiert werden (31,3% nach 48h und 52,6% nach 72h). Einfachbehandlungen mit siRNA wurden in U2OS-Zellen in 11 unabhängigen Experimenten angewendet, von denen 8 Experimente eine Reduktion wie im abgebildeten Versuch (siehe **Abb. 11**) oder besser bewirkten und 3 Experimente eine geringere Reduktion erzielten. Aufgrund der Vielzahl der durchgeführten Experimente

konnten diese statistisch ausgewertet werden und die durchschnittlichen hLa-Proteinspiegel in einer Abbildung dargestellt werden (siehe **Abb. 12**).



Abb. 12: Durchschnittliche Reduktion der hLa-Proteinexpression nach siRNA-Einfachbehandlung in U2OS-Zellen: U2OS-Zellen wurden einmal mit siRNA behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Die dargestellten Werte geben durchschnittliche hLa-Signale nach der Standardisierung mit den Tubulinsignalen wieder. Die jeweilige Standardabweichung ist angegeben.

In U2OS-Zellen konnte nach einer siRNA-Einfachbehandlung eine durchschnittliche Reduktion der La-Proteinspiegel auf 23,1% nach 36h, auf 20,9% nach 48h und auf 18,6% nach 72h gezeigt werden. Insgesamt konnte eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erreicht werden als in Huh7- oder Hep G2 2.15-Zellen.

Um eine längerfristige und stärkere Reduktion zu erreichen, wurde ebenfalls eine siRNA-Doppelbehandlung durchgeführt (siehe Abb. 13). Im Falle der U2OS-Zellen erwies sich eine zweite Behandlung am sechsten Tag nach der ersten Behandlung als sehr günstig, um über mehrere Tage hinweg einen konstanten, sehr niedrigen hLa-Proteinspiegel zu erzielen. Es gelang damit, diesen für einen Zeitraum von mehr als fünf Tagen nach der zweiten Behandlung unterhalb der Nachweisgrenze zu halten. Erst 144h nach der zweiten Behandlung konnte eine extrem schwache Bande von hLa in der *Western Blot*-Analyse wahrgenommen werden. Eine Erhöhung der siRNA-Konzentration auf 200 und 300 nM erwies sich als nicht effizienter als eine Konzentration von 100 nM.



Abb. 13: Nachhaltige starke Reduktion von La-Proteinspiegeln in U2OS-Zellen nach Doppelbehandlung mit siRNA: U2OS-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit hLa- und Luci-siRNA verschiedener Endkonzentrationen transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweiten Behandlung analysiert. Gezeigt ist eine *Western Blot*-Analyse mit Antikörpern gegen hLa (mAB SW5, Ver. 1:500) und α -Tubulin (mAB, Verd. 1:4000). Die Proteine wurden in einer 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch einen Proteinmarker. Eine Quantifizierung entfiel aufgrund der größtenteils nicht nachweisbaren hLa-Proteinsignale.

Der in Abb. 13 gezeigte Versuch stellt aufgrund des Zeitverlaufs ein Einzelexperiment dar, jedoch konnte in einem weiteren Experiment unter Anwendung der siRNA-Doppelbehandlung im Abstand von sechs Tagen, in dem ein kürzeres Zeitfenster analysiert wurde, die Beobachtung der anhaltenden, starken Reduktion bestätigt werden. Auch in U2OS-Zellen wurden Studien zur Reduktion der hLa-Proteinspiegel mittels Transfektion von pSuper-Plasmiden durchgeführt (siehe Abb. 14). Aufgrund der erfolgreichen Ergebnisse mit Huh7-Zellen wurden die Zellen ebenfalls mit 1 µg Plasmid pro 12-*well* transfiziert.



14: Reduktion von Abb. hLa-Proteinspiegeln U2OS-Zellen in durch pSuperLa unter Selektion: U2OS-Zellen wurden mit je 1 µg pSuperLa/Luci transfiziert und über ein kotransfiziertes Plasmid ab 16h nach der Transfektion selektioniert. Für die Western Blot-Analyse wurden Antikörper gegen hLa (mAb SW5, Verd. 1:500) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) verwendet. Aufgetrennt wurden die Proteine mittels 12,5%iger SDS-PAGE, übertragen auf eine Nitrozellulosemembran. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch einen vorgefärbten Proteinmarker. Die Quantifizierung der hLa-Signale wurde mit Hilfe des BioRad Multiimagers vorgenommen und mit Hilfe der Tubulinsignale normalisiert.

Die Abb. 14 zeigt, dass 48h nach der pSuperLa-Transfektion das La-Protein auf 39% gesenkt war. Für U2OS-Zellen kann an dieser Stelle aufgrund der ausreichenden Datenfülle eine statistische Reduktionseffizienz durch das pSuperLa-Plasmid aus insgesamt sechs Experimenten dargestellt werden (siehe Abb. 15).



Abb. 15: Durchschnittliche Reduktion der La-Proteinspiegel durch pSuperLa in U2OS-Zellen: U2OS-Zellen wurden mit pSuperLa transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Dargestellt wurde die durchschnittliche hLa-Signalstärke nach Normalisierung gegen die Tubulinsignale. Standardabweichungen Die wurden berücksichtigt.

Im Durchschnitt konnte die Menge ds La-Proteins mit Hilfe dieser Anwendung nach 48h auf 23,9% und nach 72h auf 15% gesenkt werden. Damit lagen die Ergebnisse in einem Bereich, der etwa dem von siRNA-Einfachbehandlungen entspricht. Auch in U2OS-Zellen wurde versucht, eine stabil mit pSuper-Plasmiden transfizierte Zellinie zu etablieren. Jedoch war ebenso wie in Huh7-Zellen nach vier Wochen keine

Verminderung des hLa-Proteinspiegels mehr nachweisbar. Insgesamt konnten in U2OS-Zellen durch siRNA-Einfachbehandlungen und pSuper-Transfektionen effiziente und durch siRNA-Doppelbehandlungen hoch effiziente Verminderungen des hLa-Proteinspiegels erreicht werden.

4.1.4 Anwendung der RNA-Interferenz in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden wie U2OS-Zellen aufgrund ihrer guten Transfizierbarkeit verwendet und sollten ebenfalls den Untersuchungen zur generellen Wirkung der verminderten La-Proteinexpression auf die Zelle dienen. In dieser Arbeit konnten hoch signifikante und effiziente Ergebnisse mit Doppelbehandlungen erzielt werden, die in einem Zeitabstand von sechs Tagen erfolgten.



Abb. 16: Reduktion der La-Proteinspiegel nach siRNA-Doppelbehandlung in HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweiten Behandlung analysiert. Für die *Western Blot*-Analyse wurden Antikörper gegen hLa (mAb, 3B9, Verd. 1:500) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) benutzt. Die Auftrennung erfolgte in einer 12,5%-igen SDS-PAGE. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mittels Proteinmarker. Die Quantifizierung entfiel aufgrund der teilweise nicht nachweisbaren hLa-Signale.

In HeLa-Zellen konnte eine reproduzierbar hoch effiziente Verminderung des hLa-Proteinspiegels mit Hilfe der siRNA-Doppelbehandlung erreicht werden (siehe Abb. 16). Diese lag in sechs von sieben entsprechenden Experimenten unterhalb der Nachweisgrenze durch die *Western Blot*-Analyse und konnte zudem anhand von Immunfluoreszenzbildern belegt werden (siehe Abb. 39 A).

Da eine Vielzahl an Experimenten unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, ist es möglich, an dieser Stelle die Reduktion für bestimmte Zeitpunkte in statistisch ausgewerteter Form darzustellen (siehe **Abb. 17**).





Aus Abb. 17 geht hervor, dass siRNA-Doppelbehandlungen in HeLa-Zellen zu massiven Verminderungen der La-Proteinspiegel von sehr hoher Reproduzierbarkeit führten. Der durchschnittliche Proteinspiegel von hLa lag zu allen untersuchten Zeitpunkten zwischen 1 und 1,6% des Vergleichswertes.

4.2 Untersuchungen zur Funktion des humanen La-Proteins im Zellzyklus

Da bislang keine Informationen bezüglich der Frage nach der Notwendigkeit des hLa-Proteins für die Überlebensfähigkeit, das Zellwachstum und die Zellteilung vorliegen, sollte innerhalb der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Konsequenzen eine Reduktion des hLa-Proteinspiegels für diese Parameter hat. Erste Hinweise auf einen Einfluss auf die Zellvermehrung wurden bereits in den Experimenten zur Etablierung der Methodik der RNA-Interferenz gegen hLa gewonnen. Unter Zellvermehrung (Proliferation) wird die Erhöhung der Zellzahl als ein Resultat von Zellwachstum und Zellteilung verstanden (<u>http://ghr.nlm.mih.gov/ghr/glossary/cellproliferation</u>). Es wurde beobachtet, dass hLa-siRNA-behandelte Zellen scheinbar weniger Zellvermehrung maße in Huh7-Zellen gemacht werden und war auch im Phasenkontrastmikroskop zu beobachten. Zusätzlich wurde nach einigen Tagen eine offensichtlich geringere Stoffwechselaktivität durch die Farbe des Mediums im Vergleich mit den Kontrollzellen angezeigt. Ein verstärkter Zelltod in Form von abgelösten Zellen im Medium konnte im Vergleich mit kontrollbehandelten Zellen nicht erfasst werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weiterführende Experimente zur Zellvermehrung durchgeführt.

4.2.1 Die Reduktion des hLa-Proteinspiegels führt zu einer verminderten Zellvermehrung von U2OS-Zellen

Für den Zellvermehrungsassay (siehe 3.1.13) wurden U2OS-Zellen entweder zweifach im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt, am Tag nach der zweiten Behandlung gezählt und jeweils 0.5×10^5 Zellen auf 10 cm-Kulturschalen ausgesät oder mit pSuper-Plasmiden transfiziert, nach fünf Tagen gezählt und die gleiche Anzahl an Zellen auf 10 cm-Kulturschalen übertragen. In letzterem Fall wurde ein leeres GFP-Plasmid kotransfiziert, über welches eine Selektion mit dem Antibiotikum Neomycin ermöglicht wurde. Die Plasmid-transfizierten Zellen wurden ebenso wie die siRNAbehandelten Zellen drei Tage nach der Übertragung auf Kulturschalen mit GIEMSA-Lösung angefärbt und per Analyse mit dem BioRad Multiimager und der Software Quantity One ausgewertet. Hierbei wurde jedoch nicht zwischen Kolonien und nahe beieinander liegenden Zellen differenziert. Daher wurden zusätzlich Zellen stichprobenartiger Ausschnitte der 10 cm-Platten unter dem Mikroskop ausgezählt. Es stellte sich dabei heraus, dass die maschinell und mikroskopisch ermittelten Werte nicht signifikant divergierten. Bei den Versuchen wurden die entsprechenden Bedingungen jeweils in Doppelansätzen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter Trennung der unterschiedlichen Versuchsbedingungen.

Als zusätzliches Instrument zur Dokumentation der verminderten Zellvermehrung wurden Ausschnitte der zweimal siRNA-behandelten Zellen auf Kulturschalen mit 5facher Vergrößerung nach der Färbung unter dem Phasenkontrastmikroskop photographiert. An dieser Stelle werden einige dieser Daten exemplarisch gezeigt (siehe **Abb. 18; 19**).



Abb. 18: Normale Zellvermehrung von U2OS-Zellen nach Doppelbehandlung mit LucisiRNA: U2OS-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und am ersten Tag nach der zweiten RNAi auf Kulturschalen übertragen. Die Abbildung zeigt vier repräsentative Ausschnitte kontrollbehandelter Zellen, angefärbt mit GIEMSA drei Tage nach der Übertragung auf Kulturschalen.



Abb. 19: Verminderte Zellvermehrung von U2OS-Zellen nach Doppelbehandlung mit LasiRNA: U2OS-Zellen wurden zweifach im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und am ersten Tag nach der zweiten RNAi auf Kulturschalen übertragen. Die Abbildung zeigt vier repräsentative Ausschnitte kontrollbehandelter Zellen, angefärbt mit GIEMSA drei Tage nach der Übertragung auf Kulturschalen.

Im Vergleich der Abb. 18 und 19 wird deutlich, dass sich der Unterschied in der Zellvermehrung von hLa-siRNA-behandelten Zellen verglichen mit Kontrollzellen im

Phasenkontrastmikroskop deutlich zeigte, was die absolute Zellzahl betraf. Gleichzeitig konnte kein erhöhter Zelltod festgestellt werden, so dass die niedrigere Zellzahl nur auf eine verminderte Zellvermehrung zurückgeführt werden konnte.



Abb. 20: Zellvermehrung von U2OS-Zellen nach siRNA-Doppelbehandlung: Die Reduktion des La-Proteinspiegels hemmt die Zellvermehrung: U2OS-Zellen wurden im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt und am ersten Tag nach der zweiten RNAi-Behandlung auf Kulturschalen übertragen Diese wurden drei Tage nach dem Übertragen der Zellen mit GIEMSA-Lösung angefärbt und per Zellzählung mit Hilfe des BioRad *Imagers* ausgewertet.



Abb. 21: Zellvermehrung von U2OS-Zellen nach pSuper-Transfektion: Die Reduktion des La-Proteinspiegels hemmt die Zellvermehrung: U2OS-Zellen wurden mit pSuperLa/Luci transfiziert behandelt und nach fünf Tagen auf Kulturschalen übertragen Die Zellen wurden nach weiteren drei Tagen mit GIEMSA-Lösung angefärbt und per Zellzählung mit Hilfe des BioRad *Imagers* ausgezählt.

Nach der hLa-siRNA-Doppelbehandlung (siehe Abb. 20) war die Zellzahl drei Tage nach der Übertragung auf 10 cm-Kulturschalen mit nur 35,8% im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen deutlich verringert. Für pSuperLa-Transfektionen wurde hingegen verglichen mit den pSuperLuci-transfizierten Zellen eine Zellzahl von 51,2% bestimmt (siehe Abb. 21), so dass die Verminderung der Zellvermehrung hier etwas

weniger drastisch war. Um genauere Aussagen über die Zusammenhänge zwischen der Reduktion des hLa-Proteinspiegels und der verminderten Zellvermehrung machen zu können, sollten weiterführende Analysen durchgeführt werden (siehe **4.2; 4.3; 4.4**).

4.2.2 Die Reduktion des hLa-Proteinspiegels verursacht eine verminderte Zellvermehrung von HeLa-Zellen

Aufgrund der Beobachtungen während der Vorexperimente zur Etablierung der La-RNA-Interferenz sollte die Zellvermehrung in HeLa-Zellen mit Hilfe der in U2OS-Zellen angewandten Methodik reproduziert werden. Daher wurde ein Zellvermehrungsassay durchgeführt, für welchen HeLa-Zellen zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und am Tag nach der zweiten Behandlung gezählt wurden. Jeweils $0.5 \ge 10^5$ Zellen wurden für weitere drei Tage auf 10 cm-Kulturschalen übertragen. Es wurden jeweils Doppelansätze verwendet und ausgewertet. Um die Effekte der verminderten La-Proteinexpression auf die Zellvermehrung zu werden dieser Stelle zunächst einige verdeutlichen, an exemplarische Ausschnittsphotographien gezeigt (siehe Abb. 22; 23).



Abb. 22: Normale Zellvermehrung von HeLa-Zellen nach Doppelbehandlung mit LucisiRNA: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und am ersten Tag nach der zweiten RNAi-Behandlung auf Kulturschalen übertragen. Die Abbildung zeigt vier repräsentative Ausschnitte kontrollbehandelter Zellen, angefärbt mit GIEMSA drei Tage nach der Übertragung auf Kulturschalen.



Abb. 23: Verminderte Zellvermehrung von HeLa-Zellen nach Doppelbehandlung mit hLasiRNA: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und am ersten Tag nach der zweiten RNAi auf Kulturschalen übertragen. Die Abbildung zeigt vier repräsentative Ausschnitte der Zellen, angefärbt mit GIEMSA drei Tage nach der Übertragung auf Kulturschalen.

Die Auswertung erfolgte nach der GIEMSA-Färbung und dem mikroskopischen Dokumentieren der Kulturschalen mit Hilfe des BioRad *Multiimagers* (siehe Abb. 24). Zusätzlich wurden zur Kontrolle zufällig gewählte Bereiche der Kulturschalen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die ermittelten Zellzahlen divergierten nicht signifikant von den maschinell erhobenen.



Abb. 24: Die Zellvermehrung von HeLa-Zellen ist nach Reduktion des La-Proteinspiegels stark vermindert: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA transfiziert und am Folgetag auf Kulturschalen übertragen. Nach weiteren drei Tagen erfolgten die Färbung der Zellen mit GIEMSA und die Zählung mit Hilfe des BioRad *Multimagers*. Die graphische Darstellung beinhaltet die gemittelten Werte aus zwei Experimenten mit Doppelansätzen. Die Standardabweichung wurde berücksichtigt.

Im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen konnten nach der Reduktion des La-Proteinspiegels nur durchschnittlich 27,7% der Zellen gezählt werden. Ebenso wie in U2OS-Zellen bestand daher auch in HeLa-Zellen ein Zusammenhang zwischen der Verminderung des Proteinspiegels und der Zellvermehrung, welcher sich ebenfalls in der absoluten Zellzahl niederschlug. Da auch in diesem Experiment kein vermehrter Zelltod durch abgelöste Zellen detektiert wurde, lag die Annahme eines Einflusses der hLa-Proteinspiegel auf den Zellzyklus nahe. Dieser Einfluss sollte daher für HeLa-Zellen ebenfalls in weiterführenden Experimenten studiert werden (siehe **4.2; 4.3; 4.4**).

4.2.3 Untersuchung von Zellzyklusveränderungen nach Reduktion des hLa-Proteinspiegels durch FACS-Analysen

Aus den Zellvermehrungsassays ging deutlich hervor, dass sich die Verminderung des La-Proteinspiegels durch RNA-Interferenz in U2OS- und HeLa-Zellen auf die Zellvermehrung auswirkte. Es sollte zunächst untersucht werden, ob sich der beobachtete Effekt durch die Messung der Zellzyklusphasen belegen lässt. Mit Hilfe der FACS-Analyse (siehe **3.1.12**) sollten die einzelnen Phasen des Zellzyklus bestimmt werden, um so eine eventuelle prozentuale Verschiebung in Zellen mit hLa-Defizit dokumentieren zu können. Die FACS-Analysen wurden mit Hilfe eines Coulter Epics XL der Firma Beckman durchgeführt und mit der Software EXPOTM 32 (Beckman) ausgewertet. Für die quantitative Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen wurden jeweils innerhalb des entsprechenden Experiments die gleichen Bereiche der DNA-Gehalt-Skala für die einzelnen Zyklusphasen gesetzt (siehe **Abb. 25**), so dass zwischen La-siRNA-behandelten Zellen und Kontrollzellen verglichen werden konnte.



Abb. 25: Darstellung der quantifizierten Regionen zur Zellzyklusbestimmung: Die in den folgenden Abschnitten dargestellten Daten wurden mit Hilfe des Programms EXPO 32 ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden innerhalb jeden Experiments die gleichen Regionen für die Bestimmung der G1-, S- und G2-Phase gesetzt. Die Sub-G1-Phase konnte nicht direkt quantifiziert werden, da sie nicht nur ganze Zellen beinhaltet. Die X-Achse gibt den relativen DNA-Gehalt der Zellen an, gemessen anhand der Intensität der Propidiumiodid-Fluoreszenz (PI). Die Y-Achse gibt die Menge der gezählten Zellen an.

4.2.4 Die Senkung des hLa-Proteinspiegels bewirkt eine Erhöhung der G1-Population in U2OS-Zellen

Für die Versuche in U2OS-Zellen wurden zunächst einmal und zweimal (im Abstand von sechs Tagen) behandelte Zellen verwendet, die nicht teilsynchronisiert wurden (Daten nicht gezeigt). In diesen konnte eine Zellzyklusverschiebung nach einfacher hLa-siRNA-Behandlung zu den Zeitpunkten 36h, 48h und 60h festgestellt werden, während sich zu früheren Zeitpunkten (6h, 12h, 18h und 24h) und zum Zeitpunkt 72h im Vergleich mit Kontrollzellen keine signifikante Veränderung nachweisen ließ. Daher handelte es sich um einen vorübergehenden Effekt, der nur zwischen 36h und 60h zu beobachten war. Um die Unterschiede in der Zellzyklusverteilung noch deutlicher sichtbar zu machen, wurde das (partielle) Synchronisieren (siehe **3.1.14**) der Zellen durch eine 7-tägige Serum-Mangel-Phase mit 0,1%FCS angewandt, welches den messbaren Effekt verstärkte (siehe **Abb. 26; 27**). Der Erfolg der Teilsynchronisierung wurde in Vorexperimenten überprüft und zeigte ab einer dreitägigen Serum-Mangelphase eine deutliche G1-Phasen-Erhöhung. Die Rate der Synchronisierung wurde durch eine Verlängerung der Serum-Mangelphase bis zu 7 Tagen nicht signifikant erhöht (Daten nicht abgebildet).



Abb. 26: Vorübergehende (*transiente*) Erhöhung der G1-Population teilsynchronisierter U2OS-Zellen nach Reduktion des La-Proteinspiegels durch siRNA-Einfachbehandlung: U2OS-Zellen wurden sechs Tage vor der RNAi unter Serum-Mangel (0,1%) kultiviert und dadurch teilsynchronisiert Das Entlassen erfolgte 24h nach der siRNA-Behandlung. Die angegebenen Zeitwerte beziehen sich auf die Stundenzahl nach der RNA-Interferenz. Eine prozentuale Erhöhung der G1-Population nach Reduktion der La-Proteinexpression war zu allen abgebildeten Zeitpunkten nachweisbar (Tab. 1).

Tab. 1	Luci 36h	La 36h	Luci 48h	La 48h	Luci 60h	La 60h
G1-Phase	44,20%	54,90%	41%	44,20%	43,90%	51,90%
S-Phase	18,80%	15%	27%	29,90%	20,80%	19,20%
G2-Phase	36,90%	30%	32%	25,90%	35,20%	28,90%



Abb. 27: Teilsynchronisierte U2OS-Zellen zeigen eine veränderte Zellzyklusverteilung nach Einfachbehandlung mit hLa-siRNA: U2OS-Zellen wurden sieben Tage unter Serum-Mangel kultiviert und einmal mit siRNA behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der RNAi wurden die Zellen für die FACS-Analyse fixiert. Die graphisch dargestellten Werte aus Tab. 1 sind die ermittelten Zahlen aus dem in Abb. 26 dargestellten Experiment.

Aufgrund der FACS-Analysen von teilsynchronisierten U2OS-Zellen konnte festgestellt werden, dass eine Umverteilung der Zellzyklusphasen zu bestimmten Zeitpunkten stattfand. Zellen mit hLa-Defizit arretierten zwischen 36h und 60h verstärkt in der G1-Phase (siehe **Tab. 1**). Zum Zeitpunkt 36h befanden sich von diesen mit 54,9% gegenüber 44,2% bei kontrollbehandelten Zellen 10,7% mehr Zellen in der G1-Phase. Zum Zeitpunkt 48h waren es nur 3,2% mehr Zellen, jedoch auch 2,9% mehr Zellen in der S-Phase und deutlich weniger Zellen (25,9% der Zellen mit La-Mangel gegenüber 32% bei den Kontrollzellen), die bereits die G2-Phase erreicht hatten. Zum Zeitpunkt 60h wurde die Zellzyklusverschiebung wieder anschaulicher mit 51,9% der Zellen mit La-Defizit und 43,9% der Kontrollzellen in der G1-Phase. Diese Erhöhung der G1-Population konnte in der dargestellten Größenordnung nicht zu früheren Zeitpunkten und nicht mehr 72h nach Einfachbehandlung mit siRNA beobachtet werden. Daher handelte es sich um eine *transiente* (vorübergehende) G1-Erhöhung.

