

**Entwicklung und Etablierung von induzierbaren
RNAi-Systemen zur Regulierung der Expression von
Polo-like Kinase 1 (Plk1) *in vitro* und *in vivo***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Sven Kappel
aus Gelnhausen

Frankfurt am Main 2007

(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Prof. Dr. R. Wittig

Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn und Herr Prof. Dr. K. Strebhardt

Datum der Disputation:

I INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS..... I

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... VI

1 EINLEITUNG..... 1

1.1 Phänotypische Grundlagen der Krebsentstehung..... 1

1.2 Zellzykluskontrolle und molekulare Grundlagen der Krebsentstehung..... 2

1.2.1 Der Zellzyklus.....2

1.2.2 Die Mitose.....3

1.2.3 Kontrollpunkte des Zellzyklus.....3

1.2.4 Positive Zellzyklus-Regulatoren.....4

1.2.5 Tumorsuppressorgene.....4

1.2.6 Stabilitätsgene und DNA-Reparatursysteme..... 5

1.2.7 Proto-Onkogene und Onkogene.....6

1.3 Polo-like Kinase 1 (Plk1)..... 8

1.3.1 Die Familie der Polo-like Kinasen.....8

1.3.2 Strukturelle Charakterisierung von Plk1.....8

1.3.3 Die Funktion von Plk1 beim G₂/M-Übergang..... 10

1.3.4 Plk1 und die Segregation der Chromosomen.....13

1.3.5 Die Funktion von Plk1 während der Zellteilung.....14

1.3.6 Plk1 und Krebs.....15

1.3.7 Plk1 als Zielgen für eine mögliche Krebstherapie..... 16

1.4 RNA-Interferenz (RNAi).....18

1.4.1 Entdeckung und allgemeine Grundlagen der RNA-Interferenz.....18

1.4.2 RNA-Interferenz in Säugerzellen..... 21

1.4.3 RNA-Interferenz als Werkzeug zum Studium der Genfunktion.....24

1.4.4 Potential von RNA-Interferenz als Therapieform gegen Krebs..... 26

1.5 Das Tet-System als induzierbares Genexpressionssystem..... 28

1.5.1 Das prokaryotische Tet-System..... 28

1.5.2 Anwendungen des prokaryotischen Tet-Systems in eukaryotischen
Organismen..... 29

1.5.3 Das eukaryotische Tet-System durch Entwicklung von
Transaktivatoren und Transrepressoren..... 30

1.5.4 Das eukaryotische Tet-On-System..... 33

1.5.5 Induktionsbereiche der verschiedenen Komponenten von Tet-Off-
und Tet-On-System..... 35

1.5.6 Vorteile des Tet-Systems gegenüber alternativen induzierbaren
Systemen..... 35

1.6 RNA-Polymerase III (Pol III)-abhängige Promotoren..... 36

1.6.1 RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren zur Expression von
siRNAs oder shRNAs..... 36

1.6.2 Der U6 snRNA-Promotor..... 38

1.6.3 Der H1-Promotor..... 39

1.7	Ziel dieser Arbeit.....	40
2	MATERIAL UND METHODEN.....	43
2.1	Material.....	43
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	43
2.1.2	Lösungen und Puffer.....	43
2.1.2.1	Zusätze für die Herstellung kompetenter Bakterien.....	44
2.1.2.2	Klonierungen und Arbeiten mit DNA.....	44
2.1.2.3	Southern-Blot.....	45
2.1.2.4	Arbeiten mit RNA und Northern-Blot.....	45
2.1.2.5	Arbeiten mit Proteinen und Western-Blot.....	46
2.1.3	Enzyme.....	50
2.1.3.1	Restriktionsendonukleasen.....	50
2.1.3.2	Nukleinsäure-modifizierende Enzyme.....	50
2.1.3.3	Sonstige Enzyme.....	51
2.1.4	Antikörper.....	51
2.1.4.1	Primäre Antikörper.....	51
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper.....	51
2.1.5	Oligonukleotide und Primer.....	52
2.1.5.1	Primer für die Amplifikation von Plk1-Exons aus genomischer DNA.....	52
2.1.5.2	Primer für Klonierungen und zur Herstellung von Sonden.....	53
2.1.5.3	DNA-Oligonukleotide für die Klonierung von shRNA-kodierenden Sequenzen.....	54
2.1.6	Plasmide und Vektoren.....	55
2.1.6.1	Parentale Plasmid-Vektoren.....	55
2.1.6.2	Modifizierte und klonierte Plasmid-Vektoren.....	55
2.1.7	Bakterien und Bakterienmedien.....	57
2.1.7.1	Bakterienstämme.....	57
2.1.7.2	Bakterienmedien und Zusätze.....	58
2.1.8	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	59
2.1.8.1	Zelllinien.....	59
2.1.8.2	Zellkulturmedien.....	59
2.1.8.3	Antibiotika für die Zellkultur.....	60
2.1.9	Tiermodelle mit Nacktmäusen.....	60
2.1.10	Laborgeräte.....	60
2.1.11	Software.....	62
2.2	Methoden.....	63
2.2.1	Klonierungen und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	63
2.2.1.1	Präparation kompetenter Bakterien.....	63
2.2.1.2	Transformation von Bakterien.....	63
2.2.1.3	Isolierung von Plasmiden für die Analyse.....	63
2.2.1.4	Isolierung von Plasmiden für Transfektionen in Säugerzellkulturen.....	63
2.2.1.5	Präparation genomischer DNA aus Bakterien.....	64
2.2.1.6	Restriktionsverdau von DNA.....	64
2.2.1.7	Ligation von linearen DNA-Fragmenten.....	65
2.2.1.8	Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten.....	65
2.2.1.9	Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Enden.....	65
2.2.1.10	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	65
2.2.1.11	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	66
2.2.1.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	66
2.2.1.13	Design von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden.....	68
2.2.1.14	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	69

2.2.1.15	Aufreinigung genomischer DNA aus Säugerzellen.....	69
2.2.1.16	Aufreinigung genomischer DNA aus Tumoren.....	69
2.2.1.17	Southern-Blot.....	69
2.2.1.18	Aufreinigung von RNA aus Säugerzellen.....	70
2.2.1.19	Aufreinigung von RNA aus Tumoren.....	70
2.2.1.20	Northern-Blot.....	70
2.2.1.21	Herstellung von radioaktiv markierten Sonden.....	71
2.2.1.22	Hybridisierungen von DNA und RNA mittels radioaktiver Sonden.....	71
2.2.1.23	Autoradiographie.....	72
2.2.2	Zellkultur.....	72
2.2.2.1	Allgemeine Arbeiten mit Zellkulturen.....	72
2.2.2.2	Passagieren von Zellen.....	73
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	73
2.2.2.4	Transfektion von Zellen.....	73
2.2.2.5	Selektion von transfizierten Zellen.....	74
2.2.2.6	Herstellung von stabilen Zellklonen.....	74
2.2.2.7	Induktion von Promotoren durch Applikation von Doxyzyklin.....	75
2.2.2.8	Durchflußzytometrie mittels FACScan-Analyse (<i>fluorescence activated cell scanning</i>) zur Bestimmung der EGFP-Fluoreszenz und der Apoptose... <i>cell scanning</i>) zur Bestimmung der EGFP-Fluoreszenz und der Apoptose... <i>cell scanning</i>) zur Bestimmung der EGFP-Fluoreszenz und der Apoptose...	75
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	76
2.2.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen.....	76
2.2.3.2	Herstellung von Proteinlysaten aus Tumoren.....	76
2.2.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	77
2.2.3.4	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	77
2.2.3.5	Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie-Färbung.....	78
2.2.3.6	Western-Blot und Immundetektion.....	78
2.2.4	Quantitative Auswertung von Gelen und Autoradiogrammen.....	80
2.2.5	Bestimmung von Zellzahlen.....	80
2.2.6	Experimente mit Xenograft-Mäusen.....	81
2.2.7	Statistische Auswertung.....	82
3	ERGEBNISSE.....	83
3.1	Aufklärung von Mutationen im humanen Plk1-Gen.....	83
3.1.1	Analyse des Plk1-Gens in humanen Tumor-Zelllinien.....	83
3.1.2	Analyse des Plk1-Gens in humanen Mamma- und Ovariakarzinomen.....	85
3.2	Herstellung von Plasmid-Vektoren zur Expression von shRNA.....	87
3.2.1	Klonierung des parentalen Wildtyp-H1-Promotors.....	87
3.2.2	Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden.....	88
3.2.3	Klonierung von Plasmiden zur konstitutiven Expression von shRNA.....	89
3.2.4	Klonierung von Tetrazyklin-induzierbaren Derivaten des H1-Promotors.....	90
3.2.5	Klonierung von Plasmiden zur konditionellen Expression von shRNA.....	92
3.2.6	Klonierung der cDNA von Tet-Repressor und TetR-KRAB- Fusionsprotein.....	93

3.3	Inhibition der Genexpression durch Vektor-basierte RNAi...95	
3.3.1	Suppression der EGFP-Expression durch Transfektion von Plasmid-Vektoren zur konstitutiven Expression von shRNA.....	95
3.4	Funktionelle Studien induzierbarer RNAi-Systeme im transienten Zustand.....96	
3.4.1	Konditionelle Inhibition der Plk1-Expression durch Vektor-basierte, Doxyzyklin-induzierbare RNAi.....	96
3.4.2	Analyse der konzentrationsabhängigen Aktivität Doxyzyklin-induzierbarer Derivate des H1-Promotors.....	100
3.4.3	Inhibition der Proliferation von Tumorzellen durch konditionelle Suppression von Plk1.....	102
3.5	Funktionelle Studien induzierbarer RNAi-Systeme im stabilen Zustand..... 104	
3.5.1	Etablierung stabiler Zellklone durch Integration induzierbarer RNAi-Kassetten in das Genom von Tumorzellen.....	104
3.5.2	Doxyzyklin-abhängige Inhibition der zellulären Plk1-Expression mittels genomisch integrierter, induzierbarer RNAi-Kassetten.....	106
3.5.3	Inhibition der Proliferation von Tumorzellen durch konditionelle Unterdrückung der Plk1-Expression mittels stabil integrierter RNAi-Kassetten.....	109
3.6	<i>In vivo</i>-Studien eines induzierbaren RNAi-Systems anhand eines Xenograft-Modells..... 111	
3.6.1	Etablierung von immunsupprimierten Nacktmäusen mit humanen Tumoren.....	111
3.6.2	Konditionelle Inhibition des Tumorwachstums durch Doxyzyklin-abhängige Induktion stabil integrierter RNAi-Kassetten.....	111
3.6.3	Konditionelle Inhibition der Plk1-Expression durch Doxyzyklin-abhängige Induktion stabil integrierter RNAi-Kassetten.....	112
3.7	Versuche zur Etablierung induzierbarer RNAi-Systeme in transgenen Mäusen..... 113	
3.7.1	Allgemeine Strategien zur genomischen Integration von DNA-Elementen in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transgener EGFP-exprimierender Mäuse.....	113
3.7.2	Integration von Plasmid-DNA in das Genom von ES-Zellen transgener EGFP-exprimierender Mäuse zur konstitutiven Expression von TetR-KRAB / Analyse von Klonen.....	114
3.7.3	Genomische Integration eines konstitutiven RNAi-Systems in ES-Zellen transgener EGFP-exprimierender Mäuse.....	116
4	DISKUSSION.....117	
4.1	Analyse des Plk1-Gens im Hinblick auf die Eignung einer RNAi-basierten Strategie zur Unterdrückung der Genexpression..... 117	
4.2	Transiente Vektor-basierte RNA-Interferenz.....118	
4.2.1	Wirkung konstitutiver Expression von shRNA.....	118
4.2.2	Bessere Eignung des H1-Promotors gegenüber dem U6 snRNA-Promotor für die konstitutive Expression von shRNA.....	120

4.2.3	Verschiedene Parameter beeinflussen die Wirksamkeit von shRNA... 121	
4.2.4	Bewertungen der induzierbaren RNAi-Systeme im transienten Zustand.....123	
4.2.5	Bewertung der transienten konditionellen Plk1-Inhibition in bezug auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen.....132	
4.3	Stabile induzierbare RNA-Interferenz durch Etablierung von Zellklonen..... 134	
4.3.1	Bewertungen der induzierbaren RNAi-Systeme im stabilen Zustand.....134	
4.3.2	Bewertung der stabilen konditionellen Plk1-Inhibition in bezug auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen..... 137	
4.3.3	Bewertung eines der induzierbaren Systeme <i>in vivo</i> durch Etablierung eines Xenograft-Modells..... 138	
4.4	Ausblicke..... 140	
5	ZUSAMMENFASSUNG.....144	
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... 147	
7	LITERATUR..... 154	
8	PUBLIKATIONEN..... 175	
9	DANKSAGUNG..... 176	

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildungen:

Abb. 1.1:	Struktur der Polo-like Kinase 1 (Plk1).....	9
Abb. 1.2:	Einfluß von Plk1 auf die Aktivierung von MPF beim G ₂ /M-Übergang.....	12
Abb. 1.3:	Modell des RNA-Interferenz (RNAi)-Mechanismus.....	22
Abb. 1.4:	Struktur doppelsträngiger RNA.....	23
Abb. 1.5:	Die Funktion des Tet-Repressors (TetR) innerhalb des prokaryotischen Tet-Systems.....	29
Abb. 1.6:	Das eukaryotische Tet-Off-System.....	32
Abb. 1.7:	Die Funktion des transkriptionellen Transrepressors (tTR) TetR-KRAB.....	33
Abb. 1.8:	Das eukaryotische Tet-On-System.....	34
Abb. 1.9:	Allgemeine Struktur von RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren des Typs III.....	40
Abb. 3.1:	Verteilung der Exons von Plk1.....	84
Abb. 3.2:	Sequenzierung und <i>alignment</i> von Exonsequenzen.....	86
Abb. 3.3:	shRNA-kodierende Oligonukleotide und prozessierte siRNAs.....	89
Abb. 3.4:	Induzierbare Derivate des H1-Promotors.....	91
Abb. 3.5:	Schematische Darstellung von Aufbau und Struktur der verwendeten Plasmid-Vektoren für konstitutive / induzierbare Expression von shRNA.....	93
Abb. 3.6:	Schematische Darstellung von Aufbau und Struktur des verwendeten Plasmid-Vektors für die konstitutive Expression von TetR.....	94
Abb. 3.7:	Nachweis der EGFP-Fluoreszenz mittels Durchflußzytometrie (FACScan-Analyse).....	96
Abb. 3.8:	Wirkungsweise eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors in Abwesenheit und Anwesenheit von Doxyzyklin.....	97
Abb. 3.9:	Konditionelle Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein als Antwort auf die Doxyzyklin (Dox)-abhängige Expression von shRNA/Plk1, vermittelt von verschiedenen induzierbaren Derivaten des H1-Promotors.....	99

Abb. 3.10:	Konditionelle Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein als Antwort auf die Doxyzyklin (Dox)-abhängige Expression von shRNA/Plk1, vermittelt durch den induzierbaren Promotor vom US/DS-Typ.....	101
Abb. 3.11:	Konditionelle Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein als Antwort auf die Doxyzyklin (Dox)-abhängige Expression von shRNA/Plk1, vermittelt durch den induzierbaren Promotor vom US-Typ.....	102
Abb. 3.12:	Proliferation von HeLa-Zellen nach Transfektion unterschiedlicher Plasmid-Vektoren.....	103
Abb. 3.13:	Genomisch integrierte RNAi-Kassetten für die konstitutive oder Tetrazyklin (Tet)-induzierbare Expression von shRNA.....	105
Abb. 3.14:	Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein durch Tetrazyklin (Tet)-induzierbare Expression von shRNA/Plk1, vermittelt durch Derivate des H1-Promotors, welche stabil ins Genom von HeLa-Zellen integriert wurden.....	108
Abb. 3.15:	Proliferationsraten von shRNA/Plk1MM (<i>mismatch</i> -shRNA)- und shRNA/Plk1-exprimierenden induzierbaren HeLa-Klonen.....	110
Abb. 3.16:	Tumorwachstum in Nacktmäusen nach Doxyzyklin-induzierter Expression von shRNA/Plk1MM oder shRNA/Plk1.....	113
Abb. 3.17:	Stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom von EGFP-exprimierenden ES-Zellen der Maus zur konstitutiven Expression von TetR-KRAB.....	115
Abb. 3.18:	Stabile genomische Integration von RNAi-Kassetten zur konstitutiven Expression von shRNA/EGFP durch den Wildtyp-H1-Promotor.....	116

Tabellen:

Tab. 3.1:	Übersicht der Exons von Plk1.....	83
Tab. 3.2:	Übersicht über die Zielsequenzen der verwendeten shRNAs.....	88
Tab. 3.3:	Bezeichnungen der generierten HeLa-Zellklone mit stabil ins Genom integrierten RNAi-Kassetten in einer Gegenüberstellung mit ihren zuvor transfizierten Plasmid-Vektoren.....	104

1 EINLEITUNG

1.1 Phänotypische Grundlagen der Krebsentstehung

In den westlichen Industrieländern ist Krebs nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Statistisch betrachtet, erkranken in den USA knapp die Hälfte aller Männer (ca. 46%) und mehr als ein Drittel der Frauen (ca. 38%) im Laufe ihres Lebens an Krebs (American Cancer Society, 2006). Bei Männern sind Prostatakrebs (33%), Lungenkrebs (13%) und Darmkrebs (10%) die häufigsten Krebsarten in bezug auf Neuerkrankungen. Bei Frauen hingegen ist der Brustkrebs, welcher bei Neuerkrankungen einen Anteil von 32% ausmacht, gefolgt von Lungenkrebs (12%) und Darmkrebs (11%), die häufigste Krebsart.

Krebs ist eine genetisch bedingte Krankheit, bei welcher das Gleichgewicht zwischen Wachstum, Teilung und Absterben von Zellen gestört ist. Die Folge ist eine unkontrollierte Proliferation betreffender Zellen. Dabei werden regulierende Mechanismen umgangen, da der verantwortliche genetische Code Fehlfunktionen hervorruft, oder gar komplett ausgefallen ist. Ursachen dafür sind Mutationen in solchen Genen somatischer Zellen, welche für die Kontrolle des Zellzyklus essentiell sind.

Eine in bezug auf ihre Teilungsrate außer Kontrolle geratene Zelle entwickelt sich im Zuge der Krebsentstehung zunächst zu einem benignen (gutartigen) Tumor oder einer Neoplasie (Neubildung von Körpergewebe). Benigne Tumoren und Neoplasien zeichnen sich phänotypisch durch eine erhöhte Teilungsrate ihrer beteiligten Zellen aus. Diese erhöhte Teilungsrate resultiert aus einer gesteigerten Sezernierung von Wachstumsfaktoren betreffender Zellen in ihre unmittelbare Umgebung. Neoplasien zeigen kein Metastasierungspotential. Sie sind in der Regel von einer fibrillären Kapsel umgeben und stehen mit Strukturproteinen der extrazellulären Matrix in Wechselwirkung. Durch die klare Abgrenzung zu umliegenden Gewebsregionen können benigne Tumoren durch operative Eingriffe relativ leicht entfernt werden.

Zellen, welche ein unreguliertes Teilungswachstum zeigen, d. h. schneller als gesunde Zellen proliferieren und immortalisiert sind, können jedoch unter Umständen in umliegendes Gewebe eindringen und bilden somit einen malignen (bösartigen) Primärtumor. Im Zuge der weiteren Krebsentstehung sondern sich aus solchen malignen Primärtumoren Zellen ab, welche invasiv sind und in umliegendes gesundes Gewebe einwandern. Nicht zuletzt können betreffende Zellen auf diese Weise über den Blutweg oder die Lymphgefäße größere Distanzen in relativ geringer Zeit zurücklegen und in entfernte Körperregionen einwandern

(Metastasierung), wodurch Sekundärtumoren gebildet werden. Im Zuge der Krebsentstehung können Zellen völlig neue Eigenschaften erwerben, z. B. die Fähigkeit, unter Sauerstoffmangel zu überleben. Nicht zuletzt kommt es zu einer Steigerung der Angiogenese, durch deren vermehrte Neubildung von Blutgefäßen die Versorgung der Tumoren mit Nährstoffen aus dem Blut gewährleistet wird. Eine verstärkte Angiogenese wird durch die erhöhte Produktion und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren induziert. Schreiten Wachstum von Tumoren und deren Metastasierungspotential sehr schnell voran, wird nach und nach mehr gesundes Gewebe zerstört, wodurch es zu Funktionsausfällen der betroffenen Organe kommen kann. Im Endstadium bedeutet dies den Tod des Patienten.

1.2 Zellzykluskontrolle und molekulare Grundlagen der Krebsentstehung

1.2.1 Der Zellzyklus

Unter dem Begriff Zellzyklus versteht man den zeitlichen Prozeß des Entstehens zweier erbgleicher somatischer Tochterzellen aus einer Mutterzelle bis zu ihrer erneuten Teilung. Der Zellzyklus läßt sich grob in zwei Phasen gliedern, zum einen die Interphase (Arbeitsphase) und zum anderen die M-Phase (Mitosephase). Die Interphase wiederum besteht aus drei Unterphasen, der G₁-Phase (*Gap*₁-Phase), der S-Phase (Synthese-Phase) und der G₂-Phase (*Gap*₂-Phase). In der G₁-Phase erfolgt die Synthese von Proteinen, nicht-kodierender RNA und anderen Zellbestandteilen, die darauffolgende S-Phase ist gekennzeichnet durch die Replikation der gesamten genomischen DNA, während sich die Zelle in der abschließenden G₂-Phase einer „Selbst-Kontrolle“ unterzieht. Dabei wird überprüft, ob die Replikation des Genoms vollständig und korrekt abgelaufen ist und genügend Zellmasse für eine erfolgreiche Zellteilung vorhanden ist. Zellen, welche einem Mangel an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ausgesetzt sind, verlassen den Zellzyklus und gehen nach der G₁-Phase in die G₀-Phase (*Gap*₀-Phase) über. Sie verharren so lange in G₀, bis sie entweder absterben oder durch Wachstumssignale zurück in die Interphase übergehen. Zellen, welche nach finaler Teilung ausdifferenzieren und sich keiner weiteren Teilung unterziehen, befinden sich ebenfalls in G₀. Nach der Interphase, bei Austritt aus der G₂-Phase, geht die Zelle in die M-Phase über, in welcher Mitose (Kernteilung) und Zytokinese (Teilung des Zytoplasmas) stattfinden. Dabei muß sichergestellt werden, daß beide entstehende Tochterzellen jeweils ein komplettes Genom, ein Centrosom und eine ausreichende Menge an Zytoplasma mit zugehörigen Zellorganellen erhalten. Die Ereignisse während der Mitose werden hauptsächlich durch Prozesse wie Phosphorylierung und Dephosphorylierung essentieller

Proteine ausgelöst. Für die Phosphorylierung von Proteinen spielt die Aktivität von Kinasen eine wichtige Rolle. Die Dephosphorylierung von Proteinen wird durch Phosphatasen vermittelt. Des Weiteren spielen Prozesse wie Methylierung, Acetylierung und die Proteolyse von Strukturproteinen eine wichtige Rolle für die Regulation mitotischer Prozesse.

1.2.2 Die Mitose

Die Mitose ist der Prozeß der Kernteilung, in welchem sichergestellt wird, daß beide entstehende Tochterzellen jeweils einen kompletten Chromosomensatz aus dem zuvor replizierten Genom erhalten. Sie wird in der Regel in fünf Phasen unterteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Die für die einzelnen Phasen typischen Ereignisse sind folgend beschrieben: In der Prophase findet die Kondensation des gesamten Chromatins statt, die Nucleoli verschwinden, das Zytoskelett ändert die Organisation seiner Struktur und es kommt zur Ausbildung der Mitosespindel. In der Prometaphase kommt es zur Auflösung der Kernhülle, dem Auswachsen der Mikrotubuli des Zellkerns und zur Ausbildung der Kinetochoren. Während der Metaphase ordnen sich die Chromosomen in einer Äquatorialebene an und werden folgend über ihre Kinetochore an den Mikrotubuli der Mitosespindel angeheftet. In der Anaphase kommt es zur Trennung der Chromosomen in Richtung der Spindelpole. Die abschließende Telophase kennzeichnet sich durch Lokalisation der Chromosomen an den jeweiligen Centrosomen, es kommt zur Auflösung der Kinetochor-Mikrotubuli, zur Ausbildung einer neuen Kernmembran, zur Dekondensation der Chromosomen zu Chromatin und zur Regeneration der Nucleoli. Die Zytokinese beschreibt die Teilung des Zytoplasmas mit allen zugehörigen Organellen. Sie beginnt bereits in der späten Anaphase und endet mit der Abschnürung der beiden Tochterzellen.