Auch eine Doppelbehandlung mit siRNA wurde durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen behandelt und lediglich zum Zeitpunkt 48h nach

Zweitbehandlung analysiert. Obwohl diese Zellen nicht teilsynchronisiert wurden, zeigten sie eine sehr deutliche G1-Erhöhung (siehe Abb. 28; 29).



Abb. 28: Deutliche G1-Erhöhung nach Reduktion des La-Proteinspiegels durch siRNA-Doppelbehandlung in asynchronen U2OS-Zellen: U2OS-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und 48h nach der zweiten RNAi analysiert. Es wurde eine deutliche Verschiebung zugunsten der G1-Phase bei Zellen mit La-Defizit gemessen.

Tab. 2	Luci 48h	La 48h
G1-Phase	37,7%	56,3%
S-Phase	29,7%	19,4%
G2-Phase	32,6%	24,3%



Abb. 29: Asynchrone U2OS-Zellen mit La-Defizit zeigen eine deutlich veränderte Zellzyklusverteilung nach siRNA-Doppelbehandlung: U2OS-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und zum angegebenen Zeitpunkt nach der zweiten RNAi für die FACS-Analyse fixiert. Die hier graphisch dargestellten Werte aus Tab. 2 sind die ermittelten Zahlen aus dem in Abb. 28 dargestellten Experiment.

Eine sehr klare Erhöhung der G1-Population konnte in U2OS-Zellen beobachtet werden, die zweifach im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt wurden. Wie

Tab. 2 sowie **Abb. 29** entnommen werden kann, befanden sich zu dem untersuchten Zeitpunkt mit 56,3% der Zellen mit hLa-Defizit gegenüber 37,7% der Kontrollzellen etwa 20% mehr Zellen in der G1-Phase und deutlich weniger Zellen in der S-Phase und der G2-Phase. Die **Abb. 28** zeigt diesen Effekt sehr anschaulich, ist aber in Bezug auf die in der Darstellung erhöhte Sub-G1-Phase der Zellen mit hLa-Mangel nicht repräsentativ.

Mit Hilfe der FACS-Analyse können nicht nur die einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt werden, sondern auch erste Hinweise auf Apoptose gewonnen werden. Apoptotische Zellen erscheinen in der sog. Sub-G1-Phase, welche jedoch keine genaue Quantifizierung ermöglicht, da sie sowohl tote Zellen als auch Zelltrümmer beinhaltet. Daher kann diese Methode nur zum Ausschluss von Apoptose verwendet werden. Wie anhand sämtlicher Abbildungen deutlich wird, bestand in den durchgeführten Experimenten kein Anlass zur weiterführenden Untersuchung einer möglichen Apoptose nach Reduktion des hLa-Proteinspiegels. Die gemessenen Proben beinhalteten zudem abgelöste Zellen des Überstandes, so dass selbst tote Zellen erfasst worden wären. Somit konnte insgesamt im Vergleich zwischen Luci- und hLa-siRNAbehandelten Zellen kein signifikanter, reproduzierbarer Unterschied festgestellt werden. Eine dennoch vorhandene Sub-G1-Rate war von der Qualität der Fixierung abhängig und trat sowohl bei hLa- als auch bei Luci-siRNA-behandelten Zellen gelegentlich auf. Insgesamt konnte eine sehr deutlich erhöhte G1-Population in doppelt hLa-siRNAbehandelten, asynchronen Zellen und eine vorübergehende Erhöhung der G1-Population in einfach hLa-siRNA-behandelten, teilsynchronisierten Zellen beobachtet werden.

4.2.5 Die Senkung des La-Proteinspiegels bewirkt keine messbare Veränderung der Zellzyklusverteilung in HeLa-Zellen

Da in HeLa-Zellen wie in U2OS-Zellen ein Einfluss der Reduktion des La-Proteinspiegels auf die Zellvermehrung nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob dieser ebenfalls mit einer Erhöhung der G1-Population einhergeht. Es wurden drei verschiedene Experimente durchgeführt, in denen HeLa-Zellen im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt wurden. Nachdem im ersten Experiment ohne Teilsynchronisation gearbeitet wurde und keine deutliche prozentuale Verschiebung gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde in zwei Experimenten das Serum im Zellmedium auf 0,1% FCS reduziert. Daher wurden die Zellen zunächst für drei Tage ab Tag 4 nach der ersten siRNA-Behandlung unter Entzugsbedingungen kultiviert. Der Entzug wurde 18h nach der zweiten RNA-Interferenz beendet. Die Proben (jeweils Doppelwerte) wurden 24h und 42h nach der zweiten RNAi-Behandlung für die FACS-Analyse fixiert (siehe **Abb. 30**).



Abb. 30: Zellzyklusverteilung von teilsynchonisierten HeLa-Zelen nach siRNA-Doppelbehandlung und dreitägiger Serum-Mangelphase: HeLa-Zellen wurden im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt und mit Serum-Mangel teilsynchronisiert. Das Entlassen aus dem Serum-Mangel erfolgte 18h nach der zweiten RNAi-Behandlung. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 24h (6h nach Entlassen) und 42h (24h nach Entlassen) nach der zweiten RNAi-Anwendung für die FACS-Analyse fixiert.

Tab. 3	Luci 24h	La 24h	Luci 42h	La 42h
G1-Phase	67,8%	63,6%	68,5%	74,3%
S-Phase	17,9%	20,9%	17,4%	15,3%
G2-Phase	14,3%	15,5%	14,1%	10,4%





Aus den Ergebnissen der FACS-Messung der Zellen, die für drei Tage unter Serum-Mangel kultiviert worden waren, konnte keine signifikante Zellzyklusverschiebung detektiert werden (siehe **Abb. 30; 31**). Daher wurde angenommen, dass bei HeLa-Zellen eine längere Serum-Mangelphase notwendig sein könnte, um eine höhere Synchronisationsrate zu erreichen und damit einen eventuell vorhandenen Effekt sichtbar zu machen. Daher wurden erneut Zellen zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt. Die Serum-Mangelphase erstreckte sich über einen Zeitraum von 5 Tagen während der Behandlungen. Das Entlassen erfolgte 24h nach der zweiten RNAi-Behandlung durch Zugabe von Serum zum Zellmedium (Endkonz. 10% FCS). Die Proben wurden 30h, 42h und 56h nach der zweiten RNAi-Behandlung für die FACS-Analyse fixiert und zu einem späteren Zeitpunkt gefärbt und gemessen.



Abb. 32: FACS-Analyse von teilsynchronisierten HeLa-Zellen nach Doppelbehandlung mit siRNA unter fünftägigem Serum-Mangel: HeLa-Zellen wurden im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA transfiziert und währenddessen für fünf Tage durch Serum-Mangel (0,1% FCS) teilsynchronisiert. 24h nach der zweiten siRNA-Behandlung wurden die Zellen aus dem Entzug entlassen (10% FCS). Zu den Zeitpunkten 30h, 42h und 56h nach der zweiten RNAi wurden die Zellen für die FACS-Analyse fixiert.

Tab. 4	Luci 30h	La 30h	Luci 42h	La 42h	Luci 72h	La 72h
G1-Phase	54,8%	58,8%	64,7%	61,7%	60,4%	58,9%
S-Phase	12%	14%	10,7%	14%	12,8%	15,9%
G2-Phase	33,2%	27,2%	24,6%	24,4%	26,8%	25,2%

Wie im Serum-Mangel-Experiment konnte auch ersten unter längeren Mangelbedingungen keine starke Umverteilung im Zellzyklus festgestellt werden. Lediglich geringfügige Unterschiede konnten ermittelt werden (siehe Abb. 32; 33). Ein G1-Arrest war zu keinem untersuchten Zeitpunkt erkennbar. Ein sehr geringer Zuwachs konnte jedoch bei Zellen mit La-Mangel der S-Phase zugeordnet werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass bei diesen Zellen ab dem Zeitpunkt 42h eine zweite G1-Spitze sichtbar wurde. Zudem wurde unter diesen Bedingungen eine deutlich erhöhte Sub-G1-Phase im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen festgestellt. Eine generelle Erhöhung der Sub-G1-Phase in allen untersuchten Proben dieses Experiments verglichen mit den Ergebnissen vorhergehender Experimente wurde einer großen Empfindlichkeit von HeLa-Zellen gegenüber einer längeren Serum-Mangelphase zugeschrieben. Unter anderen Bedingungen konnte jedoch ebenso wie in U2OS-Zellen keine erhöhte Sub-G1Phase bei Zellen mit La-Defizit detektiert werden, so dass keine Anhaltspunkte für apoptotische Prozesse gegeben waren. Da die gemessenen Proben ebenfalls stets den Zellüberstand enthielten, konnte auf diese Weise mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die Verminderung des hLa-Proteinspiegels zu Apoptose führt.

Insgesamt konnte in HeLa-Zellen keine signifikante Verschiebung der Zellzyklusphasen nach Reduktion der La-Proteinspiegel beobachtet werden.



Abb. 33: HeLa-Zellen zeigen keine signifikant veränderte Zellzyklusverteilung nach hLasiRNA-Doppelbehandlung unter 5-tägigem Serum-Mangel: HeLa-Zellen wurden im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt, währenddessen für fünf Tage mit Serum-Mangel teilsynchronisiert und zu den angegebenenen Zeitpunkten nach der zweiten siRNA-Gabe für die FACS-Analyse fixiert. Die hier graphisch dargestellten Werte aus **Tab. 4** stellen die ermittelten Prozentzahlen aus dem in **Abb. 32** dargestellten Experiment dar.

4.2.6 Einfluss der verminderten La-Proteinexpression auf den Proteinspiegel von Zellzyklus-modulierenden Proteinen

Aufgrund der Ergebnisse der FACS-Analysen in U2OS-Zellen und der Studien zur Zellvermehrung in U2OS- und HeLa-Zellen wurde vermutet, dass durch die Reduktion der hLa-Proteinexpression wichtige Zellzyklusregulatoren dereguliert werden könnten. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob etwaige Veränderungen der Proteinspiegel von Zellzyklus-modulierenden Proteinen nachgewiesen werden können. Anhand der Daten aus der FACS-Analyse von U2OS-Zellen wurde das Hauptaugenmerk zunächst auf wichtige Proteine der G1-Phase gerichtet. Eine große Rolle spielen in diesem Zusammenhang unter anderem die G1-Zykline E und D1, die in daher im Mittelpunkt der nachfolgenden Untersuchungen standen.

4.2.7 Der Proteinspiegel von Zyklin E ist in U2OS-Zellen mit hLa-Defizit transient reduziert

In U2OS-Zellen konnte anhand der FACS-Analysen ein vorübergehender (*transienter*) G1-Arrest nach La-RNAi-Behandlung dokumentiert werden. Dieser begann 36h nach der siRNA-Einfachbehandlung und setzte sich bis zum Zeitpunkt 72h fort. Zu späteren Zeitpunkten war kein deutlicher G1-Arrest mehr detektierbar. Da ein G1-Arrest von einer Deregulation der G1-Zykline verursacht werden kann, sollte zunächst der Proteinspiegel von Zyklin E untersucht werden. Zyklin E ist für den Übergang von der G1- in die S-Phase von großer Bedeutung. Die Versuche wurden in nichtsuch Doppelbehandlungen angewandt.



Abb. 34: Die Verminderung des La-Proteinspiegels beeinflusst in U2OS-Zellen den Proteinspiegel von Zyklin E (Doppelbehandlung mit siRNA): U2OS-Zellen wurden im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt. Die angegebenen Zeitwerte beziehen sich auf die Zeit nach der zweiten Behandlung.

A: Für die Western Blot-Analyse wurden nach Auftrennen der Proteine in einer 12,5%-igen SDS-PAGE und Übertragung auf Nitrozellulose Antikörper gegen hLa (mAB SW5, Verd. 1:500), Zyklin E (mAb, Verd. 1:1000) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) verwendet.

B: Die Zyklin E-Signale wurden gegen die Tubulinsignale normalisiert und quantifiziert.

Mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Zyklin E-Proteinspiegel 48h nach der zweiten siRNA-Behandlung drastisch reduziert war (**Abb. 34**). Gleichzeitig war das La-Protein nicht mehr nachweisbar, während der Tubulin-Spiegel nicht betroffen war. Es ergab sich eine Reduktion von Zyklin E 48h nach der zweiten. RNAi auf 18,6%, zum Zeitpunkt 72h auf 58,1% und zum Zeitpunkt 6d auf 81,3%. Das La-Protein war zu den Zeitpunkten nicht (48h und 72h) bzw. kaum (6d) nachweisbar, weshalb keine graphische Darstellung der Quantifizierung gezeigt wird. Es zeigte sich, dass die Zyklin E-Spiegel nur vorübergehend stark vermindert waren, obwohl die hLa-Proteinspiegel über beinahe den gesamten Zeitraum unter der Nachweisgrenze lagen.



Abb. 35: Der Mangel des La-Proteins beeinflusst in U2OS-Zellen den Proteinspiegel von Zyklin E (Einfachbehandlung mit siRNA): U2OS-Zellen wurden mit siRNA transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten analysiert. Die *Western Bot*-Analyse wurde mit Antikörpern gegen hLa (mAb SW5, Verd. 1:500), Zyklin E (mAb, Verd. 1:1000), Zyklin D1 (mAb, Verd. 1:100), Pho-H3 (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Verd. (1: 100) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) durchgeführt. Nach Auftrennung in einer 12,5%-igen SDS-PAGE erfolgte die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Die Proteinspiegel wurden mit Tubulinsignalen normalisiert und quantifiziert.

Der Effekt des verminderten La-Proteinspiegels auf den Zyklin E-Proteinspiegel konnte auch in zwei Experimenten mit siRNA-Einfachbehandlung gezeigt werden. Die Proteinexpression von hLa belief sich im dargestellten Experiment (Abb. 35) auf 25,5% (36h), 31,3% (48h) bzw. 52,6% (72h), wie in Abb. 36 A graphisch gezeigt wurde. Zyklin E war nach 36h auf 28,2% und nach 48h auf 52% des Vergleichswertes erniedrigt, während es nach 72h um 17% erhöht war (siehe Abb. 36 B). Im Gegensatz zu Zyklin E konnte hinsichtlich des Proteinspiegels von Zyklin D1 keine entsprechend starke Abweichung gegenüber kontrollbehandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 36 C). Der Proteinspiegel betrug zum Zeitpunkt 36h 85,7% und zum Zeitpunkt 48h 61,4% und war nach 72h gegenüber der Kontrolle (75,5%) ebenso wie Zyklin E leicht erhöht. Der Antikörper gegen phosphoryliertes Histon H3 wurde verwendet, um zu untersuchen, ob sich weniger Zellen in der Mitose befinden, da H3 nur während der Mitose in phosphorylierter Form und in den anderen Phasen als nichtphosphoryliertes Protein vorliegt. Wie anhand der Abb. 36 D deutlich wird, unterschieden sich die Proteinspiegel von Zellen mit vermindertem La-Proteinspiegel in Hinsicht auf Pho-H3 nicht signifikant von denen der Kontrollzellen. Folglich konnte gezeigt werden, dass das La-Protein offensichtlich die Zyklin E-Proteinspiegel sehr stark, die Zyklin D1-Spiegel geringfügig und die Histon H3-P-Spiegel nicht reguliert.



Abb. 36: Der erniedrigte La-Proteinspiegel beeinflusst in U2OS-Zellen den Proteinspiegel von Zyklin E nach siRNA-Einfachbehandlung: U2OS-Zellen wurden mit siRNA behandelt und zu den dargestellten Zeitpunkten mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Die Signale der Proteinspiegel wurden gegen die Tubulinsignale normalisiert und quantifiziert. A: Der La-Proteinspiegel ist deutlich reduziert. B: Diese Reduktion korreliert mit einer transienten Verminderung von Zyklin E. C: Der Proteinspiegel von Zyklin D1 ist weniger stark beeinflusst. D: Die Quantifizierung von phosphoryliertem Histon H3 ergab keine signifikanten Veränderungen.

4.2.8 Der Proteinspiegel von Zyklin D1 ist durch die Erniedrigung des hLa-Proteinspiegels in HeLa-Zellen konstant vermindert

Eine deutliche prozentuale Verschiebung der Zellzyklusphasen wie in U2OS-Zellen konnte in der FACS-Analyse von HeLa-Zellen nicht verzeichnet werden. Da jedoch die Ergebnisse der Zellvermehrungsassays sehr stark auf einen Einfluss des La-Proteins auf die Zellvermehrung von HeLa-Zellen hinwiesen, sollten ebenfalls die Proteinspiegel wichtiger Zykline durch *Western Blot*-Analyse untersucht werden. Hierfür wurden siRNA-Doppelbehandlungen durchgeführt.



Abb. 37: Der Proteinspiegel von Zyklin D1 ist nach der Reduktion der La-Proteinexpression durch siRNA-Doppelbehandlung in HeLa-Zellen konstant stark reduziert: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und zu den angebenen Zeiten nach der zweiten RNAi analysiert. Die *Western Blot*-Analyse wurde mit Antikörpern gegen hLa (mAb 3B9, Verd. 1:400), Zyklin D1 (mAb, Verd. 1:100), Zyklin E (mAb, Verd. 1:1000), Zyklin A (polyklonaler Ab, Verd. 1:1000) und α -Tubulin durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte zuvor in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker verwendet.

In Abb. 37 wird deutlich, dass das humane La-Protein in HeLa-Zellen den Proteinspiegel von Zyklinen, insbesondere Zyklin D1, beeinflusst. Zyklin D1 war zu den Zeitpunkten 24h-72h nach der zweiten siRNA-Behandlung nicht durch *Western Blot*-Analyse bestimmbar und konnte erst zum Zeitpunkt 96h erneut in sehr geringer Menge nachgewiesen werden.



Abb. 38: Proteinspiegel von Zyklinen nach La-Mangel in HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und zu den angegebenen Zeiten nach der zweiten siRNA-Gabe analysiert. Das La-Protein war zu Zeitpunkt keinem im Western Blot sichtbar. Die Quantifizierung der Zykline erfolgte mit dem BioRad Multiimager und wurde gegen Tubulin-signale normalisiert.

A: Zyklin D1 wird durch La-Mangel drastisch gesenkt: Zyklin D1 war in Zellen mit La-Defizit erst nach 96h detektierbar.

B: Zyklin E-Spiegel nach La-Mangel: Zyklin E war an vier von fünf Zeitpunkten in Zellen mit La-Mangel vermindert.

C: Zyklin A-Spiegel nach La-Defizit: Der Proteinspiegel von Zyklin A war zu allen untersuchten Zeitpunkten nur leicht reduziert.

Abb. 38 zeigt die graphische Darstellung der quantifizierten Proteinspiegel aus dem in Abb. 37 dargestellten Experiment. Zyklin D1 konnte erst 96h nach der zweiten hLasiRNA-Behandlung mit 10,8% im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen bestimmt werden. Der Proteinspiegel von Zyklin E war ebenfalls vom La-Defizit betroffen, jedoch in einem geringeren Ausmaß als der von Zyklin D1. Zu den Zeitpunkten 24h, 72h und 96h nach der zweiten RNAi-Behandlung war Zyklin E auf etwa 40% reduziert, während sich zum Zeitpunkt 36h kein Unterschied zwischen dem Proteinspiegel von Zellen mit La-Mangel im Vergleich zur Kontrolle feststellen ließ. Innerhalb der nächsten zwölf Stunden sank die Proteinmenge vergleichsweise wieder auf etwa 70% zum Zeitpunkt 48h (**Abb. 38 B**). Zyklin A, welches im Gegensatz zu Zyklin D1 und E vor allem während der S-Phase benötigt wird, zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine leichte Verminderung auf 70%-90% des Ausgangswertes (**Abb. 38 C**). Bezüglich der Zeitwerte stellt das an dieser Stelle abgebildete und quantifizierte Experiment ein Einzelexperiment dar, jedoch konnte der Effekt auf Zyklin D1 in vier unabhängigen Experimenten reproduziert werden, in welchen der Zyklin D1-Proteinspiegel 48h nach der zweiten RNAi-Behandlung zwischen 0 und 30% lag.

Die Zyklin E-Proteinspiegel wurden in zwei weiteren Experimenten zum Zeitpunkt 48h untersucht und lagen hier nach der Erniedrigung des La-Proteinspiegels bei 67% und 84% im Vergleich zum Kontrollwert. Der Zyklin A-Proteinspiegel wurde hingegen nicht in weiteren Experimenten untersucht.

Der verminderte Proteinspiegel von Zyklin D1 nach der hLa-siRNA-Doppelbehandlung sowie die deutliche Reduktion der La-Proteinspiegel konnten auch in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Aufgrund der Reduktion der hLa-Proteinspiegel in beinahe allen Zellen kann eine hohe Transfektionseffizienz der siRNAs angenommen werden. Die gezeigte Verteilung des endogenen La-Proteins ist typischerweise überwiegend nukleär (Abb. 39 A). Die Verteilung von Zyklin D1 ist hingegen stark von der Zellzyklusphase abhängig. Eine überwiegend zytoplasmatische Verteilung, wie sie an dieser Stelle (Abb. 39 B) gezeigt wird, kann nur während der S-Phase beobachtet werden (41, 166). Da jedoch Zyklin D1 in anderen Bereichen des Präparates auch im Kern sichtbar war, wurde diese Verteilung hier ebenfalls dargestellt (siehe Abb. 39 C). Für Zyklin D1 mussten zudem sehr lange Belichtungszeiten verwendet werden, und die Färbung des Präparates war unregelmäßig, so dass die Verwendung eines anderen Antikörpers für die Immunfluoreszenzen zur Wiederholung des Experimentes für eindeutige Rückschlüsse notwendig ist. Außerdem wäre es ratsam, für die Detektion von Zyklin D1 einen polyklonalen Antikörper zu verwenden, um beide Proteine in den selben Zellen des gleichen Präparates darstellen zu können und nicht wie hier aufgrund der zwei monoklonalen Antikörper unterschiedliche, jedoch identisch behandelte Präparate verwenden zu müssen.



Abb. 39 A u. B: Die Reduktion des La-Proteinspiegels führt zu einem stark verminderten Zyklin D1-Proteinspiegel in HeLa-Zellen: Es wurden HeLa-Zellen verwendet, die im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt wurden. 48h nach der zweiten Behandlung wurden die Zellen mit Methanol/ Aceton fixiert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Antikörper gegen hLa (mAb, SW5, 1:500) (A) und Zyklin D1 (mAb, 1:100) (B) sowie Hoechstfärbung zur Darstellung des Kerns benutzt. Die Abbildungen wurden mit 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop photographiert.



Abb. 39 C: Der erniedrigte La-Proteinspiegel führt zu einem stark verminderten Zyklin D1-Proteinspiegel in HeLa-Zellen: Es wurden HeLa-Zellen verwendet, die im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt wurden. 48h nach der zweiten Behandlung wurden die Zellen mit Methanol/Aceton fixiert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Antikörper gegen Zyklin D1 (mAb, 1:100) (C) sowie Hoechstfärbung zur Darstellung des Kerns benutzt. Die Abbildungen wurden mit 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop photographiert

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das La-Protein in HeLa-Zellen offensichtlich für die Aufrechterhaltung normaler Proteinspiegel von Zyklin D1 und in geringerem Ausmaß auch für die von Zyklin E notwendig ist. Die verminderten Proteinspiegel korrelierten dabei mit einer deutlich verlangsamten Zellvermehrung.

4.3 Untersuchungen zur Spezifität der RNA-Interferenz: Aufhebung der Effekte des La-Mangels durch Überexpression von GFP-hLa

In den bisher dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass ein Defizit an endogenem La-Protein in HeLa-Zellen eine deutlich verminderte Zellvermehrung bewirkte. Zudem wurde ein stark verminderter Zyklin D1-Spiegel beobachtet. Ein unspezifischer Effekt durch siRNAs ist auch unter Verwendung von Kontroll-siRNAs ohne weitere Kontrollexperimente nicht vollkommen auszuschliessen. Daher sollte untersucht werden, ob die Zellvermehrung und der erniedrigte Zyklin D1-Proteinspiegel durch das Einbringen von hLa, dessen mRNA durch die Einführung von Mutationen in die siRNA-Erkennungsstelle nicht von der RNAi betroffen wird, aufgehoben oder vermindert werden kann.

Für die Durchführung der Experimente war es zunächst essentiell, ein hLaexprimierendes Plasmid herzustellen, dessen mRNA nicht von der hLa-siRNA degradiert wird und das dennoch das vollständige humane La-Protein exprimiert. Daher wurden drei stille Punktmutationen im Bereich der ausgewählten siRNA-Bindestelle in ein hLa-Plasmid eingeführt, welches in der Arbeitsgruppe vorhanden war (siehe **2.7**; **3.2.9**). Für diesen Zweck wurde ein Plasmid gewählt, das für ein Fusionsprotein aus einem grün <u>f</u>luoreszierenden <u>P</u>rotein (GFP) und dem humanen La-Protein der vollen Länge kodiert (pEGFP-hLa-C1-WT, siehe **2.7**). Das siRNA-Bindestellen-mutierte Plasmid wird im Folgenden mit GFP-La-WT-mut. bezeichnet. Der Vorteil des GFPhLa-Fusionsproteins bestand darin, dass es aufgrund der Fluoreszenz möglich war, die transfizierten Zellen zu sortieren und dadurch sicherzustellen, dass ausschließlich die Effekte in diesen Zellen analysiert werden konnten. Die mutierte siRNA-Bindestelle ist in **Abb. 40** dargestellt. Der genaue Ablauf des Versuchs soll im nachfolgenden Diagramm (siehe **Abb. 41**) veranschaulicht werden.



Abb. 40: Darstellung der siRNA-Bindestelle (Ausschnitt aus der hLa-Sequenz): Die Einführung von drei Punktmutationen in die siRNA-Bindestelle wurde mittels Mutagenese-PCR durchgeführt. Die Aminosäuren des La-Proteins änderten sich dadurch nicht.



Abb. 41: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs: Es wurden HeLa-Zellen verwendet. Der gesamte Versuch erstreckte sich in der dargestellten Reihenfolge über einen Zeitraum von 10 Tagen. Für die Transfektionen wurden nicht-mutierte (GFP-LaWT) oder siRNA-Bindestellen-mutierte (GFP-LaWT-mut.) Plasmide verwendet. Die Sortierung GFP-exprimierender Zellen wurde bei 515 nm durch ein FACS-Gerät Aria durchgeführt.

4.3.1 Die Überexpression von GFP-hLa vermindert die Auswirkungen des Defizits an endogenem hLa-Protein

Für den Zellvermehrungsassay wurden am Tag nach der zweiten siRNA-Behandlung jeweils 0,25 x 10⁵ Zellen in Doppelansätzen auf 10 cm-Kulturschalen übertragen. Nach drei Tagen wurde der Zellvermehrungsassay ausgewertet, indem die Zellen mit GIEMSA-Lösung angefärbt wurden. Zusätzlich wurden die Platten unter dem Phasenkontrastmikroskop photographiert und zur genauen Bestimmung der Zellzahl in zufällig gewählten Ausschnitten ausgezählt. Es wurden drei verschiedene Kombinationen von siRNA-Behandlung und GFP-Plasmid gewählt:

- 1. La-siRNA und GFP-LaWT
- 2. La-siRNA und GFP-LaWT-mut.
- 3. Luci-siRNA und GFP-LaWT (Kontrolle)

In der folgenden Abb. 42 soll gezeigt werden, dass die stillen Mutationen der siRNA-Bindestelle im GFP-La-Plasmid tatsächlich zu einer Resistenz gegen hLa-RNA- Interferenz führten. Nicht siRNA-resistentes GFP-La (exprimiert durch GFP-hLa-WT) wurde in hLa-siRNA-behandelten Zellen folglich nicht exprimiert, während siRNA-resistentes GFP-La (exprimiert durch GFP-hLa-WT-mut.) in La-siRNA-behandelten Zellen ebenso exprimiert wurde wie in kontrollbehandelten Zellen.



Abb. 42: Effekt der La-siRNA-Behandlung auf nicht mutiertes und siRNA-Bindestellenmutiertes GFP-La in HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden nach dem Versuchsschema in Abb. 41 behandelt. Die Zellen wurden am Tag der Lyse für die *Western Blot*-Analyse photographiert (48h nach zweiter RNAi-Behandlung). In der Immunfluoreszenz zeigten La-siRNA-behandelte Zellen keine Expression des GFP-La-Fusionsproteins, während GFP-LaWT-mut. exprimiert wurde.



Abb. 43: Der zellvermehrungshemmende Effekt des La-Defizits kann in HeLa-Zellen durch das Einbringen von GFP-La-WT-mut. stark vermindert werden: Die Zellen wurden drei Tage nach der zweiten siRNA-Behandlung mit GIEMSA-Lösung angefärbt und per mikroskopischer Zählung quantifiziert. Vergleich Beim der verschiedenen Behandlungskombinationen fällt auf, dass sich die Zellzahl offensichtlich unterscheidet. LasiRNA/GFP-LaWT-transfizierte Zellen zeigten die geringste Zellvermehrung, während LasiRNA/GFP-LaWT-mut.-transfizierte Zellen ein Wachstum aufwiesen, das zwischen dem von Zellen mit Gesamt-La-Proteinmangel und kontrollbehandelten Zellen lag. Die abgebildeten Ausschnitte wurden mit 5-facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop photographiert und sind repräsentativ.



Abb. 44: Das Einbringen von GFP-La-WT-mut. bewirkt eine deutliche Verminderung der durch das La-Defizit bewirkten Zellvermehrungshemmung: HeLa-Zellen wurden nach dem Schema in Abb. 41 behandelt und analysiert. Die graphische Darstellung zeigt die Ergebnisse der mikroskopischen Zellzählung. Durch die Überexpression des GFP-La-Proteins, dessen mRNA nicht durch siRNAs abgebaut wurde, konnte die Hemmung der Zellvermehrung deutlich veringert werden. (siehe Abb. 43; 44). In der Quantifizierung konnte die höchste Zellzahl bei den kontrollbehandelten Zellen ermittelt werden. Im Vergleich zu diesen belief sich die Zellzahl der La-siRNA/ GFP-LaWT-transfizierten Zellen auf 35,5%, während die hLasiRNA/ GFP-LaWT-mut.-transfizierten Zellen mit 78% mehr als die doppelte Zellzahl erreichten. Der Effekt des hLa-Proteinmangels auf die Zellvermehrung konnte folglich deutlich verringert werden. Eine 100%-ige Aufhebung des Effekts war nicht zu erwarten, da die GFP-La-Plasmide erst drei Tage nach der ersten siRNA-Behandlung eingebracht werden konnten. Ein eventuell irreversibler Schaden in der Wachstumsfähigkeit konnte folglich schon begonnen haben, bevor das Fusionsprotein transfiziert wurde. Allerdings konnte ein früherer Zeitpunkt für die Transfektion der Plasmid-DNA nicht gewählt werden, da die Expression des GFP-Fusionsproteins nach 5-7 Tagen in Vorexperimenten deutlich nachließ und somit keine etwa Proteinexpression bis zum Zeitpunkt der Auswertung sichergestellt gewesen wäre. Des Weiteren war wichtig, dass die Sortierung der Zellen nach GFP-Signalen am Folgetag nach der Transfektion der Plasmid-DNA erfolgte. Aus Vorexperimenten war bekannt, dass andernfalls die Wirkung der siRNAs auf die Expression des nicht mutierten Plasmids eine Sortierung nach GFP-Signalen unmöglich machen würde.

Zudem wurden die Proteinspiegel von endogenem hLa, GFP-La und Zyklin D1 in der *Western Blot*-Analyse überprüft. Wie in Abb. 45 sichtbar ist, konnte durch die Expression des siRNA-resistenten GFP-La-Plasmids (GFP-LaWT-mut.) der Effekt des verminderten endogenen hLa-Spiegels auf den Proteinspiegel von Zyklin D1 verringert werden. Während in hLa-siRNA/GFP-LaWT-transfizierten Zellen Zyklin D1 mit einem Proteinspiegel von 24% im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert werden konnte, betrug dieser Wert in hLa-siRNA/GFP-La-WT-mut.-transfizierten Zellen mit 44% beinahe das doppelte (Abb. 46). Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten der parallel durchgeführten Zellvermehrungsuntersuchung. In beiden Fällen konnte durch die Expression des mutierten GFP-La-Plasmids der dokumentierte Effekt des hLa-Mangels partiell aufgehoben werden. Diese außerordentlich wichtigen Ergebnisse zeigen, dass das La-Protein für das Aufrechterhalten eines normalen Zyklin D1-Proteinspiegels und einer ungehemmten Zellvermehrung essentiell ist und es sich hier um einen spezifischen Effekt handelt.


Abb. 45: Einfluss der Transfektion von GFP-La nach RNAi-Behandlung auf den Zyklin D1-Spiegel: HeLa-Zellen wurden nach dem Versuchsschema in Abb. 4.37 behandelt und 48h nach der zweiten siRNA-Behandlung lysiert. Die Proteine wurden in einer 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für die *Western Blot*-Analyse wurden Antikörper gegen hLa (mAb SW5, Verd. 1:500), Zyklin D1 (mAb, Verd. 1:500) und α -Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) verwendet. Die Zyklin D1-Signalstärken wurden quantifiziert und gegen die Tubulinsignale normalisiert.



Abb. 46: Die Erniedrigung von Zyklin D1 nach Verminderung des endogenen hLa-Proteinspiegels kann durch Transfektion von GFP-La-WT-mut. partiell aufgehoben werden: Die graphische Darstellung zeigt die ermittelten Proteinmengen nach Standardisierung mit Tubulinsignalen. Der Zyklin D1-Spiegel in LasiRNA-behandelten Zellen mit nicht mutiertem GFP-La beträgt 24%, in LasiRNA-behandelten Zellen mit siRNAresistentem GFP-La-WT-mut. hingegen 44%.

4.3.2 Vorexperimente für weitere funktionelle Studien

Unter **4.3.1** konnte gezeigt werden, dass die Expression von siRNA-resistentem GFP-La der vollen Länge zu einem partiellen Aufheben des Zellvermehrungsdefizits in HeLa-Zellen führte. Um zu untersuchen, welche Domänen des La-Proteins für diese partielle "Rettung" verantwortlich sind, sollten entsprechende Versuche mit GFP-La-Plasmiden mit unterschiedlichen Deletionen der La-Sequenz durchgeführt werden. Von besonders

großem Interesse waren dabei die in der Arbeitsgruppe vorhandenen Deletionsmutanten GFP-La-Del.2, GFP-La-Del.6, GFP-La-Del.6.3 und GFP-La-Del.7 (siehe 2.7). Die deletierten Bereiche bestehen bei GFP-La-Del.2 aus aa 113-118, bei GFP-La-Del.6 aus aa 274-354, bei GFP-La-Del.6.3 aus aa 323-354 und bei GFP-La-Del.7 aus aa 353-393. Es konnte gezeigt werden, dass GFP-La-Del.2 im Nukleolus akkumuliert und keine RNA binden kann, da das RNP-2 des RRM-1 fehlt (83, 85). GFP-La-Del.6 und GFP-La-Del.6.3 hingegen zeigen eine diffus nukleäre Lokalisation ohne nukleoläre Anhäufung, da das Nukleolus-Lokalisationssignal fehlt (83, 85). GFP-La-Del.7 ist aufgrund des fehlenden Kern-Lokalisationssignals ausschließlich im Zytoplasma vorzufinden (83). Die entsprechenden Deletionen sind in Abb. 47 im Vergleich mit dem hLa-Protein voller Länge veranschaulicht. Mit Hilfe der unter 3.2.9 beschriebenen Methode wurden die entsprechenden stillen Mutationen der siRNA-Bindestelle in die Plasmide eingeführt.



Abb. 47: Deletionen des hLa-Proteins:

hLa-Del.2: aa 113-118 (RNP-2 des RRM-1 (schwarzer Streifen im linken rosa Bereich) fehlen \rightarrow keine RNA-Bindung

hLa-Del.6: aa 274-354 (NRE (grün), NoLS (lila) und WAM (rot) fehlen \rightarrow diffus nukleäre Lokalisation

hLa-Del.6.3: aa 323-354 (NoLS (lila) und WAM (rot) fehlen \rightarrow diffus nukleäre Lokalisation hLa-Del.7: aa 353-393 (NLS) fehlen \rightarrow cytoplasmatische Verteilung

Die genauen Funktionen und Bezeichnungen der einzelnen Bereiche können Abb. 1 und Abschnitt 1.1 entnommen werden.



Abb. 48: Die Mutation der siRNA-Bindestelle in GFP-hLa-Del.2-mut. und GFP-hLa-Del.6.3mut. führt durch siRNA-Resistenz zur Proteinexpression: U2OS-Zellen wurden mit mutierten GFP-hLa-Deletionsplasmiden transfiziert, am Folgetag nach GFP-Signalen sortiert und einen Tag danach mit hLa-siRNA behandelt. Beide hier gezeigten Plasmide exprimierten das Protein, ohne dass ihre Transkripte von der RNA-Interferenz abgebaut wurden. Der Effekt auf das endogene hLa-Protein ist dennoch evident.

Aus **Abb. 48** wird ersichtlich, dass die drei stillen Punktmutationen der siRNA-Bindestellen erfolgreich in die Plasmide GFP-La-Del.2 und GFP-La-Del.6.3 eingeführt werden konnten, so dass die Transkripte der resultierenden Plasmide GFP-La-Del.2mutiert und GFP-La-Del.6.3-mutiert nicht von der RNA-Interferenz gegen das La-Protein betroffen waren. Daher war durch die siRNA-Behandlung am Folgetag der Sortierung nur das endogene La-Protein betroffen, während das GFP-La-Protein in LasiRNA-behandelten Zellen ebenso wie in Luci-siRNA-behandelten Zellen exprimiert wurde.

Die Deletionsplasmide GFP-La-Del.6-mutiert und GFP-La-Del.7-mutiert müssen für weitere Studien noch durch Analyse der entsprechenden Extrakte per *Western Blot*-Analyse bezüglich der siRNA-Resistenz überprüft werden. Das erfolgreiche Einführen der siRNA-Bindestellen-Mutation konnte bereits durch die Sequenzierung der Plasmide bestätigt werden (siehe **3.2.11**).

4.4 Studien zum molekularbiologischen Mechanismus der reduzierten Proteinspiegel von Zyklinen nach hLa-RNA-Interferenz

Da durch den Mangel des hLa-Proteins in U2OS-Zellen ein veränderter Zyklin E- und in HeLa-Zellen ein stark verminderter Zyklin D1-Proteinspiegel beobachtet wurde, stellte sich die Frage nach dem molekularbiologischen Zusammenhang. Es sollte untersucht werden, auf welche Weise das humane La-Protein diese wichtigen Zellzyklusproteine reguliert. Es wurde berücksichtigt, dass die veränderten Proteinspiegel durch verschiedene Möglichkeiten auf molekularbiologischer Ebene zustande kommen könnten. Prinzipiell könnte es sich um mindestens 4 verschiedene Ebenen handeln: die transkriptionelle, die posttranskriptionelle, die translationelle und die posttranslationelle Ebene. Auch ein Zusammenspiel mehrerer betroffener Ebenen wäre nicht auszuschließen. Zudem könnte es sich entweder um einen direkten oder einen indirekt durch weitere Faktoren vermittelten Einfluss handeln. In den nachfolgenden Untersuchungen wurde versucht, diese Fragenkomplexe durch gezielte Experimente zu beantworten.

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus im Folgenden auf Experimenten der vom hLa-Proteinmangel verursachten Verminderung des Zyklin E-Proteinspiegels in U2OS-Zellen und des Zyklin D1-Proteinspiegels in HeLa-Zellen.

4.4.1 Untersuchung der Zyklin E-Promotoraktivität nach der Verminderung des La-Proteinspiegels in U2OS-Zellen

Mit Hilfe des Luciferase-Assays (siehe **3.1.16**) sollte untersucht werden, ob der vom La-Mangel veränderte Zyklin E-Proteinspiegel durch eine verminderte Promotoraktivität des Zyklin E-Promotors zustande kommt. Dafür wurden durch eine Kotransfektion zwei Plasmide in U2OS-Zellen eingebracht, ein pSuper-Plasmid und eines, welches die Zyklin E-Promotor-Sequenz vor einem Luciferase-Gen enthielt (siehe **2.7**) (55). Die Luciferase-Aktivität in den transfizierten Zellen wurde als Maß für die Zyklin E-Promotoraktivität gewertet. In diesen Versuchen wurde als Kontrolle anstelle des LucisiRNA-exprimierenden pSuperLuci-Plasmids ein pSuper-Plasmid ohne einklonierte Sequenz verwendet, um nicht die *Luciferase*-mRNA des Promotor-Plasmids durch die Expression spezifischer siRNAs zu degradieren. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert, wonach die Messung der Luciferase-Aktivität der Extrakte erfolgte. Für diese Experimente eigneten sich die pSuper-Transkripte, da bei einer Kotransfektion normalerweise beide Plasmide in die transfizierten Zellen eingebracht werden. Eine hohe Transfektionseffizienz oder eine Selektion über ein weiteres kontransfiziertes Plasmid war nicht notwendig, da durch die Luciferase-Messung nur Zellen berücksichtigt wurden, die Plasmid-DNA aufgenommen hatten, nicht transfizierte Zellen dagegen keinen Einfluss auf die Messergebnisse hatten.



Abb. 49: Aktivität des Zyklin E-Promotors in U2OS-Zellen nach RNA-Interferenz: Für die Transfektion von U2OS-Zellen wurden je 500 ng pSuper-Plasmid und/oder 500 ng Zyklin E-Promotor-Plasmid pro 12-*well* verwendet. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und deren Luciferase-Aktivität gemessen. Die abgebildeten Ergebnisse entstanden aus drei unabhängigen Experimenten und beinhalten die Standardabweichungen.

Anhand der Messergebnisse (siehe Abb. 49) wurde deutlich, dass die Reduktion von Zyklin E nach der RNA-Interferenz gegen hLa nicht durch eine verminderte Transkription verursacht wurde. Im Vergleich zu pSuper-transfizierten Zellen mit 60% Luciferase-Aktivität wurde in pSuperLa-transfizierten Zellen mit 97,5% sogar eine erhöhte Luciferase-Aktivität vermerkt. Die niedrigere Promotoraktivität der Zyklin E-Promotor-Plasmid/pSuper-Kontrolle gegenüber der nur das Promotorplasmid enthaltenden Kontrolle war vermutlich auf eine Kompetition der beiden Promotoren zurückzuführen.

4.4.2 Nachweis eines unveränderten *Zyklin E*-mRNA-Spiegels nach hLa-RNA-Interferenz in U2OS-Zellen

Aufgrund der aus den Luciferase-Versuchen gewonnenen Ergebnisse konnte eine verminderte Zyklin E-Promotor-Aktivität als Ursache für den veränderten Zyklin E-Proteinspiegel von U2OS-Zellen mit hLa-Defizit ausgeschlossen werden. Daher sollte untersucht werden, ob die Unterschiede des Proteinspiegels sich auf der posttranskriptionellen Ebene erklären lassen. Mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR (siehe **3.2.14**) sollte der sogenannte *steady state level*, der bestehende Status, der *Zyklin E-*mRNA bestimmt werden. Dabei unberücksichtigt bleiben bei dieser Methode Unterschiede in der mRNA-Stabilität, die sich aufgrund einer zusätzlich veränderten Transkription ausgleichen. Da die stärkste Verminderung des Zyklin E-Proteinspiegels 36h nach siRNA-Einfachbehandlung beobachtet wurde, umfassten die Untersuchungen sowohl diesen als auch einen früheren Zeitpunkt.



Abb. 50: Der Spiegel der Zyklin E-mRNA ist in U2OS-Zellen nicht durch die Verminderung des La-Proteinspiegels verändert: Die Gesamt-RNA von U2OS-Zellen wurde 24h und 36h nach einer Einfachbehandlung mit siRNA isoliert. Für die RT-PCR wurde jeweils 1 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Als Kontrolle diente β -Aktin-mRNA. Die entsprechenden Ansätze enthielten jeweils nur ein *Primer*-Paar. Die Proben wurden nach 30 Zyklen in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Mengen mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die DNA-Signale von Zyklin E wurden mit *Quantity One* quantifiziert und gegen β -Aktin-Signale korrigiert.

Wie in **Abb. 50** gezeigt wird, konnte der veränderte Zyklin E-Proteinspiegel nach Verminderung des hLa-Proteinspiegels in U2OS-Zellen nicht auf einen veränderten Status der in der Zelle vorhandenen mRNA zurückgeführt werden. Die Quantifizierung der umgeschriebenen DNA-Mengen führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen hLa-siRNA- und kontrollbehandelten Zellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die in Zellen mit hLa-Defizit deutlich verminderten Zyklin E-Proteinspiegel weder durch eine verringerte Transkriptionsrate noch einen veränderten Status der *Zyklin E-m*RNA zu erklären sind. Die verbleibenden Möglichkeiten könnten sich demnach nur noch die translationelle und/oder posttranslationelle Ebene betreffen. Aufgrund der zeitlichen Begrenzung, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, konnten diesbezüglich bislang keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen der deutlich stärkeren und konstanten Effekte des hLa-Proteinmangels auf die Zyklin D1-Proteinspiegel in HeLa-Zellen wurden als wichtiger erachtet und entsprechend durchgeführt.

4.4.3 Nachweis eines unveränderten Zyklin D1-mRNA-Spiegels nach der Reduktion des La-Proteinspiegels in HeLa-Zellen

Um der Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Reduktion des hLa- und des Zyklin D1-Proteinspiegels in HeLa-Zellen nachzugehen, wurde zunächst untersucht, ob die transkriptionelle oder posttranskriptionelle Ebene reguliert werden könnte. Daher sollte durch *Northern Blot*-Analyse (siehe **3.2.17**) erforscht werden, ob der Effekt durch einen niedrigeren *Zyklin D1*-mRNA-Spiegel begründet ist. Ein veränderter mRNA-Spiegel könnte jedoch sowohl aufgrund von Änderungen der mRNA-Stabilität als auch durch eine verminderte/ verstärkte Transkription zustande kommen. Dieses Experiment diente daher der initialen Kontrolle der Gesamtmenge der *Zyklin D1*-mRNA. Im Falle einer Änderung müssten weiterführende Analysen durchgeführt werden, z.B. die Halbwertszeitbestimmung der mRNA und die Messung der Promotor-Aktivität.

Für den Versuch wurden HeLa-Zellen zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und 48h nach der zweiten Behandlung für die RNA-Isolierung verwendet.



Abb. 51: Der Zyklin D1-mRNA-Spiegel ist nach Reduktion des La-Proteinspiegels unverändert: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit RNAi behandelt. 48h nach der zweiten RNAi-Behandlung wurde die Gesamt-RNA isoliert. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA wurden in einem 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und per Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Detektion der 28S rRNA und der 18S rRNA wurde die Membran mit Methylenblau gefärbt. Für die Detektion der Zyklin D1- und der GAPDH-mRNA wurden radioaktiv markierte in vitro-Transkripte her-gestellt.