1.2.3 Kontrollpunkte des Zellzyklus

Der komplette Ablauf des Zellzyklus wird von mehreren Regulationsmechanismen überwacht. Durch sogenannte Kontrollpunkte wird der korrekte Ablauf der einzelnen Vorgänge sichergestellt. So wird der Zellzyklus angehalten, falls es zu Schädigungen der DNA oder des Spindelapparates kommt. Über den DNA-Replikationspunkt wird der Eintritt der Zelle in die Mitose (G₂/M-Übergang) gesteuert, hingegen regelt der Spindel-Kontrollpunkt die Transition von der Meta- in die Anaphase während der Mitose (Molinari, 2000). Bei fehlerhafter Replikation der DNA in der S-Phase oder Schädigungen bei Ausbildung der Mitosespindel in der M-Phase werden Signalwege aktiviert, welche bewirken, daß wichtige Mediatoren für das Voranschreiten des Zellzyklus, wie z. B. MPF (*mitosis*

promoting factor) inhibiert werden. MPF ist ein zentraler Faktor, welcher durch Phosphorylierung von Substraten den Eintritt der Zelle in die Mitose auslöst und darüber hinaus Funktionen während des Durchlaufens der Mitose hat.

1.2.4 Positive Zellzyklus-Regulatoren

Die meisten Ereignisse während des Zellzyklus werden durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen reguliert. Die Phosphorylierungen werden dabei von Kinasen, in erster Linie den Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks = *cyclin-dependent kinases*), durchgeführt. Diese Kinasen bilden mit ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, aktive Enzymkomplexe. Cdks wurden zunächst in Hefen entdeckt und ursprünglich mit Cdc (*cell division cycle*) bezeichnet. Cdks sind ohne die Bindung von Cyclinen katalytisch inaktiv. Sie liegen gegenüber den Cyclinen im Überschuß vor. Die Aktivität der Cdks wird somit durch die vorliegende Konzentration ihrer aktivierenden Cycline bestimmt.

Im Gegensatz zu den Cdks, welche zeitlich konstant exprimiert werden, werden die Cycline zu unterschiedlichen Zeiten während des Zellzyklus exprimiert und abgebaut. Bis heute kennt man fünf unterschiedliche Typen von Cyclinen, A, B, D, E und H, welche zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus unterschiedliche Aufgaben erfüllen: Die Cycline D und E lösen G₁-Phase-spezifische Prozesse aus, Cyclin A vermittelt den Eintritt der Zelle in die S-Phase, während das Cyclin B durch Bindung an Cdk1 (Cdc2) den MPF bildet und somit den Eintritt der Zelle in die Mitose auslöst. Cyclin H spielt eine Rolle bei der Aktivierung des MPF.

Neben den Cyclinen regulieren noch einige andere Faktoren die Aktivität der Cdks. In diesem Zusammenhang spielen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, vermittelt durch Kinasen und Phosphatasen eine wichtige Rolle. Eine weitere Kontrolle der Cdks wird durch Inhibitor-Proteine, die sogenannten CKIs (*Cdk-inhibitors*) ausgeübt.

1.2.5 Tumorsuppressorgene

Unter Tumorsuppressorgenen versteht man Gene, welche als negative Regulatoren für die Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich sind. Sie wirken inhibierend auf die Proliferationsrate betreffender Zellen und senken somit die Wahrscheinlichkeit, daß gesunde Zellen zu Tumorzellen entarten. Eine Mutation oder Deletion dieser Gene erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß Zellen, welche zuvor ein geregeltes Teilungswachstum zeigten, entarten und Tumoren bilden können. In der Regel werden Tumorsuppressorgene in gesunden Zellen kaum oder sehr schwach exprimiert.

Ein prominentes Tumorsuppressorgen ist das RB-Gen (Retinoblastom-Gen), dessen Produkt, das RB-Protein den Transkriptionsfaktor E2F1 bindet und funktionsunfähig macht. Im Zytoplasma frei vorliegender E2F1 ist ein Regulator für den Eintritt der Zelle in die S-Phase. Ein weiteres Tumorsuppressorgen, welches einen negativen Regulator für den Zellzyklus darstellt, ist p53, das durch verschiedene zelluläre Ereignisse, z. B. DNA-Doppelstrangbrüche infolge abiotischer Streßfaktoren wie Einwirkung von ultraviolettem Licht, aber auch durch Hypoxie oder eine virale Infektion, aktiviert werden kann. Durch Aktivierung verschiedenster Signalwege kann p53 einen Stillstand des Zellzyklus, sowohl in der G₁-, als auch in der G₂-Phase hervorrufen. Dabei spielt die gesteigerte Expression von p21, einem Inhibitor für Cdks, eine wichtige Rolle (Vogelstein et al., 2000). Des Weiteren kann p53 durch Aktivierung von proapoptotischen Genen wie Bax oder Fas zur Auslösung der Apoptose beitragen. Des Weiteren wurden bereits einige andere Zielgene von p53 beschrieben (El Deiry, 1998).

Funktionsausfälle von Tumorsuppressorgen infolge heterozygoter Mutationen auf nur einem Allel sind in der Regel nicht ausreichend, um unkontrolliertes Teilungswachstum von Zellen auszulösen. Dies bedeutet, daß beide Allele mutiert sein müssen, um einen Funktionsverlust zu bewirken, welcher wiederum einen aberranten Phänotypen hervorruft.

1.2.6 Stabilitätsgene und DNA-Reparatursysteme

Stabilitätsgene bezeichnen den Oberbegriff von Genen, welche an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. So ist jede Zelle ständigen Mutationen unterschiedlichster Art unterworfen, wie Punktmutationen, welche durch fehlerhafte DNA-Replikation entstehen, DNA-Doppelstrangbrüchen, Mutationen während der Rekombination des Genoms, (z. B. Chromosomentranslokationen), oder Mutationen, die zu fehlerhafter mitotischer Chromosomensegregation (Chromosomensatzmutation) führen. Ursachen dafür können durch verschiedenste Streßfaktoren wie Chemikalien, Sauerstoffradikale, ultraviolettes Licht oder ionisierende Strahlung begründet sein. Die Klasse der Stabilitätsgene umfaßt zum einen Gene, welche bei fehlerhafter DNA-Replikation einschreiten, z. B. *mismatch*-Reparatur (MMR), Basen-Exzisionsreparatur (BER), Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), oder Doppelstrangbrüche mittels DNA-*endjoining* reparieren. Zum anderen werden Gene, welche Zellen vor fehlerhafter Rekombination und Chromosomensegregation bewahren, ebenfalls zu den Stabilitätsgenen gezählt, z. B. BRCA1 (*breast cancer susceptibility gene 1*), BLM (*bloom syndrome mutated gene*) und ATM (*ataxia telangiectasia mutated gene*). Ein mutiertes BRCA1-Gen tritt vermehrt in Mamma- und Ovarialkarzinomen auf (Lemoine, 1994; Welch und King, 2001; McCoy et al., 2003), Mutationen im BLM-Gen

führen vermehrt zur Tumorprogression in Mäusen (Goss et al., 2002), und ein Funktionsausfall des ATM-Gens trägt zur Bildung von Lymphomen bei (Stankovic et al., 2002). In der Gesamtheit sorgen Stabilitätsgene somit dafür, daß genetische Veränderungen nur ein minimales Ausmaß erreichen. Bei Funktionsausfällen solcher Gene aufgrund von Mutationen, treten vermehrt weitere Mutationen in anderen Genen auf (Friedberg, 2003). Dies kann im schlimmsten Fall dazu führen, daß betroffene Zellen durch weitere Mutationen in Tumorsuppressor- oder Onkogenen ihre Zellzykluskontrolle umgehen, was wiederum unkontrolliertes Wachstumsverhalten der Zellen bewirkt und Tumorstadium auslösen kann. So ist ein Funktionsausfall von Genen, welche für die DNA-Reparatur notwendig sind, grundlegender Bestandteil aller Krebsarten (Kinzler und Vogelstein, 1998). Ähnlich wie bei den Tumorsuppressorgenen führt der Funktionsausfall nur eines Allels eines Stabilitätsgens nicht unmittelbar zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle. Für einen physiologischen Effekt müssen daher beide Allele eines betreffenden Gens inaktiviert sein.

1.2.7 Proto-Onkogene und Onkogene

Als Proto-Onkogene können alle Gene bezeichnet werden, deren Wirkungsweise in irgendeiner Weise zum Voranschreiten des Zellzyklus beiträgt. Dazu zählen alle direkten Auslöser von Zellzyklus-spezifischen Ereignissen, wie mitotische Kinasen oder Cycline. Des Weiteren werden auch Faktoren, welche indirekt Wachstumssignale über Signalwege weiterleiten, zu den Proto-Onkogenen gezählt. Es kann sich dabei um membranständige Rezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren), kleine G-Proteine, frei im Zytoplasma vorliegende Tyrosinkinasen, Serin/Threonin-Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren oder Ko-Faktoren handeln. Aus einem Proto-Onkogen kann ein Onkogen entstehen, indem das betreffende Gen durch Mutation konstitutiv exprimiert wird. Die Folge ist eine Überexpression des zugehörigen Proteins. Beispiele für überexprimierte Proteine in Tumoren sind die EGFRs (*epidermal growth factor receptors*). So findet sich in vielen Brust-, Darm- und Gehirn-Tumoren eine Überexpression meist eines bestimmten Mitglieds der EGFR-Familie (Yarden und Ullrich, 1988; Koretz et al., 1990; Schlegel et al., 1994).

In einem anderen Fall kann eine Mutation ein Proto-Onkogen so verändern, daß es unter Konditionen, bei welchen das zugehörige Wildtyp-Protein inaktiv ist, permanent im aktiven Zustand vorliegt. So können z. B. Chromosomentranslokationen oder Punktmutationen innerhalb eines Gens zu einer Aktivitätssteigerung des Genprodukts aufgrund einer Strukturveränderung führen. Ein Beispiel für solch eine strukturelle Veränderung, aus welcher

Tumoren entstehen, ist eine Mutation von Codon 600 im humanen B-Raf-Gen, welches für eine Serin/Threonin-Kinase kodiert. Diese Mutation bewirkt für die exprimierte Kinase den Austausch der Aminosäure Valin durch Glutamat (Davies et al., 2002). Codon 600 befindet sich in der „Aktivierungs-Schleife“ der Kinase-Domäne von B-Raf. Diese „Aktivierungs-Schleife“ wird normalerweise durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen an den benachbarten Resten Thr-599 und Ser-602 reguliert. Die Substitution von Valin durch Glutamat an Position 600 (Val599Glu) scheint nun eine Phosphorylierung zu imitieren, welche die Kinasefunktion von B-Raf auch ohne Wachstumssignale konstitutiv aktiviert. Die Folge ist eine Aktivierung von ERK (*extracellular regulated kinase*) und die damit verbundene Aktivierung des zugehörigen ERK-Signalwegs, resultierend in verändertem Wachstumsverhalten betreffender Zellen (Wan et al., 2004). Ein weiteres prominentes Proto-Onkogen ist das kleine G-Protein Ras, welches u. a. B-Raf aktiviert. Ras wechselt in der gesunden Zelle zwischen inaktivem (GDP-gebundenem) und aktivem (GTP-gebundenem) Zustand. In vielen humanen Tumoren, darunter Tumoren des Dickdarms, ist Ras jedoch durch Mutation in ein Onkogen konstitutiv aktiv (Kinzler und Vogelstein, 1996), wodurch es Signalkaskaden aktiviert, welche in wachstumsspezifische Prozesse involviert sind.

Neben den Signal-vermittelnden Molekülen sind auch die Transkriptionsfaktoren zu nennen, welche potentiell zu Onkogenen mutieren können. In diesem Zusammenhang sind die Gene für c-jun, c-fos und auch c-myc zu nennen, welche in Tumoren häufig überexprimiert werden oder permanent aktiv sind (Prins et al., 1993; Vogt, 2001; Milde-Langosch, 2005).

Weitere Proto-Onkogene, die durch Mutationen zu Onkogenen werden können, sind die Cdks, wie auch ihre regulatorischen Untereinheiten, die Cycline. So liegt mehreren humanen Tumorarten eine Überexpression von Cyclin D, verursacht durch eine gesteigerte Gen-Amplifikation, zugrunde (Weinstat-Saslow et al., 1995; Steeg und Zhou, 1998). Ähnliches gilt für Cyclin E, welches häufig in Mamma-Karzinomen überexprimiert wird und den Übergang von der G₁- in die S-Phase stimuliert (Schraml et al., 2003).

In letzter Zeit gewann ein weiterer Regulator des Zellzyklus in Zusammenhang mit gesteigerter Zellproliferation erheblich an Bedeutung. Es handelt sich dabei um Polo-like Kinase 1 (Plk1), ein Mitglied der Polo-Kinasen. Die Familie der Polo-Kinasen beinhaltet mehrere Serin/Threonin-Kinasen mit hoch konservierten Strukturen. Plk1 ist in den meisten Tumorgeweben überexprimiert und kann somit als Proliferationsmarker bezeichnet werden. Die Überexpression von Plk1 ist nach bisherigen Erkenntnissen allerdings nicht auf Mutationen innerhalb des Plk1-Gens zurückzuführen, sondern unterliegt Mechanismen, welche bislang unbekannt sind.

1.3 Polo-like Kinase 1 (Plk1)

1.3.1 Die Familie der Polo-like Kinasen

Die Familie der Polo-like Kinasen beinhaltet für Säugerzellen neben Plk1 drei weitere Mitglieder: Plk2 (Snk), Plk3 (Fnk oder Prk) und Plk4 (Sak) (Simmons et al., 1992; Clay et al., 1993; Lake und Jelinek, 1993; Holtrich et al., 1994; Hamanaka et al., 1994; Fode et al., 1994; Ouyang et al., 1997; Karn et al., 1997; Holtrich et al., 2000). In anderen Organismen wurden zudem weitere Familienmitglieder beschrieben: Plx1, Plx2 und Plx3 in *Xenopus laevis* (Kumagai und Dunphy, 1996; Duncan et al., 2001), polo und Sak/Plk4 in *Drosophila* (Sunkel und Glover, 1988; Fenton und Glover, 1993; Bettencourt-Dias et al., 2005), Plo1 in *Schizosaccharomyces pombe* (Ohkura et al., 1995) und Cdc5 in *Saccharomyces cerevisiae* (Kitada et al., 1993). Dabei sind Plx1, polo, Plo1 und Cdc5 in ihren jeweiligen Organismen der Wirkungsweise von Plk1 während klassischen mitotischen Ereignissen homolog und darüber hinaus untereinander hoch konserviert.

1.3.2 Strukturelle Charakterisierung von Plk1

Polo-like Kinase 1 (Plk1; *accession no*: NP 005021) ist eine humane Serin/Threonin-Kinase mit einem molekularen Gewicht von 66 kD, bestehend aus 603 AS. Das humane Plk1-Gen (GeneID: 5347) besteht aus einem ca. 4,4 kb großen genomischen DNA-Abschnitt, welcher auf Chromosom 16 an Position 12 (16p12) lokalisiert ist (Golsteyn et al., 1994). Dabei weist der Promotor mit seinen regulatorischen Elementen eine Länge von ca. 2,3 kb auf (Brauninger et al., 1995), der ORF (*open reading frame* = offener Leseraster) (*accession no*: NM_005030) besteht aus 1809 bp, gefolgt von einem ca. 0,3 kb langen nicht-kodierenden Terminationssignal.

Das exprimierte Protein besteht aus zwei funktionellen Domänen, einer hoch konservierten katalytischen Kinase-Domäne am N-Terminus, bestehend aus 252 AS, und einer Polo-Box-Domäne (PBD) in der C-terminalen Region, bestehend aus zwei Polo-Boxen, von denen jede eine Länge von ca. 70 AS hat (Abb. 1.1).

Die N-terminal gelegene Kinase-Domäne bringt ein für Serin/Threonin-Kinasen charakteristisches Kennzeichen ein (Hanks et al., 1988; Hanks und Quinn, 1991). Es handelt sich dabei um ein Konsensus-Motiv mit der Struktur Gly-X-Gly-X-X-Ala, welches in der ATP-Bindedomäne von Subdomäne 1 lokalisiert ist. Es tritt hier anstelle der klassischen Konsensus-Sequenz für Serin/Threonin-Kinasen (Gly-X-Gly-X-X-Gly) auf. Der rapide Anstieg der Plk1-Konzentration während der G₂-Phase wird von einem noch größeren

Anstieg der Kinase-Aktivität begleitet, was auf eine post-translationale Modifikation des Enzyms hinweist (Golsteyn et al., 1995; Hamanaka et al., 1995; Lee und Erikson, 1997). Zudem wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung der T-Schleife innerhalb der Kinase-Domäne (Abb.1.1) einen für Kinasen typischen regulatorischen Mechanismus darstellt (Marshall, 1994). Eine Mutation von Threonin 210 in Aspartat (Thr210Asp), welche somit eine phosphorylierte Stelle imitiert, ist für eine Erhöhung der Kinase-Aktivität hinreichend (Jang et al., 2002). Für mögliche Effektor-Kinasen von Plk1 gibt es zwei potentielle Kandidaten, Slk (*human STE20-like kinase*) und Stk10 (*serine/threonine kinase 10*), welche beide Thr-210 *in vitro* phosphorylieren können und so die Kinase-Aktivität von Plk1 erhöhen (Ellinger-Ziegelbauer et al., 2000; Walter et al., 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß plx1, das Analog von Plk1 in *xenopus laevis*, aktiviert werden kann. Dies kann durch Phosphorylierung von Thr-201, welche durch die PKA katalysiert wird, erreicht werden (Kelm et al., 2002). Ob PKA, Slk und Stk10 die Kinasen sind, welche hauptsächlich für die Aktivierung von Plk1 während der Mitose verantwortlich sind, oder ob es weitere direkte Effektor-Kinasen von Plk1 gibt, bedarf weiterer Untersuchungen.

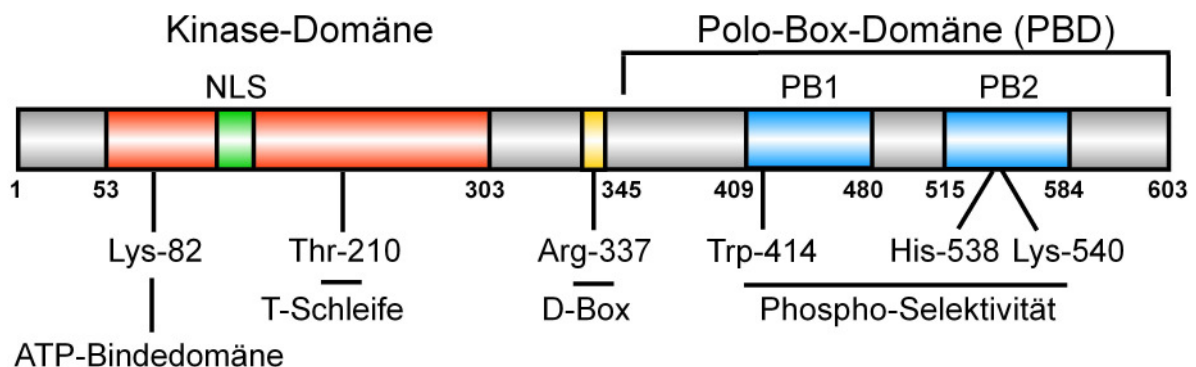


Abb. 1.1: Struktur der Polo-like Kinase 1 (Plk1). Die Serin/Threonin-Kinase hat eine Länge von 603 Aminosäuren und kann in zwei funktionelle Abschnitte untergliedert werden. Die N-terminal gelegene Kinase-Domäne (rot dargestellt) bildet an Thr-210 eine T-Schleife aus, deren Phosphorylierung eine Voraussetzung für die Aktivität der Kinase-Domäne ist. Die Bindedomäne für ATP ist an Lys-82 lokalisiert. Des weiteren befindet sich die Signalsequenz für den Kerntransport (NLS = *nuclear localization signal*, grün dargestellt) innerhalb der Kinase-Domäne. Die C-terminal gelegene Polo-Box-Domäne (PBD) besteht aus zwei Polo-Boxen (PB1 und PB2, blau dargestellt), welche mit Hilfe der Aminosäurereste Trp-414, His-538 und Lys-540 phosphorylierte Zielproteine als Substrate erkennen und binden. Des weiteren ist die PBD für subzelluläre Lokalisation von Plk1 verantwortlich. Das D-Box-Motiv (Degron-Box, gelb dargestellt) dient der Ubiquitinierung an Arg-337, welche von APC/C durchgeführt wird und zum Abbau von Plk1 führt.

Die C-terminal gelegene Polo-Box-Domäne (PBD) von Plk1 besteht aus zwei Polo-Boxen (PB1 und PB2), welche beide aus einem $\beta_6\alpha$ -Motiv bestehen und in bezug auf ihre Kristallstruktur nahezu übereinstimmen, obwohl ihre Aminosäuresequenzen nur zu ca. 12% übereinstimmen (Cheng et al., 2003; Elia et al., 2003b). Die PBD weist ein Motiv auf, welches für die Erkennung und Bindung phosphorylierter Zielproteine verantwortlich ist

(Yaffe und Cantley, 2000; Elia et al., 2003a). Es handelt sich hierbei um die AS-Reste His-538 und Lys-540 in Polo-Box 2. Auch Trp-414 in Polo-Box 1, ein in allen Plks phylogenetisch hoch konservierter Rest, trägt zur Erkennung und Bindung von phosphorylierten Proteinen bei. In Einklang damit steht die Erkenntnis, daß eine Mutation von Tryptophan 414 in Phenylalanin (Trp414Phe) die Bindung von Plk1 am Centrosom verhindert (Lee et al., 1998). Des Weiteren konnte anhand der Kristallstruktur von Polo-Box 1 gezeigt werden, daß Trp-414 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette eines phosphorylierten Serins aus einem bestimmten Phosphopeptid eingeht (Elia et al., 2003b). Bei diesem Phosphopeptid handelt es sich um ein zuvor beschriebenes Peptid, welches gegenüber der PBD von Plk1 optimale Bindungseigenschaften aufwies (Elia et al., 2003a). Durch weitere Interaktionsstudien bezüglich der Substrat-Bindung der PBD konnten Zielproteine von Plk1 gefunden werden, welche Strukturelemente der Zelle darstellen. Es handelt sich dabei um GRASP65, ein im Golgi-Apparat lokalisiertes Protein (Lin et al., 2000), und TCTP, ein Mikrotubuli-stabilisierendes Protein (Yarm, 2002). Die Erkenntnis, daß die PBD in der Lage ist, strukturelle Elemente zu binden, legt nahe, daß sie für die subzelluläre Verteilung von Plk1 verantwortlich ist. Dazu zählt in erster Linie die Bindung an Multiprotein-Komplexe, wie Centrosomen, Kinetochoren, Kern-Spindel und Golgi-Apparat (Lee et al., 1998; Seong et al., 2002; Preisinger et al., 2005).

Über den Mechanismus, mit welchem die PBD Einfluß auf die Kinase-Aktivität von Plk1 ausübt, besteht noch keine allgemein gültige Einigkeit. Eine gegenwärtige Modellvorstellung geht davon aus, daß sich die PBD in Abwesenheit von phosphorylierten Bindungspartnern um die Kinase-Domäne von Plk1 durch einen unbekanntem Mechanismus herum windet, wodurch eine Aktivierung der Kinasefunktion verhindert wird. Die Bindung eines angemessenen phosphorylierten Proteins an die PBD könnte somit eine Art „molekularen Schalter“ betätigen, welcher eine zugängliche Konformation des Proteins bewirkt. Zusammen mit der Phosphorylierung von Thr-210 in der T-Schleife der Kinase-Domäne könnte dies die katalytische Aktivität von Plk1 erhöhen.

1.3.3 Die Funktion von Plk1 beim G₂/M-Übergang

In den einzelnen Phasen des Zellzyklus wird Plk1 verschieden stark exprimiert. So zeigen Zellen in der G₀-, G₁ und S-Phase einen sehr geringen Gehalt des Enzyms, hingegen steigt die Expression in der G₂-Phase deutlich an und erreicht während der Mitose ihr höchstes Niveau (Golsteyn et al., 1995; Lee et al., 1995). Die Anreicherung von Plk1 in der späten G₂-Phase

erfolgt vermehrt an den Centrosomen, was Auswirkungen auf die Regulation des Eintritts in die Mitose der Zelle hat.

Die initiale Aktivierung des Cdk1/Cyclin B-Komplexes, welcher den MPF bildet, erfolgt nach neueren Erkenntnissen an den Centrosomen (Jackman et al., 2003). Diese Aktivierung ist abhängig von einer Phosphorylierung des Thr-161 innerhalb der Kinase-Domäne von Cdk1, welche durch Cak (*Cdk-activating kinase* = Cdk-aktivierende Kinase), einem Komplex aus Cdk7, Cyclin H und Mat1, vermittelt wird (Fisher und Morgan, 1994). Ist Cdk1 nun aktiviert, phosphoryliert diese die beiden Kinasen Myt1 und Wee1, sowie die Phosphatase Cdc25C, wodurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus ausgelöst wird: Die beiden Kinasen Myt1 und Wee1 werden durch ihre Phosphorylierung inaktiviert, während Cdc25C durch seine eigene Phosphorylierung aktiviert wird. Die aktive Phosphatase Cdc25C kann nun durch Dephosphorylierungen der beiden Phosphatgruppen an Thr-14 und Tyr-15 von Cdk1 den abrupten Eintritt der Zelle in die Mitose einleiten (Draetta und Eckstein, 1997). Dagegen wird durch Inaktivierung der beiden Kinasen Myt1 und Wee1, welche gegenüber Cdc25C antagonistisch wirken, eine Phosphorylierung von Thr-14 innerhalb Cdk1 unterbunden, wodurch eine Inhibition von MPF nicht erfolgen kann (Parker et al., 1992; Booher et al., 1997; Liu et al., 1997). Diese Art positiver Rückkopplung dient dazu, aktiven MPF möglichst schnell anzureichern. Die Wee1- und Myt1-vermittelte Inaktivierung des MPF findet dagegen bei fehlerhafter Replikation des Genoms statt. Sie hält die Zelle in der G₂-Phase fest und verhindert somit einen Eintritt in die Mitose.