Mit Hilfe des Zyklin D1-in vitro-Transkriptes konnten zwei Banden detektiert werden, welche den erwarteten Transkript-Größen von ~4,3 kb und ~1,7 kb entsprachen (87, 143). Für die Sonde war ein template verwendet worden, welches von dem spezifischen Zyklin D1-Produkt einer RT-PCR unter Verwendung eines T7-Promotor-Primers generiert werden konnte. Das entstandene Produkt entsprach mit 550 nt der erwarteten Größe. Von diesem template konnte anschließend durch in vitro-Transkription eine radioaktiv markierte RNA-Sonde hergestellt werden. Von dieser wurde aufgrund der Länge eine relativ hohe Spezifität erwartet. Dennoch wurde eine auffallende Ähnlichkeit der Signale mit der Größe und Intensität der methylenblaugefärbten 28S rRNA beobachtet. Diese sollte jedoch erwartungsgemäß mit einer Größe von 5 kb und einem Laufverhalten von 4-5 kb tatsächlich in der Region der 4,3 kb großen Zyklin D1mRNA auftreten. Daher wurde in einem weiteren Experiment eine Aufreinigung von PolyA-mRNAs, die im Gegensatz zu rRNAs PolyA-Enden besitzen, durchgeführt und für die Northern Blot-Analyse verwendet (Daten nicht abgebildet). Es stellte sich heraus, dass die Sonde zwar beide Transkripte spezifisch erkannte und auch die DNA-Sequenzierung der Sonde das Resultat einer spezifischen Sonde erbrachte, das größere Transkript jedoch möglicherweise von einer unspezifischen Bindung an die 28S rRNA überlagert wurde. Dieses Experiment erbrachte jedoch ebenfalls nicht das Resultat eines erniedrigten Status des großen Zyklin D1-Transkriptes in Zellen mit La-Defizit. Um die Signale des in Abb. 51 gezeigten Experiments normalisieren zu können, wurde ein in vitro-Transkript gegen GAPDH-mRNA verwendet.



Abb. 52: Graphische Darstellung quantifizierten des Zyklin D1-mRNA-Spiegels: Die Signalintensität der Zyklin D1mRNA aus Abb. 50 wurde gegen die der GAPDH-mRNA-Signale normalisiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software TINA 2.09 der Firma Raytest.

Insgesamt konnte mit Hilfe der *Northern Blot*-Analyse für beide Transkripte keine Statusveränderung vorhandener *Zyklin D1*-mRNA festgestellt werden (siehe Abb. 51; 52). Dadurch entfielen weiterführende Untersuchungen zur Transkription und mRNA-Stabilität. Es lag daher nahe anzunehmen, dass die Verminderung von Zyklin D1 auf Proteinebene nach der Reduktion des La-Proteinspiegels nicht aufgrund von Veränderungen der Transkription oder mRNA-Stabilität verursacht wurde.

4.4.4 Untersuchung der Proteinstabilität von Zyklin D1 nach hLa-RNA-Interferenz in HeLa-Zellen

Nachdem sowohl die transkriptionelle als auch die posttranskriptionelle Ebene der Regulation als Ursache des erniedrigten Zyklin D1-Proteinspiegels nach Verminderung des La-Proteinspiegels ausgeschlossen werden konnten, sollte als nächstes analysiert werden, ob ein schnellerer Proteinabbau von Zyklin D1 in hLa-siRNA-behandelten Zellen vorliegt. Dafür sollte mit Hilfe des Antibiotikums Zykloheximid die Translation inhibiert und anschließend die Halbwertszeit von Zyklin D1 bestimmt werden (siehe **3.4.3**). Zunächst wurde in Vorexperimenten die Menge des einzusetzenden Zykloheximids ausgetestet. Eine Konzentration von 150 µg/ ml Medium erwies sich als optimal. Für die nachfolgende Untersuchung wurden HeLa-Zellen im Abstand von sechs Tagen zweimal mit siRNA behandelt. Zum Zeitpunkt 48h nach der zweiten Behandlung wurde durch die Zugabe des Zykloheximid zum Medium die Translation angehalten. Da die Halbwertszeit von Zyklin D1 unter normalen Bedingungen bei etwa 25-30 min liegt (20, 42), wurde eine Zeitkinetik mit den Werten t0, t30, t60 und t120 durch Lyse der Zellen und anschließende SDS-PAGE und *Western Blot*-Analyse erstellt (siehe **Abb. 53; 54**). Daher konnte die Halbwertszeit von Zyklin D1 durch

Quantifizierung und Normalisierung der Zyklin D1-Signale nach Reduktion der La-Proteinspiegel und nach Kontrollbehandlung bestimmt werden (siehe **Abb. 55**).



Abb. 53: Proteinstabilität von Zyklin D1 in kontrollbehandelten HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt. 48h nach der zweiten RNAi-Behandlung legte die Zugabe von 150 µg Zykloheximid/ ml zum Medium den Zeitpunkt t0 fest. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer 12,5%-igen SDS-PAGE mit anschließender Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Für die *Western Blot*-Analyse wurden Antikörper gegen hLa (mAb 3B9, Verd. 1:500), Zyklin D1 (mAb, Verd. 1:100) und Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) verwendet.



Abb. 54: Proteinstabilität von Zyklin D1 in HeLa-Zellen mit vermindertem La-Proteinspiegel: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt. 48h nach der zweiten RNAi legte die Zugabe von 150 µg Zykloheximid/ ml zum Medium den Zeitpunkt t0 fest. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Nach der Auftrennung der Proteine in einer 12,5%-igen SDS-PAGE erfolgte die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. In der anschließenden *Western Blot*-Analyse wurden Antikörper gegen hLa (mAb 3B9, Verd. 1:500), Zyklin D1 (mAb, Verd. 1:100) und Tubulin (mAb, Verd. 1:4000) verwendet.



Abb. 55: Die Halbwertszeit von Zyklin D1 ist nach Reduktion der La-Proteinexpression durch siRNA-Doppelbehandlung in HeLa-Zellen nicht vermindert: Zur Bestimmung der Halbwertszeit wurden die Proteinmengen von Zyklin D1 quantifziert. Eine Korrektur gegen Tubulinsignale konnte aufgrund dessen langer Halbwertszeit von 50h (27) durchgeführt werden, da sich die Halbwertszeituntersuchung nur über einen Zeitraum von 120 min erstreckte und in dieser Zeit keine signifikante Änderung der Tubulinmengen erwartet wurde.

In kontrollbehandelten Zellen konnte für Zyklin D1 eine Halbwertszeit von etwa 20 min ermittelt werden, während sich diese in Zellen mit La-Mangel auf etwa 90 min belief. Aufgrund der geringen Menge an Zyklin D1 musste bei letzteren eine extrem lange Expositionszeit gewählt werden. Dies hatte zur Folge, dass ein sehr hoher Hintergrund nicht vermieden werden konnte, der eine exakte Quantifizierung erschwerte. Daher ist die Halbwertszeitbestimmung in Zellen mit La-Defizit als etwas ungenauer einzustufen als die in kontrollbehandelten Zellen. Da jedoch die Halbwertszeit von Zyklin D1 nach Reduktion des La-Proteinspiegels verlängert und nicht verkürzt war, konnte ein schnellerer Proteinabbau eindeutig als Ursache des erniedrigten Zyklin D1-Proteinspiegels ausgeschlossen werden.

4.4.5 Untersuchung der Polysomenassoziation von *Zyklin D1*-mRNA nach hLa-RNA-Interferenz in HeLa-Zellen

Aufgrund der Bestimmung der Halbwertszeit des Zyklin D1-Proteins und der Statusbestimmung der Zyklin D1-mRNA konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass es sich um einen transkriptionellen, posttranskriptionellen oder posttranslationellen Effekt handelte. Daher wurde angenommen, dass der beobachtete Effekt in einem Einfluss des La-Proteins auf die Translation von Zyklin D1 begründet liegen könnte. Um dieser Frage nachzugehen, sollte untersucht werden, ob in eine veränderte Assoziation der Zyklin D1-mRNA mit den für die Translation von Proteinen essentiellen Polyribosomen verzeichnet werden kann. Im Falle einer Verschiebung oder Veränderung in bestimmten Fraktionen würde dies auf einen Einfluss des humanen La-Proteins auf die Translation der Zyklin D1-mRNA rückschließen lassen.

Um die Methode der Gradientenfraktionierung Polyribosomen-assoziierter mRNAs (siehe **3.4.4**) zu etablieren, wurden zunächst unbehandelte Zellen verwendet. Diese wurden mit zwei verschiedenen Puffern lysiert. Während einer der Puffer aufgrund seiner Zusammensetzung zur stabilen Assoziation der mRNAs mit den Polyribosomen beitragen sollte, wurde dem zweiten Puffer statt Magnesiumchlorid EDTA zugesetzt, welches zur Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten führt und mRNP-Komplexe (mRNP – messenger-<u>R</u>ibonukleoproteinkomplex) zerstört. Dies sollte eine Verschiebung der Positionen von mRNAs im Gradienten von polysomalen Fraktionen in Richtung freier Ribosomen hervorrufen. Das Experiment wurde wie unter **3.4.4** beschrieben durchgeführt. Gleiche Volumina der RNA-Fraktionen wurden in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel (siehe **3.2.16**) aufgetrennt und einer *Northern Blot*-Analyse (siehe **3.2.17**) unterzogen.



Abb. 56: Absorptionsprofil der Fraktionen: Der Kurvenverlauf gibt die Wanderung der ribosomalen Untereinheiten an. Die Fraktionen wurden in 1,2 ml-Schritten von oben nach unten entnommen (dargestellt von links nach rechts) und die Absorption bei 254 nm im Photometer gemessen.

Das in **Abb. 56** gezeigte Absorptionsprofil wurde durch die Messung der einzelnen Fraktionen bei 254 nm im Photometer erstellt und gibt im Wesentlichen die Position der ribosomalen Untereinheiten im Gradienten an. Da durch die Gradientenzentrifugation nach relativer Masse aufgetrennt wird, können der Kurve entsprechend freie Ribosomen sowie Polyribosomenkomplexen zugeordnet werden.



Abb. 57: Die Assoziation von mRNAs mit Polyribosomen wird durch EDTA zugunsten freier Ribosomen verschoben: Unbehandelte HeLa-Zellen wurden entweder mit MgCl₂-haltigem oder EDTA-haltigem Polysomenpuffer lysiert und über einen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die Gradienten wurden nach Zentrifugation in 9 1,2 ml-Fraktionen unterteilt. Die RNA wurde mit Hilfe von Guanidiniumchlorid isoliert. Die Fraktionen von oben nach unten wurden von links nach rechts dargestellt. Gleiche Volumina der Fraktionen wurden in einem 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die RNA wurde auf eine Nylonmembran übertragen und zur Visualisierung der 28 und 18S rRNA mit Methylenblau gefärbt. Die Markierung der *Aktin*-mRNA erfolgte mit einem radioaktiv markierten *in vitro*-Transkript.

In **Abb. 57** konnte gezeigt werden, dass die Methode zur Fraktionierung polyribosomenhaltiger und monoribosomenassoziierter mRNAs erfolgreich war. Wie der Darstellung zu entnehmen ist, kam es durch den Zusatz von EDTA im Extraktionspuffer zu einer Verschiebung der *Aktin*-mRNA sowie der 28S und der 18S rRNA in die monosomalen Fraktionen, während unter Standardbedingungen (MgCl₂ anstelle von EDTA im Extraktionspuffer) die Normalverteilung dieser RNAs vorlag.

Um die ribosomale Assoziation der *Zyklin D1*-mRNA in Zellen mit La-Defizit zu untersuchen, wurden siRNA-Doppelbehandlungen im Abstand von sechs Tagen durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte 48h nach der zweiten Behandlung gemäß **3.4.4**. Nach der Gradientenzentrifugation wurde die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 254 nm gemessen (siehe **Abb. 58**) sowie die RNA isoliert.



Abb. 58: Absorptionsprofil der Fraktionen nach siRNA-Doppelbehandlung: Der Kurvenverlauf gibt die Wanderung der ribosomalen Untereinheiten an. Die Fraktionen wurden dem Gradienten in 11 1 ml-Schritten unten von oben nach entnommen (dargestellt von links nach rechts) und die Absorptionen bei 254 nm im Photometer gemessen.

Die Messung der Absorption der einzelnen Fraktionen ergab für Zellen mit reduziertem La-Proteinspiegel im Vergleich mit kontrollbehandelten Zellen keinen signifikant veränderten Kurvenverlauf.

Nach der Auftrennung gleicher Volumina der isolierten RNA-Proben konnte mit Hilfe der *Northern Blot*-Analyse unter Verwendung von *Zyklin D1-* und *GAPDH-*mRNA-spezifischen *in vitro*-Transkripten die ribosomale Assoziation gezeigt werden (siehe **Abb. 59**).



Abb. 59: Die Assoziation der Zyklin D1-mRNA mit Polyribosomen zeigt nach der Reduktion des La-Proteinspiegels eine insgesamt leicht verminderte Assoziation: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt und 48h nach der zweiten RNAi mit Extraktionspuffer lysiert. Die Lysate wurden über einen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die Gradienten wurden nach der Zentrifugation in 11 1 ml-Fraktionen unterteilt. Die RNA wurde mit Guanidiniumchlorid isoliert. Die Fraktionen von oben nach unten wurden von links nach rechts dargestellt. Gleiche Volumina der Fraktionen wurden in einem 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die RNA mit Methylenblau gefärbt. Die Markierung der Zyklin D1- und GAPDH-mRNA erfolgte mit radioaktiv markierten *in vitro*-Transkripten.

Um eine Aussage über die Verteilung der Transkripte imVerhältnis zur Gesamt-RNA treffen zu können, wurden die quantifizierten Signalstärken im Verhältnis zur für das Haushaltsprotein GAPDH kodierenden mRNA-Signalstärke berechnet und graphisch dargestellt. Die Intensität der in **Abb. 59** dargestellten Zyklin D1-Signale wurde mit der Intensität der GAPDH-Signale standardisiert und in Zellen mit erniedrigtem La-Proteinspiegel und Kontrollzellen verglichen.

Für die graphische Darstellung der ermittelten Verhältnisse wurden die Werte der Fraktion 11 aufgrund der unregelmäßigen Hybridisierung bei kontrollbehandelten Zellen vernachlässigt (siehe Abb. 60).



Abb. 60: Der verminderte Proteinspiegel von Zyklin D1 korreliert mit einer veränderten ribosomalen Assoziation der 1,7 kb Zyklin D1-mRNA: HeLa-Zellen wurden zweimal im Abstand von sechs Tagen mit siRNA behandelt, 48h nach der zweiten RNAi lysiert und über einen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die Gradienten wurden nach Zentrifugation in 11 1 ml-Fraktionen unterteilt. **RNA** wurde Die mit Guanidiniumchlorid isoliert. Die Fraktionen von oben nach unten wurden von links nach rechts dargestellt. Gleiche Volumina der Fraktionen wurden in einem 1%-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Die RNA wurde auf Nylonmembran eine übertragen und zur Visualisierung der 28 und 18S rRNA mit Methylenblau gefärbt. Die Markierung der GAPDH-Zyklin D1und mRNAs erfolgte mit radioaktiv markierten in vitro-Transkripten.

Anhand der graphischen Darstellung (siehe Abb. 60) konnte ein Unterschied der ribosomalen Assoziation der 1,7 kb Zyklin D1-mRNA festgestellt werden. Durch das Defizit des La-Proteins wurde eine insgesamt verminderte Assoziation dieser mRNA in den Fraktionen 5-10 beobachtet, von denen die Fraktionen 7-10 den translationell aktiven Polyribosomen zugeordnet werden können, während sich in den nicht polyribosomalen und somit translationell inaktiven Fraktionen 3 und 4 eine leichte Anhäufung dieser mRNA zeigte. Daher ist anzunehmen, dass der erniedrigte Zyklin D1-Proteinspiegel nach der Verminderung des hLa-Proteinspiegels unter anderem auf eine veränderten Translationsinitiation des kleinen Transkriptes der Zyklin D1-mRNA zurückzuführen ist. Eine exakte Aussage über die Assoziation des 4,3 kb-Transkriptes ist aufgrund der vermuteten Überlagerung (siehe 4.4.4) leider nicht möglich. Die gezeigte Verteilung ähnelt der des kleinen Transkriptes stark, muss aber in weiteren Experimenten gegebenenfalls unter Verwendung einer anderen Sonde überprüft werden.

4.5 Untersuchungen zum Einfluss einer verminderten La-Proteinexpression auf den HBV-RNA-Spiegel in Leberzellen

Das humane La-Protein spielt im RNA-Metabolismus des Hepatitis B Virus eine wichtige Rolle, indem es an die virale RNA bindet und diese so vor Degradierung durch RNasen schützt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Verminderung der hLa-Proteinspiegel zu einer Erniedrigung der HBV-RNA-Spiegel führt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde zunächst die Technik der RNA-Interferenz auf die Leberkarzinomzellinien Hep G2 2.15 und Huh7 angewandt. Es wurde sowohl unter Verwendung von siRNAs als auch pSuper-Konstrukten gearbeitet. Im Falle der Huh7-Zellen musste zusätzlich ein HBV-exprimierendes Plasmid in die Zellen eingebracht werden, da diese Zellinie im Gegensatz zu Hep G2 2.15-Zellen nicht mit einem solchen stabil transfiziert ist. Die Untersuchungen wurden durch die Isolierung von Gesamt-RNA und die Auftrennung dieser in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen mit anschließender *Northern Blot*-Analyse durchgeführt.

Einem experimentellen Zugang zur komplexen Fragestellung stand die schlechte Transfizierbarkeit von Hep G2 2.15-Zellen als erschwerendes Moment im Wege. Nach mehreren Vorexperimenten fiel auf, dass die Verminderung der La-Proteinspiegel in Hep G2 2.15-Zellen im Durchschnitt deutlich weniger effizient war als in anderen Zellinien (siehe **4.1.2**). Insgesamt wurden 7 Experimente vollständig bis zur *Northern Blot*-Analyse durchgeführt und ausgewertet. Drei dieser Experimente wurden in Hep G2 2.15-Zellen unter Verwendung von siRNAs durchgeführt. Das La-Protein wurde dabei insgesamt nur auf 50 bis 75% reduziert. Auch konnten keine signifikanten Änderungen der HBV-RNA-Spiegel beobachtet werden.

Für die Untersuchungen in Huh7-Zellen wurden pSuper-Konstrukte verwendet, da ein HBV-Plasmid kotransfiziert werden musste und sich die Kontransfektion von siRNA-Molekülen und Plasmid-DNA als ungünstig erwiesen hatte. Während in einem Experiment eine geringfügige Erniedrigung der HBV-RNA an nur einem von zwei Erntetagen durch die Verminderung des La-Proteinspiegels zu verzeichnen war, konnten in zwei weiteren Experimenten keinerlei Veränderungen an Tag 1, 2, 4, und 5 nach RNAi-Behandlung bestimmt werden. Eine Reduktion der HBV-RNA um 20% (Tag 2) bzw. 50% (Tag 3 nach RNAi) konnte hingegen in einem vierten Experiment ermittelt werden. Insgesamt führte die Bearbeitung der Fragestellung leider zu keinen reproduzierbaren, auswertbaren Daten. In weiterführenden Studien muss deshalb zunächst eine reproduzierbar gute Methode der RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein in Leberzellinien zu etabliert werden, bevor ein ähnlicher experimenteller Ansatz zu weiteren Aussagen führen kann.

5 Diskussion

Das humane La-Protein ist ein hoch konserviertes RNA-Bindeprotein, welches in einer Vielzahl von viralen Infektionen den RNA-Metabolismus des Virus auf der Ebene der RNA-Stabilisierung, wie es für die HBV-RNA gezeigt wurde (s. 1.2.1), oder Translationskontrolle, wie im Falle von HCV, beeinflusst (siehe 1.2.2). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das La-Protein ebenso die Stabilität oder Translation verschiedener zellulärer RNAs moduliert (siehe 1.2.1; 1.2.2). Aufgrund des oftmals dramatischen chronischen Verlaufs der genannten viralen Infektionen und der bislang unzureichenden Therapiemöglichkeiten ist es erforderlich, neue antivirale Therapien zu etbalieren. Um das La-Protein als potentiellen Ansatzpunkt dieser Strategien nutzbar zu machen, ist es unerlässlich, dessen genaue zellulären Funktionen detailliert zu studieren. Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen keine veröffentlichten Ergebnisse hinsichtlich einer Beteiligung des La-Proteins an der Überlebensfähigkeit und der Zellvermehrung von humanen Zellen vor. Diese Informationen sind für die Etablierung neuer antiviraler Therapien jedoch unentbehrlich, daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Verminderung der Proteinspiegel des humanen La-Proteins in lebenden Zellen mittels RNA-Interferenz durchgeführt und die Auswirkungen untersucht.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente führten eindeutig zu der Erkenntnis, dass das humane La-Protein die Zellvermehrung maßgeblich beeinflusst und durch die Verminderung seiner Proteinexpression erhebliche Proliferationsdefizite auftreten.

5.1 Etablierung der RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Etablierung der RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein verschiedene Ansätze zur Reduktion verwendet. Es wurden sowohl synthetisierte siRNA-Moleküle als auch Vektoren zur siRNA-Expression verwendet. Im Vordergrund der Untersuchungen standen dabei zunächst die Effektivität der Reduktion und die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse.

Insgesamt stellte sich heraus, dass sich die unterschiedlichen Methoden der RNA-Interferenz in ihrer Reduktionseffizienz in den verwendeten Zellinien stark unterschieden. Diese Unterschiede traten nicht nur zwischen den einzelnen Methoden auf, sondern wiesen auch eine Zellinienabhängigkeit auf. Grundsätzlich waren Ergebnisse in den Leberkarzinomzellinien Huh7 und Hep G2 2.15 weniger gut reproduzierbar als in U2OS- und HeLa-Zellen, da die Transfektionseffizienz vermutlich stark schwankte. Hep G2 2.15-Zellen zeigten insgesamt die geringsten Reduktionen des La-Proteinspiegels (siehe 4.1.2). Die Verwendung von U2OS-Zellen und HeLa-Zellen erwies sich dagegen als sehr geeignet. Beide Zellinien zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (siehe 4.1.3 und 4.1.4). Die Anwendung von Doppelbehandlungen im Abstand von sechs Tagen erzielte dabei die bestmögliche Reduktion von hLa-Proteinspiegeln (siehe Abb. 13; 16). In diesen Experimenten lag die Menge des La-Proteins fast immer unterhalb der Nachweisgrenze der Western Blot-Analyse. In U2OS-Zellen wurden zudem siRNA-Einfachbehandlungen mit einer deutlichen und reproduzierbaren Verminderung des La-Proteinspiegels durchgeführt. Bestimmte Effekte der Reduktion des hLa-Proteinspiegels, auf die in den folgenden Abschnitten ausführlicher eingegangen wird, waren mit siRNA-Einfachbehandlungen nach wie vor zu beobachten, jedoch im Vergleich zu siRNA-Doppelbehandlungen in abgeschwächter Form. Es wird daher angenommen, dass die Menge des verbliebenen La-Proteins darüber entscheidet, wie stark sich bestimmte Defizite bemerkbar machen. Um eine genaue Aussage über die notwendige Menge des La-Proteins für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen treffen zu können, müssten Untersuchungen durchgeführt werden, die es erlauben, einzelne Zellen zu analysieren. Western Blot-Analysen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, spiegeln hingegen den Gesamt-Proteinspiegel aller lysierten Zellen wider, ohne zwischen transfizierten und nichttransfizierten Zellen zu differenzieren.

Die Verwendung von siRNAs bewirkt keine dauerhafte Verminderung von Proteinspiegeln. Da für Langzeitstudien diese jedoch notwendig ist, wurde zudem mit siRNA-exprimierenden pSuper-Vektoren (pSuperLa und pSuperLuci) gearbeitet. Es zeigte sich, dass die erreichte Reduktion stark von der Selektion über ein kontransfiziertes Plasmid abhing, da andernfalls durch die im Vergleich zu siRNA-Transfektionen niedrigere DNA-Transfektionseffizienz viele nicht-transfizierte Zellen mitanalysiert wurden und somit das Ergebnis verfälschten. Zudem wurde eine Abhängigkeit von der Qualität der Plasmidpräparation vermutet, die auf Verunreinigungen der DNA zurückzuführen gewesen sein könnte. Die Etablierung stabiler pSuperLa/Luci-transfizierter Zellinien zur Untersuchung der Langzeitwirkung einer Reduktion der endogenen hLa-Proteinmenge wurde angestrebt. Diese scheiterte jedoch sowohl in U2OS- als auch in Huh7-Zellen, da nach etwa vier Wochen in beiden Zellinien wieder die ursprünglichen Proteinmengen nachgewiesen wurden. Es ist denkbar, dass die DNA des Expressionsplasmides in den transfizierten Zellen nach einiger Zeit methyliert wurde und dadurch zu einer Verminderung oder Hemmung der siRNA-Expression führte. Eine potentielle Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, besteht möglicherweise in der Etablierung eines induzierbaren Systems mit siRNAexprimierenden Vektoren.

5.2 Die Reduktion humaner La-Proteinspiegel mittels RNA-Interferenz führt zu schwerwiegenden Störungen der Zellvermehrung

Erste Hinweise darauf, dass das humane La-Protein für die Zellvermehrung benötigt wird, konnten bereits durch die Experimente zur Etablierung der Methodik der RNA-Interferenz gegen hLa gewonnen werden. Dabei wurde erfasst, dass hLa-siRNA-behandelte Zellen sich langsamer vermehrten als kontrollbehandelte Zellen. Diese ersten Hinweise konnten durch Zellvermehrungsassays bestätigt werden. Gleichzeitig konnte kein erhöhter Zelltod durch abgelöste Zellen detektiert werden, und auch in den nachfolgenden FACS-Analysen, mit Ausnahme des ausgedehnten Serum-Mangel-Experiments mit HeLa-Zellen, konnte keine Erhöhung apoptotischer Zellen nachgewiesen werden. Es kann folglich weitgehend ausgeschlossen werden, dass die Verminderung der hLa-Proteinspiegel in humanen Zellen innerhalb des untersuchten Zeitraums zu apoptotischen Prozessen führt. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass das humane La-Protein für die Aufrechterhaltung zellzyklusabhängiger Vorgänge notwendig ist.

Bei diesen Studien wurde sowohl mit siRNA-Doppelbehandlungen als auch mit pSuper-Plasmid-Transfektionen gearbeitet. Dabei zeigte sich. dass hLa-siRNA-Doppelbehandlungen einen deutlicheren Effekt auf die Zellvermehrung ausübten als pSuperLa-Transfektionen (siehe 4.2.1; 4.2.2). Diese resultierten im Vergleich mit Kontrollzellen in einer auf etwa ein Drittel verminderten Zellvermehrung, während durch die Verwendung von pSuperLa-Plasmiden nur eine Reduktion der Zellvermehrung auf 60% erreicht wurde. Da aus den Vorexperimenten zur Etablierung der RNA-Interferenz eindeutig hervorging, dass nach hLa-siRNA-Doppelbehandlungen reproduzierbar eine deutlich stärkere Reduktion des La-Proteinspiegels erreicht wurde als nach pSuperLa-Transfektionen, wird vermutet, dass die Menge des verbliebenen Proteinspiegels die Zellvermehrungsdefizite reguliert. So kann angenommen werden,

dass bestimmte zelluläre Defizite nach der Verminderung des La-Proteinspiegels dann stärker zutage treten, wenn dieser unter einen bestimmten Pegel fällt und eine geringfügigere Reduktion besser toleriert wird.

Während in Hefezellen das La-Protein allein für die Lebens- und Wachstumsfähigkeit nicht essentiell zu sein scheint (189), spielt es im Gegensatz dazu in humanen Zellen eine unverkennbare Rolle in der Zellvermehrung. Erwähnenswert ist dabei, dass auch in Hefezellen das La-Protein essentiell für das Wachstum der Zellen wird, wenn zusätzliche Mutationen im Lsm2-Lsm8-Proteinkomplex vorliegen (132). Dieser Proteinkomplex ist offensichtlich zusammen mit La für die Stabilisierung neu synthetisierter U6-snRNA und den Zusammenbau von U6 snRNPs essentiell (131, 132). Daher wird vermutet, dass die Störung dieses Weges zu nicht aufzuhebenden Defekten der Wachstumsfähigkeit führt. Ein wesentlicher Unterschied der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Erkenntnisse zu den Ergebnissen aus Hefezellen besteht darin, dass für die Untersuchung von Hefezellen das La-Protein durch das Ausschalten des erfoderlichen La-Gens komplett entfernt wurde, und dennoch die Wachstumsfähigkeit der Zellen ohne weitere Mutationen nicht beeinträchtigt wurde, während in humanen Zellen bereits eine Reduktion der Proteinexpression von hLa durch RNA-Interferenz gravierende Defizite verursacht. In diesem Zusammenhang könnte der im Vergleich zum Hefe-La-Protein verlängerte C-terminale Bereich des humanen La-Proteins von Interesse sein. Dieser könnte mit Funktionen assoziiert sein, die in humanen Zellen für die Aufrechterhaltung der Zellvermehrung notwendig sind. So ist es denkbar, dass z.B. das RRM-2, welches dem Hefe-La fehlt (siehe Abb. 2), für die Bindung wichtiger zellulärer RNAs essentiell ist. Besonders interessant wäre es in diesem Zusammenhang, zu untersuchen, ob Hefezellen, die durch das Fehlen des La-Homologs und die Mutation im Lsm-Komplex in ihrer Wachstumsfähigkeit behindert sind, durch das Einbringen von humanem La-Protein wieder zur Zellvermehrung befähigt werden.

5.3 Untersuchung von Zellzyklusphasen und Zyklin-Proteinspiegeln nach der Verminderung der hLa-Proteinspiegel

Aufgrund der Ergebnisse der Zellvermehrungsstudien wurde die Frage nach den Ursachen der verminderten Zellvermehrung aufgeworfen. Daher wurde zunächst untersucht, ob diese Beobachtungen mit Verschiebungen der Zellzyklusphasen in Einklang gebracht werden können. In U2OS-Zellen wurde nach Reduktion der La-Proteinspiegel eine prozentuale Verschiebung der Zellzyklusphasen zugunsten einer G1-Population im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen beobachtet (siehe Abb. 26; 27). Die Erhöhung war jedoch transient und nicht zu allen untersuchten Zeitpunkten gleich stark ausgeprägt. Wie bereits zuvor diskutiert, ist es vorstellbar, dass bestimmte La-Proteinspiegel unterschritten werden müssen, damit es zur Hemmung des Zellzyklus kommt. Diese Spekulation ist im Einklang damit, dass zu frühen Zeitpunkten bis 24h nach hLa-siRNA-Einfachbehandlung keine Verschiebung gemessen werden konnte, denn die Zeitspanne bis zur Reduktion des La-Proteinspiegels nach der siRNA-Transfektion hängt unter anderem von der Halbwertszeit des Proteins ab, welche für das humane La-Protein in EM-3-Zellen mit etwa 11h bestimmt wurde (176). Demnach könnte nach 11h bestenfalls mit einer 50%-igen, nach 22h mit einer 75%-igen und nach 33h mit einer 87,5%-igen Reduktion der La-Proteinmenge gerechnet werden. Diese Situation ist in expreimentellen Ansätzen sicherlich nicht gegeben, da sie sowohl eine hundertprozentige Transfektionseffizienz als auch einen hundertprozentigen Abbau der mRNA durch die RNA-Interferenz voraussetzen würde. Da jedoch die stärkste Reduktion des La-Proteinspiegels frühestens nach 36h nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 11; 12) und zum selben Zeitpunkt erstmals eine Verschiebung der Zellzyklusphasen beobachtet werden konnte (s. Abb. 26; 27), ist aufgrund der Vorexperimente anzunehmen, dass die La-Proteinspiegel für einen initialen Effekt auf den Zellzyklus um mindestens 75% verringert sein müssen. Es ist zu vermuten, dass die Zellen jedoch nicht vollständig arretiert waren, da zum Zeitpunkt 48h eine vergleichsweise geringere Erhöhung der G1-Population auffiel, während 72h nach der RNA-Interferenz erneut eine stärkere Verschiebung gemessen werden konnte. Dieser Umstand wäre mit einer Verlängerung der G1-Phase erklärbar. Die Zellen könnten sich zunächst vermehrt in der G1-Phase angesammelt haben und dort aufgrund eines durch Reduktion der La-Proteinspiegel verursachten Defektes länger als kontrollbehandelte

Zellen verweilt haben. Somit wäre es möglich, dass ein wiederholter G1-Effekt erst detektiert werden konnte, nachdem sich erneut vermehrt Zellen in der G1-Phase angesammelt hatten. Diese These würde für einen vorübergehenden "Stau" am Übergang der G1-Phase zur S-Phase sprechen, der möglicherweise von Schwankungen des La-Proteinspiegels beeinflusst wurde. Es ist jedoch schwierig, zwischen einem "Arrest" und einer Verlängerung der G1-Phase zu differenzieren, da Zellen, die sich vorübergehend oder dauerhaft in einer "Ruhephase", der sog. G0-Phase befinden, einen G1-Phasen-DNA-Gehalt aufweisen (134) und daher in der FACS-Analyse dieser fälschlicherweise zugerechnet werden. Da jedoch der in U2OS-Zellen detektierte G1-"Arrest" offensichtlich reversibel war, wird angenommen, dass die Zellen nicht vollständig arretiert waren, sondern lediglich ein erschwerter Übergang von der G1-Phase in die S-Phase vorliegt. Es ist jedoch nicht klar, ob die stark verminderte Proliferation der Zellen zusätzlich durch eine generelle Verlangsamung aller Phasen mit besonders ausgeprägter Manifestation in der G1-Phase bedingt wurde. Aufgrund des offensichtlich erschwerten Übergangs von der G1- in die S-Phase wurde eine Beteiligung von Zyklin E vermutet, welches diesen moduliert (siehe 1.3.1). Diese Vermutung konnte mittels Western Blot-Analysen in U2OS-Zellen bestätigt werden, indem eine transiente Verminderung von Zyklin E in Zellen mit hLa-Defizit beobachtet wurde, während der Proteinspiegel des ebenfalls der G1-Phase zuzuordnenden Proteins Zyklin D1 nur unwesentlich betroffen war (siehe Abb. 34-36). Da in Zellkulturen gezeigt werden konnte, dass die Inaktivierung von Zyklin E zu einem G1-"Arrest" führt, während seine Überexpression die G1-Phase deutlich verkürzt (129, 130, 144), wurde lange Zeit angenommen, dass dieses Protein für den Zellzyklus essentiell ist. Ein transient verminderter Zyklin E-Spiegel, wie er in Zellen mit hLa-Defizit vorzufinden ist, könnte demnach an einer Verlängerung der G1-Phase und demzufolge einer Erhöhung der G1-Population beteiligt sein. Für das Ausüben von Zellzyklusfunktionen ist jedoch vor allem die Menge des aktiven Zyklin-Cdk-Komplexes entscheidend ((133) u. Übersichtsartikel (154)). Demnach könnte ein verminderter Zyklin E-Proteinspiegel dazu führen, dass auch die Menge des aktiven Zyklin E-Cdk2-Komplexes verringert ist. Mit Hilfe eines Mausmodells, in dem das für Zyklin E (E1) kodierende Gen ausgeschaltet wurde, konnte kürzlich erstmalig gezeigt werden, dass eine normale embryonale Entwicklung dennoch stattfinden kann und zu entwickelten Mäusen mit durchschnittlicher Lebenserwartung ohne gesundheitliche Einschränkungen führt (57), womit der gängigen Meinung der absoluten Notwendigkeit dieses Zyklins

widersprochen wurde. Andererseits scheint Zyklin E dennoch in vollständig wachstumsarretierten Zellen (G0) für den Wiedereintritt in den Zellzyklus essentiell zu sein ((57) u. diskutiert in (148)), was ebenfalls dafür spricht, dass es sich bei den hier untersuchten Effekten nicht um ein Verlassen des Zellzyklus handelt. Um die Verminderung der hLa-Proteinspiegel mit der Verringerung der Zyklin E-Proteinspiegel und der Erhöhung der G1-Population in einen zeitlichen Zusammenhang bringen zu können, wird die Korrelation der Ergebnisse der *Western Blot*-Analyse mit denen der FACS-Analyse im nachfolgenden Modell graphisch dargestellt (siehe Abb. 61).



Abb. 61: Die Reduktion des hLa-Proteinspiegels korreliert mit einem verminderten Zyklin E-Proteinspiegel und einer erhöhten G1-Population nach siRNA-Einfachbehandlung in U2OS-Zellen: Die Grafik zeigt den Zusammenhang zwischen der Reduktion des hLa-Proteinspiegels nach Einfachbehandlung mit siRNA, dem Zyklin E-Proteinspiegel und der G1-Rate (graue Balken). Es wurden die Proteinspiegel aus dem in Abb. 35 gezeigten Experiment sowie die FACS-Werte aus Tab. 1 verwendet.

Aufgrund der dargestellten Korrelation (siehe **Abb. 61**) wird vermutet, dass die Stärke des Effekts auf den Zyklin E-Proteinspiegel von der Menge des La-Proteins abhängt. Andererseits ist eine Erhöhung der G1-Population offensichtlich nicht direkt mit der absoluten Menge der Zyklin E- und hLa-Proteinspiegel in Einklang zu bringen. Diese Daten sprechen jedoch für eine Funktion von Zyklin E, die von anderen Zellzyklusregulatoren zumindest teilweise übernommen werden kann und sind damit im Einklang mit den neuesten Erkenntnissen bezüglich der Rolle von Zyklin E für die Zellvermehrung (57).

Da nach einer Doppelbehandlung mit hLa-siRNA eine stärkere Erhöhung der G1-Phase in U2OS-Zellen verzeichnet werden konnte als nach Einzelbehandlungen (siehe Abb. 28; 29), ist erneut ein Hinweis für eine Zellzyklusregulation, die von der Menge des verbliebenen La-Proteins abhängig ist, erbracht. Doppelbehandlungen führen nachweislich zu einer stärkeren Verminderung des hLa-Proteinspiegels und bewirken offensichtlich infolgedessen auch eine stärkere Zellzyklusbeeinträchtigung. Unterstützt wird diese Vermutung mit dem zum untersuchten Zeitpunkt ebenfalls stärker reduzierten Zyklin E-Proteinspiegel. Es ist dennoch unklar, ob es sich ebenfalls um einen transienten Effekt handelte, da keine weiteren Zeitpunkte analysiert wurden. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten sowie der Erkenntnis, dass Zyklin E für den Zellzyklus nicht essentiell zu sein scheint (57), ist dies jedoch anzunehmen.

Um HeLa-Zellen bezüglich einer eventuellen Verschiebung der Zellzyklusphasen zu analysieren, wurden nur doppelt siRNA-behandelte Zellen verwendet. Obwohl nicht nur asynchrone Zellen mittels FACS-Analyse untersucht wurden, sondern auch zwei unterschiedlich lange Serum-Mangelphasen durchgeführt wurden, konnte keine signifikante Verschiebung der Zellzyklusphasen beobachtet werden (siehe 4.2.5). Eine in anderer Hinsicht interessante Veränderung offenbarte sich hingegen durch die längere Serum-Mangelphase. So zeigte sich, dass HeLa-Zellen offensichtlich sensitiver auf einen Serum-Mangel reagierten als U2OS-Zellen. Es trat im Vergleich zu sämtlichen vorhergehenden FACS-Analysen ein generell verstärkter Zelltod auf, der durch eine auffallend erhöhte Sub-G1-Rate widergespiegelt wurde (siehe Abb. 32). Obwohl die Sub-G1-Population keine exakte Quantifizierung toter Zellen ermöglicht, da sowohl ganze Zellen als auch Zelltrümmer einbezogen werden, fiel auf, dass Zellen mit hLa-Defizit noch stärker auf den ausgedehnten Serum-Mangel reagierten als kontrollbehandelte Zellen. Diese Beobachtung kann darauf hinweisen, dass durch den längeren Serum-Mangel irreversible Zellschäden entstanden waren. Neben der erhöhten Sub-G1-Rate konnte jedoch bei Zellen mit La-Deifizit eine weitere Besonderheit durch das Auftreten eines zusätzlichen G1-Peaks beobachtet werden. Ein derartiger "Supra"-G1-Peak (siehe Abb. 32) könnte auf Veränderungen der Chromatinstruktur hinweisen (194). Da Propidium-Iodid ohne Sequenzspezifität zwischen den DNA-Strängen interkaliert, ist seine Fluoreszenzintensität direkt proportional zum zugänglichen DNA-Gehalt und reflektiert damit auch den Kondensierungsstatus des Chromatins. Der "Supra"-G1-Peak könnte daher einen Anteil der G1-Population mit weniger stark kondensiertem Chromatin reflektieren. Da dieser Effekt nicht in Experimenten mit unsynchronisierten oder kürzer unter Serum-Mangel kultivierten HeLa-Zellen auftrat (siehe Abb. 30), ist es wahrscheinlich, dass der längere Serum-Mangel generell für Änderungen verantwortlich war, die sich besonders in Zellen mit La-Defizit manifestierten. Die Struktur von Chromatin wird im Wesentlichen durch die Wechselwirkung von DNA und Histonen bestimmt. Da in *in vitro*-Experimenten eine Funktion für das La-Protein bei der Stabilisierung von Histon H4-mRNA gezeigt werden konnte (118), könnte hier ein Zusammenhang bestehen. So wäre es möglich, dass durch die Verminderung der hLa-Proteinspiegel eine Destabilisierung der Histon H4-mRNA zu einer verringerten Histon H4-Menge führt. Da Histon H4 im Zusammenspiel mit weiteren Histonen zur Verdichtung der Chromatin-Struktur beiträgt, könnte sich ein durch verminderte hLa-Proteinspiegel verursachtes H4-Defizit unter Serum-Entzug als "Stressantwort" durch dekondensiertes Chromatin zeigen.

Da eine Erhöhung der G1-Population nach der Verminderung der La-Proteinspiegel, wie sie in U2OS-Zellen beobachtet wurde, in keinem Experiment mit HeLa-Zellen erkennbar war, wird angenommen, dass die Verminderung des hLa-Proteinspiegels in HeLa-Zellen zu einem generell stark verlangsamten Zellzyklus führt und damit alle Zellzyklusphasen beeinflusst. Auch in HeLa-Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen einem La-Defizit und dem Proteinspiegel der G1-Zykline D1 und E sowie des S-Phasen-Zyklins A erfasst. Dieser betraf jedoch im Gegensatz zu U2OS-Zellen Zyklin D1 in einem deutlich stärkeren und konstanten Ausmaß (siehe Abb. 37; 38). In einem geringeren Ausmaß als für Zyklin D1 wurde zudem eine transiente Verminderung von Zyklin E beobachtet sowie eine sehr geringfügige Beeinflussung des S-Phasen-Zyklins A. Da bereits vor wenigen Jahren ein Mausmodell mit ausgeschaltetem Zyklin D1-Gen etabliert werden konnte, welches jedoch nur unter Einbringen des Zyklin E-Gens im selben Genlokus die phänotypischen Defekte überwinden konnte, (56) scheint auf den ersten Blick Zyklin D1 "wichtiger" zu sein als Zyklin E. Dies könnte in seiner initialen Rolle bei der Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins begründet liegen, wodurch unter anderem die Transkription von Zyklin E, Zyklin A und weiteren E2F-abhängigen Genprodukten erfolgt (49, 55, 73, 93, 115), siehe auch 1.3). Während frühe Studien zeigen, dass durch die Inaktivierung von Zyklin D1 durch Antikörper oder antisense-Oligonukleotide ein G1-Arrest ausgelöst wird (13, 141), konnte später der Hinweis erbracht werden, dass die Eliminierung des Zyklin D1-Gens in Vertebraten-Zellen zu einer generellen Verlangsamung des Zellzyklus mit Beeinträchtigung von G1-, G2- und M-Phase führen kann (100). In dieser Veröffentlichung wurde zudem ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Zyklin D1 und der Sensitivität für Apoptose hergestellt. So scheinen Zellen ohne Zyklin D1 sowohl auf UV- als auch auf Röntgen-Strahlung mit erhöhtem Zelltod zu reagieren. Es wird daher vermutet, dass Zyklin D1 nicht nur im Zellzyklus agiert, sondern auch eine Funktion bei der Unterdrückung von Apoptose unter Stressbedingungen innehat. Die Ergebnisse dieser Arbeit befinden sich somit eindeutig im Einklang mit dem Befund des verlangsamten Zellzyklus. Auch die Beobachtungen des verstärkten Zelltods La-defizienter (und somit Zyklin D1-verminderter) Zellen bei längerem Serum-Mangel könnten hierdurch erklärt werden.

5.4 Nachweis einer spezifischen Funktion des La-Proteins für die Aufrechterhaltung der Zellvermehrung

Die Reduktion endogener La-Proteinspiegel bewirkt eine deutlich verminderte Zellvermehrung, welche in HeLa-Zellen mit einer drastischen Senkung des Zyklin D1-Proteinspiegels korreliert. Da die Möglichkeit einer unspezifischen Wirkung von siRNAs auf die Expression anderer Proteine auch durch den durchgeführten Datenbankabgleich der siRNA-Sequenz nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann (153), war es außerordentlich wichtig zu zeigen, dass die Überexpression des La-Proteins die beobachteten Defizite aufheben kann. Die unter 4.3.1 dargestellte Studie erbrachte den Beweis, dass die Transfektion von siRNA-resistentem GFP-hLa-WT-mut. sowohl die Hemmung der Zellvermehrung größtenteils aufhob als auch die Proteinspiegel von Zyklin D1 partiell normalisierte (siehe Abb. 43-46). Eine vollständige Aufhebung der durch das La-Defizit verursachten Effekte war nicht zu erwarten gewesen, da aufgrund der experimentellen Erfordernisse das "Ersatz"-Protein erst drei Tage nach der ersten siRNA-Behandlung exprimiert werden konnte. Somit wäre es denkbar, dass sich zelluläre Schäden durch den La-Mangel bereits manifestiert hatten und entweder irreversibel waren oder nicht im zeitlichen Rahmen des durchgeführten Experiments ausgeglichen werden konnten. Da bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Fusion des La-Proteins mit GFP dessen Funktionalität und Lokalisierung per se nicht einschränkt (83, 85), kann dieser Aspekt als Ursache ausgeschlossen werden. Die Überexpressionsstudie erbrachte somit eindeutig den Beweis einer spezifischen Beteiligung des La-Proteins für die Aufrechterhaltung von Zellzyklusfunktionen. Damit ist in vivo eine völlig neue

Funktion des humanen La-Proteins für die direkte Regulation des Zellzyklus gefunden worden. Es stellt sich nun die Frage, welcher Mechnismus dieser Regulation zugrunde liegt. Daher ist es erforderlich, zu untersuchen, welche Domänen des La-Proteins für die Aufrechterhaltung der Zellvermehrung notwendig sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten bereits Mutationen in die siRNA-Bindestelle von GFP-hLa-Deletions-Plasmiden eingeführt und somit die Grundlage für weitere Untersuchungen geschaffen werden (siehe **4.3.2**). So kann durch die Überexpression der Deletionsmutanten in Zellen mit Mangel an endogenem hLa untersucht werden, ob die Hemmung der Zellvermehrung von der Lokalisation des Proteins im Kern, im Zytoplasma oder im Nukleolus abhängt und ob die RNA-Bindung durch das RNP-2 des RRM-1 dabei eine entscheidende Rolle spielt.