In letzter Zeit gab es zunehmend Hinweise, daß Plk1 in die Aktivierung des beschriebenen Rückkopplungsmechanismus eingebunden ist. So wurde gezeigt, daß Plk1 die Phosphatase Cdc25C durch Phosphorylierung aktiviert und somit bei Einleitung von Mitose-spezifischen Ereignissen beteiligt ist (Roshak et al., 2000; Elia et al., 2003a). Des weiteren bewirkt die Plk1-vermittelte Phosphorylierung zu Beginn der Prophase eine Rekrutierung von aktiviertem Cdc25C in den Zellkern (Toyoshima-Morimoto et al., 2002).

Zum anderen konnte gezeigt werden, daß Plk1 durch Phosphorylierung von Resten in der Kinase-Domäne von Myt1 diese inhibitorische Kinase inaktiviert (Nakajima et al., 2003). Dies geschieht jedoch nur nach vorheriger DNA-Schädigung. Zudem konnte ebenfalls geklärt werden, daß Plk1 durch Phosphorylierung zweier Serin-Reste von Wee1, ein entscheidendes Signal für die Degradierung dieser zweiten inhibitorischen Kinase liefert, welche folgend über den Ubiquitin-Signalweg abgebaut wird (Watanabe et al., 2004).

Die wichtige Bedeutung von Plk1 für den Eintritt in die Mitose wird nicht zuletzt durch den Nachweis der direkten Interaktion mit dem MPF deutlich. So wurde zum einen gezeigt, daß

Plk1 Cyclin B, die regulatorische Untereinheit des MPF, durch Phosphorylierung aktiviert und anschließend aktivierten MPF während der Prophase in den Zellkern leitet (Toyoshima-Morimoto et al., 2001), zum anderen, daß die entscheidende Phosphorylierung an Ser-133 geschieht und diese von vorherigen Phosphorylierungsereignissen an Cyclin B abhängig ist (Yuan et al., 2002). Die Phosphorylierungsstelle Ser-133 liegt dabei innerhalb eines Substrat-Erkennungsmotives, welches auch in Cdc25C zu finden ist (Elia et al., 2003a).

Ein älterer Befund stützt die Modellvorstellung des positiven Rückkopplungsmechanismus zusätzlich: Cdk1, die katalytische Untereinheit des MPF, welche aufgrund der beschriebenen Dephosphorylierung durch Cdc25C aktiviert wurde, phosphoryliert plx1, das Plk1-Homolog aus *Xenopus laevis* während des G₂/M-Übergangs (Abrieu et al., 1998).

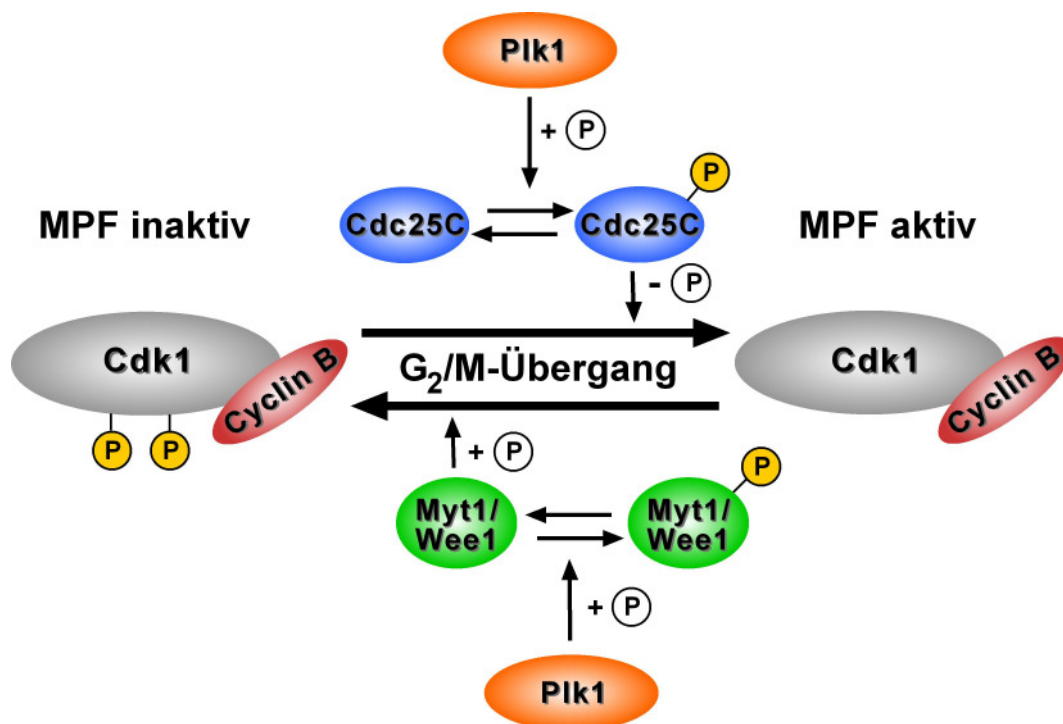


Abb. 1.2: Einfluß von Plk1 auf die Aktivierung von MPF beim G₂/M-Übergang. Während der G₂-Phase phosphorylieren die inhibitorischen Kinasen Myt1 und Wee1 (grün dargestellt) Cdk1 (grau dargestellt) an Thr-14, wodurch MPF, welcher durch Bindung von Cyclin B (rot dargestellt) an Cdk1 gebildet wird, inaktiv bleibt. Die Aktivierung von Cdk1 erfolgt u. a. durch Dephosphorylierungen an Thr-14 und Tyr-15, welche durch die Phosphatase Cdc25C (blau dargestellt) vermittelt wird. Aktivierte Cdk1 löst einen positiven Rückkopplungsmechanismus aus, da sie durch Phosphorylierungen Cdc25C aktiviert und die inhibitorischen Kinasen Myt1 und Wee1 hemmt (nicht dargestellt). Plk1 (orange dargestellt) greift in die Ereignisse beidseitig ein, da es beim G₂/M-Übergang durch Phosphorylierungen Cdc25C aktiviert und die inhibitorischen Kinasen Myt1 und Wee1 deaktiviert. Die Rolle von Plk1 als Schlüsselenzym für den Eintritt in die Mitose wird außerdem deutlich, da Plk1 die Zusammenlagerung von Cdk1 und Cyclin B zu aktivem MPF fördert, indem es durch Phosphorylierung von Cyclin B dessen Akkumulation im Zellkern bewirkt (nicht dargestellt). P (gelb dargestellt) = Phosphatgruppe an phosphorylierten Proteinen; P (weiß dargestellt) = abgespaltene (-) oder übertragene (+) Phosphatgruppe

Zusammenfassend stellt sich die Frage, welche der beiden Kinasen, Plk1 oder Cdk1 vor einschreitender Mitose zuerst aktiviert wird, und ob Plk1 für den G₂/M-Übergang zwingend erforderlich ist. So verursachen Eingriffe in die Funktion von Plk1 in erster Linie Aberrationen und Verspätungen von Mitoseereignissen, weniger einen G₂-Arrest. Für frühe mitotische Ereignisse, wie Auflösung der Kernmembran und korrekte Ausbildung der bipolaren Kernspindel, ist sowohl die Anwesenheit von Cdk1 als auch jene von Plk1 erforderlich (Lane und Nigg, 1996; Chase et al., 2000). Plk1 dürfte somit ein wichtiger auslösender Faktor für die Wiederaufnahme des Zellzyklus nach einem G₂-Arrest sein (van Vugt et al., 2004a). Diese These wird unterstützt durch die Erkenntnis, daß Überexpression von Plk1 nach einem UV-induzierten Zellzyklusblock durch Aktivierung von Cdc25C die Dephosphorylierung des Tumorsuppressorgens p53 bewirkt, wodurch die Wiederaufnahme des Zellzyklus eingeleitet wird (Chen et al., 2006).

In einer sehr umfangreichen Studie wurde verdeutlicht, daß Plk1 ein Substrat von CCT, (*chaperonin containing TCP1 complex*), einem Multienzymkomplex, ist, welcher für die Biogenese von Plk1 erforderlich ist. So führt eine durch RNAi bewirkte Unterdrückung der Expression des CCT zu einem G₂-Arrest trotz vorheriger kompletter Replikation der Chromosomen (Liu et al., 2005). Dieser G₂-Arrest führt schließlich zur Apoptose der Zellen. Zellen, welche teilweise CCT-defizient sind, zeigen einen mitotischen Arrest, der aufgehoben wird, sobald aktive Plk1 in die Zelle eingeschleust wird. Betreffende Zellen zeigen daraufhin einen Wiedereintritt in den Zellzyklus (Liu et al., 2005).

1.3.4 Plk1 und die Segregation der Chromosomen

In mitotischen Zellen ist Plk1 nicht ausschließlich an den Centrosomen lokalisiert, sondern befindet sich auch an den Kinetochoren (Arnaud et al., 1998). Diese stehen in direkter Verbindung mit den Centromeren der replizierten Chromosomen und erfüllen zwei wichtige Funktionen: Zum einen bilden sie die Strukturen für die Anheftung der Chromosomen an die Mikrotubuli der Kernspindel, zum anderen sind sie entscheidend für die Überwachung des Spindel-Kontrollpunkts (Cleveland et al., 2003). Der Spindel-Kontrollpunkt stellt sicher, daß alle replizierten Chromosomen bipolar an die Mikrotubuli der Kernspindel angeheftet werden, bevor die einzelnen Schwesterchromatiden in Richtung der beiden Pole separiert werden. Die Teilung der Schwester-Chromatiden und der damit verbundene Austritt aus der Mitose kann erst erfolgen, wenn die Kohäsin-Komplexe, welche die Schwesterchromatiden zusammenhalten, gespalten werden. Bereits in der Prophase und Prometaphase kommt es zur Phosphorylierung der Kohäsin-Komplexe durch Plk1, wodurch die spätere Trennung der

Chromatiden vorbereitet wird (Sumara et al., 2002). Ein weiterer entscheidender Schritt für die Fähigkeit zur Teilung der Chromatiden ist der durch Ubiquitinierung eingeleitete proteolytische Abbau der Schlüsselproteine Securin und Cyclin B. Diese Ubiquitinierung wird von der Ubiquitin-Ligase APC/C (*anaphase promoting complex / cyclosome*) durchgeführt (Peters, 2002; Wasch und Engelbert, 2005). Nach Abbau von Securin durch das Proteasom schneidet das aktivierte Enzym Separase eine Untereinheit der Kohäsion-Komplexe, so daß sich die beiden Schwester-Chromatiden der Chromosomen voneinander lösen und an die entgegengesetzten Spindelpole wandern können.

Bei der Regulation des APC/C spielt Plk1 eine wichtige Rolle. Es wurde bereits früh gezeigt, daß sowohl Plk1, als auch plx1 (*xenopus laevis*) APC/C aktivieren, so daß Cyclin B vermehrt ubiquitiniert wird und folglich durch das Proteasom abgebaut wird (Lee et al., 1998; Descombes und Nigg, 1998; Golan et al., 2002). In neueren Studien wird ein weiterer, allerdings indirekter Einfluß von Plk1 auf APC/C beschrieben (Eckerdt und Strebhardt, 2006). Um aktiv zu sein, muß APC/C den Ko-Faktor Cdc20 binden. Das inhibitorische Protein Emi1 (*early mitotic inhibitor 1*) bindet jedoch freies Cdc20, so daß nicht genügend Cdc20 zur Aktivierung des APC/C verfügbar ist. Nach einer Studie von Moshe und Kollegen wird Emi1 durch Plk1 phosphoryliert, wodurch der proteolytische Abbau von Emi1 infolge Ubiquitinierung eingeleitet wird (Moshe et al., 2004). Durch Ergebnisse anderer Studien kann Plk1 jedoch nicht als der hauptsächliche APC/C-Aktivator angesehen werden. In Plk1-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung des APC/C weiterhin möglich ist (Sumara et al., 2004; van Vugt et al., 2004b).

Ein weiterer Interaktionspartner von Plk1, welcher die Bedeutung von Plk1 bei der Chromosomensegregation verdeutlicht, ist, wie in Kap. 1.3.2 angedeutet, TCTP, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (Yarm, 2002).

1.3.5 Die Funktion von Plk1 während der Zellteilung

Für die Initiation der Zytokinese (Zellteilung) ist die Inaktivierung von MPF notwendig. Diese Inaktivierung erfolgt durch die APC/C-vermittelte Degradierung von Cyclin B. In diesen Signalprozeß ist Plk1, wie in Kap. 1.3.4 beschrieben, als wichtiger Bestandteil eingebunden.

Die Einleitung der Zellteilung ist durch mehrere phänotypische Ereignisse charakterisiert. In diesem Zusammenhang ist die Ausbildung eines äquatorialen kontraktiven Aktin-Rings für die Bildung der Teilungsfurche mit verbleibender Mittelzone ein wichtiger initialer Schritt. Der Nachweis der Lokalisation von Plk1 innerhalb der Mittelzone weist dabei auf eine Bedeutung

von Plk1 am beschriebenen Vorgang hin (Lee et al., 1995). So führte katalytisch inaktive Plk1 nicht nur zu Veränderungen während der Mitose, sondern letztendlich durch nicht erfolgte Zellteilungen zur Bildung von vielkernigen Zellen (Mundt et al., 1997). Bereits zuvor wurde entdeckt, daß in *Drosophila* polo-Allele mit leichten Funktionsverlusten Defekte bei der Zellteilung verursachen (Carmena et al., 1998). Dabei entpuppte sich das mitotische Kinesin Parvarotti, ein Motormolekül, als wichtiger Interaktionspartner von polo. Zur Ausbildung des kontraktiven Aktin-Rings ist die richtige Lokalisation der beiden Proteine an der Mitosespindel eine notwendige Bedingung. Für diese Lokalisation ist jedes der beiden Proteine auf den jeweiligen Interaktionspartner angewiesen, denn auch Mutationen im Parvarotti-Gen führten zu unvollständiger Zellteilung (Adams et al., 1998). In Säugerzellen wurden analog zu *Drosophila* Interaktionen von Plk1 mit Motorproteinen beschrieben. Bei den Motorproteinen handelt es sich um die Kinesine MKLP1 (*mitotic kinesin like protein 1*) und MKLP2, sowie NudC (*nuclear distribution gene C*), einer Komponente des Dynein-Komplexes. Es konnte gezeigt werden, daß MKLP1 für die Lokalisation von Plk1 in der späten Mitose und während der frühen Zytokinese verantwortlich ist. So führt eine RNAi-vermittelte Unterdrückung der MKLP1-Expression zur Bildung von vielkernigen Zellen mit mehreren Centrosomen (Liu et al., 2004). MKLP2, welches für die Bildung der Teilungsfurche und damit ebenso für die Zytokinese notwendig ist, konnte in gleicher Weise als Substrat von Plk1 identifiziert werden (Neef et al., 2003). Plk1 wirkt dabei als sich selbst verstärkende Kinase, da MKLP2 zunächst von Plk1 vor-phosphoryliert wird, bevor Plk1 das Substrat bindet und sich seine Kinasefunktion so entfaltet, daß MKLP2 durch abermalige Phosphorylierung seitens Plk1 final aktiviert wird. Die Bindung von NudC, einem weiteren Substrat von Plk1, erfordert dagegen keine Vor-Phosphorylierung (Zhou et al., 2003). Inaktivierung von NudC führt zu Defekten, sowohl bei der Chromosomensegregation, als auch bei der Zytokinese (Aumais et al., 2003).

1.3.6 Plk1 und Krebs

Die molekulare Charakterisierung von Plk1 wurde von Untersuchungen bezüglich der Expressionsstärke in verschiedenen Geweben begleitet (Holtrich et al., 1994; Golsteyn et al., 1994). Während der Plk1-Gehalt in den meisten adulten und ausdifferenzierten Geweben unter der Nachweisgrenze liegt, wird Plk1 in Geweben wie Thymusdrüse, Milz und Hoden, deren Zellen stärker proliferieren, schwach, aber immerhin detektierbar exprimiert. Die ersten Hinweise, die verdeutlichten, daß Plk1 etwas mit neoplastischem Zellwachstum zu tun hat, wurden durch Studien gewonnen, in denen gezeigt wurde, daß die Plk1-Expression in

primären Tumorgeweben im Vergleich zu gesunden Geweben deutlich erhöht ist (Holtrich et al., 1994; Yuan et al., 1997). Eine frühe Studie beschrieb den Zusammenhang zwischen der Höhe der Plk1-Expressionsrate und der Prognose bei Krebspatienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (Wolf et al., 1997). Dieser Zusammenhang wurde daraufhin auch für verschiedene andere Krebsarten bestätigt, wie z. B. für Karzinome der Mundhöhle, Melanome, Karzinome des Dickdarms, der Leber und der Brust (Knecht et al., 1999; Strebhardt et al., 2000; Knecht et al., 2000; Takahashi et al., 2003; Weichert et al., 2005). Ferner wurde eine Korrelation zwischen Plk1-Expression und Metastasierungspotential gezeigt (Kneisel et al., 2002; Ahr et al., 2002). In einigen Tumorzelllinien wurden Mutationen im Plk1-Gen gefunden, die dazu führten, daß die Interaktion des exprimierten Plk1-Proteins mit Hsp90 (*heat shock protein 90*) inhibiert wurde, wodurch die Instabilität von Plk1 hervorgerufen wurde (Simizu und Osada, 2000). Dies wiederum läßt vermuten, daß sehr hohe Konzentrationen von funktionsfähiger Plk1 für die Tumorentstehung vonnöten sind, was allerdings noch bewiesen werden muß.

1.3.7 Plk1 als Zielgen für eine mögliche Krebstherapie

Schon die frühen Beobachtungen, daß defekte Allele des Gens *polo* in *Drosophila* bereits auf Ebene der Zygote zu Lethalität führten, verdeutlichten die Schlüsselrolle von *polo* für Zellteilung und Entwicklung (Sunkel et al., 1988; Llamazares et al., 1991). Infolgedessen gab es zahlreiche Ansätze, die Funktion von Plk1 in Säugerzellen zu inhibieren. Ein frühes Experiment, in welchem spezifische Antikörper gegen Plk1 in HeLa-Zellen injiziert wurden, führte zu phänotypischen Veränderungen der Tumorzellen und der Inhibition ihres Proliferationsverhaltens (Lane et al., 1996). Die Zellen zeigten Defekte bei Ausbildung der Kernspindeln, ungetrennte Centrosomen, sowie kondensierte M-Phase-Chromosomen. Dies verdeutlichte, daß Säugerzellen für die Centrosomenreifung und Ausbildung der bipolaren Kernspindel Plk1 benötigen, ebenso wie in *Drosophila* funktionsfähiges *polo*-Protein für die beschriebenen Prozesse vonnöten war. Des weiteren verblieben nicht-immortalisierte Hs68-Fibroblasten nach Injektion von Plk1-spezifischen Antikörpern in der Interphase und gingen nicht in die Mitose über. Dies ließ darauf schließen, daß die Kontrolle des G₂-Restriktionspunktes, welche Plk1-Konzentration, Centrosomenreifung und Ausbildung der Kernspindel überwacht (Xie et al., 2005), in diesem Fall weiterhin intakt war. Dagegen war in immortalen HeLa-Zellen die Kontrolle des G₂-Restriktionspunkts gestört, sichtbar in ihrem veränderten Karyotyp. Darüber hinaus führte die viral vermittelte Expression dominant-negativer Plk1 in zwei von zehn Tumorzelllinien zu einem Phänotyp, welcher als mitotische

Katastrophe bezeichnet wurde und schließlich die Zellen in die Apoptose trieb (Cogswell et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigten primäre epitheliale Zellen während Expression dominant-negativer Plk1 zwar eine verlangsamte Teilungsrate, insgesamt gesehen aber eine normale Centrosomenreifung, welche von einer äußerst geringen Apoptoserate begleitet wurde. Diese Studie beschrieb somit als erste einen Mechanismus von tumorspezifischer Apoptose infolge der Degradierung von Plk1. In einer neueren Studie wurde nachgewiesen, daß primäre Zellen im Gegensatz zu Tumorzellen in bezug auf Plk1-Inhibition nicht sensitiv sind (Liu et al., 2006).

Im einem ersten Versuch zur therapeutischen Inhibition von Plk1 wurden *antisense*-Oligonukleotide (ASOs) verwendet, um die Translation des Plk1-Transkripts zu blockieren (Spankuch-Schmitt et al., 2002b). Dabei unterdrückten ausgewählte ASOs die Plk1-Expression und die damit verbundene Kinase-Aktivität in verschiedenen Tumorzelllinien auf konzentrationsabhängige und sequenzspezifische Weise, sichtbar in einem anti-proliferativen Effekt *in vitro*. Ein siRNA-basierter Ansatz zur Unterdrückung der Plk1-Expression war im Hinblick auf eine zeitlich länger andauernde Wirkung erfolgreicher als die Applikation von ASOs. So bewirkte die siRNA-vermittelte Unterdrückung von Plk1 in vielen Tumorzelllinien eine deutlich schwächere Proliferation und eine massive Steigerung der Apoptoserate (Spankuch-Schmitt et al., 2002a; Reagan-Shaw und Ahmad, 2005). Dabei wurde eine Aktivierung der Caspase-3, sowie des p53-Signalweges beobachtet (Liu und Erikson, 2003). Die Steigerung der Apoptoserate korrelierte mit dem Grad der Unterdrückung der Plk1-Expression. In primären Zellen konnte zwar eine verlangsamte Teilungsrate verzeichnet werden, die Apoptoserate stieg aber nicht signifikant an. Darüber hinaus zeigten *in vivo*-Studien in einem orthotopen Mausmodell die siRNA-vermittelte Unterdrückung des Wachstums von Blasen Tumoren (Nogawa et al., 2005), wodurch RNAi-vermittelte Ansätze mehr und mehr in den Fokus der Krebstherapie gelangten. ASO- oder siRNA-vermittelte Ansätze unterliegen aber auch Limitierungen. So können sie mögliche Metastasen nicht angreifen und sind aufgrund der Nukleaseaktivität innerhalb eines Organismus nur begrenzt wirksam. Deshalb wurde ein alternativer Ansatz zur Vektor-vermittelten Expression von shRNAs gegen Plk1 gewählt, welcher eine potente und länger andauernde Unterdrückung des Proteins zur Folge hatte (Spankuch et al., 2004). Darüber hinaus wurde eine deutliche Inhibition des Tumor-Wachstums im Rahmen eines Xenograft-Modells bewirkt. Für die Etablierung von RNAi-vermittelten Therapien sind jedoch noch massive Hürden zu überwinden. So ist bis jetzt zu wenig über mögliche unspezifische Effekte (*off-target effects*)

bekannt, welche der RNAi-vermittelten spezifischen Unterdrückung von Plk1 zugrunde liegen.

1.4 RNA-Interferenz (RNAi)

1.4.1 Entdeckung und allgemeine Grundlagen der RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) wurde zuallererst durch Experimente im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Zunächst wurde die Erkenntnis gewonnen, daß die Applikation von einzelsträngiger *sense*-, wie auch von *antisense*-RNA gleichermaßen eine Unterdrückung der Expression eines kognitiven Gens bewirkte (Guo und Kemphues, 1995). Die daraus abgeleitete Überlegung, Synergieeffekte zu nutzen, führte schließlich zu dem Versuch, doppelsträngige RNA (dsRNA) zur Unterdrückung der Genexpression einzusetzen. Tatsächlich wurde ein großer Durchbruch erzielt, als man feststellte, daß Verabreichung dieser dsRNA als Auslöser der Gen-Unterdrückung zu einer zehnfach potenteren Wirkung führte, als die Verabreichung der jeweiligen *sense*- oder *antisense*- Einzelstränge alleine (Fire et al., 1998). Der Prozeß der RNAi konnte sowohl durch direkte Injektion von dsRNA in die Keimdrüse von *C. elegans*, als auch durch Verfütterung von dsRNA ausgelöst werden (Timmons und Fire, 1998) und blieb nicht nur im behandelten Tier, sondern auch in der Folgegeneration bestehen. Diese Entdeckung führte zu der Ansicht, daß einige zuvor beschriebene Mechanismen, welche Gen-Unterdrückung bewirkten, einen gemeinsamen biologischen Ursprung haben müssen. So versuchten Jorgensen und Kollegen bereits einige Jahre zuvor, die Pigmentierung der Blütenblätter von Petunien durch Einschleusung von Transgenen zu intensivieren. Das Einführen der Transgene führte jedoch nicht zum erhofften Ergebnis, sondern endete mit dem Resultat verschiedenster Farbausprägungen, von gleichmäßig unberührt, über panaschiert, bis farblos (Jorgensen, 1990). Dies ließ darauf schließen, daß die eingeschleusten Transgene nicht nur ihre eigene Expression negativ beeinflussten, sondern auch die endogene Expression beteiligter Gene störten. Dieser Prozeß, der auch Ko-Suppression genannt wird, kann durch Einwirkung eines einzelnen Transgens mit hoher Expressionrate ausgelöst werden (Jorgensen et al., 1996; Elmayan und Vaucheret, 1996), sowie durch Integration schwächer exprimierender Transgene mit mehreren Kopien innerhalb eines Komplexes (Que et al., 1997). Das Phänomen der Ko-Suppression war nicht nur auf Pflanzen beschränkt, sondern fand sich auch in einzelligen (Romano und Macino, 1992) oder Metazoen wie *C. elegans*, oder *Drosophila* (Pal-Bhadra et al., 1997; Dernburg et al., 2000). Parallel dazu wurde festgestellt, daß einige Pflanzen nach viraler Infektion entsprechende Viren-RNA gezielt zerstören konnten (Dougherty et al., 1994), andere aber,

wie zuvor beschrieben, dem Effekt der Unterdrückung von Genen durch Verabreichung von exogen eingebrachter DNA unterworfen waren (Jorgensen, 1990).