5.5 Molekularbiologische Mechanismen des La-Proteins zur Regulation von G1-Zyklinen

Aufgrund der Ergebnisse der Zellvermehrungsassays und der *Western Blot*-Analysen wurde ein Zusammenhang zwischen der Verminderung der hLa-Proteinspiegel und der Regulation von G1-Zyklinen in U2OS- und HeLa-Zellen hergestellt, der mit der verminderten Zellvermehrung korreliert. Um der Frage nach den Ursachen der verminderten Proteinspiegel nachzugehen, wurden die molekularbiologischen Regulationsmechanismen untersucht. Grundsätzlich könnte das La-Protein sowohl direkt als funktionelles Protein als auch indirekt über weitere Faktoren an einer Regulation der Zykline beteiligt sein. Unabhängig von der Frage der direkten oder indirekten Beteiligung können derartige Änderungen im Proteinspiegel prinzipiell auf verschiedenen molekularbiologischen Ebenen entstehen. So können Veränderungen der Transkription, der mRNA-Stabilität, der Translation oder Proteinstabilität eine Änderung des Proteinspiegels bewirken. Auch ein Zusammenspiel mehrerer dieser Möglichkeiten ist denkbar.

Da sich die Zyklin E-Promotoraktivität in Zellen mit hLa-Defizit jedoch nicht verminderte, sondern sogar erhöhte (siehe Abb. 49), kann ein transkriptioneller Mechanismus als Ursache für die zu diesem Zeitpunkt festgestellte Reduktion des Zyklin E-Proteinspiegels ausgeschlossen werden. Die erhöhte Promotoraktivität könnte möglicherweise durch eine Autoregulation erklärt werden. Prinzipiell ist es denkbar, dass der verminderte Zyklin E-Proteinspiegel in der Zelle zu einer Erhöhung der

Promotoraktivität führt, um dadurch den verminderten Zyklin E-Spiegel auszugleichen. Die Transkription von Zyklin E unterliegt jedoch der Kontrolle von E2F-Transkriptionsfaktoren (55, 99), welche ebenfalls durch einen Rückkopplungsmechanismus über aktive Zyklin E-Cdk2-Komplexe und hyperphosphoryliertes pRb aktiviert werden (44, 76, 161). Da es sich in diesem Fall um eine positive Rückkopplung handelt, kann der Mechanismus durch einen niedrigen Zyklin E-Spiegel weitere Faktoren vermutlich nicht ausgelöst werden. ohne Somit ist es unwahrscheinlich, dass ein niedriger Proteinspiegel von Zyklin E selbst zu einer Erhöhung der Zyklin E-Promotoraktivität führt. Ein wahscheinlicherer Mechanismus wäre gegeben, wenn eine transkriptionelle Repression vermindert würde. So konnte z.B. gezeigt werden, dass der Zyklin E-Promotor von WT1, einem Tumorsuppressorprotein, reprimiert wird (105). Es wäre daher denkbar, dass das La-Protein mit einem Repressorprotein oder dessen Transkript interagiert und eine Verminderung des La-Proteins somit zu einer verminderten Repression und einer erhöhten Promotoraktivität führt.

Da die Transkription von Zyklin E in Zellen mit hLa-Defizit jedoch nicht vermindert, sondern erhöht war, mussten weitere Regulationsmechanismen betroffen sein, die zu einem erniedrigten Proteinspiegel von Zyklin E und auch Zyklin D1 führten. Bei der Untersuchung der Zyklin E- und Zyklin D1-mRNA-Spiegel konnte jedoch ebenfalls keine Erniedrigung des vorhandenen Status nachgewiesen werden (siehe Abb. 50-52). Es wäre theoretisch denkbar, dass eine geringere mRNA-Stabilität nach La-Mangel zum Ausgleich einer leicht erhöhten Transkription führte, wie sie für den Zyklin E-Promotor gemessen wurde, und damit einen schnelleren "Umsatz" zwischen Transkription und Abbau bewirkte. Dies ist insofern möglich, da die Zyklin E-mRNA im Verlauf des Zellzyklus zwar eine unterschiedlich starke Expression zeigt, die normalerweise nicht mit einer veränderten mRNA-Stabilität einhergeht (108), eine erhöhte Zyklin E-mRNA-Stabilität aber z.B. in Brustkrebszellen auftritt (94). Umgekehrt ist eine verminderte Stabilität nach Ausfall zellulärer Faktoren ebenso vorstellbar. Zudem besteht offenbar ein genereller Zusammenhang zwischen der Expression von Zyklin E und Tumorerkrankungen (95, 145). Es wäre daher möglich, dass das La-Protein in der Knochenkrebszellinie U2OS eine Funktion für die Aufrechterhaltung des Tumorstatus spielt. So wäre es denkbar, dass es nach der Verminderung der hLa-Proteinspiegel zunächst zu einer erhöhten Transkription der Zyklin E-mRNA kommt, welche sich durch eine gleichzeitig verminderte mRNA-Stabilität jedoch nicht in einem erhöhten *Zyklin E*-mRNA-Status ausdrückt. Diese Möglichkeit wäre z.B. gegeben, wenn das La-Protein sowohl einen Repressor der Transkription reguliert, als auch die Stabilität der *Zyklin E*-mRNA beeinflusst. Da die Promotoraktivität für Zyklin D1 in Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, sind entsprechende Vermutungen hinfällig. Insgesamt könnte dieser Aspekt formal zur Erklärung des unveränderten Status der *Zyklin E*mRNA trotz erhöhter Transkription beitragen, ist aber für die Reduktion der Zyklin Eund auch Zyklin D1-Proteinspiegel irrelevant, da beide Transkripte nach La-Proteinspiegel-Senkung in unveränderter Menge vorliegen. Somit können die veränderten Proteinspiegel nicht transkriptionell oder posttranskriptionell erklärt werden. Folglich kann eine Regulierung nur durch eine Beteiligung der translationellen oder der posttranslationellen Ebene erklärt werden.

Demzufolge wurde exemplarisch die Halbwertszeit des Zyklin D1-Proteins in Ladefizienten und kontrollbehandelten HeLa-Zellen bestimmt und verglichen, um hier eventuell bestehende Unterschiede nachweisen zu können. Es stellte sich heraus, dass die Halbwertszeit von Zyklin D1 nach der Reduktion des La-Proteinspiegels etwa 90 min betrug, während sie in kontrollbehandelten Zellen mit etwa 20 min bestimmt werden konnte (siehe Abb. 53-55). Somit wurde in Kontrollzellen eine Halbwertszeit des Zyklin D1-Proteins bestimmt, die nicht signifikant von publizierten Halbwertszeiten zwischen 25 und 30 min abweicht (20, 42), während in Zellen mit La-Defizit eine Erhöhung der Proteinstabilität vorzuliegen scheint. Diese könnte auf einen Regulationsmechanismus im Abbauweg zurückzuführen sein. Der Abbau von Zyklin D1 über den Ubiquitin-Proteasom-Weg und erfolgt ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus der Aminosäure Threonin an Position 286. Zudem wurde gezeigt, dass die Hemmung der Phosphorylierung an dieser Stelle eine Erhöhung der Halbwertszeit des Zyklin D1-Proteins auf bis zu 3,5h nach sich zieht (42). Die Phosphorylierung erfolgt spezifisch durch die Glykogensynthasekinase-3-β, welche eine Präferenz für Cdk 4-komplexiertes Zyklin D1-Protein zeigt, die jedoch vom Aktivitätsstatus des Komplexes unabhängig ist (41). Prinzipiell ist es daher möglich, dass die erhöhte Zyklin D1-Halbwertszeit nach der Verminderung des La-Proteinspiegels auf eine verminderte Phosphorylierung an Threonin-286 zurückzuführen ist. Ob dies tatsächlich zutrifft, könnte durch die Untersuchung des Phosphorylierungsgrads von Zyklin D1 überprüft werden. Ein solcher Befund würde suggerieren, dass die verbliebene Menge des Zyklin D1-Proteins in Zellen mit La-Defizit weniger stark mit Cdk4 komplexiert ist als in Kontrollzellen. Grundsätzlich wäre es möglich, dass das La-Protein z.B. über eine Bindung der *Glykogensynthasekinase-3-β*-mRNA in diesen Weg eingreift, jedoch sind derartige Informationen zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt. Die drastische Senkung des Zyklin D1-Proteinspiegels nach der Verminderung des La-Proteinspiegels kann folglich nicht auf einen schnelleren Abbau des Zyklin D1-Proteins zurückgeführt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann letztlich als wahrscheinliche Erklärung lediglich eine Veränderung der translationellen Ebene angenommen werden. Diese könnte auf einer verringerten Initiation der Zyklin D1-mRNA mit Polyribosomen, einer verminderten Elongation, einer verhinderten Termination oder mehrerer dieser Faktoren beruhen. Da eine effiziente Translation nur in den sog. Polyribosomen erfolgt (siehe 3.4.4), würde eine Verschiebung der assoziierten Transkripte zugunsten von freien Ribonukleoproteinkomplexen eine geringere Translationseffizienz beinhalten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten diese Frage nur im Zusammenhang mit der Assoziation des 1,7 kb großen Zyklin D1-mRNA-Transkriptes exakt beantworten, während die Signalstärke des 4,3 kb großen Transkriptes möglicherweise von einer unspezifischen Bindung der Sonde an die 28S rRNA überlagert wurde. Ein Abgleich aller verfügbaren mRNA-Sequenzen von Zyklin D1 zeigte jedoch, dass die unterschiedlichen Transkriptlängen sich stets in der 3'nichttranslatierten Region ausdrücken und somit die 5'-nichttranslatierte Region bei beiden detektierten Transkripten identisch ist. Da die Translationsinitiation oftmals nur über die 5'-Region vermittelt wird (siehe Übersichtsartikel (120)), ist an dieser Stelle nicht zwangsläufig eine gravierend unterschiedliche Initiation zwischen den Transkriptgrößen zu erwarten. Tatsächlich konnte eine unterschiedliche polysomale Assoziation der 1,7 kb Zyklin D1-mRNA zwischen Zellen mit La-Mangel und Kontrollzellen festgestellt werden (siehe Abb. 59; 60), die sich in einer generellen Verminderung der Assoziation mit Polyribosomen äußerte, während eine leichte Erhöhung in den Fraktionen freier Ribosomen auftrat. Es bleibt jedoch zu klären, ob der veränderte Proteinspiegel von Zyklin D1 allein auf diesen Effekt zurückzuführen ist und ob es sich bei dem 4,3 kb-Transkript ebenso verhält. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass die verminderte Initiation mit Polyribosomen zumindest teilweise für den erniedrigten Zyklin D1-Spiegel verantwortlich ist. Eine Funktion des La-Proteins, die in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung sein könnte, ist die bereits erwähnte, unterstützende Wirkung bei der Translationsinitiation sog. 5'-TOPmRNAs (siehe 1.2.2), welche durch die Bindung einer terminalen

Oligopyrimidinsequenz in der 5'-Region der Transkripte vermittelt und von nichtphosphoryliertem La-Protein ausgeübt wird (37, 90, 138). Da für die 5'nichttranslatierte Region der *Zyklin D1*-mRNA ebenfalls die Präsenz eines mutmaßlichen Traktes von Oligopyrimidinen (TOP) in der Nähe der 5'-*Cap*-Struktur vermutet wird (80), wäre es möglich, dass an dieser Stelle eine Verbindung existiert. Anhand der Gemeinsamkeiten von typischen terminalen Oligopyrimidinsequenzen, für die das La-Protein eine Bindeaffinität besitzt (26, 37), konnte nach entsprechenden Motiven der *Zyklin D1*-mRNA und auch der *Zyklin E*-mRNA gesucht werden. Prinzipiell wäre es möglich, dass das La-Protein eine generelle Bindeaffinität für derartige Nukleotidfolgen aufweist, die sich nicht nur auf die 5'-Region beziehen. In der folgenden Abbildung werden einige Oligopyrimidinmotive der *Zyklin D1*- und *Zyklin E*-mRNA exemplarisch gezeigt und bekannten, terminalen Oligopyrimidinsequenzen gegenübergestellt (siehe **Abb. 62**).



Abb. 62: Vergleich der terminalen Oligopyrimidinmotive zweier bekannter 5'TOP-mRNAs mit ähnlichen Oligopyrimidinmotiven der Zyklin D1- und Zyklin E-mRNA: A: Terminale Oligopyrimidinmotive der mRNA des ribosomalen Proteins rp L4 (NM_000968) und des eukaryotischen Elongationsfaktors eEF1- α (J04617). Für beide mRNAs konnte eine Stimulation der Translationsinitiation durch das La-Protein gezeigt werden. (37) B: Die 5'-nichttranslatierte Region der Zyklin D1-mRNA (NM_053056) besitzt ein oligopyrimidinreiches Motiv in einer Entfernung von 180 nt zum terminalen 5'-Ende. Im proteinkodierenden Bereich und in der 3'-nichttranslatierten Region befinden sich mehrere derartige Motive, von denen jeweils eins beispielhaft dargestellt wurde. Die Zyklin E-mRNA (NM_01238) verfügt über kein oligopyrimidinreiches Motiv in der 5'-nichttranslatierten Region, jedoch über mehrere mind. 7 nt lange Oligopyrimidinsequenzen im proteinkodierenden und im 3'-nichttranslatierten Bereich (zwei Beispiele gezeigt).

Alle dargestellten Transkripte spiegeln nicht das tatsächliche Längenverhältnis innerhalb der mRNAs und im Vergleich mit anderen mRNAs wider.

Cap - 5'-*cap*-7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende der mRNA, TOP – terminales Oligo-pyrimidinmotiv

Beim Vergleich der mRNA-Sequenzen (siehe Abb. 62) wurden sowohl in der Zyklin D1- als auch in der Zyklin E-mRNA mehrere potentielle Motive gefunden, die theoretisch eine Bindung des La-Proteins aufgrund von 7-15 Pyrimidinen in Folge zulassen würden. Während diese Motive in der Zyklin E-mRNA nur in der proteinkodierenden und der 3'-nichttranslatierten Region enthalten sind, konnte für die Zyklin D1-mRNA tatsächlich ein Oligopyrimidinmotiv in der 5'-nichttranslatierten Region bestimmt werden, welches bei der Initiation der mRNA eine Rolle spielen könnte, wie bereits vermutet wurde (80). Dementsprechend wäre es denkbar, dass die Oligopyrimidin-Region der Zyklin D1-mRNA in vivo für die Initiation der Translation funktionell sein könnte. Im Kontrast dazu steht jedoch der Befund, dass die Zugabe von Rapamycin, einem Inhibitor der G1-Phase, trotz eines veränderten Proteinspiegels keine Veränderung der polysomalen Assoziation der Zyklin D1-mRNA hervorruft (75), während typische mRNAs mit einer funktionellen 5'-TOP-Struktur durch Rapamycin eine verminderte Translationsinitiation zeigen ((173), siehe auch Übersichtsartikel (121)). Es wäre trotzdem vorstellbar, dass der ribosomalen Translationsinitation der Zyklin D1-mRNA ein anderer Mechansimus als der von typischen 5'-TOP-mRNAs zugrunde liegt, der zwar über eine Oligopyrimidinstruktur vermittelt, aber durch die Zugabe von Rapamycin nicht beeinträchtigt wird. Auch für Zyklin E wäre eine Translationsregulation durch das La-Protein vorstellbar, die sich jedoch durch das Fehlen eines Oligopyrimidinmotivs in der 5-nichttranslatierten Region vermutlich nicht auf die Initiation auswirkt. Um eine Aussage treffen zu können, wäre allerdings zunächst die Untersuchung der polyribosomalen Assoziation und der Translationseffizienz erforderlich.

Selbstverständlich wäre es nach wie vor möglich, dass das La-Protein im Falle einer direkten Bindung eine andere Nukleotidfolge als eine Oligopyrimidinsequenz erkennt. Daher wurden die Zyklin D1-mRNA und die Zyklin E-mRNA zusätzlich mit der Mdm2mRNA verglichen, für die eine Bindung des La-Proteins ebenfalls als translationell unterstützend beschrieben wurde (176) (siehe 1.2.2). Hierbei wurde die mögliche Kompetitionsexperimente mit Bindungsstelle durch einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden auf eine 34 nt große Sequenz der intercistronischen Region der Mdm2-mRNA eingeengt. Jedoch konnten keine signifikanten Übereinstimmungen mit der Zyklin D1- oder Zyklin E-mRNA aufgezeigt werden. Da das La-Protein auch für einige virale und zelluläre Transkripte an der *IRES*-vermittelten Translation beteiligt ist (siehe 1.2.2), wäre diese Möglichkeit ebenfalls zu erwägen. Jedoch konnte bislang weder für die *Zyklin D1*- noch für die *Zyklin E*-mRNA das Vorhandensein eines solchen *IRES*-Elements bewiesen werden, was ein Vorhandensein einer derartigen Region allerdings nicht ausschließt.

Worin könnte nun aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine Funktion des La-Proteins in der Proteinsynthese von Zyklin D1 bestehen? Da das La-Protein in seinen vielfältigen Funktionen diese meist über eine Bindung von RNA vermittelt, ist anzunehmen, dass es sich auch in diesem Fall so verhält. Diese Vermutung wirft zusätzlich die Frage auf, ob es sich dabei tatsächlich um eine direkte Wirkung durch die Bindung an die Zyklin D1-mRNA handelt oder um eine indirekte Funktion durch die Bindung an eine zelluläre RNA, die mit der Translation von Zyklin D1 in Verbindung steht. Kürzlich konnte mit Hilfe einer Microarray-Analyse eine Anzahl von mRNAs, die mit hLa in einer Immunopräzipitation assoziiert waren, aufgelistet werden (persönliche Kommunikation, S. Tenenbaum). Darunter befand sich tatsächlich die Zyklin D1-mRNA (und auch die der assoziierten Kinase Cdk4), womit eine direkte Bindung des La-Proteins an diese sehr wahrscheinlich wird. Da jedoch auch die mRNA des Elongationsfaktors eEF-1-α im hLa-Pellet gefunden wurde, für welchen ein stimulierender translationeller Effekt des La-Proteins über ein 5'-TOP-Element bereits gezeigt werden konnte (26), ist ebenso eine indirekte Funktion auf der Ebene der Elongation denkbar. Entsprechend können nun verschiedene Erklärungsmodelle entwickelt werden:

Das La-Protein könnte direkt an das Oligopyrimidinmotiv der 5'nichttranslatierten Region der Zyklin D1-mRNA binden und dadurch die
ribosomale Translationsinitiation dieses Transkripts bewirken, indem es durch
seine Bindung zur Ausbildung eines Initiationskomplexes kommt. Durch eine
Verminderung des La-Proteinspiegels würde demnach die Initiation erschwert
oder verhindert werden, was sich letztendlich in einem erniedrigten
Proteinspiegel äußern würde (siehe Abb. 63). Dieses Modell wird besonders
durch die gewonnenen Daten zur polyribosomalen Assoziation unterstützt.



Abb. 63: Modell einer möglichen Beteiligung des La-Proteins bei der Translationsinitiation: A: Erfolgreiche polyribosomale Initiation der mRNA: Das La-Protein ist für die polyribosomale Translationsinitiation der mRNA notwendig, indem es an eine Region der 5'nichttranslatierten Region bindet. Dadurch kommt es unter Beteiligung von Initiationsfaktoren (IF, grünes Quadrat) zur Ausbildung des Initiationskomplexes, der Anlagerung der ribosomalen Untereinheiten, der Bindung der Initiator-tRNA und somit zur erfolgreichen Translation. B: Blockade der Translationsinitiation ohne hLa: Ohne die Bindung des La-Proteins kann die mRNA nicht mit den ribosomalen Untereinheiten und dem Initiationskomplex interagieren. Es kommt daher nicht zur Anlagerung der ribosomalen Untereinheiten und der Synthese des Proteins.

 Des Weiteren wäre es denkbar, dass die gezeigte, unterstützende Funktion des La-Proteins bei der Translationsinitiation des Elongationsfaktors eEF-1-α (37) essentiell ist und das Fehlen des La-Proteins damit zu einer Verminderung dieses Proteins führt, welche sich selektiv auf die Kettenverlängerung bestimmter Proteine, wie die von Zyklin D1, auswirkt. Da eEF-1-α jedoch eine
generelle Funktion in der Translation durch die Katalyse des ersten Schritts des Elongationszyklus zukommt, müssten hierbei weitere Faktoren die Proteinbiosynthese von Haushalts-Proteinen (sog. *Housekeeping*-Proteinen) gewährleisten. Dieser Mechanismus würde im Zusammenhang mit der *Zyklin D1*-mRNA von einer indirekten Funktion ausgehen, für die keine Bindung des La-Proteins an letztere erforderlich wäre, ist aber aufgrund der publizierten Daten zur Rolle des La-Proteins bei der Translationsinitiation der *eEF-1-α*-mRNA die nächstwahrscheinliche Möglichkeit.

Weiterhin ist theoretisch denkbar, dass das La-Protein nicht nur die Initiation der Translation von mRNAs, sondern auch die Elongation direkt modulieren kann, was einer völlig neuen Funktion entsprechen würde, die bislang nicht durch veröffentlichte Daten unterstützt wird. So könnte es direkt an ein Element der proteinkodierenden Sequenz in der *Zyklin D1*-mRNA binden und z.B. durch die Rekrutierung von Elongationsfaktoren für die Verlängerung der Polypeptidkette notwendig sein. Demnach wäre es vorstellbar, dass diese durch die Verminderung der Menge des La-Proteins nicht effizient erfolgen kann, da Elongationsfaktoren nicht oder nicht ausreichend rekrutiert werden können. Dies würde bedeuten, dass die Transkripte ohne weitere Kettenverlängerung mit den Polyribosomen assoziiert bleiben und somit eine translationelle Blockade entsteht, die sich in einer verminderten Proteinsynthese äußert (siehe Abb. 64).



Abb. 64: Modell einer möglichen Beteiligung des La-Proteins an der Translation auf der Ebene der Elongation: A: Erfolgreiche Elongation der mRNA: Nach der Initiation stehen Elongationsfaktoren (EF, grünes Quadrat) zur Verfügung, die ihre Funktion erfüllen können, da in bestimmten Regionen der kodierenden Region eine Bindung mit dem La-Protein besteht. Somit erfolgt die Proteinsynthese ordnungsgemäß. B: Verhinderte Kettenverlängerung ohne hLa: Nach einer erfolgreichen Translationsinitiation der mRNA kann die Elongation nicht fortgesetzt werden, da hierfür die Bindung des La-Proteins an die mRNA notwendig wäre. Es kommt daher nicht durch Elongationsfaktoren zur Verlängerung der Aminosäurekette und damit der Synthese des Proteins.

 Die zuvor erläuterte Theorie wäre auch bei der Termination der mRNA mit einer direkten Funktion des La-Proteins in Einklang zu bringen, jedoch gibt es ebenso wie für eine direkte Rolle bei der Elongation bislang keine Hinweise. In diesem Fall könnte die fehlende Bindung des La-Proteins verhindern, dass ein Terminationsfaktor (*Release factor*) zum ordnungsgemäßen Kettenabbruch herangezogen werden kann (siehe Abb. 65). Es könnte somit entweder zur Blockierung von Ribosomen und einer dementsprechend verminderten Proteinsynthese oder zum falschen Abbruch kommen, welcher in einem veränderten Polypeptid resultiert.



Abb. 65: Modell einer möglichen Beteiligung des La-Proteins an der Translation auf der Ebene der Termination: A: Erfolgreiche Termination der mRNA: Nach der Initiation und der Elongation muss ein Terminationsfaktor (Release Factor - RF, grüner Kreis) die vollständige Polypetidkette lösen. Dieser kann nur agieren, wenn eine Bindung des La-Proteins an die mRNA besteht. Es kommt nach dem Ablösen des Polypeptids entweder zur Dissoziation der mRNA oder zu einem erneuten Translationszyklus. Das synthetisierte Protein kann vom Ort der Translation (Zytoplasma) zu seinem Bestimmungsort transportiert werden. B: Blockade der Termination ohne hLa: Nach einer erfolgreichen Initiation und Elongation der mRNA kann die Polypetidkette nicht von der mRNA und diese nicht vom Ribosom gelöst werden, da die Bindung des La-Proteins erforderlich ist. Der Terminationsfaktor ist entweder nicht ausreichend vorhanden oder kann seine Funktion nicht erfüllen. Daher kommt es nach der Synthese des Polypeptids nicht zum Weitertransport, das Ribosom bleibt aufgrund der bestehenden Assoziation mit der mRNA und der Polypeptidkette jedoch inaktiv für weitere Prozesse.

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Ergebnisse und aller verfügbaren Informationen ist es am wahrscheinlichsten, dass der verminderte Proteinspiegel von Zyklin D1 aufgrund einer fehlenden direkten Bindung des La-Proteins an die Oligopyrimidinsequenz der 5'-nichttranslatierten Region der Zyklin D1-mRNA bei der Translationsinitiation zustande kommt (siehe Abb. 63 B), da eine verminderte polysomale Assoziation der 1,7 kb-*Zyklin D1*-mRNA in dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden konnte. Es wäre möglich, dass diese jedoch nur partiell für den verminderten Zyklin D1-Proteinspiegel ursächlich ist und die Translation gleichzeitig

auf der Ebene der Elongation und/ oder Termination eingeschränkt oder verhindert ist. Während ein indirekter Einfluss auf die Elongation durch das La-Protein aufgrund dessen unterstützender Funktion bei der Translationsinitiation der eEF-1-α-mRNA nahe liegt (37) und damit Anhaltspunkte für eine daraus resultierende, selektiv eingeschränkte Elongation gegeben wären, konnte für einen Terminationsfaktor noch nicht explizit ein Bezug zum La-Protein hergestellt werden. Da sich in der Gruppe der 5'-TOP-mRNAs jedoch auch Terminationsfaktoren befinden, sind hier in nächster Zeit neue Erkenntnisse denkbar. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die wahrscheinlichsten Modelle befinden sich im Einklang mit der aktuellen Literatur, in der Hinweise auf eine translationelle Regulation von Zellzyklusproteinen auf der Ebene der Initiation und Elongation zunehmend auftreten. So wurde beispielsweise in zahlreichen Studien eine Assoziation zwischen der Überexpression von Initiations- und Elongationsfaktoren und der malignen Transformation von Zellen gezeigt (25, 39, 101). Da Zyklin D1 ein wichtiger Zellzyklusregulator ist, der ebenso wie Zyklin E eine hohe onkologische Relevanz besitzt (siehe 1.3.1), ist es durchaus wahrscheinlich, dass hier eine entsprechende Regulation erfolgen kann. Diese wird offensichtlich durch das humane La-Protein moduliert. Somit würde die Reduktion des La-Proteinspiegels durch die verminderte Translationsinitiation und evtl. -elongation einen erniedrigten Zyklin D1-Proteinspiegel nach sich ziehen. Dieser manifestiert sich in einer drastischen Verlangsamung des Zellzyklus.

5.6 Das humane La-Protein als essentieller Faktor humaner Zellen

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten drastischen Verminderung der Zellvermehrung durch die Reduktion des La-Proteinspiegels stellt sich die Frage nach der absoluten Notwendigkeit des La-Proteins für die Überlebensfähigkeit von Zellen. Da mit Hilfe der RNA-Interferenz trotz hoher Wirksamkeit sicherlich keine 100%-ige Depletion eines Proteins zu erreichen ist, kann diese Frage mit dieser Methode nicht vollständig beantwortet werden. Es ist stets möglich, dass der Verbleib einer minimalen Menge eines Proteins Zellen vor dem Tod bewahrt. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Beurteilung von Effekten in Zelkulturen. Die Situation in Organismen, insbesondere während der embryonalen Entwicklung, kann in dieser Hinsicht vollkommen anders aussehen. Für das La-Protein existiert bislang kein Mausmodell mit ausgeschaltetem La-Gen. Es ist jedoch aufgrund der vielfältigen Funktionen des La-Proteins und der großen Molekülmenge, in der es vorliegt, wahrscheinlich, dass die Etablierung einer gesunden, lebensfähigen Maus ohne das La-Protein nicht möglich ist. Dementsprechend weisen die in dieser Arbeit mittels Zellkulturuntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse darauf hin, dass das humane La-Protein eine derartig wichtige Funktion in der Zellvermehrung spielt, dass eine normale embryonale Entwicklung mit fortschreitender Zellvermehrung ohne dieses Protein nicht erreichbar ist. Es wäre daher selbstverständlich nicht sinnvoll, die vollständige Entfernung des La-Proteins als möglichen Ansatz einer Gentherapie bei viralen Infektionen wie der Hepatitis B Virus-, Hepatitis C Virus- oder der Humane Immundefizienz Virus-Infektion zu erwägen. Vielmehr ist es erforderlich, die Untersuchungen bezüglich der Zellzyklus-abhängigen Funktionen des La-Proteins zu vertiefen, um herauszufinden, welche Bereiche zur Aufrechterhaltung normaler Funktionen notwendig sind. So wäre es vorstellbar, dass in diesem Zusammenhang bestimmte Regionen des La-Proteins gefunden werden, die ausreichen, um notwendige zelluläre Funktionen aufrechtzuerhalten, während dabei die essentiellen Funktionen bei der Vermehrung viraler Erreger nicht mehr gewähleistet ist.

5.7 Weiterführende Experimente

Um die molekularen Mechanismen der Regulation von Zyklin D1 und auch Zyklin E durch das La-Protein vollständig zu verstehen, müssten insbesondere Experimente durchgeführt werden, die sich auf die translationelle Ebene beziehen und speziell zur Aufklärung der Rolle bei der Initiation, Elongation und auch Termination beitragen. Dafür wäre es notwendig, die veränderte Translationsinitiation der Zyklin D1-mRNA experimentell zu bestätigen, sowie zu überprüfen, ob diese allein gegebenenfalls für die erniedrigten Zyklin D1-Proteinspiegel in Zellen mit La-Defizit verantwortlich ist. Die Effektivität der Translation mit und ohne das La-Protein müsste daher mit Hilfe von in vitro-Translationsstudien in Retikulozyten-Lysaten bestimmt werden. Jedoch wäre damit nicht die Frage geklärt, ob eventuelle weitere Änderungen auf der Ebene der Elongation oder Termination stattfinden. Es wäre in dieser Hinsicht sinnvoll, durch Western Blot-Analyse zu überprüfen, ob diese ebenfalls in ihrem Proteinspiegel vermindert sind. Sollte dies der Fall sein, könnten zunächst Elongationsfaktoren in Zellen mit La-Proteinmangel überexprimiert und die Effekte analysiert werden. Des Weiteren ist es erforderlich herauszufinden, ob die beobachteten Auswirkungen direkt oder indirekt vermittelt werden. Daher müsste den Hinweisen auf eine direkte Bindung

des La-Proteins an die *Zyklin D1*-mRNA nachgegangen werden, indem die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse (persönliche Kommunikation, S. Tenenbaum; siehe **5.5**) durch eine RT-PCR bestätigt werden. Da es möglich ist, dass nicht nur die in dieser Arbeit untersuchten Proteine durch die Verminderung des La-Proteinspiegels betroffen sind, wäre es zudem sinnvoll, diesen Aspekt mit Hilfe einer zweidimensionalen Gelelektrophorese zu untersuchen.

Besonders interessant wären weiterführende funktionelle Studien zur Untersuchung von Domänen des La-Proteins, die für die Zellvermehrung essentiell sind. Aufgrund der erfolgreichen Vorarbeiten durch das Einführen von stillen Mutationen in die siRNA-Bindestelle von GFP-La-Plasmiden (siehe **4.3**) können in Zukunft sinnvolle *in vivo*-Studien durchgeführt werden, die offenbaren könnten, welche Bereiche unentbehrlich sind (siehe **5.4**). In diesem Zusammenhang könnte langfristig versucht werden, durch Gentherapie vor viralen Infektionen, wie z.B. der HBV- oder HCV-Infektion zu schützen oder deren oftmals chronische Auswirkungen zu kurieren, ohne dabei die essentiellen zellulären Funktionen des La-Proteins zu gefährden.

6 Zusammenfasung

Das humane La-Protein ist ein RNA-bindendes Protein, welches nicht nur bei vielen viralen Infektionen, sondern auch bei zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Im Zusammenhang mit einer potentiellen Nutzung des humanen La-Proteins als Zielstruktur für neue antivirale Therapeutika ist die detaillierte Untersuchung seiner zellulären Funktionen unerlässlich. Da von Beginn der Arbeit bis zum heutigen Zeitpunkt keine Daten hinsichtlich der Notwendigkeit des La-Proteins für die Überlebens- und Wachstumsfähigkeit humaner Zellen veröffentlicht wurden, sollte diese Fragestellung in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der RNA-Interferenz-Technik bearbeitet werden.

Um diese außerordentlich wichtigen Gesichtspunkte eingehend untersuchen zu können, wurde die Wirksamkeit der RNA-Interferenz gegen das humane La-Protein in verschiedenen Zellinien getestet und optimiert. Durch Variation einer Vielzahl von Parametern gelang es, die Proteinexpression effizient und reproduzierbar zu senken. Bereits während der Vorexperimente offenbarte sich bei verminderter La-Proteinexpression ein Zellvermehrungsdefizit, welches in nachfolgenden Studien bestätigt werden konnte. Die schwerwiegenden Defekte bei der Zellvermehrung korrelierten in U2OS-Zellen mit einer erhöhten G1-Population und wurden in HeLa-Zellen auf eine generelle Verlangsamung des Zellzyklus zurückgeführt. Zugleich wurde ein verminderter Proteinspiegel von bestimmten Zyklinen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus von besonderer Bedeutung sind, nachgewiesen. Während in U2OS-Zellen eine zeitabhängige Verminderung des Zyklin E-Proteinspiegels beobachtet wurde, zeigte sich in HeLa-Zellen nach der Senkung des hLa-Proteinspiegels eine dauerhafte und drastische Verminderung von Zyklin D1. Ein unspezifischer Effekt der RNA-Interferenz konnte als Ursache hierfür durch die Überexpression eines GFP-La-Fusionsproteins in Zellen mit vermindertem endogenen hLa-Proteinspiegel ausgeschlossen werden, da das GFP-La-Fusionsprotein das Zellvermehrungsdefizit beinahe vollständig ausgleichen konnte und überdies zu einer Normalisierung des Proteinspiegels von Zyklin D1 führte.

Um die Mechanismen der erniedrigten Zyklin D1-Spiegel nach Reduktion der La-Proteinspiegel zu verstehen, wurden Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt. Diese führten eindeutig zu dem Ergebnis, dass die Effekte weder auf einem verminderten *Zyklin D1*-mRNA-Spiegel noch auf einer erniedrigten Halbwertszeit dieses Proteins beruhten. Vielmehr gelang es, Hinweise auf eine durch Reduktion endogener hLa-Proteinspiegel verminderte Polyribosomeninitiation der *Zyklin D1*-mRNA zu gewinnen. Demzufolge wird der vom hLa-Defizit verursachte Zyklin D1-Proteinmangel sehr wahrscheinlich auf translationeller Ebene durch eine verminderte Proteinbiosynthese verursacht.

Die mit der Verminderung humaner La-Proteinspiegel assoziierten schweren Defizite in der Zellvermehrung lassen schlussfolgern, dass dieses Protein einen wichtigen Beitrag zur Zellvermehrung leistet und seine Funktionen nicht von anderen zellulären Proteinen übernommen werden können. So konnte eindeutig gezeigt werden, dass das humane La-Protein ein essentieller Bestandteil proliferativer Vorgänge ist und die Reduktion seiner Proteinexpression bereits über einen Zeitraum von nur zehn Tagen zu massiven Defekten in humanen Zellen führt.

Diese Arbeit identifizierte das humane La-Protein erstmals als einen essentiellen zellulären Faktor, der eine bedeutende modulierende Funktion im Zellzyklus ausübt. Diese völlig neuen Erkenntnisse über das humane La-Protein leisten dadurch einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des humanen Proteoms und können langfristig potentiell für therapeutische Zwecke genutzt werden.

7 Literatur

- Agrawal N., Dasaradhi P.V.N., Mohmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., and Mukherjee S.K. 2003. RNA interference: Biology, mechanism, and applications. Microbiol and Mol Biol Rev 67:657-685.
- Aigner S., Lingner J., Goodrich K.J., Grosshans C.A., Shevchenko A., Mann M., and Cech T.R. 2000. Euplotes telomerase contains a La motif protein produced by apparent translational frameshifting. EMBO Journal 19:6230-9.
- Akervall J.A., Michalides R.J., Mineta H., Balm A., Borg A., Dictor M.R., Jin Y., Loftus B., Mertens F., and Wennerberg J.P. 1997. Amplification of Cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and Cyclin D1 overexpression. Cancer 79:380-389.
- Albanese C., Johnson J., Watanabe G., Eklund N., Vu D., Arnold A., and Pestell R.G. 1995. Transforming p21^{ras} mutants and c-Ets-2 activate the Cyclin D1 promoter through distinguishable regions. J Biol Chem 270:23589-23597.
- Alfano C.S., Babon J., Kelly G., Jacks A., Curry S., and Conte M.R. 2004. Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. Nat Struct Mol Biol 11:323-329.
- Ali N., and Siddiqui A. 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. Proc Natl Acad Sci USA 94:2249-54.
- Ali N., Pruijn G.J., Kenan D.J., Keene J.D., and Siddiqui A. 2000. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. J Biol Chem 275:27531-40.
- Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Futcher A.B., Greider C.W., and Harley C.B. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc Nat Acad Sci USA 82:10114-10118.
- Alspaugh M.A., Talal N., and Tan E.M. 1976. Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum 19:216-22.

- Avni D., Shama S., Loreni F., and Meyuhas O. 1994. Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal oligomyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: Characterization of the translational *cis*-regulatory element. Mol Cell Biol 14:3822-3833.
- Ayukawa K., Taniguchi S., Masumoto J., Hashimoto S., Sarvotham H., Hara A., Aoyama T., and J. Sagara. 2000. La Autoantigen Is Cleaved in the COOH Terminus and Loses the Nuclear Localization Signal during Apoptosis. J Biol Chem 275:34465-34470.
- Bai C., Li Z., and Tolias P.P. 1994. Developmental Characterization of a Drosophila RNA-Binding Protein Homologous to the Human Systemic Lupus Erythematosus-Associated La/SS-B Autoantigen. Molecular & Cellular Biology 14:5123-5129.
- Baldin V., Lukas J., Marcote M.J., Pagano M., and Draetta G. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. Genes Dev 7:812-821.
- 14. **Bartkova J., Lukas J., and Bartek J.** 1997. Aberrations of the G1- and G1/Sregulation genes in human cancer. Prog Cell Cycle Res **3**:211-220.
- Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S.M., and Hannon G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409:363-366.
- Bernstein E., Denli A. M., and Hannon G.J. 2001. The rest is silence. RNA 7:1509-1521.
- Birnboim H.C., and Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids. Res. 7:1513-23.
- Boelens W.C., Palacios I., and I. W. Mattaj. 1995. Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. RNA 1:273-283.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. Anal Biochem 72:248-254.
- Brewer J.W., Hendershot L.M., Sherr C.J., and Diehl A. 1999. Mammalian unfolded protein response inhibits Cyclin D1 translation and cell-cycle progression. Proc Nat Acad Sci USA 96:8505-8510.
- 21. Broekhuis C.H., Neubauer G., van Der Heijden A., Mann M., Proud C.G., van Venrooij W.J., and G.J. Pruijn. 2000. Detailed Analysis of the

Phosphorylation of the Human La (SS-B) Autoantigen. (De)phosphorylation Does Not Affect Its Subcellular Distribution. Biochemistry **39:**3023-3033.

- 22. Brummelkamp T.R., Bernards R., and Agami R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science **296**:550-553.
- 23. Burd C.G., and Dreyfuss G. 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. Science 265:615-21.
- 24. Calvo O., Cuesta R., Anderson J., Gutierrez N., Garcia-Barrio M.T., Hinnebusch A.G., and Tamame M. 1999. GCD14p, a repressor of GCN4 translation, cooperates with Gcd10p and Lhp1p in the maturation of initiator methionyl-tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 19:4167-4181.
- 25. Caraglia M., Budillon A., Vitale G., Lupoli G., Tagliaferri P., and Abbruzzese A. 2000. Modulation of molecular mechanisms involved in protein synthesis machinery as a new tool for the control of cell proliferation. Eur J Biochem 267:3919-3936.
- Cardinali B., C. Carissimi, P. Gravina, and P. Pierandrei-Amaldi. 2003. La Protein Is Associated with Terminal Oligopyrimidine mRNAs in Actively Translating Polysomes. J. Biol. Chem. 278:35145-35151.
- 27. Caron J.M., Jones A. L., and Kirschner M.W. 1985. Autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblasts. J Cell Biol 101:1763-72.
- Carter M.S., and Sarnow P. 2000. Distinct mRNAs that encode La autoantigen are differentially expressed and contain internal ribosome entry sites. J Biol Chem 275:28301-28307.
- Caudy A.A., and Hannon G.J. 2004. Induction and biochemical purification of RNA-induced silencing complex from Drosophila S2 cells. Methods Mol Biol 265:59-72.
- 30. Chakshusmathi G., Kim S.D., Rubinson D.A., and Wolin S.L. 2003. A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. Embo J 22:6562-72.
- Chang Y.N., D.J. Kenan, J.D. Keene, A. Gatignol, and K.T. Jeang. 1994. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. Journal of Virology 69:618-9.
- Cheng M., Sexl M.V., Sherr C.J., and Roussel M.F. 1998. Assembly of Cyclin D-dependent kinase and titration of p27^{kip1} regulated by mitogenactivated protein kinase (MEK1). Proc Nat Acad Sci USA 95:1091-1096.

- 33. Chisari F.V., C.A. Pinkert, D.R. Milich, P. Filippi, A. McLachlan, R.D. Palmiter, and R.L. Brinster. 1985. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. Science 230:1157-1160.
- Cooper S. 2003. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. FASEB 17:333-340.
- 35. Costa-Mattioli M., Y. Svitkin, and N. Sonenberg. 2004. La Autoantigen Is Necessary for Optimal Function of the Poliovirus and Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site In Vivo and In Vitro. Mol. Cell. Biol. 24:6861-6870.
- 36. Craig A.W., Y.V. Svitkin, H.S. Lee, G.J. Belsham, and N. Sonenberg. 1997. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. Molecular & Cellular Biology 17:163-9.
- Crosio C., P.P. Boyl, F. Loreni, P. Pierandrei-Amaldi, and F. Amaldi. 2000.
 La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. Nucl.
 Acids. Res. 28:2927-2934.
- Darzynkiewicy Z., G. J. P., Juan G., Ardelt B., and Traganos F. 1996. Cytometry of cyclins. Cytometry 25:1-13.
- De Benedetti A., and Graff J.R. 2004. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. Oncogene 23:3189-3199.
- Deng, J.S., Y. Takasaki, and E.M. Tan. 1981. Nonhistone nuclear antigens reactive with autoantibodies. Immunofluorescence studies in distribution in synchronized cells. J Cell Biol 91:654-660.
- Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., and Sherr C.J. 1998. Glycogen synthase kinase-3-beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Dev 12:3499-3511.
- 42. **Diehl J.A., Zindy F., and Sherr C.J.** 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine 286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin proteasome pathway. Genes Dev **11**:957-72.
- 43. **Dong G., G. Chakshusmathi, S.L. Wolin, and K.M. Reinisch.** 2004. Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. Embo J **19:**19.
- Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRb-family proteins. Genes Dev 12:2245-2262.
- E.M. Southern. 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Anal Biochem 100:304-18.

- Ehlers I., Horke S., Reumann K., Rang A., Grosse F., Will H., and Heise T.
 2004. Functional characterization of the interaction between human La and Hepatitis B Virus. J Biol Chem elektronische Publikation, August 2004, Manuskript M402227200.
- 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.
- 48. Elbashir S.M., Lendeckel W., and Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev 15:188-200.
- 49. Ewen M.E., Sluss H.K., Sherr C.J., Matsushime H., Kato J.Y. and Livingston D.M. 1993. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. Cell 73:487-497.
- 50. Fan, H., A.L. Sakulich, J.L. Goodier, X. Zhang, J. Qin, and R.J. Maraia. 1997. Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate reZykling of RNA polymerase III transcription complexes. Cell 88:707-15.
- 51. Fan, H., J.L. Goodier, J.R. Chamberlain, D.R. Engelke, and R.J. Maraia. 1998. 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. Mol Cell Biol. 18:3201-11.
- 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 *C. elegans*. Nature 391:806-811.
- 53. Ford L.P., J.W. Shay, and W.E. Wright. 2001. The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. RNA 7:1068-75.
- 54. Gansauge S., Gansauge F., Ramadani M., Stobbe H., Rau B., Harada N., and Beger H.G. 1997. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. Cancer Res 57:1634-1637.
- 55. Geng Y., Eaton E.N., Picón M., Roberts J.M., Lundberg A.S., Gifford A., Sardet C., and Weinberg R.A. 1996. Regulation of cyclin E transription by E2Fs and retinoblastoma protein. Oncogene 12:1173-1180.
- 56. Geng Y., Whoriskey W., Park M.Y., Bronson R.T., Medema R.H., Li T., Weinberg R.A., and Sicinski P. 1999. Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E. Cell 97:767-77.

- 57. Geng Y., Yu Q., Sicinska E., Das M., Schneider J.E., Bhattacharaya S., Rideout III W.M., Bronson R.T., Gardner H., and Sicinski P. 2003. Cyclin E ablation in the mouse. Cell 114:431-443.
- Gillett C., Smith P., Gregory W., Richards M., Millis R., Peters G., and Barnes D. 1996. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. Int J Cancer 69:92-99.
- 59. Gitlin L., Karelsky S., and Andino R. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. Nature **418**:430–434.
- Goodier J. L., and R.J. Maraia. 1998. Terminator-specific recycling of a B1-Alu transcription complex by RNA polymerase III is mediated by the RNA terminus-binding protein La. J Biol Chem 273:26110-6.
- Goodier J.L., H. Fan, and R.J. Maraia. 1997. A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. Mol Cell Biol 17:5823-32.
- Gorlach M., C.G. Burd, and G. Dreyfuss. 1994. The determinants of RNAbinding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. Journal of Biological Chemistry 269:23074-23078.
- Gottlieb E., and J.A. Steitz. 1989. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. Embo Journal 8:851-61.
- 64. Gottlieb E., and J.A. Steitz. 1989. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. EMBO Journal 8:841-50.
- 65. Grimm C., E. Lund, and J.E. Dahlberg. 1997. In vivo selection of RNAs that localize in the nucleus. EMBO J 16:793-806.
- 66. **Guddat U., A.H. Bakken, and T. Pieler.** 1990. Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in xenopus oocytes. Cell **60:**619-28.
- Guidotti L.G., and Chisari F.V. 2000. Cytokine-mediated control of viral infections. Virology 273:221-7.
- Guidotti L.G., K. Ando, M.V. Hobbs, T. Ishikawa, L. Runkel, R.D. Schreiber, and F.V. Chisari. 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. Proc Nat Acad Sci USA 91:3764-8.

- Guidotti L.G., T. Ishikawa, M.V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, and F.V. Chisari. 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. Immunity 4:25-36.
- 70. Habets, W.J., J.H. den Brok, A.M. Boerbooms, L.B. van de Putte, and W.J. van Venrooij. 1983. Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. EMBO J 2:1625-31.
- 71. Hannon G.J. 2002. RNA interference. Nature 418:244-251.
- 72. Harborth J, Elbashir S., Bechert K, Tuschl T, and Weber K. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. Journal of Cell Science 114:4557-4565.
- 73. Harbour J.W., Luo R. X., Dei Santi A., Postigo A.A., and Dean D.C. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell 98:859-869.
- 74. Hartwell L.H., Weinert T.A. 1989. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246:629-634.
- 75. Hashemolhosseini S., Nagamine Y., Morley S.J., Desrivieres S., Mercep L., and Ferrari S. 1998. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. J Biol Chem 273:14424-14429.
- 76. Hatakeyama M., Brill J.A., Fink G.R., and Weinberg R.A. 1994. Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. Genes Dev 8:1759-1771.
- 77. Heise T., L.G. Guidotti, and F.V. Chisari. 2001. Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. J Virol 75:6874-83.
- 78. Heise T., L.G. Guidotti, and F.V. Chisari. 1999. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA. J Virol **73**:5767-76.
- 79. Hendrick J. P., S.L. Wolin, J. Rinke, M.R. Lerner, and J.A. Steitz. 1981. Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. Mol Cell Biol. 1:1138-49.
- 80. Herber B., Truss M., Beato M., and Müller R. 1994. Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. Oncogene 9:1295-1304.