Genetische und biochemische Untersuchungen haben bis heute ergeben, daß RNAi, Ko-Suppression und Virus-induzierte Gen-Unterdrückung in bezug auf ihre zugrunde liegenden Mechanismen Gemeinsamkeiten aufweisen. Die beteiligten Signalwege existieren ferner in den meisten Eukaryoten.

In *C. elegans* führte die Verabreichung von dsRNA zu einer Degradierung der korrespondierenden mRNA, dagegen waren Introns oder Promotor-Sequenzen als Auslöser der Gen-Suppression ineffektiv (Fire et al., 1998). Dies stimmte mit Beobachtungen aus Pflanzen überein: Hier löste virale dsRNA ebenfalls die Zerstörung der korrespondierenden mRNA aus, ohne daß die Transkriptionsrate des Gens beeinflußt wurde (Jones et al., 2001). Dies führte zu der Vermutung, daß es sich beim beschriebenen Prozeß um einen post-transkriptionalen Vorgang handelte, wodurch gezielt das Transkript degradiert wurde, das Genom jedoch unberührt blieb. In einem Experiment von Sharp und Kollegen wurde gezeigt, daß die Inkubation von spezifischer dsRNA in zellfreien Lysaten dazu führte, daß keine Luciferase-Expression nach Einbringung einer synthetischen Luciferase-mRNA stattfand (Tuschl et al., 1999). Dieser Befund ließ sich durch die Degradierung der mRNA erklären, wodurch die Vorstellung wuchs, daß dsRNA die Zusammenlagerung eines Multi-Nuklease-Komplexes initiiert, welcher homologe mRNAs gezielt degradiert. Dieser Effektor-Nuklease RISC (*RNA-induced silencing complex*) wurde aus Zellextrakten von *Drosophila* isoliert. In diesen Tieren wurde zuvor RNAi durch *in vivo*-Behandlung mit dsRNA ausgelöst (Hammond et al., 2000). Es stellte sich nun die Frage, durch welchen Mechanismus dieser Multi-Nuklease-Komplex RISC die korrespondierenden mRNAs als Ziele identifizierte und angriff. Die Vorstellung der Existenz von RNA-Molekülen, welche in vermittelnder Funktion RISC-Komplexe zu ihrem kognitiven Ziel leiten, bewahrheitete sich nicht. Dagegen wurden kurze 25 nt lange *antisense*-RNA-Stränge in transgenen Pflanzen identifiziert, deren Sequenzen den durch Ko-Suppression unterdrückten Transgenen homolog waren (Hamilton und Baulcombe, 1999). Ähnliche kurze RNA-Stränge mit einer Länge von 22 nt wurden auch nach Verabreichung von dsRNA in Embryo-Extrakten von *Drosophila* produziert (Zamore et al., 2000) und korrelierten in ihrer Häufigkeit mit der Nukleaseaktivität von RISC (Hammond et al., 2000). Aufgrund der Beobachtungen schloß man auf eine Verbindung von Ko-Suppression in Pflanzen und RNAi in Tieren, welche in einer Modellvorstellung resultierte: Der initiale Schritt bei der Unterdrückung von Genen erfolgt durch Erkennung von dsRNA durch ein Enzym, welches dsRNA in 21-25 nt lange Abschnitte schneidet. Diese kurzen

entstehenden siRNAs (*small interfering RNAs*) wiederum leiten den Effektor-Komplex RISC zu ihren homologen mRNA-Substraten, welche anschließend zerschnitten werden. Bei genauerer Untersuchung der Struktur dieser kurzen siRNAs entpuppten sich diese als doppelsträngige RNAs mit 5'-phosphorylierten Enden und charakteristischem 3'-Überhang zweier Nukleotide (Elbashir et al., 2001b). Die Suche nach dem Enzym, welches diese siRNAs herstellte, führte zur Familie der RNaseIII-Enzyme, da bekannt war, daß diese Familie von Enzymen dsRNA schneidet und 5'-phosphorylierte Enden zurückläßt. Schließlich wurden Vertreter der Klasse III von RNaseIII-Enzymen, welche eine dsRNA-Bindungsdomäne und eine katalytische Domäne aufwiesen, als verantwortliche Enzyme identifiziert (Bernstein et al., 2001). Die Vertreter der Klasse III von RNaseIII-Enzymen werden Dicer genannt und prozessieren dsRNA zu siRNA, wodurch RNAi ausgelöst wird. Es handelt sich um hochkonservierte Enzyme, welche in verschiedensten Organismen, darunter *Arabidopsis*, *Drosophila* und *C. elegans* entdeckt wurden, und überall auf die gleiche Weise dsRNA erkennen und diese zu siRNAs prozessieren (Bernstein et al., 2001; Ketting et al., 2001; Knight und Bass, 2001; Grishok et al., 2001).

Bereits in frühen Experimenten konnte gezeigt werden, daß RNAi-spezifische Ereignisse den ganzen Organismus durchdringen können und in manchen Fällen sogar vererbbar sind (Palauqui et al., 1997; Fire et al., 1998). Es mußte also ein Mechanismus existieren, welcher einerseits Signale von Zelle zu Zelle weiterleitet, andererseits verstärkend wirkt. So führte die Verabreichung von siRNAs in *C. elegans* nicht nur zur Degradierung der kognitiven mRNA, sondern auch zur Produktion verschiedener neuer siRNAs (Sijen et al., 2001). In dieser heterogenen Ansammlung von siRNAs fanden sich nicht nur Sequenzen, welche den verabreichten siRNAs homolog waren, sondern auch Sequenzen, welche Abschnitten aus anderen Bereichen der angegriffenen mRNA homolog waren. Durch weitere Untersuchungen gelangte man zu der Erkenntnis, daß für die Amplifikation der siRNAs eine Klasse von Enzymen, die RdRPs (*RNA-directed RNA polymerases*) verantwortlich ist, welche zuvor in Tomaten entdeckt wurde (Schiebel et al., 1998). Auch in *C. elegans* und *Drosophila* wurden anschließend verwandte Enzyme entdeckt (Smardon et al., 2000; Lipardi et al., 2001). In einer Modellvorstellung geht man davon aus, daß siRNA als Primer für die Amplifikation von weiterer dsRNA fungiert. Dabei wird die Amplifikation durch RdRPs katalysiert. Obwohl die Anwesenheit von RdRPs für die Auslösung von RNAi in *Drosophila* nicht erforderlich ist, bleibt dennoch die Vorstellung, daß solche Enzyme die RNAi-Antwort durch Produktion neuer dsRNA verstärken, so wie z. B. die Expressionsrate bei Vorhandensein zahlreicher Kopien eines bestimmten Transgens steigt.

1.4.2 RNA-Interferenz in Säugerzellen

Bis vor einiger Zeit existierte die allgemeine Auffassung, daß die Verabreichung von dsRNA in Säugerzellen ausschließlich zu einer Immunantwort führt. In erster Linie ging es dabei um die Induktion eines Interferon-regulierten Signalweges, welcher zur Abwehr viraler Infektionen dient. Dabei wird infolge der Bindung von dsRNA an PKR (*dsRNA-dependent protein kinase*), diese Kinase aktiviert, wodurch ein unspezifischer Abbau von zellulären RNAs eingeleitet wird (Williams, 1997). Zusätzlich aktiviert PKR ELF2a (*elongation factor 2a*). Die Folge ist eine Hemmung der zellulären Proteinsynthese (Clemens und Elia, 1997). Im Hinblick auf die Strategie, durch Verabreichung von dsRNA die Expression eines bestimmten Säugergens zu unterdrücken, schien die Aktivierung des Interferon-Signalweges unumgänglich zu sein. Auf der anderen Seite machte man die Beobachtung, daß Komponenten, welche an RNAi-spezifischen Mechanismen beteiligt waren, hoch konserviert waren und auch in Säugerzellen vorhanden waren (Bernstein et al., 2001). So führte die Einschleusung von dsRNA in embryonale Stammzellen der Maus, in welchen antivirale Mechanismen in der Regel keine Interferonantwort auslösen, zu spezifischen Gen-Antworten (Hannon, 2002). Wie konnte man also die RNAi-vermittelte Suppression eines Säugergens unter Umgehung der Interferonantwort auslösen? Die Antwort lieferten Tuschl und Kollegen, welchen es durch Applikation kurzer 21 nt langer siRNAs zum ersten Mal gelang, ohne die Aktivierung des Interferon-Signalwegs RNAi in Säugerzellen auszulösen (Elbashir et al., 2001a).

siRNAs können auf vielfältige Art und Weise in Säugerzellen überführt werden. Die Antwort der Zellen ist dabei abhängig von unterschiedlichen Faktoren wie Transfektionseffizienz, intrazellulärer siRNA-Konzentration und Potential der siRNA, RISC zur kognitiven Zielsequenz zu leiten. Sogar eine weniger potente siRNA ist in der Lage, die Expression des Zielgens zu unterbinden, vorausgesetzt sie liegt in ausreichender Konzentration vor. Auf der anderen Seite bewirken sehr hohe siRNA-Konzentrationen nicht erwünschte Nebeneffekte (*off-target effects*), welche in der Hemmung der Translation von Transkripten bestehen. Diese Hemmung wird hervorgerufen durch partielle Sequenzhomologien (Jackson und Linsley, 2004).

Die zeitlich stark limitierte Wirkung von siRNAs führte zu der Überlegung, RNAi in Säugerzellen durch Einschleusung von siRNA-exprimierenden Genen auszulösen. Paddison und Kollegen benutzten in einem Vektor-basierten Ansatz einen U6 snRNA-Promotor zur Expression von shRNA (*short hairpin RNA*), welche eine Haarnadel-Struktur aufwies

(Paddison et al., 2002). Dabei wurden RNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge exprimiert, welche so konzipiert waren, daß *sense*- und *antisense*-Strang durch Bildung einer Schleife intramolekular hybridisierten. Die vorliegende shRNA wurde durch Dicer zu wirksamer siRNA prozessiert. In einer weiteren Studie wurde die Länge der Schleife kritisch betrachtet. Es fiel dabei auf, daß shRNA mit einer intramolekularen Schleife von neun nicht-hybridisierten Nukleotiden am besten durch Dicer in charakteristische siRNA prozessiert wurde und somit die größte Wirkung erzielte (Brummelkamp et al., 2002a). Alternativ zur Expression von shRNA wurden in einem weiteren Ansatz *sense*- und *antisense*-RNA-Strang getrennt exprimiert, welche anschließend zu siRNA hybridisierten (Yu et al., 2002).

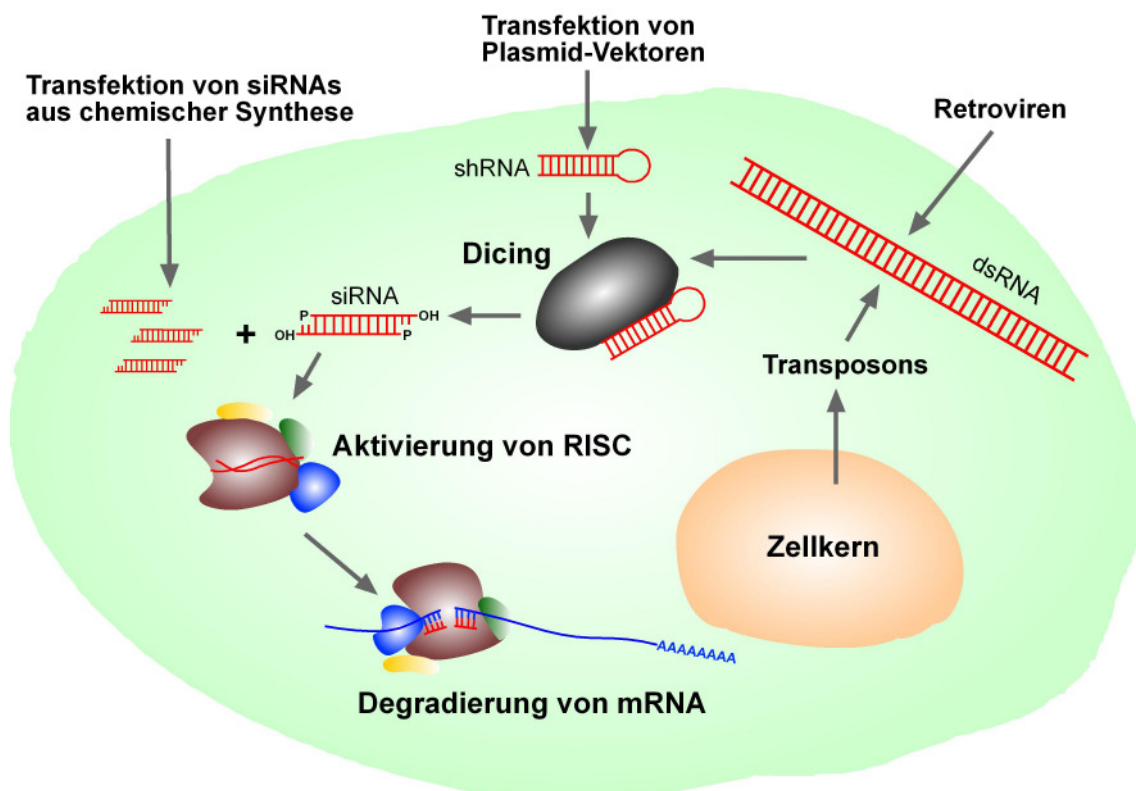


Abb. 1.3: Modell des RNA-Interferenz (RNAi)-Mechanismus. Im Laufe der Evolution entwickelten lebende Zellen Mechanismen, um sich vor viralem Befall zu schützen. Doppelsträngige RNA (dsRNA), welche von Retroviren im Zuge der Replikation ihres Genoms produziert wird, wird vom Enzym Dicer (schwarz dargestellt), einem Vertreter der RNase III-Enzyme, zu kurzen 21 nt langen siRNAs (*small interfering RNAs*) prozessiert. Diese kurzen siRNA-Doppelstränge werden durch ihre charakteristische Struktur von einem Multienzymkomplex namens RISC (*RNA-induced silencing complex*; braun dargestellt) erkannt und inkorporiert. Die Sequenz des *antisense*-Strangs der siRNA ist dabei für die Erkennung von kognitiver mRNA (blau dargestellt) verantwortlich, welche von RISC gebunden und durch die Endonuklease-Funktion des Komplexes zerschnitten wird. Dadurch kommt es zur Degradierung von mRNA-Transkripten. Intrazellulär exprimierte shRNAs infolge Transfektion von Plasmid-Vektoren werden in gleicher Weise wie lange dsRNA von Dicer zu wirksamer siRNA prozessiert. Mittels Applikation chemisch synthetisierter siRNAs kann RNAi dagegen direkt ausgelöst werden. Bei Säugerzellen unterliegt der RNAi-Mechanismus Einschränkungen. So bewirkt die Applikation langer dsRNA unspezifische Immunantworten. Um RNAi im Säugersystem auszulösen, müssen betreffende Säugerzellen mit siRNAs aus chemischer Synthese oder shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert werden.

Die entwickelten Systeme zur Expression von siRNA oder shRNA konnten auf verschiedenste Weise in die Zielzelle überführt werden, darunter mittels transienter Transfektion oder durch viral-vermittelte Infektion (Brummelkamp et al., 2002b).

Beobachtungen bezüglich unterschiedlicher Wirksamkeit von siRNA bzw. shRNA resultierten in einem Determinismus, welcher Regeln für das Entwerfen möglichst effektiver siRNAs aufstellte. So muß die in RISC inkorporierte siRNA der Zielsequenz der mRNA komplett homolog sein. Es reicht dabei schon eine einzige nicht komplementäre Base (*mismatch*) aus, um den RNAi-Effekt drastisch zu vermindern (Elbashir et al., 2001b). Des weiteren zeigten siRNAs mit einer Sequenzhomologie von mindestens 11 Nukleotiden Kreuz-Interferenzen mit anderen Genen (*off-target effects*) (Jackson et al., 2003). Daher ist es unumgänglich, daß beim Entwerfen von siRNAs die verwendete Zielsequenz mit der Gen-Bank abgeglichen wird, um Kreuz-Interferenzen auszuschließen, welche auf andere Gene zielen. Dies wird in der Regel unter Verwendung eines *BLAST*-Algorithmus (Altschul et al., 1990) erreicht.

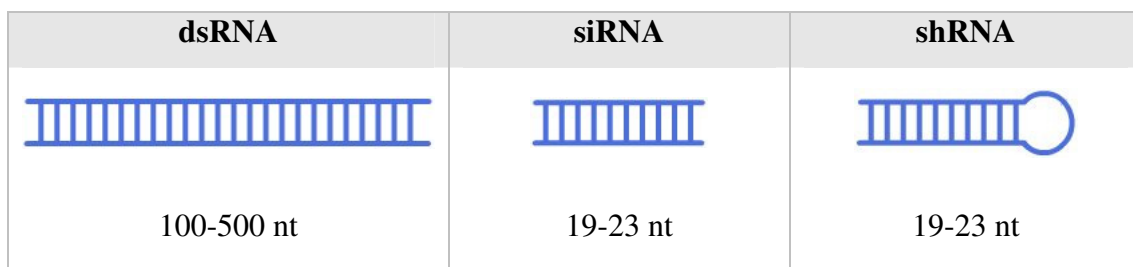


Abb. 1.4: Struktur doppelsträngiger RNA. Doppelsträngige RNA mit einer Länge von 100-500 nt wird als dsRNA bezeichnet. siRNA (*small interfering RNA*), welche durch das Enzym Dicer prozessiert wird oder durch chemische Synthese hergestellt werden kann, hat eine Länge von 19-23 nt mit charakteristischen 3'-Überhängen von jeweils zwei Uridin-Nukleotiden. Um RNAi über einen längeren Zeitraum auslösen zu können, besteht die Möglichkeit, mittels Transfektion von Plasmid-Vektoren intrazellulär shRNA (*short hairpin RNA*) zu exprimieren. Dabei wird ein RNA-Einzelstrang synthetisiert, welcher intramolekular hybridisiert und eine Haarnadelstruktur durch nicht-hybridisierende Basen ausbildet. shRNA wird intrazellulär analog der dsRNA durch das Enzym Dicer zu wirksamer siRNA prozessiert.

Aufgrund der Ergebnisse aus breit gefächerten Versuchen, in welchen eine große Anzahl von siRNAs getestet und in bezug auf ihre Wirksamkeit klassifiziert wurden, stellte man weitere Regeln auf. Dabei wurde nach charakteristischen Merkmalen geschaut, welche wirksame siRNAs von weniger wirksamen unterscheiden (Khvorova et al., 2003). So gilt, daß siRNAs, welche am 5'-Ende ihres *antisense*-Stranges bzw. am 3'-Ende des *sense*-Stranges eine geringere Thermostabilität ihrer Helix aufweisen, generell wirksamer sind, als siRNAs mit umgekehrten Eigenschaften. Des weiteren sollte der G/C-Gehalt knapp unterhalb von 50% liegen und es sollten möglichst keine internen Motive wiederholt auftreten. Weitere wichtige Determinanten für die Einbringung der siRNAs in den RISC-Komplex sind das Auftreten

bestimmter Nukleotide an vier verschiedenen Positionen des *sense*-Stranges. So sollte an den Positionen 3 und 19 jeweils ein Adenosin und an Position 10 ein Uridin auftreten, hingegen sollte sich an Position 13 auf keinen Fall ein Guanosin und an Position 19 auf keinen Fall ein Guanosin oder Cytidin befinden (Reynolds et al., 2004). Durch Untersuchungen des RISC-Komplexes in *Drosophila*-Embryonen wurde die thermodynamische Ausrichtung wirksamer siRNAs bestimmt. Dabei stellte man fest, daß die beiden Stränge einer jeden siRNA für die Einbringung in den RISC-Komplex unterschiedlich gut geeignet waren (Schwarz et al., 2003). Selbst einzelsträngige RNAs, welche in der Lage waren, RISC-Komplexe zu formieren (Meister et al., 2004), zeigten die gleiche thermodynamische Asymmetrie, welche auch wirksame siRNAs aufwiesen (Silva et al., 2003). Durch all diese Untersuchungen wurde deutlich, daß der initiale Schritt, welcher letztendlich die Wirksamkeit von siRNA ausmacht, durch Ausbildung des RISC-Komplexes determiniert wird. Dieser Prozeß ist von der Struktur der siRNA abhängig. Durch bevorzugte Bindung eines der beiden siRNA-Stränge wird die Formierung von RISC beschleunigt. Voraussetzung dafür ist neben den o. g. Eigenschaften in erster Linie die Asymmetrie der siRNA in bezug auf ihre Thermostabilität. Hat sich der RISC-Komplex formiert, so spielt dies für die Determinierung der Wirksamkeit von siRNA keine Rolle mehr, da die Zielsequenz auf die folgenden RISC-vermittelten Reaktionskinetiken wie Bindung und Zerschneiden der kognitiven mRNA keinen Einfluß hat.

1.4.3 RNA-Interferenz als Werkzeug zum Studium der Genfunktion

Eine der ersten Entscheidungen, welche bei RNAi-basierten Experimenten getroffen werden muß, ist die Frage der Verwendung von siRNA aus chemischer Synthese oder shRNA/siRNA-exprimierenden Expressionsplasmiden. Die Vorteile von siRNA liegen in der unaufwendigen Synthese und einer großen Transfektionseffizienz, gepaart mit der höchst möglichen intrazellulären Konzentration. Ein großer Nachteil liegt jedoch in ihrer transienten Wirkung, welche zeitlich äußerst begrenzt ist. Ein weiterer Nachteil ist die durch Zellteilung deutlich verminderte Konzentration von siRNAs in Tochterzellen. So weisen Säugerzellen keinen Mechanismus auf, welcher RNAi durch Amplifikation verstärkt oder verbreitet, wie dies in *C. elegans* der Fall ist. Dazu kommen Faktoren wie physiologische Veränderungen durch Transfektionen.

Die Applikation von shRNA/siRNA-exprimierenden Plasmiden ist dagegen anfänglich durch einen größeren Aufwand gekennzeichnet. So müssen betreffende Konstrukte zunächst kloniert und sequenziert werden, damit eine fehlerfreie Expression sichergestellt ist. Zusätzlich müssen die Strukturen der shRNA-kodierenden Oligonukleotide so gewählt

werden, daß die exprimierten shRNAs möglichst effektiv zu wirksamen siRNAs prozessiert werden. Ein großer Vorteil ist jedoch die nachhaltige Wirkung der Expressionsplasmide. Des Weiteren kann durch virale Infektion eine stabile genomische Integration erreicht werden, wodurch die Expression von shRNA/siRNA auf unbestimmte Zeit erfolgen kann.

Sowohl siRNAs als auch shRNA/siRNA-exprimierende Vektoren wurden für genetische *in vivo*-Studien, meist in Mäusen, benutzt. Die erste effektive RNAi-vermittelte Repression eines Gens im adulten Tier führte unter Verwendung sowohl von siRNA als auch von shRNA-exprimierenden Plasmiden zu einer Inhibierung der Expression eines Luciferase-Reportergens in der Leber von Mäusen (McCaffrey et al., 2002). In weiteren Experimenten konnten siRNAs oder Plasmid-Vektoren mittels direkter Injektion in Mäuse eingebracht werden (Lewis et al., 2002; Layzer et al., 2004). Länger andauernde *in vivo*-Effekte konnten dagegen nur in stabiler Situation beobachtet werden.

So konnte das Wachstum einer Tumorzelllinie, in welche zuvor eine Kasette zur konstitutiven Expression von shRNA gegen das Onkogen Ras integriert wurde, in einem Xenograft-Modell inhibiert werden (Brummelkamp *et al.*, 2002b). Sogenannte Mosaik-Mäuse wurden geschaffen, indem man Stammzellen mit stabil integrierten RNAi-Systemen generierte und diese zur Regeneration von Organen verabreichte (Rubinson et al., 2003; Hemann et al., 2003). In anderen Ansätzen wurden durch stabile Integration konstitutiv aktiver RNAi-Kassetten in embryonale Stammzellen der Maus Tiere geschaffen, welche die Expression eines bestimmten Zielgens inhibierten (Hasuwa et al., 2002; Carmell et al., 2003; Kunath et al., 2003). Diese neu erworbenen Eigenschaften waren vererbbar und traten ebenso in den Folgegenerationen der Tiere auf. Letzten Endes könnte stabile RNAi durch Entwicklung transgener Tiere angewendet werden und in induzierbarer oder gewebsspezifischer Unterdrückung eines oder mehrerer Gene resultieren. Durch die Erstellung Genomumfassender Bibliotheken von siRNAs könnte so die Funktion von Genen auf breiter Ebene definiert werden. In kleinerem Umfang wurde dies bereits in verschiedenen Studien getan. So wurden z. B. durch den Einsatz von 148 verschiedenen siRNAs Gene aus dem Signalweg der PI 3-Kinase (*phosphatidyl-inositol 3-OH kinase*) gesucht, welche Akt, ein Substrat der PI 3-Kinase phosphorylierten (Hsieh et al., 2004). In weiteren Experimenten wurde eine Bibliothek shRNA-exprimierender Vektoren gegen de-ubiquitinierende Enzyme eingesetzt, um die Relevanz solcher Enzyme bei der Krebsentstehung zu studieren. Dabei wurde das Tumorsuppressorgen CYLD (*cylindromatosis susceptibility gene*) als Suppressor der Aktivität von NF κ B, einem für Proliferation, Immunantwort und Apoptose sehr wichtigen Transkriptionsfaktor, identifiziert (Brummelkamp et al., 2004). shRNA-Bibliotheken könnten

auch durch phänotypisches *Screening* von Zellen, wie z. B. dem Wachstumsverhalten, untersucht werden. Auf diese Weise wurden fünf neue Gene identifiziert, welche Einfluß auf den p53-Signalweg hatten (Berns et al., 2004). Durch diese und weitere Entwicklungen wird es voraussichtlich möglich sein, die Signaltransduktion nicht nur von Zelllinien, sondern auch von gesamten Organismen zu beschreiben.

1.4.4 Potential von RNA-Interferenz als Therapieform gegen Krebs

Die Entdeckung und Erforschung der RNA-Interferenz führte zu der Erkenntnis, diese nicht nur als Werkzeug zur Erforschung von Genfunktionen anzusehen. Vielmehr steigerten sich im Laufe der Zeit die Erwartungen, diese Methode für die Therapie zu nutzen. Obwohl die Wirksamkeit von siRNA bereits in Tiermodellen bestätigt wurde, ist für die Anwendung von siRNA im Rahmen möglicher Therapien gegen Krebs die Bewertung ihrer Wirksamkeit in Tumorzellen zwingend erforderlich. Zunächst jedoch müssen geeignete Zielgene, welche Einfluß auf die Proliferation der Zellen haben, identifiziert und ausgewählt werden. In der Praxis sind dies häufig mutierte oder translozierte Gene. So wurde bereits die Expression prominenter Gene wie K-Ras (Brummelkamp et al., 2002b), mutiertem p53 (Martinez et al., 2002) oder Her2/neu (Faltus et al., 2004; Choudhury et al., 2004) effizient unterdrückt. Nach Auswahl relevanter Zielgene ist eine optimale Gestaltung der siRNA-Sequenzen nach den in Kap. 1.4.2 beschriebenen Kriterien erforderlich. Des Weiteren müssen funktionelle Analysen, beispielsweise über Morphologie, Proliferation oder Apoptoserate der verwendeten Tumorzellen durchgeführt werden, um die Anti-Tumor-Effekte verstehen und bewerten zu können. In nachfolgenden *in vivo*-Studien müssen zugehörige Modelle abgeleitet werden, durch welche siRNA-Effekte auf Tumoren beschrieben werden. Letzten Endes bleibt die hauptsächliche Herausforderung zur Entwicklung von RNAi-basierten Therapien bestehen. Sie liegt in der geeigneten Zuführung der Konstrukte an ihren Zielort. So sollten siRNAs idealerweise ins Zytoplasma der Zielzellen innerhalb des Zielgewebes eingeschleust werden. Expressionsplasmide sollten dagegen vermehrt in die Kerne der Zellen gelangen. Einige Experimente führten bereits zur erfolgreichen Einschleusung von siRNA *in vivo*. So wurden mittels direkter hydrodynamischer Applikation wirksame siRNAs in einem großen Volumen physiologischer Kochsalzlösung in Mäuse injiziert (McCaffrey et al., 2002; Lewis et al., 2002). Dies führte zur erfolgreichen Unterdrückung der Expression von Luciferase- und GFP-Reportergenen. In einer weiteren Studie wurde durch intranasale Injektion reiner siRNA die Expression von HO-1 (Häm-Oxygenase 1) der Maus unterdrückt (Zhang et al., 2004). Im Falle der systemischen Applikation von siRNA sind Methoden zur gewebspezifischen

Einschleusung in bestimmte Organe von Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen einer Studie siRNAs durch Anlagerung von Cholesterol-Konjugaten modifiziert. Diese Modifikationen führten zu einer vermehrten Bindung der siRNAs an Serumalbumin-Moleküle des Blutes, wodurch sie gegenüber Nukleasen resistenter wurden. Die Folge war ein deutlicher Anstieg modifizierter siRNAs in der Leber von Mäusen (Soutschek et al., 2004).

Obwohl diese Methoden der direkten Applikation nackter siRNAs in Mäusen zum Erfolg führten, ist es schwer vorstellbar, sie eines Tages unter den bisherigen Voraussetzungen beim Menschen anzuwenden, da einige massive Hürden überwunden werden müßten. Hier spielen in erster Linie Hindernisse wie die Aktivität von Nukleasen in den Blutgefäßen eine Rolle. Um siRNAs dennoch gewinnbringend für die Krebstherapie einzusetzen, liegt das Augenmerk bei einem der Forschungsansätze deshalb auf der Entwicklung geeigneter Vehikel, welche einen Angriff durch Nukleasen massiv erschweren. So konnten siRNAs zusammen mit Atelokollagen, einem neutralen, nicht toxischen Makromolekül, komplexiert werden und durch intravenöse Verabreichung eine Inhibition der Luciferase-Expression in Xenograft-Tumoren von Mäusen erreicht werden (Minakuchi et al., 2004). In einem orthotopen Mausmodell wurden kationische Lipid-Vesikel mit siRNAs gegen Bcl-2 formiert und Tumor-tragenden Mäusen intravenös verabreicht. Die Folge war ein starker anti-tumoraler Effekt auf die vorhandenen Leber-Metastasen (Yano et al., 2004). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, daß durch intravesikale Injektion von siRNA-beladenen Liposomen das Wachstum von Blasenkrebs in einem orthotopen Mausmodell durch Unterdrückung der Plk1-Expression erfolgreich inhibiert werden konnte (Nogawa et al., 2005).

Neueste Studien beschäftigen sich mit der Entwicklung von Tumor-spezifischem „targeting“, der gezielten Einschleusung der Wirksubstanz in Tumorzellen. Dazu müssen spezifische Determinanten berücksichtigt werden, welche Tumorzellen angreifbar machen. In der Regel sind dies überexprimierte Rezeptoren auf der Oberfläche betreffender Zellen. Durch Bindung des Her2/neu-Rezeptors, welcher in einigen Brusttumoren überexprimiert ist, konnte über Antikörper-vermittelte Endozytose die erfolgreiche Aufnahme von siRNAs in Xenograft-Tumoren der Maus gezeigt werden (Song et al., 2005). Dazu wurden Konstrukte aus Her2/neu-spezifischen Antikörper-Fragmenten und Protamin hergestellt, an welche siRNA gebunden werden konnte. Durch ein Gemisch von siRNAs, welche gegen die Wachstumsgene VEGF (*vascular endothelial growth factor*), c-myc und MDM-2 gerichtet waren, konnte eine erfolgreiche Inhibition von Melanomen in Xenograft-Mäusen erreicht werden.

Trotz all dieser Erfolge bleibt das Problem der vergleichsweise massenhaften Herstellung von siRNAs für eine mögliche Therapieform beim Menschen ungelöst. Denn eine

Verpackungsstrategie kann die benötigten Mengen zwar reduzieren, bleibt aber auf die sehr aufwendige und teure chemische Synthese von siRNAs angewiesen. Um wirkungsvolle Effekte zu erzielen, geht man bei Mäusen von einer täglich zu applizierenden Dosis von 50 mg siRNA pro kg Körpergewicht aus (Soutschek et al., 2004). Dies würde umgerechnet bedeuten, daß für einen Menschen mit einem Körpergewicht von 75 kg eine tägliche Dosis von 3,75 g siRNA notwendig wäre, was bei einer massenhaften humanen Anwendung denkbare Produktionskapazitäten übersteigen dürfte. Dagegen scheint für die Zukunft die Applikation von Plasmiden zur Expression von shRNA mehr Erfolg zu versprechen als eine siRNA-Therapie. Zum einen genügt eine geringere Wirkdosis bei Mäusen, um gleiche Effekte auszulösen (McCaffrey et al., 2002). Zum anderen ist die Herstellung von Plasmiden unaufwendig und steht somit in keinem Verhältnis zur Synthese von siRNA.

1.5 Das Tet-System als induzierbares Genexpressionssystem

1.5.1 Das prokaryotische Tet-System

Die beteiligten Komponenten des prokaryotischen Tet-Systems (Tetrazyklin-Systems) wurden in Zusammenhang mit der Resistenz mancher *E. coli*-Stämme gegen das Antibiotikum Tetrazyklin entdeckt. Für diese Resistenz spielen Gene, welche in Tn.10 (Transposon 10) resistenter Bakterien lokalisiert sind, eine wichtige Rolle: Das TetA-Protein, ein Protonen-[Tetrazyklin/Mg]⁺-Antiporter, welcher in der Bakterienmembran lokalisiert ist, bewirkt unter Einschleusung von Protonen die gleichzeitige Ausschleusung von Tetrazyklin (Yamaguchi et al., 1990; Yamaguchi et al., 1991). Die Expression des TetA-Proteins wird auf transkriptioneller Ebene vom Tetrazyklin-abhängigen TetR (Tetrazyklin-Repressor) reguliert. In Abwesenheit des Induktors Tetrazyklin bildet TetR ein Dimer und bindet an TetO₁ und TetO₂ (Tetrazyklin-Operator 1 und 2), zwei Operatorsequenzen, welche innerhalb des Promotors für das Resistenzgen TetA und des eigenen Promotors für TetR lokalisiert sind. Dadurch wird die Genexpression von TetA und TetR blockiert. Betritt nun Tetrazyklin die Zelle, so bindet es als [Tetrazyklin/Mg]⁺-Komplex an TetR (Takahashi et al., 1986). Aufgrund der nun erfolgenden Konformationsänderung von TetR (Orth et al., 2000), wird die weitere Bindung von TetR an die Operatorsequenzen TetO₁ und TetO₂ verhindert (Lederer et al., 1996) (siehe auch Abb. 1.5). Die Folge ist ein massiver Anstieg der Expression von TetA und TetR, die zu einer schnellen Reduzierung der intrazellulären Tetrazyklin-Konzentration führt (McMurry et al., 1980), wodurch die Expression von TetA und TetR erneut unterdrückt wird. Somit liegen der Expression beider Gene negative Rückkopplungsmechanismen zugrunde.

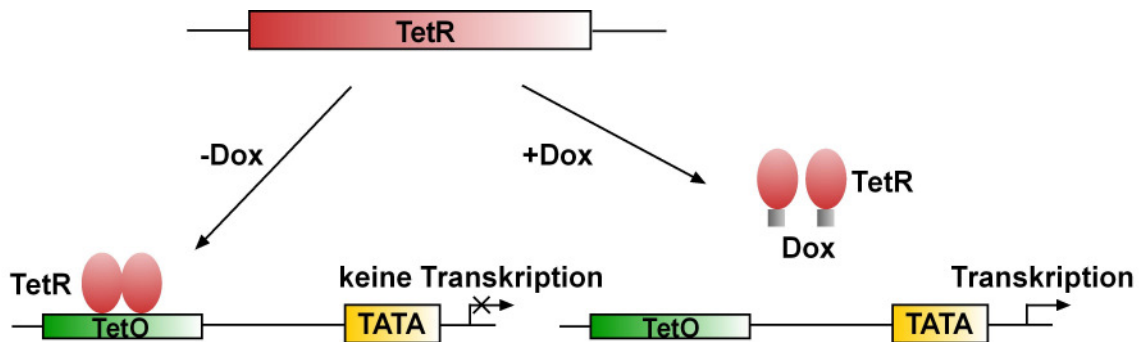


Abb. 1.5: Die Funktion des Tet-Repressors (TetR) innerhalb des prokaryotischen Tet-Systems. In Abwesenheit von Doxyzyklin (Dox), einem synthetischen Tetrazyklin-Analogen besetzt der prokaryotische TetR (rot dargestellt) seine zugehörige Operatorsequenz TetO (grün dargestellt) innerhalb eines Promotors, wodurch die RNA-Polymerase blockiert wird und keine Expression eines nachgeschalteten Gens stattfinden kann. Dagegen bewirkt die Anwesenheit von Doxyzyklin eine Konformationsänderung der Struktur von TetR, wodurch der Kontakt zu TetO verloren geht. Die Folge ist eine Aufhebung der Blockade des beteiligten Promotors, worauf die RNA-Polymerase mit der Transkription eines nachgeschalteten Gens beginnen kann. TATA = TATA-Box (gelb dargestellt).

Steigende Expressionsraten des TetA-Proteins sind schädlich für die Bakterienzelle, eine Überexpression aufgrund des steigenden Membranpotentials gar lethal (Berg et al., 1988; Eckert und Beck, 1989). Deshalb muß die Expression von TetA in Abwesenheit von Tetrazyklin strikt unterdrückt werden. Auf der anderen Seite muß das Protein nach Diffusion von Tetrazyklin in die Zelle so schnell exprimiert werden, daß es noch vor einer Steigerung der zytoplasmatischen Tetrazyklin-Konzentration, welche eine Translationshemmung hervorruft, exprimiert werden kann. Dies erfordert zum einen eine hohe Affinität von TetR für TetO und zum anderen eine hohe Affinität von Tetrazyklin für TetR, damit auf der einen Seite die Basalaktivität des TetA-Promotors gering gehalten wird, gleichzeitig aber sichergestellt wird, daß bei steigenden intrazellulären Tetrazyklin-Konzentrationen die Expression von TetA rechtzeitig anspringt, bevor die Translation inhibiert wird. Dazu gehört, daß TetA in einer hohen Frequenz, aber nur kurzzeitig, exprimiert wird. Für eine sensitive Induktion der TetA-Expression ist eine geringe TetR-Expression vonnöten, da *E. coli*-Stämme mit einer hohen TetR-Expressionsrate für eine Induktion sehr hohe Tetrazyklin-Konzentrationen benötigen (Bertrand et al., 1984).

1.5.2 Anwendungen des prokaryotischen Tet-Systems in eukaryotischen Organismen

Die beschriebenen Eigenschaften der feinen Regulierbarkeit von TetR zusammen mit der langjährigen Verwendung von Tetrazyklin in klinischen Versuchen machten sich einige Forscher zunutze, indem sie TetR für die Regulation der Transkription in eukaryotischen Systemen einsetzten (Gossen et al., 1993; Saez et al., 1997; Baron und Bujard, 2000). In der

ersten Studie, welche Tetrazyklin-induzierbare Regulation der Genexpression in eukaryotischen Organismen beschreibt, wurde der ursprüngliche bakterielle TetR benutzt, um die Transkription zu reprimieren (Gatz und Quail, 1988). Dabei wurde durch einfache Bindung des TetR an seine Operatorsequenz, welche zuvor in direkte Nachbarschaft der TATA-Box oder des Transkriptionsstartpunktes eingefügt wurde, die Bindung der RNA-Polymerase und weiterer Transkriptionsfaktoren blockiert (Gatz et al., 1991; Gossen et al., 1993). Die Expression des TetR stand unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors mit hoher Expressionsrate. In nachfolgenden Studien wurden regulierbare Genexpressionssysteme auf Basis aller drei Typen von RNA-Polymerase-abhängigen Promotoren entwickelt. So wurde ein RNA-Polymerase I-abhängiger Promotor unter Tetrazyklin-regulierbare Kontrolle gestellt, indem man eine TetO-Sequenz unmittelbar stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes einfügte (Yan et al., 2001). In einem weiteren Experiment wurden alternativ ein oder zwei TetO-Sequenzen in unmittelbarer Nachbarschaft der TATA-Box eines RNA-Polymerase III-abhängigen Promotors eingefügt (Ohkawa und Taira, 2000). Hierbei wurde für den Promotor-Typ mit zwei inserierten TetO-Sequenzen eine vollständige Inhibition der Genexpression beobachtet. Des Weiteren wurde eine TetR-vermittelte Inhibition der RNA-Polymerase II-abhängigen Expression in Pflanzen (Heins et al., 1992), Pilzen (Faryar und Gatz, 1992) und Säugerzellen (Yao et al., 1998) erreicht. Diese geschah am besten durch Insertion mehrerer TetO-Sequenzen in unmittelbare Nachbarschaft der TATA-Box betreffender Promotoren. Dagegen mußte die Insertion von ein bis vier TetO-Sequenzen unmittelbar stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes erfolgen, um die Genexpression RNA-Polymerase II-abhängiger Promotoren in Einzellern zu unterdrücken (Hamann et al., 1997; Sun und Tai, 2000). Durch die Beobachtung verbliebener Basalaktivitäten nach Bindung von TetR an die zugehörige(n) TetO-Sequenz(en), welche in einer nicht vollständigen Repression der Genexpression sichtbar ist, wurde deutlich, daß nicht nur die Anzahl der eingefügten TetO-Sequenzen, sondern auch deren Lokalisation entscheidenden Einfluß auf die Restaktivität des betreffenden Promotors hatten.

1.5.3 Das eukaryotische Tet-System durch Entwicklung von Transaktivatoren und Transrepressoren

Während der bakterielle TetR als transkriptioneller Repressor in Pflanzen und niederen Eukaryoten fungieren kann, ist er in Säugerzellen bislang weniger häufig eingesetzt worden (Yao et al., 1998). Zur Erlangung einer beständig funktionellen Form in Säugerzellen wurde

TetR deshalb mit verschiedenen regulatorischen Domänen fusioniert, wodurch Hybridproteine entstanden.

Durch die Bindung einer RNA-Polymerase II-spezifischen Aktivierungsdomäne aus VP16 (*virion protein 16*), welche aus dem Herpes-Simplex-Virus stammt, wurde ein tTA (*transcriptional transactivator* = transkriptioneller Transaktivator) geschaffen, welcher in Abwesenheit von Tetrazyklin TetO-Sequenzen bindet (Gossen und Bujard, 1992). Als korrespondierender Promotor wurde ein RNA-Polymerase II-abhängiger Minimalpromotor aus dem humanen Cytomegalovirus (CMV) verwendet. An diesen Promotor wurde ein Element aus Transposon 10 von *E. coli* angehängt, welches sieben TetO-Sequenzen in Tandem-Struktur enthielt. Nach der genomischen Integration des so entwickelten induzierbaren Promotors in das Genom von tTA-exprimierenden Säugerzellen, bindet exprimierter tTA an seine korrespondierenden Operatorsequenzen innerhalb des induzierbaren Promotors und initiiert durch Zusammenlagerung des Transkriptionskomplexes die Expression nachgeschalteter Gene. Die Anwesenheit von Doxyzyklin, einem synthetischen Tetrazyklin-Analogen, bewirkt dagegen eine Konformationsänderung der TetR-Domäne, wodurch sich tTA von seinen Operatorsequenzen löst und folglich eine Expression nachgeschalteter Gene unterdrückt wird (siehe auch Abb. 1.6). Ein Problem der tTA-vermittelten Genexpression bestand zunächst in der geringen Stabilität des tTA-Transkriptes. Durch nachfolgende Studien, in welchen Schnittstellen für Endonukleasen, potentielle Spleißstellen und Haarnadelstrukturen entfernt wurden, konnte eine deutliche Erhöhung der mRNA-Stabilität und eine damit verbundene verstärkte Expression erreicht werden (Wells et al., 1999; Urlinger et al., 2000a; Stebbins et al., 2001). Eine weitere Schwachstelle des entwickelten Systems war die vorhandene Basalaktivität des Promotors in Anwesenheit von Doxyzyklin, welche von der Lokalisation der TetO-Sequenzen abhängig war. Hier konnte durch Modifikationen ebenfalls Abhilfe geschaffen werden (Hoffmann et al., 1997). Im Laufe der Zeit gab es immer wieder kritische Stimmen bezüglich der Anwendung des beschriebenen Tet-Off-Systems *in vivo*, da die Aktivierungsdomäne VP16 einen viralen Ursprung hat und die Infektion von Herpes-Simplex-Viren eine zelluläre Immunantwort beim Menschen auslöst (Ashley et al., 1994; Mikloska und Cunningham, 1998). Nach diesen Argumenten könnten bei Verwendung von VP16-basierten Transaktivatoren Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden. Dagegen spricht, daß in Mäusen, welche rtTA (*reverse* tTA = reverser transkriptioneller Transaktivator, siehe Kapitel 1.5.4) exprimierten, keine störenden Effekte beobachtet wurden (Bohl et al., 1997).

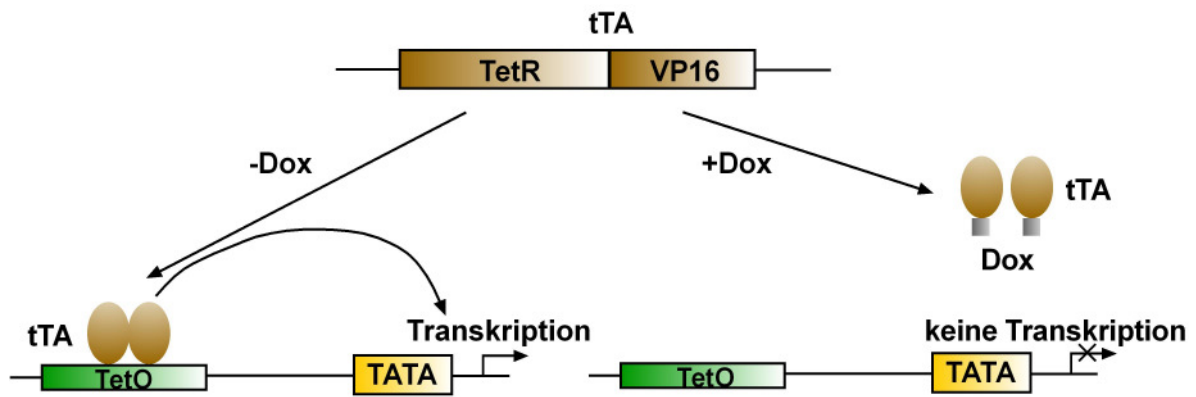


Abb. 1.6: Das eukaryotische Tet-Off-System. Durch Schaffung eines Hybridproteins, bestehend aus dem prokaryotischen TetR und der eukaryotischen Aktivierungsdomäne VP16 wurde ein transkriptioneller Transaktivator (tTA) (braun dargestellt) geschaffen. In Anwesenheit des Effektors Doxyzyklin (Dox) kann tTA durch Konformationsänderung der TetR-Domäne die zugehörige TetO-Sequenz (grün dargestellt) nicht binden, wodurch die Aktivierung des Transkriptionsstarts unterdrückt wird. Das Entfernen von Doxyzyklin aus der Umgebung versetzt die TetR-Domäne in ihren ursprünglichen Zustand, sodaß tTA an TetO bindet und folgend die Transkription des nachgeschalteten Gens startet. TATA = TATA-Box (gelb dargestellt).

Um mögliche Immunantworten unwahrscheinlicher zu machen, wurde der vorhandene tTA auf zwei Weisen verändert. Im ersten Fall wurde die VP16-Domäne komplett entfernt und durch eine neu entwickelte Transaktivator-Domäne ersetzt, woraufhin tTA2 entstand. Die Aktivator-domäne von tTA2 wurde durch Verknüpfung dreier minimaler Aktivierungsdomänen, welche aus einem 12 AS umfassenden Motiv von VP16 abgeleitet wurden, gebildet (Baron et al., 1997).

Zum anderen wurde in weiteren Experimenten zur Schaffung alternativer Transaktivatoren eine Vielfalt humaner Aktivierungsdomänen aus sauren, Glutamin-reichen, Serin/Threonin-reichen und Prolin-reichen funktionellen Gruppen auf ihre Fähigkeit hin getestet, VP16 zu ersetzen. Nach der Fusion mit TetR waren dabei ausschließlich saure Aktivierungsdomänen, wie p65 aus NFκB (Urlinger et al., 2000b) oder eine Domäne aus E2F4 (Akagi et al., 2001) aktiv, und somit für die Substitution von VP16 geeignet.