- Holcik M., and R.G. Korneluk. 2000. Functional characterization of the Xlinked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. Mol Cell Biol 20:4648-57.
- 82. **Honda R., and Yasuda H.** 1999. Association of p19^{ARF} with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. Embo J **18**:22-27.
- Horke S. 2003. Identifikation und Charakterisierung funktioneller Domänen des humanen La Proteins. Dissertation Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.
- 84. Horke S., K. Reumann, A. Rang, and T. Heise. 2002. Molecular characterization of the human La protein Hepatitis B virus RNA.B interaction *in vitro*. J Biol Chem 277:34949-58.
- 85. Horke S., K. Reumann, M. Schweizer, H. Will, and T. Heise. 2004. Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified NoLS and the ability to bind RNA. J Biol Chem 1:1.
- Houshmand H., and Bergqvist A. 2003. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. Biochem and Biophys Res Comm 309:695-701.
- Iida S, Seto M., Yamamoto K, and Ueda R. 1992. Overexpression of PRAD1 gene in B-cell malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. Nippon Rinsho 50:1374-9.
- 88. Intine R.V., A.L. Sakulich, S.B. Koduru, Y. Huang, E. Pierstorff, J.L. Goodier, L. Phan, and R.J. Maraia. 2000. Control of transfer RNA maturation by phosphorylation of the human La antigen on serine 366. Mol Cell 6:339-48.
- Intine R.V., M. Dundr, T. Misteli, and R.J. Maraia. 2002. Aberrant nuclear trafficking of La protein leads to disordered processing of associated precursor tRNAs. Mol Cell 9:1113-23.
- Intine R.V., S.A. Tenenbaum, A.L. Sakulich, J.D. Keene, and R.J. Maraia.
 2003. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. Mol Cell 12:1301-7.
- 91. Jacks A., J. Babon, G. Kelly, I. Manolaridis, P.D. Cary, S. Curry, and M.R. Conte. 2003. Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. Structure 11:833-43.

- 92. Jacque J., Triques, K. and Stevenson M. 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. Nature **418:**435-438.
- 93. Kato J., Matsushime H., Hiebert S.W., Ewen M.E., and Sherr C.J. 1993. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase cdk4. Genes Dev 7:331-342.
- 94. **Keyomarsi K., and Pardee A.B.** 1993. Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cacner cells. Proc Nat Acad Sci USA **90**:1112-1116.
- 95. Keyomarsi K., Tucker S.L., Buchholz T.A., Callister M., Ding Y., Hortobagyi G.N., Bedrosian I., Knickerbocker C., Toyofuku W., Lowe M., Herliczek T.W., and Bacus S.S. 2002. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. New England Journal of Medicine 347:1566-1575.
- 96. Koff A., Cross F., Fisher A., Schumacher J., Leguellec K., Philippe M., and Roberts J.M. 1991. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. Cell 66:1217-1228.
- 97. Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper J.W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D.O., Franza B.R., and Roberts J.M. 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science 257:1689-1694.
- 98. Kufel J., C. Allmang, G. Chanfreau, E. Petfalski, D.L. Lafontaine, and D. Tollervey. 2000. Precursors of the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. Mol Cell Biol 20:5415-24.
- 99. La Thangue N.B. 2003. The yin and yang of E2F-1: balancing life and death. Nat Cell Biol 5:587-589.
- 100. Lahti J.M., Li H., and Kidd V.J. 1997. Elimination of cyclin D1 in vertebrate cells leads to an altered cell cycle phenotype, which is rescued by overexpression of murine cyclins D1, D2, or D3 but not by a mutant cyclin D1. J Biol Chem 272:10859-10869.
- 101. Lamberti A., Caraglia M., Longo O., Marra M., Abbruzzese A., and Arcari P. 2004. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis. Amino Acids 26:443-448.
- 102. Lerner M.R., Andrews N., Miller G, and Steitz J.A. 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. Proc Nat Acad Sci USA 78:805-809.

- Lew D.J., Dulic V., and Reed S.I. 1991. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. Cell 66:1197-1206.
- 104. Lin-Marq, N., and S.G. Clarkson. 1998. Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in Xenopus extracts depleted of La protein. EMBO J 17:2033-41.
- Loeb D.M., Korz D., Katsnelson M., Burwell E.A., Friedman A.D., and Sukumar S. 2002. Cyclin E is a target of WT1 transcriptional repression. J Biol Chem 277:19627-19632.
- Long K.S., T. Cedervall, C. Walch-Solimena, D.A. Noe, M.J. Huddleston, R.
 S. Annan, and S.L. Wolin. 2001. Phosphorylation of the Saccharomyces cerevisiae La protein does not appear to be required for its functions in tRNA maturation and nascent RNA stabilization. RNA 7:1589-602.
- Lundberg A.S., and Weinberg R.A. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two cyclincdk complexes. Mol Cell Biol 18:753-761.
- 108. Maity A., McKenna W.G., and Muschel R.J. 1997. Cyclin A message stability varies with the cell cycle. Cell Growth Differ 8:311-318.
- 109. Maraia R.J., and R.V. Intine. 2001. Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. Mol Cell Biol. 21:367-79.
- 110. Maraia R.J., and R.V. Intine. 2002. La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs. Gene Expr 10:41-57.
- 111. Maraia R.J., D.J. Kenan, and J.D. Keene. 1994. Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. Mol Cell Biol 14:2147-58.
- 112. Martinez-Salas E.R., R. Lafuente, and López de Quinto S. 2001. Functional interaction in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. J Gen Virol 82:973-984.
- 113. Mate J.L., Ariza A., Aracil C., Lopez D., Isamat M., Perez-Piteria J., and Navas-Palacios J.L. 1996. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki 67 labeling index and poor cytoplasmic differentiation. J Pathol 180:395-399.
- 114. Mathews MB, and Francoeur A. 1984. La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylate tail of small RNA. Mol Cell Biol 4:1134-1140.

- 115. Matsushime H., Roussell M.F., Ashmun R.A., and Sherr C.J. 1991. Colonystimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. Cell 65:701-13.
- 116. Mattioli M., and M. Reichlin. 1974. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus: Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. Arthritis & Rheumatism 17:421-429.
- 117. Mc Bratney S., and Sarnow P. 1996. Evidence for involvement of trans-acting factors in selection of the AUG start codon during eukaryotic translational initiation. Mol Cell Biol 16:3523-24.
- McLaren R.S., N. Caruccio, and J. Ross. 1997. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. Mol Cell Biol 17:3028-36.
- 119. Meerovitch K., Y.V. Svitkin, H.S. Lee, F. Lejbkowicz, D.J. Kenan, E.K. Chan, V.I. Agol, J.D. Keene, and N. Sonenberg. 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. J Virol 67:3798-807.
- Merrick W.C. 1992. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. Microbiol Rev 56:291-315.
- 121. **Meyuhas O., and Hornstein E.** 2000. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. Eur J Biochem **267**:6321-30.
- 122. Motokura T., Bloom T., Kim H.G., Juppner H., Ruderman J.V., Kronenberg H.M., and Arnold A. 1991. A novel cyclin encoded by a *bcl*1linked candidate oncogene. Nature 350:512-515.
- Murray A.W. 2004. Recycling the cell cycle: Cyclins revisited. Cell 116:221-234.
- 124. Myers J.W., Jones J.T., Meyer T., and Ferrell J.E.Jr. 2003. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. Nat Biotechnology 21:324-8.
- 125. Nagai K., C. Oubridge, T.H. Jessen, J. Li, and P.R. Evans. 1990. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. Nature 348:515-20.
- 126. Napoli C., Lemieux C., and Jorgensen R. 1990. Introduction of chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible cosuppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2:279-289.

- 127. Nishida N., Fukuda Y., Komeda T., Kita R., Sando T., Furukawa M., and Amenomori M. 1994. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 54:3107-3110.
- 128. Ohndorf U.M., C. Steegborn, R. Knijff, and P. Sondermann. 2001. Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity. J Biol Chem 276:27188-96.
- Ohtsubo M., and Roberts J.M. 1993. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. Science 259:1908-1912.
- Ohtsubo M., Theodoras A.M., Schumacher J., Roberts J.M., and Pagano M. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. Mol Cell Biol 15:2612-2624.
- 131. Pannone B.K., D. Xue, and S.L. Wolin. 1998. A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. EMBO J 17:7442-53.
- 132. Pannone B.K., S.D. Kim, D.A. Noe, and S.L. Wolin. 2001. Multiple functional interactions between the components of the Lsm2-Lsm8 complex, U6 snRNA, and the Yeast La protein. Genetics 158:187-196.
- 133. Pardee A.B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. Science 246:603-608.
- Pardee A.B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc Nat Acad Sci USA 71:1286-1290.
- 135. Parkin N.T., C.E., Darveau A., Rosen C., Haseltine W., and Sonenberg N. 1988. Mutational analysis of the 5' non-coding region of human immunodeficiency virus type 1: effects of secondary structure on translation. Embo J 7:2831-2837.
- Peek R., Pruijn G.J.M., and van Venrooij W.J. 1996. Interaction of the La (SS-B) autoantigen with small ribosomal subunits. Eur J Biochem 236:649-55.
- Pelletier J., and Sonenberg N. 1988. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature 334:320-325.
- 138. Pellizzoni L., Lotti F., Rutjes S.A., and Pierandrei-Amaldi P. 1998. Involvement of the *Xenopus laevis* Ro60 Autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5'UTR of L4 ribosomal protein mRNA. J Mol Biol 281:593-608.

- 139. Pines J. 1991. Cyclins: Wheels within wheels. Cell Growth Differ 2:305-310.
- 140. Provost P., Dishart D., Doucet J., Frendewey D., Samuelsson B., and Radmark O. 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. Embo J 21:5864-5874.
- 141. Quelle D.E., Ashmun R.A., Shurtleff S.A., Kato J.Y., Bar-Sagi D., Roussel M.F., and Sherr C.J. 1993. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. Genes Dev 7:1559-1571.
- 142. Reddy R., Henning D., Tan E., and Busch H. 1983. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA). J Biol Chem 258.
- 143. Reissmann P.T., Koga H., Figlin R.A., Holmes E.C., and Slamon D.J. 1999. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor genes in non-small-cell lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol 125:61-70.
- 144. **Resnitzky D., and Reed S.I.** 1995. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. Mol Cell Biol **15**:3463-.
- 145. **Richter J., Wagner U., and Kononen J.** 2000. High-throughput tissue micorarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. Am J Pathol **157**:787-794.
- 146. **Rinke J., and J.A. Steitz.** 1985. Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. Nucleic Acids Res **13**:2617-29.
- 147. Rinke J., and J.A. Steitz. 1982. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. Cell 29:149-59.
- Roberts J.M., and Sherr C.J. 2003. Bared essentials of Cdk2 and cyclin E. Nat Genetics 35:9-10.
- Rosenblum J.S., L.F. Pemberton, N. Bonifaci, and G. Blobel. 1998. Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. J Cell Biol 143:887-99.
- 150. Rutjes S.A., P.J. Utz, A. van der Heijden, C. Broekhuis, W.J. van Venrooij, and G.J. Pruijn. 1999. The La (SS-B) autoantigen, a key protein in RNA biogenesis, is dephosphorylated and cleaved early during apoptosis. Cell Death Differ 6:976-86.
- 151. Sanger F.N., and Coulsen A.R. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467.

- 152. Sarnow P., and Johannes G. 1998. Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. RNA 4:1500-13.
- 153. Scacheri P.C., Rozenblatt-Rosen O., Caplen N.J., Wolfsberg T.G., Umayam L., Lee J.C., Hughes C.M., Shanmugam K.S., Bhattacharjee A., Meyerson M., and Collins F.S. 2004. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. Proc Nat Acad Sci USA 101:1892-1897.
- 154. Schafer K.A. 1998. The cell cycle: a review. Vet Pathol 35:461-478.
- Scherly D., F. Stutz, N. Lin-Marq, and S.G. Clarkson. 1993. La proteins from Xenopus laevis. cDNA cloning and developmental expression. J Mol Biol 231:196-204.
- 156. Sears R.C., Nevins J. R. 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. J Biol Chem 277:11617-11620.
- 157. Sells M.A., Chen M.L., and Acs G. 1987. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Nat Acad Sci USA 84:1005-1009.
- 158. Sharp P.A. 2001. RNA interference 2001. Genes Dev 15:485-490.
- 159. Sherr C.J. 1993. Mammalian G1 Cyclins. Cell 73:1059-1065.
- Sherr C.J. 2000. The Pezcoller lecture: Cancer cell cycles revisited. Cancer Res 60:3689-3695.
- 161. Sherr C.J., and Roberts J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 13:1501-1512.
- 162. Shiroki K., T. Isoyama, S. Kuge, T. Ishii, S. Ohmi, S. Hata, K. Suzuki, Y. Takasaki, and A. Nomoto. 1999. Intracellular redistribution of truncated La protein produced by poliovirus 3Cpro-mediated cleavage. J Virol 73:2193-200.
- 163. Simons F.H., F.J. Broers, W.J. Van Venrooij, and G.J. Pruijn. 1996. Characterization of cis-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen. Exp Cell Res 224:224-36.
- 164. Simons F.H., S.A. Rutjes, W.J. van Venrooij, and G.J. Pruijn. 1996. The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA. RNA 2:264-73.

- Sledz C.A., Holko M., de Veer M.J., Silverman R.H. and Williams B.R.G.
 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol 5:834-839.
- 166. Solomon D.A., Wang Y., Fox S.R., Lambeck T.C., Giesting S., Lan Z., Senderowicz A.M., and Knudsen E.S. 2003. Cyclin D1 splice variants. J Biol Chem 278:30339-30347.
- 167. Spangberg K., L. Goobar-Larsson, M. Wahren-Herlenius, and S. Schwartz. 1999. The La protein from human liver cells interacts specifically with the Urich region in the hepatitis C virus 3' untranslated region. J Hum Virol 2:296-307.
- Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., and Schreiber R.D.
 1998. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem 67:227–264.
- 169. **Stefano J.** 1984. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. Cell **36**:145-154.
- Svitkin Y.V., K. Meerovitch, H.S. Lee, J.N. Dholakia, D.J. Kenan, V.I. Agol, and N. Sonenberg. 1994. Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus translation in vitro. J Virol 68:1544-50.
- Svitkin Y.V., Ovchinnikov L.P., Dreyfuss G., and Sonenberg N. 1996. General RNA binding proteins render translation cap dependent. Embo J 15:7147-55.
- Tang L., L.G., Tron V.A., Trotter M.J., and Ho V.C. 1999. Expression of cell cycle regulators in human cutaneous malignant melanoma. Melanoma Res 9:148-154.
- 173. Terada N., Patel H.R., Takase K., Kohno K., Nairn A.C., and Gelfand E.W. 1994. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. Proc Nat Acad Sci USA 91:11477-11481.
- 174. Terns M.P., E. Lund, and J.E. Dahlberg. 1992. 3'-end-dependent formation of U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in Xenopus laevis oocyte nuclei. Mol Cell Biol 12:3032-40.
- 175. Topfer F., T. Gordon, and J. McCluskey. 1993. Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. J Immunol 150:3091-100.

- 176. Trotta R., T. Vignudelli, O. Candini, R.V. Intine, L. Pecorari, C. Guerzoni, G. Santilli, M.W. Byrom, S. Goldoni, L.P. Ford, M.A. Caligiuri, R.J. Maraia, D. Perrotti, and B. Calabretta. 2003. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. Cancer Cell 3:145-60.
- 177. Tsui L.V., L.G. Guidotti, T. Ishikawa, and F.V. Chisari. 1995.
 Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. Proc Nat Acad Sci USA 92:12398-12402.
- 178. U.K. Laemmli 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-85.
- 179. Van Horn D.J., C.J. Yoo, D. Xue, H. Shi, and S.L. Wolin. 1997. The La protein in Schizosaccharomyces pombe: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. RNA **3**:1434-43.
- Watson J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. Nat New Biol 239:197-201.
- 181. Weber J.D., Raben D.M., Philips P.J., and Baldassare J.J. 1997. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK 1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. Biochem 326:61-68.
- 182. Weser S., M. Bachmann, K.H. Seifart, and W. Meissner. 2000. Transcription efficiency of human polymerase III genes in vitro does not depend on the RNPforming autoantigen La. Nucleic Acids Res 28:3935-42.
- Westermann S., and K. Weber. 2000. Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from Trypanosoma brucei. Biochim Biophys Acta 1492:483-7.
- Wolin S.L., and T. Cedervall. 2002. The La Protein. Annu Rev Biochem 71:375-403.
- 185. Wright W.E., and Shay J.W. 2000. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: Fundamental differences in human and mouse telomere maintenance. Nat Med 6:849-851.
- Xiong Y., Connolly T., Futcher B., and Beach D. 1991. Human D-type Cyclin. Cell 65:691-699.
- 187. Xue D., D.A. Rubinson, B.K. Pannone, C.J. Yoo, and S.L. Wolin. 2000. U snRNP assembly in yeast involves the La protein. EMBO J [published erratum appears in EMBO J 2000 Jun 1;19(11):2763] 19:1650-60.

- Yasui W., Naka K., and Suzuki T. 1999. Expression of p27^{Kip1}, cyclin E and E2F-1 in primary and metastatic tumors of gastric carcinoma. Oncol Rep 6:983-987.
- 189. Yoo C.J., and S.L. Wolin. 1994. La proteins from Drosophila melanogaster and Saccharomyces cerevisiae: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. Mol Cell Biol. 14:5412-24.
- 190. Yoo C.J., and S.L. Wolin. 1997. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. Cell **89:**393-402.
- 191. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., and Bartel D.P. 2000. RNAi: Doublestranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21- to 23nucleotide intervals. Cell 101:25-33.
- 192. Zariwala M., Liu J., and Xiong Y. 1998. Cyclin E2: a novel Cdk2 partner in the late G1 and S phase of the mammalian cell cycle. Oncogene 17:2637-2643.
- 193. Zhang T., Nanney L.B., Luongo C., Lamps L., Heppner K.J., DuBois R.N., and Beauchamp R.D. 1997. Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. Cancer Res 57:169-175.
- 194. Zhao J., Morozova N., Williams L., Libs L., Avivi Y., and Grafi G. 2001. Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. J Biol Chem 276:22772-22778.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Nicht gesondert aufgeführt sind die im deutschen Sprachgebrauch üblichen Standardabkürzungen.

A	Adenin
aa	amino acid(s) = Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin = Rinder-Serum-Albumin
С	Cvtosin
°C	Grad Celsius
cDNA	copy DNA = DNA-Kopien der mRNA, die keine
	Introns enthalten
cpm	counts per minute = gezählte Signale pro Minute
СТР	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP(s)	2'-Deoxyribonukleotid-5'-Trinhosnhat(e)
ds	donnelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E coli	Escherichia coli
EDTA	Esenenenia con
FACS	fluoerescence associated cell sorting
G	Guanin
a	Gramm: Gravitationskraft
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GFP-I 2-WT	Fusionsprotien aus GEP und hLa der vollen Länge
OII - La - WI	(nEGEP_C1_bL a_WT)
GFP-I a-WT-mut	nEGEP-C1-hL a-WT mit stiller Mutation der
011 -La- w 1-11101.	siRNA_Bindestelle
GEP La Del 2 mut	nEGED C1 hL a Del 2 mit stiller Mutation der
OFT-La-DCI.2-IIIdt.	siPNA Dindestalle
GEP La Dal 6 mut	nECED C1 bl a Dal 6 mit stillar Mutation dar
OFF-La-Del.0-Illut.	siPNA Dindestalle
CED La Dal 6 mut	SIGNA-Dillucsion pECED C1 bLa Dal 6.2 mit stillar Mutation dar
	siDNA Dindestalle
CED La Dal 7 mut	SIKINA-DIIIUUSUUlu nECED C1 hLa Dal 7 mit atillar Mutation dan
GFP-La-Del./-mul.	giDNA Dindestalle
	SIKINA-BINGESTEIIE

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	humanes Immundefizienz Virus
hLa	humanes La-Protein
IRES	internal ribosomal entry site
k	Kilo (10^3)
1	Liter
Luci	Luciferase
m	Milli (10^{-3})
M	Mol
m A	Milliampere
	Mikro (10 ⁻⁶)
μ min	Minute(n)
	Malalaulorgowicht
MQ mL a	Moue Le Protein
mLa MODE	Maus La Protein
MOPS	(3-[N-Morpholino]propansuitonsaure)
MKNA	messenger (Boten-) Kibonukleinsaure
n	Nano (10^{-1})
nM	Nanomol; nanomolar
nm	Nanometer
NLS	Nukleus Lokalisations Signal
NoLS	Nukleolus Lokalisations Signal
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
o/N	über Nacht (over night)
р	Pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction - Polymerase-Ketten-
	Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	<i>rounds per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RRM	<i>RNA recognition motif</i> - RNA Erkennungs-Motiv
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
S nombe	Schizosaccharomyces pombe
ss	einzelsträngig
Т	Thymin
Тад	Thermus aquaticus
TEMED	N N N' N'-Tetramethyl-Fthylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
tRNA	transfer Rihonukleinsäure

U	Uridin; Unit
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume - Volumen pro Volumen
W	Watt
WAM	Walker-A-Motiv
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume - Gewicht pro Volumen
w/w	weight per weight - Gewicht pro Gewicht
X. laevis	Xenopus laevis

8.2 Plasmidkarte des pSuper-Plasmids zur Expression von siRNAs



5⁻-<u>GATCCC</u>CCGTACGCGGAATACTTCGATTCAAGAGATCGAAGTATTCCGCGTACG<u>TTTTTGGAAA</u>-3⁻ 3⁻-GGGGCATGCGCCTTATGAAGCTAAGTTCTCTAGCTTCATAAGGCGCATGC<u>AAAAACCTTTTCGA</u>-5⁻ (*Hind*III)

Danksagung:

Mein Dank gilt folgenden Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Will danke ich herzlich für die Unterstützung, Motivation, die anregenden Diskussionen und die Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit und letztlich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Mühlbach möchte ich herzlich danken, dass er sich sofort zur Gutachtertätigkeit für diese Arbeit außerhalb seines Fachbereichs bereit erklärt hat.

Herrn Dr. Tilman Heise danke ich sowohl für die interessante Aufgabenstellung, als auch für die intensive und gute Betreuung, das stets offene Ohr, die gemeinsamen Planungen und Diskussionen und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft während der letzten drei Jahre.

Gritta Tettweiler, Sven Horke, Kerstin Reumann, Tilman Heise und Gunhild Sommer danke ich ganz besonders für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors, die wesentlich zum Stressabbau und Durchhaltevermögen beigetragen haben.

Hannah Staege danke ich sehr für die Hilfen bei den FACS-Analysen und deren Auswertung. Gabor Rohaly möchte ich ebenfalls für die Hilfe bei den FACS-Analysen und die thematischen Hilfestellungen zum Einstieg in den Zellzyklus danken.

Allen Mitgliedern der Abteilung "Allgemeine Virologie" danke ich für die nette Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit.

Herrn Arne Düsedau danke ich herzlich für die durchgeführten Zellsortierungen.

Und natürlich danke ich auch allen treuen "Kontaktpersonen", die mir familiär oder freundschaftlich verbunden sind, für die emotionale Unterstützung während der gesamten Zeit.