Eine andere Strategie sah vor, den ursprünglichen aus Bakterien stammenden TetR nicht durch Bindung einer Aktivierungsdomäne für das oben beschriebene Tet-Off-System zu benutzen, sondern durch Bindung einer Repressordomäne einen tTR (transkriptioneller Transrepressor; engl. auch tTS = *transcriptional trans-silencer*) zu schaffen (siehe auch Abb. 1.7). Dabei wurde die KRAB (*Krüppel associated box*)-Domäne, eine aus dem humanen Kox1-Gen (*accession no*: NM_015394) stammende Domäne mit TetR fusioniert (Deuschle et al., 1995). Die evolutiv hoch konservierte KRAB-Domäne ist eine Vertreterin der großen Unterklasse der C₂H₂-Krüppel-typischen Zinkfinger-Proteine (Bellefroid et al., 1991; Thiesen et al., 1991; Mark et al., 1999). Sie ist in diesen Zinkfinger-Proteinen N-terminal lokalisiert

und besteht aus den beiden KRAB-Boxen A und B. Nach Bindung an die DNA ist die KRAB-Domäne für die Bildung von Heterochromatin in einem weiträumigen Bereich mit einer beidseitigen Entfernung bis zu 3 kb verantwortlich (Margolin et al., 1994; Pengue et al., 1994; Witzgall et al., 1994; Moosmann et al., 1997).

Die KRAB-Domäne gilt bis heute als die potenteste Repressordomäne für die Transkription im Säugersystem. Durch Verwendung des tTR konnte eine komplette Inhibition der Transkription erreicht werden, wobei sogar CMV-Promotoren, deren Expressionsraten durch Verstärkerelemente (*enhancer*) zusätzlich erhöht wurden, komplett ausgeschaltet werden konnten (Ryu et al., 2001). Die Verwendung des tTR schien damit für eine stringendere Unterdrückung der Genexpression geeigneter zu sein als die Verwendung des tTA.

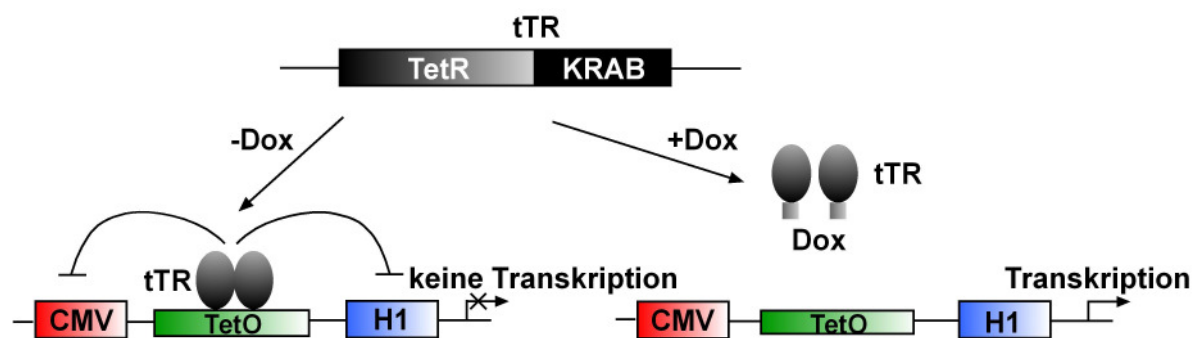


Abb. 1.7: Die Funktion des transkriptionellen Transrepressors (tTR) TetR-KRAB. Durch Fusion von TetR mit der aus dem humanen Kox1-Gen stammenden Repressor-Domäne KRAB wurde ein transkriptioneller Transrepressor (tTR) (schwarz dargestellt) geschaffen. In Abwesenheit von Doxyzyklin (Dox) bindet die TetR-Domäne des tTR an die zugehörige Operatorsequenz (TetO; grün dargestellt). Die Repressor-Domäne KRAB verursacht dabei die Bildung von Heterochromatin in einem beidseitigen Bereich von bis zu 3 kb Entfernung, wodurch benachbarte Promotoren, wie z. B. der CMV-Promotor (rot dargestellt) oder der H1-Promotor (blau dargestellt) inhibiert werden. Die Folge ist ein völliges Erliegen der Genexpression in betreffendem Bereich. Die Anwesenheit von Doxyzyklin bewirkt eine durch Konformationsänderung hervorgerufene Bindungsunfähigkeit von tTR an TetO, wodurch die Transkription benachbarter Gene stattfinden kann.

1.5.4 Das eukaryotische Tet-On-System

Die tTA-vermittelte Regulation der Genexpression hat einen dynamischen Bereich, in welchem sie gut funktioniert. In der Praxis existieren jedoch einzelne Nachteile. So muß Tetrazyklin kontinuierlich anwesend sein, um die Genexpression zu unterdrücken. Obwohl Tetrazyklin in den für die Genregulation benötigten Konzentrationen nicht toxisch ist, ist eine lange Einwirkungszeit des Antibiotikums in transgenen Tieren nicht erstrebenswert und erscheint somit für eine Gentherapie ungeeignet. Des weiteren erfolgt die Induktion eines so kontrollierten Gens sehr langsam, da das Antibiotikum komplett aus betreffendem Organismus oder der Kultur entfernt werden muß. Im Hinblick darauf, daß Genregulation innerhalb von Kulturen oder Organismen leichter durch Applikation einer Effektor-Substanz ausgelöst werden kann, als durch Verminderung einer Substanz (Kistner et al., 1996), wurde

ein rtTA (*reverse transcriptional transactivator* = reverser transkriptioneller Transaktivator) entwickelt, welcher die Operatorsequenz für TetR nur in Anwesenheit eines Induktors bindet (Gossen et al., 1995) (siehe auch Abb. 1.8). Für die Entwicklung des rtTA wurde die geläufige, aus tTA bekannte Transaktivator-Domäne VP16 belassen, die TetR-Domäne des Hybridproteins, welche bisher in Abwesenheit von Tetrazyklin an die zugehörige Operatorsequenz band, wurde jedoch durch Mutation verändert (Gossen et al., 1995).

Diese Mutation der TetR-Domäne führte zu einer Konformationsänderung des DNA-Bindemotivs, wodurch rtTA die Fähigkeit verlor, in Abwesenheit des Induktors an TetO-Sequenzen zu binden. Hingegen bewirkte die Bindung des Induktors eine Konformationsänderung der mutierten TetR-Domäne, wodurch die Fähigkeit erlangt wurde, TetO-Sequenzen zu binden und folgend die Genexpression zu starten. Somit konnte unter Verwendung des rtTA der Zeitpunkt der Induktion präziser kontrolliert werden, als unter Verwendung des tTA.

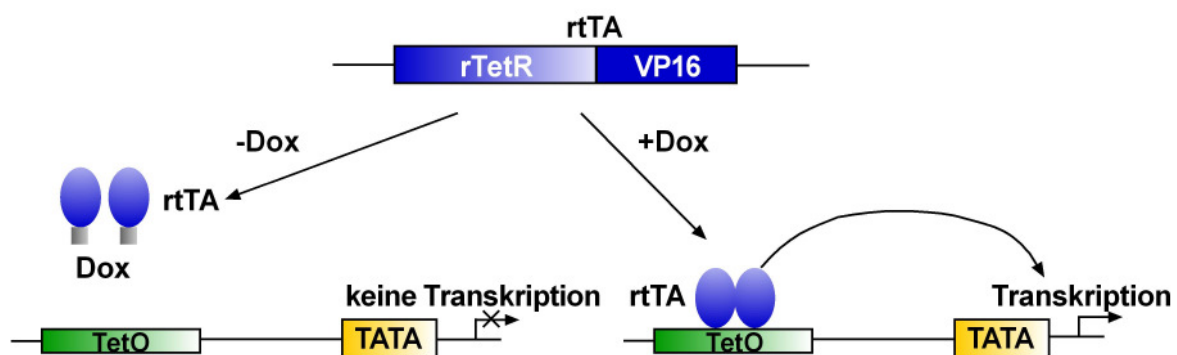


Abb. 1.8: Das eukaryotische Tet-On-System. Durch Schaffung eines reversen transkriptionellen Transaktivators (rtTA) (blau dargestellt), bestehend aus einer reversen TetR-Domäne und der Aktivierungsdomäne VP16, wurden die Eigenschaften des tTA aus dem Tet-Off-System umgekehrt. Dazu waren Mutationen innerhalb der ursprünglichen TetR-Domäne erforderlich, um die Bindungsfähigkeit von rtTA an TetO (grün dargestellt) in Abwesenheit von Doxyzyklin (Dox) zu unterdrücken. Erst durch die Doxyzyklin-vermittelte Konformationsänderung der reversen TetR-Domäne erlangt rtTA die Fähigkeit an TetO zu binden, wodurch die Transkription aktiviert wird.

Die Anwendung des so geschaffenen Tet-On-Systems offenbarte trotz Abwesenheit von Induktoren gelegentlich auftretende Basalaktivitäten der beteiligten Promotoren, sowie geringe Sensitivitäten nach Induktion mit dem Antibiotikum. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden interne Modifikationen des rtTA vorgenommen, welche in der Entwicklung zweier Derivate resultierten. Während durch die Bindung des Derivates rtTA-S2 die Basalaktivität verwendeter Promotoren gesenkt wurde, zeigte rtTA-M2 eine erhöhte Sensitivität gegenüber Tetrazyklin / Doxyzyklin (Urlinger et al., 2000a). Das eukaryotische Tet-On-System unter Verwendung des rtTA-M2 ist bislang das häufigste in transgenen Tieren eingesetzte induzierbare Genregulationssystem (Ohno-Matsui et al., 2002; Grill et al., 2003).

1.5.5 Induktionsbereiche der verschiedenen Komponenten von Tet-Off- und Tet-On-System

Die Transaktivatoren tTA aus dem Tet-Off-System und rtTA aus dem Tet-On-System zeigten in Studien über induzierbare Genexpression unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber verschiedenen Tetrazyklin-Derivaten. Während tTA durch Tetrazyklin, Doxyzyklin und Anhydrotetrazyklin angesprochen werden konnte (Baron et al., 1999), antwortete rtTA nur auf Doxyzyklin und Anhydrotetrazyklin (Gossen et al., 1995). Des Weiteren war tTR gegenüber Doxyzyklin ungefähr zweifach weniger sensitiv als rtTA (Rossi et al., 1998). Der Induktionsbereich von tTA durch Doxyzyklin (0,1–10 ng/ml) lag deutlich unterhalb jenem von rtTA (100–3000 ng/ml) (Baron et al., 1999), überlappte aber mit dem Induktionsbereich des sensitiveren rtTA-M2 (2–200 ng/ml) (Urlinger et al., 2000a). Die der unterschiedlichen Sensitivität zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang weitestgehend unbekannt. Die Entdeckung des Tetrazyklin-Antagonisten GR33076X für die spezifische Bindung an TetR (Chrast-Balz und Hooft, 1996) und die Beschreibung seiner Wirkungsweise in Pflanzen (Love et al., 2002) lassen die Entdeckung weiterer TetR-Induktoren als wahrscheinlich erachten.

1.5.6 Vorteile des Tet-Systems gegenüber alternativen induzierbaren Systemen

In seinen vielen Variationen mit beteiligten Transaktivatoren, Transrepressoren und induzierbaren Promotoren sind die Tet-Systeme die am meisten verbreiteten und am häufigsten angewandten induzierbaren Genregulationssysteme. Im Gegensatz zu anderen induzierbaren Systemen für die konditionelle Expression von Genen, wie Steroidhormon-regulierten Systemen (Graham, 2002), Schwermetallionen- (Skroch et al., 1993) oder Hitzeschock-Protein-basierten Systemen (Leppä und Sistonen, 1997), deren beteiligte Promotoren durch hohe Basalaktivitäten im nicht-induzierten Zustand gekennzeichnet sind, und LacR- (Lactose-Repressor) basierten Expressionssystemen (Deuschle et al., 1989; Deuschle et al., 1990; Labow et al., 1990), welche schwer induzierbar sind und nur schwache Expressionsraten aufweisen, kann das Tet-System höheren Ansprüchen genügen. Solche Ansprüche bestehen in der Forderung nach geringer Basalaktivität der beteiligten Promotoren und einer präzisen, variablen und reversiblen Regulierbarkeit. Diese Eigenschaften der feinen Regulierbarkeit werden durch die in Kap. 1.5.5 beschriebenen sehr breit gefächerten Induktionsbereiche der verschiedenen Transaktivatoren und Transrepressoren deutlich. Diese

Induktionsbereiche umfassen Effektor-Konzentrationen von über einer Zehnerpotenz (rtTA) bis hin zu zwei Zehnerpotenzen (tTA und rtTA-M2).

1.6 RNA-Polymerase III (Pol III)-abhängige Promotoren

Eukaryotische Expressionssysteme bedienen sich für die Transkription von Genen in der Regel dreier Typen von RNA-Polymerasen. So sind Promotoren von Genen, welche zelluläre Proteine kodieren, RNA-Polymerase II-abhängig. Die RNA-Polymerase II ist somit für die Produktion sämtlicher mRNAs (*messenger RNAs*), welche folgend translatiert werden, verantwortlich. RNA-Polymerase vom Typ I steuert dagegen die Expression großer rRNAs (ribosomaler RNAs), während kleine strukturelle RNAs, wie tRNA (transfer RNA), 5S rRNA und einige andere nicht kodierende RNAs von RNA-Polymerase III-Enzymen exprimiert werden (Paule und White, 2000).

Die Promotoren von RNA-Polymerase I- und II-spezifischen Genen sind sehr komplex aufgebaut. Meistens befinden sich zusätzliche regulatorische Elemente innerhalb der zu transkribierenden Regionen. Deshalb eignen sich solche Promotoren nur bedingt für die Expression exogener Gene. Da funktionelle Studien oftmals mittels Überexpression der betreffenden Gene durchgeführt werden, setzten sich virale Promotoren für die Expression exogen eingebrachter Gene durch, welche RNA-Polymerase II-abhängig sind. Virale Promotoren zeichnen sich nach Betreten der Zielzelle durch eine früh beginnende RNA-Synthese und meist sehr hohe Expressionsraten aus. In diesem Zusammenhang sind die Promotoren CMV (*Cytomegalovirus*) und SV40 (*simian virus 40*) zu nennen, welche bislang sehr weite Anwendungsgebiete fanden. Des weiteren machte man sich für die Expression exogener Gene auch andere regulatorische Motive zunutze, z. B. SV40-polyA oder HSV-TK-polyA (*Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-polyA*), zwei Signale für die Termination der Transkription.

1.6.1 RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren zur Expression von siRNAs oder shRNAs

Für die Expression von siRNAs oder shRNAs liegt es nahe, sich der RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren zu bedienen, welche in ursprünglicher Funktion die Expression kleiner endogener RNAs steuern. Der hauptsächliche Vorteil von RNA-Polymerase III-basierten Systemen liegt in ihrer hohen Expressionsaktivität von 4×10^5 Transkripten pro Zelle und dem Fakt, daß keine zusätzlichen Nukleotide an das Transkript angehängt werden, welche die funktionale Wirkungsweise und Spezifität der exprimierten shRNAs negativ

beeinflussen könnten. Vertreter aus der Familie der RNA-Polymerase III-spezifischen Promotoren sind untereinander hoch konserviert. Ihre in 5'-Richtung des Transkriptionsstarts lokalisierte Struktur zeichnet sich durch das Vorhandensein von vier wichtigen Sequenz-Elementen aus, welche für die Transkription wichtig sind: Die TATA-Box, ein in den meisten Promotoren vorkommendes sehr typisches Motiv, befindet sich meist weniger als 50 bp entfernt vom Transkriptionsstart. Stromaufwärts befindet sich das PSE (proximales Sequenz-Element), gefolgt von einem stromaufwärts lokalisierten DSE (distales Sequenz-Element), welches sich aus einem Oktamer-Motiv (3'-Bereich) und der *staf binding site* (5'-Bereich) zusammensetzt. Das PSE ist neben der TATA-Box das wichtigste Motiv für die Anlagerung des RNA-Polymerase III-Apparates und spielt somit für die Initiation der Transkription eine wichtige Rolle (Paule et al., 2000). Trotz dieser Gemeinsamkeiten unterscheidet man zwischen drei Typen von RNA-Polymerase III-spezifischen Promotoren. Eine besondere Bedeutung im Hinblick auf ihre Verwendung zur Expression von siRNAs oder shRNAs kommt den Promotoren des Typs III zu, da diese im Gegensatz zu RNA-Polymerase III-Enzymen der Typen I und II keine regulatorischen Elemente in 3'-Richtung des Transkriptionsstarts enthalten. So hatten Veränderungen oder gar das Entfernen der ursprünglich zu transkribierenden Sequenz keinerlei negative Auswirkungen auf die Aktivität des U6 snRNA-Promotors. Dieser Vertreter des Typs III der RNA-Polymerase III-Promotoren ist in seiner ursprünglichen Funktion für die Expression von U6 snRNA, einem Bestandteil des Spleißosoms, verantwortlich (Das et al., 1987; Kunkel und Pederson, 1989; Lobo et al., 1990). Den gleichen Sachverhalt unveränderter Promotor-Aktivität, sichtbar in unveränderten Transkriptionsraten, zeigten Studien am 7SK-Promotor, einem weiteren Typ III-Promotor, welcher die Expression einer kleinen nukleären RNA steuert (Murphy et al., 1987). Promotoren des Typs III zeichnen sich des weiteren durch einen definierten Transkriptionsstart, welcher meist 25 bp stromabwärts der TATA-Box liegt, aus (Geiduschek und Kassavetis, 1995). Das Terminationssignal ist ebenfalls genau definiert. So bricht die RNA-Polymerase III bei einem Sequenzmotiv aus fünf aufeinanderfolgenden Thymidinen die Transkription ab, sobald das zweite komplementäre Uridin an das Transkript angehängt wird (Baer et al., 1990). Ein weiteres auffälliges Merkmal der Vertreter von Typ III-Promotoren ist der nahezu konstante Abstand zwischen PSE und TATA-Box, welcher zwischen 15 und 20 Nukleotiden liegt (Lescure et al., 1991; Goomer und Kunkel, 1992). Hieraus wird die bereits oben erwähnte tragende Rolle beider Elemente für die Zusammenlagerung des RNA-Polymerase III-Komplexes deutlich.

In einer Modellvorstellung bindet PTF (PSE-bindender Transkriptionsfaktor) an PSE (Yoon et al., 1995) und tritt mit TBP (TATA-Box-bindendes Protein), welches gleichzeitig an die TATA-Box bindet, sowie TFIIB (Transkriptionsfaktor III B) in Wechselwirkung (Bai et al., 1996). Aufgrund dieser Wechselwirkung kommt es zur Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren, woraufhin die RNA-Polymerase III bindet und einen stabilen Komplex bildet, wodurch der Transkriptionsstart ausgelöst wird (Henry et al., 1995). Eine wichtige Rolle bei der Bindung von PTF an PSE kommt dem Faktor Oct-1 zu, welcher an das Oktamer-Motiv innerhalb des DSE bindet (Murphy et al., 1989). In Anwesenheit von Oct-1 kann PTF deutlich schneller an das PSE binden als in Abwesenheit von Oct-1 (Mittal et al., 1996). Für den 7SK-Promotor verkürzt sich so die Zeit bis zum Transkriptionsstart um das Zehn- bis Zwanzigfache (Murphy et al., 1992). Des Weiteren wurde durch Mutationsanalysen festgestellt, daß Oktamer-Motiv und *staf binding site* zusammen zu voller Promotor-Aktivität beitragen (Danzeiser et al., 1993).

1.6.2 Der U6 snRNA-Promotor

Der am besten charakterisierte RNA-Polymerase III-abhängige Promotor des Typs-III ist der U6 snRNA-Promotor, welcher die Expression des RNA-Teils der U6-Untereinheit des Spleißosoms steuert. Die Bereiche innerhalb des Promotors, welche für wirkungsvolle Expression notwendig sind, sind die vier bekannten Sequenz-Motive, welche in der ca. 300 bp umfassenden Region in 5'-Richtung des Transkriptionsstarts (Position +1) lokalisiert sind. Es handelt sich dabei um die TATA-Box (Position -30 bis -25), das PSE (Position -66 bis -47) und das DSE (Position -244 bis -214), welches sich in Oktamer-Motiv und *staf binding site* untergliedert (Bark et al., 1987; Carbon et al., 1987; Kunkel und Pederson, 1988) (siehe Abb. 1.9).

In einem der ersten Versuche zur Vektor-vermittelten RNA-Interferenz wurde ein U6 snRNA-Promotor-basierter Ansatz verfolgt. Durch Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden inkl. Terminationssignal unmittelbar stromabwärts des definierten Transkriptionsstarts, konnten Plasmide generiert werden, welche unter Kontrolle des U6 snRNA-Promotors konstitutiv shRNA exprimierten. So konnte in dieser Studie die Sequenz-spezifische Inhibition der Genexpression mehrerer Gene in verschiedenen Zelllinien durch intrazellulär generierte shRNAs gezeigt werden (Paddison et al., 2002). In zahlreichen weiteren Studien wurde folgend mittels U6 snRNA-Promotor-basierten Ansätzen die erfolgreiche Expression wirksamer siRNAs/shRNAs bestätigt (Sui et al., 2002; Yu et al., 2002; Lee et al., 2002; Paul et al., 2002). Somit war der U6 snRNA-Promotor nach

Entdeckung der Möglichkeit, shRNA in Säugerzellen zu exprimieren, der zunächst am häufigsten benutzte RNA-Polymerase III-abhängige Promotor.

1.6.3 Der H1-Promotor

Ein neben dem U6 snRNA-Promotor sehr gut charakterisierter Promotor des Typs III von RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren ist der H1-Promotor. Das H1-Gen (*accession no*: X16612) kodiert die RNA-Komponente der humanen nukleären RNaseP, welche bei der 5'-Prozessierung von tRNA-Molekülen im Zellkern beteiligt ist (Baer et al., 1990). Durch mutagene Studien wurde herausgefunden, daß ausschließlich stromaufwärts des Transkriptionsstarts lokalisierte Sequenzbereiche für die Expression der H1-RNA zuständig sind. Hingegen spielen interne Sequenzbereiche in 3'-Richtung des Transkriptionsstarts für die Expression keine Rolle (Hannon et al., 1991). Der H1-Promotor ist im Gegensatz zum U6 snRNA-Promotor deutlich kompakter aufgebaut. So ist seine Sequenzlänge von 100 bp gegenüber jener des U6 snRNA-Promotors um über 200 bp verkürzt (siehe Abb.1.9). Vom Transkriptionsstart ausgehend, hat die TATA-Box des H1-Promotors (Position -30 bis -25) die gleiche relative Lage, wie jene des U6 snRNA-Promotors. Ein großer Unterschied zwischen H1-Promotor und U6 snRNA-Promotor, welcher den H1-Promotor einzigartig macht, besteht jedoch in der Lokalisation von PSE und DSE. Während im U6 snRNA-Promotor PSE und DSE 147 bp voneinander getrennt vorliegen, grenzen sie im H1-Promotor unmittelbar aneinander (PSE: -68 bis -51; DSE: -100 bis -69) (Myslinski et al., 2001). Durch seine Kompaktheit und den genau definierten Transkriptionsstart 25 bp stromabwärts der TATA-Box, sowie einen genau festgelegten Transkriptionsstopp der RNA-Polymerase III bei einem Motiv von fünf direkt aufeinanderfolgenden Thymidinen (Baer et al., 1990), ist der H1-Promotor für die Expression kleiner RNAs mit definierter Länge besonders geeignet. Ein Vorteil des H1-Promotors gegenüber dem U6 snRNA-Promotor mag darin begründet sein, daß Mutationen nahe dem Transkriptionsstart keinen negativen Einfluß auf seine Expressionsaktivität haben. Solche Mutationen sind durch den Einbau von Restriktionsschnittstellen, welche für die Klonierung notwendig sind, unumgänglich.

Die erste Studie, in welcher H1-Promotor-vermittelte konstitutive Expression wirksamer shRNA gezeigt werden konnte, erfolgte nur wenige Wochen nach Veröffentlichung des ersten U6 snRNA-Promotor-vermittelten Systems (Brummelkamp et al., 2002a). Dabei konnte die erfolgreiche Inhibition mehrerer Zellzyklus-relevanter Gene, wie CDH1, Plk1 oder p53 gezeigt werden. In einer weiteren Studie wurden H1-Promotor-basierte Plasmid-Vektoren zur Expression von shRNA mittels Retroviren in Säugerzellen eingeschleust (Brummelkamp et

al., 2002b). So konnte zum ersten Mal die Expression des K-Ras-Onkogens in Tumorzellen unterdrückt werden. Dagegen blieb die Expression des Wildtyp-Allels unbeeinflusst. Die Eignung des H1-Promotors wurde zusätzlich durch eine weitere Studie über Plasmid-Vektor-vermittelte konstitutive Expression von shRNAs (McManus et al., 2002) verdeutlicht.

U6 snRNA-Promotor



H1-Promotor

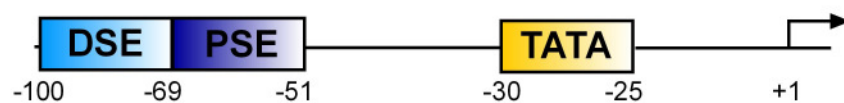


Abb. 1.9: Allgemeine Struktur von RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren des Typs III. Die Besonderheit der Typ III-Promotoren liegt in ihrer Struktur, in welcher die für die Transkription essentiellen Motive ausschließlich in 5'-Richtung des Transkriptionsstarts (+1) liegen. Die zur Expression von siRNA/shRNA am häufigsten verwendeten Vertreter, der U6 snRNA-Promotor und der H1-Promotor, haben einen definierten Transkriptionsstart, welcher 25 bp in 3'-Richtung der TATA-Box (gelb dargestellt) liegt. Ein großer Unterschied zwischen den beiden Promotoren besteht in der Länge ihrer Sequenz. Während im U6 snRNA-Promotor das proximale Sequenzelement (PSE; dunkelblau dargestellt) und das distale Sequenzelement (DSE; hellblau dargestellt) über 100 bp voneinander entfernt liegen, grenzen sie im H1-Promotor direkt aneinander. TATA = TATA-Box

1.7 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen detaillierter Studien kristallisierte sich die essentielle Bedeutung der Polo-like Kinase 1 (Plk1) für die Steuerung mitotischer Prozesse und die damit einhergehende Proliferation von Zellen heraus. Aufgrund der Überexpression in verschiedenen Tumorgeweben wurde zunächst die Bedeutung von Plk1 als Proliferationsmarker deutlich. Der Befund für Tumorzellen, wonach RNAi-vermittelte Unterdrückung der Plk1-Expression eine rapide Inhibition der Zellproliferation und den Eintritt der Zellen in die Apoptose zur Folge hatte, eröffnete die Möglichkeit, Plk1 als potentielles Zielgen für die Krebstherapie anzusehen. Förderlich war in diesem Zusammenhang, daß primäre Zellen, welche keinerlei tumorspezifische Eigenschaften besitzen, auf die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Plk1-Expression nicht angesprochen wurden und unberührt blieben. Zur Charakterisierung der Rolle von Plk1 bei der Krebsentstehung sollen im Rahmen dieser Arbeit zunächst genomische Mutationen des Plk1-Gens in verschiedenen humanen Tumorzelllinien und Primärtumoren aufgespürt werden und, wenn vorhanden, deren systematisches Auftreten

erfaßt werden. Somit könnte die Bedeutung von Plk1 als Zielgen für RNAi-basierte Therapien genauer bewertet werden.

Für das Studium zellulärer Funktionen und Zusammenhänge kann jedoch die Expression von Zielgenen wie Plk1, welche für das Fortbestehen der Zelle essentiell sind, schlecht dauerhaft unterdrückt werden. Deshalb sollte es möglich sein, durch Entwicklung und Etablierung eines genetischen Werkzeuges die Expression von Plk1 präzise zu regulieren. Die Entdeckung der RNA-Interferenz und ihre funktionale Anwendung in Säugerzellen sind hierbei von großer Bedeutung. So konnten in den letzten Jahren mittels intrazellulärer Expression von siRNAs oder shRNAs unter Kontrolle konstitutiver RNA-Polymerase III-abhängiger Promotoren große Erfolge bei der Unterdrückung von Genen erzielt werden. Auf der anderen Seite wurde im Laufe der Jahre eine Vielfalt induzierbarer Genexpressionssysteme entwickelt und etabliert. In diesem Zusammenhang spielen Tet-induzierbare Systeme eine herausragende Rolle, welche aufgrund ihrer beschriebenen Vorteile gegenüber anderen induzierbaren Systemen in verschiedenen Variationen Anwendung fanden und die am häufigsten verbreiteten induzierbaren Systeme für die konditionelle Genexpression in Säugerzellen darstellen. Das eukaryotische Tet-System ist aufgrund seiner vorhandenen Transaktivator-Domänen RNA-Polymerase II-abhängig. Promotoren hingegen, welche für die ursprüngliche Expression kleiner shRNAs zuständig sind und bei der Expression von shRNA eindeutige Vorteile besitzen, sind dagegen RNA-Polymerase III-abhängig. So wurde zu Beginn dieser Arbeit nur in einer einzigen Studie über RNA-Polymerase II-abhängige Expression von siRNA mittels CMV-Promotor berichtet (Xia et al., 2002). Es sollte daher möglich sein, induzierbare Expressionssysteme zur konditionellen Expression von shRNA zu entwickeln und zu etablieren, welche auf Basis des RNA-Polymerase III-abhängigen H1-Promotors und des ursprünglichen prokaryotischen Tet-Systems angelegt sind. Durch ihre Anwendung sollte das Ziel erreicht werden, die Plk1-Expression in Tumorzellen präzise zu regulieren.

In stabilem Zustand könnte so beispielsweise eine dauerhafte Modulation des Plk1-Niveaus ohne artifizielle Nebenwirkungen, welche durch Transfektionen entstehen, erreicht werden. Die RNAi-Technik sollte hier einen großen Vorteil gegenüber alternativen Strategien besitzen. Im Gegensatz zur Verwendung von Inhibitoren der Plk1-Kinasefunktion (Peters et al., 2006; McInnes et al., 2006), welchen bislang keine hohe Spezifität nachgewiesen werden konnte, sollten somit mögliche Nebeneffekte durch die hohe Spezifität von RNAi ausgeschlossen werden können. Kinase-Inhibitoren könnten dagegen Nebeneffekte, beispielsweise durch Hemmung verwandter Kinasen, hervorrufen. Des Weiteren könnte es mit Hilfe eines solchen spezifisch gegen Plk1 gerichteten induzierbaren RNAi-Werkzeuges

möglich sein, mitotische Funktionen von Plk1 genauer und detaillierter zu untersuchen. So könnten zukünftig Prozesse wie beispielsweise Centrosomenreifung, Eintritt in die Mitose oder die Aktivierung des APC/C präzise studiert werden. Des Weiteren könnte der Zusammenhang beleuchtet werden, nach welchem Tumorzellen infolge Plk1-Inhibition Apoptose auslösen.

Neben der Möglichkeit, damit in Zukunft mitotische Funktionen studieren zu können, sollte die Validierung von Plk1 für die Krebstherapie im Vordergrund stehen. Durch Regulation der Plk1-Expression sollte die Möglichkeit bestehen, in das Teilungsverhalten von Tumorzellen einzugreifen. So sollte durch Unterdrückung der Plk1-Expression die Zellproliferation inhibiert werden. Des Weiteren sollen die Auswirkungen einer konditionellen Inhibition der Plk1-Expression auf das Tumorwachstum *in vivo* studiert werden. Dazu sollen betreffende Systeme stabil in das Genom von humanen Tumorzellen integriert werden. Das Wachstumsverhalten von Xenograft-Tumoren, welche aus diesen stabilen Tumorzellen in einem Maus-Modell entstehen, sollte im nicht-induzierten, sowie im induzierten Zustand durch Zugabe von Doxozyklin untersucht werden.

Die Anwendung solcher induzierbarer RNA-Polymerase III-abhängiger Systeme im Hinblick auf die konditionelle Expression von shRNA und die dadurch hervorgerufene RNAi-vermittelte Unterdrückung der Genexpression wurde indes zu Beginn dieser Arbeit noch nicht gezeigt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (München), Applichem (Darmstadt), BD Biosciences (Heidelberg), Fluka (Buchs, CH), ICN Biomedical (Eschwege), J. T. Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Riedel de Haën (Seelze), Perkin Elmer (Köln), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), Pierce (Bonn), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Stratagene (Amsterdam, NL) und VWR Prolabo (Fontenay sous Bois, F) in der Qualitätsstufe p.a. bezogen. Radiochemikalien und Filme von Amersham Biosciences (München) und Perbio (Bonn) wurden verwendet.

Folgende Molekulargewichtsmarker für Proteine wurden benutzt: Precision Plus von Biorad (München) und Cruz Marker von Santa Cruz (Heidelberg).

DNA-Größenmarker (100 bp- und 1 kb-Leiter) wurden von Invitrogen (Karlsruhe), NEB (New England Biolabs, Frankfurt) und Plasmidfactory (Bielefeld) bezogen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Test) wurde BIO-Rad Protein Assay-Lösung von BIO-Rad (München) eingesetzt.

Als Protease-Inhibitor wurde der Protease-Inhibitor-Cocktail Complete™ von Roche (Mannheim) verwendet.

Plastikmaterialien, Membranen, Filtersysteme, Filmmaterialien und weiterer Bedarf für Labor und Zellkultur wurden von den Firmen Amersham Biosciences (München), BD Biosciences (Heidelberg), Beiersdorf (Hamburg), Brand (Wertheim), Braun (Melsungen), Corning (Corning, NY/USA), Dispomed (Gelnhausen), Eppendorf (Hamburg), Fisher Scientific (Schwerte), Greiner (Frickenhäusen), Kimberly-Clark (Roswell, NM/USA), Marienfeld (Lauda-Königshofen), Menzel (Braunschweig), Merck (Frankfurt), Millipore (Eschborn), Molecular BioProducts (San Diego, CA/USA), Nalgene (Rochester, NY/USA), Nunc (Wiesbaden), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Sarstedt (Nümbrecht), Schleicher & Schüll (Dassel), Starlab (Ahrensburg) und Whatman (Maidstone, GB) bezogen.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem H₂O (Aqua bidest.) angesetzt. Lösungen und Puffer wurden 20 min lang bei 121 °C und 2,0 bar autoklaviert oder im Falle der Hitzeinstabilität mit Hilfe von Sterilfiltern (Porenweite 0,22 µm, Fa. Millipore) filtriert.

2.1.2.1 Zusätze für die Herstellung kompetenter Bakterien

TFB I-Puffer

30 mM KAc pH 5,8 (mit 2 M Essigsäure einstellen)
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15% Glycerin (v/v)
in H₂O bidest.
steril filtrieren und bei 4 °C lagern

TFB II-Puffer

10 mM MOPS pH 7,5
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15% Glycerin (v/v)
in H₂O bidest.
steril filtrieren und bei 4 °C lagern

2.1.2.2 Klonierungen und Arbeiten mit DNA

Agaroselösungen für ein x%iges Gel zur Auftrennung von DNA (100 ml)

x g Agarose
ad 100 ml TAE (1 x)
aufkochen und anschließend Gel gießen

DNA-Probenpuffer (10 x)

100 mM EDTA
0,25% Bromphenolblau (w/v)
0,25% Xylencyanol (w/v)
50% Glycerin (v/v)

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml EtBr in TAE (1 x)

Ethidiumbromid-Färbelösung (1 l)

100 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)
ad 1 l TAE (1 x)

Na-Acetat 3 M pH 5,2

3 M NaAc
in H₂O bidest. lösen und mit Essigsäure (96%) auf pH 5,2 einstellen

TAE-Puffer (50 x)

2 M Tris
0,05 M EDTA (pH 8)
1 M Eisessig

TE-Puffer

10 mM Tris pH 7,5
1 mM EDTA pH 8,0

2.1.2.3 Southern-Blot**Denaturierungspuffer für DNA-Gele (Southern-Blot)**

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Depurinierungspuffer für DNA-Gele (Southern-Blot)

0,25 M HCl

Neutralisationspuffer für DNA-Gele (Southern-Blot)

0,5 M Tris-HCl pH 7,0
1,5 M NaCl

SSC-Puffer (10 x)

1,5 M NaCl (w/v)
0,15 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat (w/v)
pH 7,0 mit NaOH einstellen

2.1.2.4 Arbeiten mit RNA und Northern-Blot**Agaroselösung für ein 1,5% iges Gel zur Auftrennung von RNA (100 ml)**

1,5% Agarose (w/v)
10 ml MOPS-Puffer (20 x)
80 ml H₂O bidest.
bei 100 °C aufkochen, anschließend
10 ml 36,5% PFA-Lösung (v/v) zugeben, vor dem Erkalten unter dem Abzug das Gel
gießen

MOPS-Puffer (20 x)

800 mM MOPS
100 mM NaAc
20 mM EDTA
pH 7,0 mit NaOH einstellen

RNA-Probenpuffer (2 x)

48% Formamid (v/v)
10% PFA-Lösung (v/v)
10% MOPS-Puffer (20 x)
6,7% Glycerol (v/v)
1% EtBr (v/v)
0,25% Bromphenolblau (w/v)
0,25% Xylencyanol (w/v)
in H₂O bidest.

SSC-Puffer (20 x)

3 M NaCl (w/v)
0,3 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat (w/v)
pH 7,0 mit NaOH einstellen

Waschpuffer für Northern-Blots (hohe Salzkonzentration: 5 x SSC, 0,1% SDS)

250 ml SSC (20 x)
10 ml 10%ige SDS-Lösung
ad 1 l H₂O bidest.

Waschpuffer für Northern-Blots (hohe Salzkonzentration: 2 x SSC, 0,1% SDS)

100 ml SSC (20 x)
10 ml 10%ige SDS-Lösung
ad 1 l H₂O bidest.

Waschpuffer für Northern-Blots (niedrige Salzkonzentration: 0,1 x SSC, 0,1% SDS)

5 ml SSC (20 x)
10 ml 10%ige SDS-Lösung
ad 1 l H₂O bidest.

2.1.2.5 Arbeiten mit Proteinen und Western-Blot**20% Ammoniumperoxodisulfat (APS)**

2 g APS
ad 10 ml H₂O bidest.
in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern

Blocking-Puffer für Western-Blots

2% BSA (w/v)
in TBST (1 x)
oder
5% Magermilchpulver (w/v)
in PBS (1 x)

Blotpuffer für Western-Blots

1,4% Glycin (w/v)
0,3% Tris (w/v)
20% MeOH (v/v)
in H₂O bidest.

Coomassie-Färbelösung

40% Methanol (v/v)
10% Essigsäure (v/v)
0,125% Coomassie Brilliantblau R 250 (w/v)
in H₂O bidest.

DTT-Stammlösung (1M)

1 M DTT
in H₂O bidest. lösen und mit 10 mM NaAc auf pH 5,2 einstellen
in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern

ECL-Lösung für Western-Blots

Lösung A:

200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)

50 mg Luminol lösen

Lagerung bei 4 °C

Lösung B:

11 mg p-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO

in Dunkelheit bei RT lagern

Lösung C:

30-35% H₂O₂-Lsg. (w/v)

fertige Gebrauchslösung:

2 ml Lösung A mit 200 µl Lösung B und 0,6 µl Lösung C mischen und auf Membran inkubieren

Laufpuffer für Bis/Tris-Gele

50 mM MOPS

50 mM Tris

0,1% SDS (w/v)

1 mM EDTA

in H₂O bidest.

pH 7,7 einstellen

Laufpuffer für Tris/Glycin-Gele

1,4% Glycin (w/v)

0,3% Tris (w/v)

0,2% SDS (w/v)

in H₂O bidest.

Lysepuffer für Proteinlysate

250 mM NaCl

50 mM Hepes pH 7,0

0,1% NP-40 (v/v)

10% Glycerol (v/v)

1 mM DTT aus DTT-Stammlösung (1 M) frisch zugeben

100 µM Na₃VO₄ aus Na₃VO₄-Stammlösung (100 mM) frisch zugeben

400 µM PMSF frisch zugeben

Protease-Inhibitor (1 x) aus Stammlösung (50 x) frisch zugeben

in H₂O bidest.

Natriumacid-Stammlösung

10% NaN₃ (w/v)

in H₂O bidest.

zur Konservierung von Antikörpern 10% NaN₃ 1:200 in Milchpuffer oder TBST verdünnen

Na₃VO₄-Stammlösung 100 mM pH 9,5

100 mM Na₃VO₄ (w/v)

in H₂O bidest. lösen und mit 0,1 N NaOH auf pH 9,5 einstellen

PBS (1 x)

137 mM NaCl
 2,6 mM KCl
 8,1 mM Na₂HPO₂ x 2H₂O
 1,5 mM KH₂PO₄
 in H₂O bidest.
 mit 1N HCl auf pH 7,4 einstellen; Lagerung bei RT

PBS-T

0,2% Tween-20
 in PBS (1 x)

Bis/Tris-Gele für SDS-PAGEx%iges Trenngel:

x% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) aus 40%iger Stammlösung (v/v)
 4,7 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8
 125 µl 10% SDS-Lösung
ad 12,5 ml mit H₂O bidest. auffüllen
 zur Polymerisation:
 75 µl 20% APS-Lösung und
 5 µl TEMED hinzugeben,
 die Lösung mischen und umgehend das Gel gießen

4%iges Sammelgel:

625 µl Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) aus 40%iger Stammlösung
 2,1 ml 0,375 M Tris-HCl pH 6,8
 62,5 µl 10% SDS
ad 6,25 ml mit H₂O bidest. auffüllen
 zur Polymerisation:
 125 µl 20% APS-Lösung und
 2,5 µl TEMED hinzugeben,
 die Lösung mischen und umgehend das Gel gießen

Tris-Glycin-Gele für SDS-PAGEx%iges Trenngel:

x% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) aus 30%iger Stammlösung (v/v)
 3,35 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8
 90 µl 10% SDS-Lösung
ad 9 ml mit H₂O bidest. auffüllen
 zur Polymerisation:
 30 µl 20% APS-Lösung und
 6 µl TEMED hinzugeben,
 die Lösung mischen und umgehend das Gel gießen

4%iges Sammelgel:

400 µl Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) aus 30%iger Stammlösung
 375 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8
 30 µl 10% SDS
ad 3 ml mit H₂O bidest. auffüllen
 zur Polymerisation:
 30 µl 20% APS-Lösung und
 3 µl TEMED hinzugeben,
 die Lösung mischen und umgehend das Gel gießen

Protease-Inhibitor (50 x)

1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail Complete™ (Roche) in 1 ml H₂O bidest. lösen
Lagerung bei -20 °C

Proteinisolierungspuffer für Proteine aus Geweben und Tumoren

50 mM Hepes pH 7,5
150 mM NaCl
1 mM EDTA
2,5 mM EGTA
10% Glycerol (v/v)
0,1% Tween-20 (v/v)
10 mM β-Glycerol-Phosphat
1 mM NaF
1 mM DTT aus DTT-Stammlösung (1 M) frisch zugeben
100 μM Na₃VO₄ aus Na₃VO₄-Stammlösung (100 mM) frisch zugeben
400 μM PMSF frisch zugeben
Protease-Inhibitor (1 x) aus Stammlösung (50 x) frisch zugeben
in H₂O bidest.

RB (10 x)

14% Glycin (w/v)
3% Tris (w/v)
in H₂O bidest.

RIPA-Puffer

150 mM NaCl
20 mM Tris pH 7,4
0,25% Na-Desoxycholat (w/v)
1% NP-40 (v/v)
0,1% SDS (w/v)
1 mM EDTA
50 mM NaF
pH 7,4 einstellen
1 mM DTT aus DTT-Stammlösung (1 M) frisch zugeben
100 μM Na₃VO₄ aus Na₃VO₄-Stammlösung (100 mM) frisch zugeben
400 μM PMSF frisch zugeben
Protease-Inhibitor (1 x) aus Stammlösung (50 x) frisch zugeben
in H₂O bidest.

Schnellentfärber (Coomassie)

40% EtOH (v/v)
20% Essigsäure (v/v)
40% H₂O bidest. (v/v)

10%ige SDS-Lösung

10% SDS (w/v)
bei 68 °C in H₂O bidest. lösen
pH 7,2 einstellen

SDS-Probenpuffer (5 x)

65 mM Tris-HCl pH 8,8
 0,2% Bromphenolblau (w/v)
 5% SDS (w/v)
 5% β -Mercaptoethanol (v/v)
 20% Glycerin (v/v)
 in H₂O bidest.

Strip-Lösung für Western-Blots

65 mM Tris-HCl pH 6,7
 2% SDS (v/v)
 100 mM β -Mercaptoethanol
 in H₂O bidest.

TBST

10 mM Tris-HCl pH 7,6
 150 mM NaCl
 0,1% Tween-20
 in H₂O bidest.

Tris-HCl 1M

121,1 g Tris-HCl
 in 700 ml H₂O bidest. lösen; erwünschten pH mit konz. HCl einstellen;
 mit H₂O bidest. auf 1 l auffüllen

2.1.3 Enzyme**2.1.3.1 Restriktionsendonukleasen**

Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt) verwendet. In erster Linie handelte es sich dabei um *Bam*HI, *Hind*III, *Nhe*I und *Xho*I. Die Enzyme befanden sich in einem glycerinhaltigen Puffer und wurden bei -20 °C aufbewahrt. Für die Enzymreaktionen wurden die vom gleichen Hersteller vorgesehenen Puffer zur Einhaltung der Reaktionsbedingungen verwendet.

2.1.3.2 Nukleinsäure-modifizierende Enzyme

Enzym	Charakterisierung	Bezugsquelle / Fa.
T4-DNA-Ligase	DNA-Ligase	NEB (Frankfurt)
Quick T4-DNA-Ligase	DNA-Ligase	NEB (Frankfurt)
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Biotherm <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	DNA-Polymerase	NaTuTec (Frankfurt)
Platinum® <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase	DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
Klenow-Enzym	DNA-Polymerase	NEB (Frankfurt)
<i>Mung Bean</i> -Nuklease	Exonuklease	NEB (Frankfurt)
CIAP	Phosphatase	NEB (Frankfurt)
CIP	Phosphatase	NEB (Frankfurt)

2.1.3.3 Sonstige Enzyme

Enzym	Charakterisierung	Bezugsquelle / Fa.
Ribonuklease A	Ribonuklease	Roche (Mannheim)
Proteinase K	Serinprotease	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

spezifisches Antigen	Charakteristik	Spezies	Hersteller
β -Aktin	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
β -Aktin	polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Caspase-3	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
β -Catenin	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
GFP/EGFP variants	polyklonal	Kaninchen	BD Clontech (Heidelberg)
GFP/EGFP variants	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
Kox1 (KRAB-Linker-Domäne)	polyklonales Serum	Kaninchen	Arbeitsgruppe Prof. Dr. H.-J. Thiesen, Universität Rostock
MBP-Kox1-KRAB-Linker	polyklonales Serum	Kaninchen	Arbeitsgruppe Prof. Dr. H.-J. Thiesen, Universität Rostock
Lamin A/C	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
p21	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
Plk1	monoklonal, Cocktail	Maus	Zytomed (Berlin)
Plk1	monoklonal	Maus	BD Transduction (Heidelberg)
Plk1	monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling (Danvers/USA)
Plk1	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
Plk1	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz (Heidelberg)
Plk1	polyklonal	Ziege	Santa Cruz (Heidelberg)
Plk1	polyklonal	Kaninchen	Upstate / Millipore (Schwalbach)
TetR	monoklonal	Maus	MoBiTec (Göttingen)
TetR	polyklonal	Kaninchen	MoBiTec (Göttingen)

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper wurden ausschließlich Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Antikörper verwendet, die gegen primäre IgGs aus Maus, Kaninchen und Ziege gerichtet waren.

spezifisches Antigen	Charakteristik	Spezies	Hersteller
anti-Maus IgG	polyklonal	Ziege	Santa-Cruz (Heidelberg)
anti-Kaninchen IgG	polyklonal	Ziege	Santa-Cruz (Heidelberg)
anti-Ziege IgG	polyklonal	Affe	Santa-Cruz (Heidelberg)

2.1.5 Oligonukleotide und Primer

Oligonukleotide und Primer wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Operon Biotechnologies (Köln) bezogen.

2.1.5.1. Primer für die Amplifikation von Plk1-Exons aus genomischer DNA

Name	Verwendungszweck	Sequenz (5'→3')
Plk1Ex1_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 1 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	CGCGCAGCTTTTGTA ACGTTCCC
Plk1Ex1_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 1 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AACTGCCCCGCAGG CAGTTCCAGT
Plk1Ex2_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 2 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	TCAATCCACCTCCCC ATCCCTCCT
Plk1Ex2_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 2 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	TTCCAGCCTCTTGTA GTGATGTCA
Plk1Ex3_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 3 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AACTAGCCTTCTGC ATTGACAGATGTC
Plk1Ex3_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 3 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	GATGTCCCAAAGTT GCCCCTGCTG
Plk1Ex4_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 4 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	GTTCTGACCCTGAG ATGATTTCTCTCA
Plk1Ex4_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 4 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	GTCCTAGGATATTG CTGGGCTCCA
Plk1Ex5_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 5 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	CCTTTGAGGCCGTA CTGTACTCCA
Plk1Ex5_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 5 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AAGCTGCACACACC CCTACAACCT
Plk1Ex6_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 6 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AGTTTCAGCTGTGG CAGGGGAGT
Plk1Ex6_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 6 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	TCCAGATGCCCAA GCAATCCTGC
Plk1Ex7_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 7 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	TGTGGAGCAGAGGG GAAGAGGCT

Plk1Ex7_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 7 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AAGGTCACCTGGCT GTGCCTGAGT
Plk1Ex8_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 8 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AATCACAGGCATGT GCCACCACGC
Plk1Ex8_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 8 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AGTCTGATCCTCCA GCACAGGTCC
Plk1Ex9_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 9 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	GCTGGAGGATCAGA CTCTAATTCTGG
Plk1Ex9_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 9 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	ACTGCCAGGCATGC GGAGCCTA
Plk1Ex10_s	5'-Primer für die Amplifikation von Exon 10 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	TACTGGCCTCTG GGATCGCCAA
Plk1Ex10_as	3'-Primer für die Amplifikation von Exon 10 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	AGAGATGTTTCGCTG GATCCCAGGC
Plk1Ex10T_s	5'-Primer für die Amplifikation eines Abschnittes von Exon 10 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	GGTTGAATGTGGAG TGAGCGGCTC
Plk1Ex10T_as	3'-Primer für die Amplifikation eines Abschnittes von Exon 10 aus dem humanen Plk1-Gen für die Analyse von Tumormaterial	GCTCCTTGCAGCAG CAGTACTCC

2.1.5.2 Primer für Klonierungen und zur Herstellung von Sonden

Name	Verwendungszweck	Sequenz (5'→3')
H1_s	5'-Primer mit <i>Xho</i> I-Stelle für Amplifikation von humanem Wildtyp-H1-Promotor	GTGAGGGACACTCG AGTGGCGCCCTGCA ATATT
H1_as	3'-Primer mit <i>Bam</i> HI-Stelle für Amplifikation von humanem Wildtyp-H1-Promotor	TCCGCCCTATGGATC CGAGTGGTCTCATA CAGAA
H1_stab_s	5'-Primer zur Amplifikation von genomisch integrierten H1-Promotor-RNAi-Kassetten und Herstellung einer Sonde für Southern-Blot	CGCCCTGCAATATTT GCATG
H1_stab_as	3'-Primer zur Amplifikation von genomisch integrierten H1-Promotor-RNAi-Kassetten und Herstellung einer Sonde für Southern-Blot	GCCGATTTCCGGCCT ATTGGT
H1_upstr_s	5'-Primer zur Amplifikation von genomisch integrierten H1-Promotor-RNAi-Kassetten und Herstellung einer Sonde für Southern-Blot	GCGGACAGGTATCC GGTAAG

H1shPlk_as	3'-Primer zur Amplifikation von genomisch integrierten H1-Promotor-RNAi-Kassetten und Herstellung einer Sonde für Southern-Blot	CCGTCGACTGCAGA ATTCGAAGC
Plk1NB_s	5'-Primer zur Herstellung einer Sonde zum Nachweis der Plk1-mRNA mittels Northern-Blot	GCGGACAGGTATCC GGTAAG
Plk1NB_as	3'-Primer zur Herstellung einer Sonde zum Nachweis der Plk1-mRNA mittels Northern-Blot	CCGTCGACTGCAGA ATTCGAAGC
Tn10_s	5'-Primer mit <i>NheI</i> -Stelle für Amplifikation von TetR aus Transposon 10 von <i>E. coli</i> -Stamm HT115	GTCAACAAAAATTA GCTAGCAATGATGT CTAGAT
Tn10Koz_s	5'-Primer mit <i>NheI</i> -Stelle für Amplifikation von TetR aus Transposon 10 von <i>E. coli</i> -Stamm HT115 inkl. Kozak-Sequenz	AGCGCTAGCGCCAC CATGTCTAGATTAG ATAAAAG
Tn10_as	3'-Primer mit <i>XhoI</i> -Stelle für Amplifikation von TetR aus Transposon 10 von <i>E. coli</i> -Stamm HT115	CGGAAAAAGGTTAT CTCGAGTTTAAGAC CCACTT
TetRKRAB_s	5'-Primer mit <i>NheI</i> -Stelle für Amplifikation des TetR-KRAB-Hybridproteins aus Plasmid-Vektor	CCAGCCTCCGCGGC CCCCTAGCAACCA TGGCTAG
TetRKRAB_as	3'-Primer mit <i>XhoI</i> -Stelle für Amplifikation des TetR-KRAB-Hybridproteins aus Plasmid-Vektor	CTCATCAATGTATCT TATCATGTCTCGAGC CTTAAACTGATG
H1tetUS_as	3'-Primer mit <i>HindIII</i> -Stelle und <i>BamHI</i> -Stelle zur Insertion einer Tet-Operatorsequenz in den Wildtyp-H1-Promotor in 5'-Richtung der TATA-Box	AAGCTTGGATCCGA GTGGTCTCATAACAG AACTTATAAACTCT ATCAATGATAGAGT ATTCACGTTTATGG TGA
H1tetDS_as	3'-Primer mit <i>HindIII</i> -Stelle und <i>BamHI</i> -Stelle zur Insertion einer Tet-Operatorsequenz in den Wildtyp-H1-Promotor in 3'-Richtung der TATA-Box	CAGTGCCAAGCTTG GATCCACTCTATCA ATGATAGAGTTTAT AAGATTCCCAAATC
H1tetUS/DS_as	3'-Primer mit <i>BamHI</i> -Stelle zur Insertion von zwei Tet-Operatorsequenzen in den Wildtyp-H1-Promotor in 5'- und 3'-Richtung der TATA-Box	TTGGATCCACTCTAT CAATGATAGAGTTT ATAAACTCTATCAA TGATAGAGTATTTC ACG

2.1.5.3 DNA-Oligonukleotide für die Klonierung von shRNA-kodierenden Sequenzen

Name	Verwendungszweck	Sequenz (5'→3')
shEGFP_s	sense-Oligonukleotid mit <i>BamHI</i> - und <i>HindIII</i> -Stelle als kodierende Sequenz für eine shRNA gegen EGFP-Varianten	GTCGGATCCGCTGACCCTG AAGTTCATCTTGAATTCGG ATGAACTTCAGGGTCAGCT TTTTAAGCTTAGT

shEGFP_as	<i>antisense</i> -Oligonukleotid mit <i>Bam</i> HI- und <i>Hind</i> III-Stelle als kodierende Sequenz für eine shRNA gegen EGFP-Varianten	ACTAAGCTTAAAAAGCTGACCCTGAAGTTCATCCGAAT TCAAGATGAACTTCAGGGT CAGCGGATCCGAC
shEGFPMM_s	<i>sense</i> -Oligonukleotid mit <i>Bam</i> HI- und <i>Hind</i> III-Stelle als kodierende Sequenz für eine <i>mismatch</i> -shRNA	GCTGGATCCGCTGACCCAC TAGTTCATCTTCATATGGG ATGAACTAGTGGGTGAGCT TTTTAAGCTTATC
shEGFPMM_as	<i>antisense</i> -Oligonukleotid mit <i>Bam</i> HI- und <i>Hind</i> III-Stelle als kodierende Sequenz für eine <i>mismatch</i> -shRNA	GATAAGCTTAAAAAGCTGACCCACTAGTTCATCCCATA TGAAGATGAACTAGTGGGT CAGCGGATCCGAC
shPlk5_s	<i>sense</i> -Oligonukleotid mit <i>Bam</i> HI- und <i>Hind</i> III-Stelle als kodierende Sequenz für eine shRNA gegen Plk1	GTCGGATCCGTGCTTCGAG ATCTCGGACTTCATATGGG TCCGAGATCTCGAAGCACT TTTTAAGCTTAGT
shPlk5_as	<i>antisense</i> -Oligonukleotid mit <i>Bam</i> HI- und <i>Hind</i> III-Stelle als kodierende Sequenz für eine shRNA gegen Plk1	ACTAAGCTTAAAAAGTGCT TCGAGATCTCGGACCCATA TGAAGTCCGAGATCTCGAA GCACGGATCCGAC
shPlk5MM_s	<i>sense</i> -Oligonukleotid mit <i>Bam</i> HI- und <i>Hind</i> III-Stelle als kodierende Sequenz für eine <i>mismatch</i> -shRNA	GTCGGATCCGTGCACTGAG ATCTCGGACTTCATATGGG TCCGAGATCTCAGTGCAC TTTTAAGCTTAGT
shPlk5MM_as	<i>antisense</i> -Oligonukleotid mit <i>Bam</i> HI- und <i>Hind</i> III-Stelle als kodierende Sequenz für eine <i>mismatch</i> -shRNA	ACTAAGCTTAAAAAGTGCACTGAGATCTCGGACCCATA TGAAGTCCGAGATCTCAGT GCACGGATCCGAC

2.1.6 Plasmide und Vektoren

2.1.6.1 Parentale Plasmid-Vektoren

Plasmid-Vektor	Herkunft
pUC 19	Invitrogen (Karlsruhe)
pSilencer™ 2.0-U6	Ambion (Huntingdon, GB)
pSilencer™ 3.0-H1	Ambion (Huntingdon, GB)
pCMS-EGFP	BD Clontech (Heidelberg)
pd2EGFP	BD Clontech (Heidelberg)
pEGFP-C2	BD Clontech (Heidelberg)
pcDNA3.1Hygro ⁺	Invitrogen (Karlsruhe)
pPUR	BD Clontech (Heidelberg)
pGL3-Control Luciferase	Promega (Mannheim)

2.1.6.2 Modifizierte und klonierte Plasmid-Vektoren

Name	Ausgangsvektor	Veränderung im Rahmen dieser Arbeit
pCMS-d2EGFP	pCMS-EGFP	Substitution von EGFP (Halbwertszeit 18 h) durch destabilisiertes d2EGFP (Halbwertszeit 2 h)

pSilencer™2.0-U6shRNA/EGFP	pSilencer™2.0	Insertion einer shRNA-kodierenden Sequenz gegen EGFP-Varianten; Kontrolle der shRNA-Expression durch konstitutiven Wildtyp-U6-Promotor
pSilencer™3.0-H1shRNA/EGFP	pSilencer™3.0	Insertion einer shRNA-kodierenden Sequenz gegen EGFP-Varianten; Kontrolle der shRNA-Expression durch konstitutiven Wildtyp-H1-Promotor
pUS-CMVTetR	pEGFP-C2	Substitution von EGFP durch TetR inkl. polyA-Signal; TetR somit unter Kontrolle eines CMV-Promotors; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US-Typ) von shRNA gegen Plk1
pDS-CMVTetR	pEGFP-C2	Substitution von EGFP durch TetR inkl. polyA-Signal; TetR somit unter Kontrolle eines CMV-Promotors; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom DS-Typ) von shRNA gegen Plk1
pUS/DS-CMVTetR	pEGFP-C2	Substitution von EGFP durch TetR inkl. polyA-Signal; TetR somit unter Kontrolle eines CMV-Promotors; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US/DS-Typ) von shRNA gegen Plk1
pwtH1-H250	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette zur konstitutiven Expression (Wildtyp-H1-Promotor) eines Abschnitts des humanen H1-Gens (250bp)
pUS-H250	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US-Typ) eines Abschnitts des humanen H1-Gens (250bp)
pDS-H250	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom DS-Typ) eines Abschnitts des humanen H1-Gens (250bp)
pUS/DS-H250	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US/DS-Typ) eines Abschnitts des humanen H1-Gens (250bp)
pwtH1shRNA/EGFP	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für konstitutive Expression (Wildtyp-H1-Promotor) von shRNA gegen EGFP-Varianten
pwtH1shRNA/EGFPMM	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für konstitutive Expression (Wildtyp-H1-Promotor) von <i>mismatch</i> -shRNA
pwtH1shRNA/Plk1	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für konstitutive Expression (Wildtyp-H1-Promotor) von shRNA gegen Plk1

pwtH1shRNA/ Plk1MM	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für konstitutive Expression (Wildtyp-H1-Promotor) von <i>mismatch</i> -shRNA
pUS	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US-Typ) von shRNA gegen Plk1
pUSMM	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US-Typ) von <i>mismatch</i> -shRNA
pDS	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom DS-Typ) von shRNA gegen Plk1
pDSMM	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom DS-Typ) von <i>mismatch</i> -shRNA
pUS/DS	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US/DS-Typ) von shRNA gegen Plk1
pUS/DSMM	pEGFP-C2	Ausschneiden von CMV-EGFP; Insertion einer Kasette für induzierbare Expression (H1-Promotor vom US/DS-Typ) von <i>mismatch</i> -shRNA
pcDNA3.1Hygro TetR	pcDNA3.1Hygro ⁺	Insertion von TetR inkl. Kozak-Sequenz; TetR somit unter Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors
pTetR-KRAB	pTetR-KRAB	Plasmid für die konstitutive Expression von TetR-KRAB unter Kontrolle eines CMV-Promotors; Bezugsquelle: Prof. Dr. H.-J. Thiesen, Universität Rostock
pcDNA3.1Hygro TetR-KRAB	pcDNA3.1Hygro ⁺	Insertion von TetR-KRAB inkl. Kozak-Sequenz; TetR-KRAB somit unter Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors

2.1.7 Bakterien und Bakterienmedien

2.1.7.1 Bakterienstämme

E. coli-Stamm; Genotyp

DH5 α ; *endA1*; *hsdR17* (*rk*⁻, *mk*⁻) *supE44*, *thi*⁻, λ ⁻, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *80dlacIqZD M15*

HT115; F⁻, *mcrA*, *mcrB*, *IN(rrnD-rrnE)1*, λ ⁻, *rnc14::Tn10(DE3 lysogen:lacUV5 promotor-T7 polymerase)*

K12 JM109; F['] *traD36 proA⁺B⁺ lacI^f Δ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV44 e14⁻ gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17*

2.1.7.2 Bakterienmedien und Zusätze

Medienbestandteile wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Verwendete Antibiotika stammten von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Fluka (Buchs/CH).

Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml (10 ml)

1 g Ampicillin
ad 10 ml H₂O bidest.
sterilfiltrieren und in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern
Anwendung im Verhältnis 1:1000 für LB-Medium und LB-Agar

Kanamycin-Stammlösung 50 mg/ml (10 ml)

500 mg Kanamycin
ad 10 ml H₂O bidest.
sterilfiltrieren und in Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern
Anwendung im Verhältnis 1:1000 für LB-Medium und 1:500 für LB-Agar

LB-Medium

1% Casein-Hydrolysat (Peptone) (w/v)
0,5% Bacto-Hefe-Extrakt (w/v)
1% NaCl (w/v)
pH 7 mit NaOH einstellen, autoklavieren
oder alternativ:
80 g Lennox LB-Medium (Fa. Roth)
ad 4 l H₂O bidest., autoklavieren und in verschiedenen großen Aliquots bei RT aufbewahren

LB-Agar

LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar
autoklavieren
oder alternativ:
35 g Lennox LB-Agar (Fa. Roth)
ad 1 l H₂O bidest.
im Anschluß autoklavieren und LB-Agar-Platten in vorgesehene Schalen gießen, nach Erhaltung Lagerung bei 4 °C.
Für LB-Agar-Platten mit Antibiotikum: 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin in die nach dem Autoklavieren auf 50 °C abgekühlte LB-Agar-Lösung pipettieren und anschließend betreffende LB-Agar-Platten gießen

SOB-Medium (1 l)

2% Casein-Hydrolysat (Peptone) (w/v)
0,5% Bacto-Hefe-Extrakt (w/v)
0,05% NaCl (w/v)
ad 950 ml H₂O bidest.
pH auf 7,0 einstellen
2,5 mM KCl
ad 1 l H₂O bidest.
autoklavieren
5 ml 2 M MgCl₂ (steril, frisch zugeben)

SOC-Medium (1 l)

- 2% Casein-Hydrolysat (Peptone) (w/v)
- 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt (w/v)
- 0,05% NaCl (w/v)
- ad 950 ml H₂O bidest.
- pH auf 7,0 einstellen
- 2,5 mM KCl
- ad 1 l H₂O bidest.
- autoklavieren
- 5 ml 2 M MgCl₂ (steril, frisch zugeben)
- 10 ml 2 M Glucose (steril, frisch zugeben)

2.1.8 Zelllinien und Zellkulturmedien

2.1.8.1 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
BT-474	humanes duktales Mamma-Karzinom	DSMZ (Braunschweig)
HeLa	humanes epitheliales Cervix-Karzinom	DSMZ (Braunschweig)
HeLa S3	humanes epitheliales Cervix-Karzinom	ATCC (Manassas, VA/USA)
MCF-7	humanes epitheliales Mamma-Adenokarzinom	DSMZ (Braunschweig)
SK-BR-3	humanes Mamma-Adenokarzinom	ATCC (Manassas, VA/USA)
T-REx™-HeLa	TetR exprimierendes humanes epitheliales Cervix-Karzinom	Invitrogen (Karlsruhe)
diverse T-REx™-HeLa-Klone	TetR exprimierendes humanes epitheliales Cervix-Karzinom mit stabil integrierten induzierbaren RNAi-Kassetten	Entwicklung und Etablierung im Rahmen dieser Arbeit

2.1.8.2 Zellkulturmedien

Sämtliche Zellkulturmedien, fötales Kälberserum, Antibiotika, PBS, Trypsin/EDTA-Lösung und Zusätze für die Kultur von Säugerzellen wurden von den Firmen ATCC (Manassas, VA/USA), Biochrom (Berlin), Cambrex (Verviers/B), PAA-Laboratories (Pasching/A), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Invitrogen (Karlsruhe) geliefert.

Zelllinie	Kulturmedium	Zusätze
BT-474	RPMI 1640 Medium	20% FCS, 10 µg/ml bovines Insulin, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.
HeLa	MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	10% FCS tetrazyklinfrei, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.
HeLa S3	HAM's NUTRIENT Medium F-12	10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.
MCF-7	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	10% FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 10 µg/ml bovines Insulin, 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.

SK-BR-3	McCoy's 5A Modified Medium	10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg.
T-REx™-HeLa	MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	10% FCS tetrazyklinfrei, 2 mM L-Glutamax™ (L-Alanyl-L-Glutamin), 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg., 5 µg/ml Blasticidin S HCl
T-REx™-HeLa-Klone	MEM (Minimum Essential Medium Eagle)	10% FCS tetrazyklinfrei, 2 mM L-Glutamax™ (L-Alanyl-L-Glutamin), 1% Penicillin-Streptomycin-Lsg., 5 µg/ml Blasticidin S HCl, 500 µg/ml Geneticin (G418)

Zum Einfrieren von Zelllinien wurde spezielles Einfriermedium gemischt, welches aus 40% des jeweiligen Kulturmediums, 50% FCS (ggf. tetrazyklinfrei) und 10% DMSO oder Glycerin bestand.

2.1.8.3 Antibiotika für die Zellkultur

Antibiotikum	Herkunft
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen (Karlsruhe)
Geneticin (G418)	Invitrogen (Karlsruhe)
HygromycinB	BD Biosciences (Heidelberg)
Blasticidin S HCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Puromycin	BD Biosciences (Heidelberg)
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.1.9 Tiermodelle mit Nacktmäusen

Die in den humanen Xenograft-Experimenten eingesetzten Tiere waren 6 Wochen alte athymische immunsupprimierte männliche Nacktmäuse, welche von Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen wurden. Nach einer Ruhephase von einigen Tagen wurden sie mit betreffenden humanen Tumorzellen inokuliert, und bildeten in der Folgezeit humane Xenograft-Tumoren aus. Die Versuche wurden ausschließlich in der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

2.1.10 Laborgeräte

Bakterienschüttler (B.Braun, Melsungen)
 Brutschrank BBD 6220 (Heraeus, Hanau)
 Brutschrank BB 6060 (Heraeus, Hanau)
 Brutschrank 37 °C Kelvitron (Heraeus, Hanau)
 Blotting-Apparatur Mini Trans-Blot Transfer Cell (BIO-Rad, München)
 Blotting-Apparatur XCell II™ (Invitrogen, Karlsruhe)
 Digitalkamera DC290 (Kodak, Stuttgart)
 Elektrophoreseapparatur Mini-Protean III (BIO-Rad, München)
 Elektrophoreseapparatur Mini-Sub Cell GT (BIO-Rad, München)
 Elektrophoreseapparatur XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
 Entwicklermaschine Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Wiesloch)

FACScan-Durchflußzytometer (BD Biosciences, Heidelberg)
Filmkassette X-Omatic® (Kodak, Stuttgart)
Filmkassette Hypercassette™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Fluoreszenzmikroskop DM RB (Leica, Wetzlar)
Geltrockner Model 583 Gel Dryer (BIO-Rad, München)
Gefrierschrank -20 °C (Liebherr, Ochsenhausen)
Gefriertruhe -80 °C (Revco Scientific, Veenendal/Niederlande)
Heizplatte 60 °C DHP 37 (Fisher Scientific, Nidderau)
Hybridisierungs-ofen Model 310 (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach)
Kühlschrank 4 °C (Liebherr, Ochsenhausen)
Magnetrührer Ikamak RTC (IKA Labortechnik, Staufen)
Mikro-Dismembrator II (B.Braun, Melsungen)
Mikroskop IDO3 (Zeiss, Jena)
Mikrowellengerät (Bosch, Stuttgart)
Mono-Mixer (Sarstedt, Nümbrecht)
Netzgerät Power PAC 300 (BIO-Rad, München)
pH-Meter Mikroprozessor pH-Meter HI 9321 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
Pipetten 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100µl; 50-200µl; 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
Pipettierhilfe Automatic Sarpette (Desaga, Wiesloch)
QIArack (Qiagen, Hilden)
QIAVac 24 Vacuum Manifold (Qiagen, Hilden)
Röntgenfilmbetrachtungsgerät Planilux® (Gerätebau Felix Schulte GmbH, Warstein)
Rotator (Fisher-Scientific, Nidderau)
Schüttler (Fisher-Scientific, Nidderau)
Schüttler LS 20 (Gerhardt, Bonn)
Schüttler TCR 170 (Heidolph, Schwabach)
SpeedVac SVC100 (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt/M.)
Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
Sterilbank HB2448 (Heraeus, Hanau)
Sterilbank Lamin Air® HA 2448 GS HA (Heraeus, Hanau)
Sterilbank HERAsafe (Heraeus, Hanau)
Stickstoffbehälter (AirLiquide, Düsseldorf)
Thermoblock DRI-Block BB-3A (TECHNE, Burkhardtsdorf)
Thermo-Cycler (Perkin Elmer Cetus, Köln)
Thermo-Cycler (Eppendorf, Hamburg)
Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)
Transilluminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex / Frankreich)
Trockenschrank 6200 (Heraeus, Hanau)
Ultratorrax Dispergiwerkzeug TH (OMNI international, Marietta, GA/USA)
Vakuumentrifuge Refrigerated Condensation Trap RT100 (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt)
Vakuumpumpe Membranpumpe (Vacuumbrand GmbH + Co., Wertheim)
Vortex Janke & Kunkel (Ika Labortechnik, Staufen)
Vortex Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)
Waage Mettler AE 240 (Mettler Instruments GmbH, Gießen)
Waage Mettler PM 2000 (Mettler Instruments GmbH, Gießen)
Wasserbad klein (Mettler, Schwabach)
Wasserbad groß (Mettler, Schwabach)
Zellzählkammer Neubauer (Renner, Darmstadt)
Zentrifuge Minifuge GL (Heraeus-Christ, Hanau)
Zentrifuge Rotanta/RPC (Hettich, Tuttlingen)

Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)
 Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)
 Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

2.1.11 Software

Name	Herkunft	Beschreibung
<i>BLAST-Algorithmus</i>	NCBI = National Center for Biotechnology Information; Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Altschul <i>et al.</i> , 1990)	Programm zum Vergleich von DNA-Sequenzen mit genomischen DNA-Abschnitten
<i>CELLQuest</i>	BD Biosciences (Heidelberg)	Programm zur Steuerung eines Durchflußzytometers (FACScanners) und für die Auswertung
<i>Chromas Version 1.45</i>	C. McCarthy; (School of Health Sciences, Griffith University, Southport/AUS)	Programm zur Visualisierung von DNA-Sequenzierungen
<i>Lalign</i>	Internet: www.chembnet.org (Huang und Miller, 1991)	Algorithmus zur Gegenüberstellung von DNA-Sequenzen
<i>Macromedia FreehandMX, Version 11</i>	Adobe (San Jose, CA/USA)	Programm für die Erstellung komplexer Abbildungen
<i>MS Excel</i>	Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim)	Programm für statistische Auswertungen und zur Erstellung von Diagrammen
<i>NEBcutter V2.0</i>	New England Biolabs (NEB, Frankfurt)	Programm zur Analyse von DNA-Abschnitten
Kodak 1D 3.6	Kodak (Stuttgart)	Fotodokumentationssystem zum Fotografieren von Gelen und Southern- / Northern- / Western-Blots
<i>Reference Manager, Version 10</i>	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, CA/USA)	Programm zur Verwaltung von Textreferenzen und Erstellung von Bibliographien
<i>Reverse Complement</i>	Internet: bioinformatics.org/sms/rev_comp.html (Stothard, 2000)	Programm zur Berechnung von reversen komplementären DNA-Sequenzen
<i>SimVector 2.0</i>	Premier Biosoft International (Palo Alto, CA/USA)	Programm zum Erstellen von Vektor-Karten
<i>siRNA target finder</i>	Internet: www.molecularstation.com (Ambion, Huntingdon/GB)	Programm für die Suche nach Zielsequenzen und das <i>Design</i> von siRNAs bzw. shRNA-kodierenden Oligonukleotiden

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierungen und allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation kompetenter Bakterien

Die Präparation chemokompetenter Bakterien der *E. coli*-Stämme Dh5 α , HT115 und K12 JM109 erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983).

2.2.1.2 Transformation von Bakterien

100 μ l einer Suspension chemokompetenter Bakterien, welche sich in einem Reaktionsgefäß befand, wurden auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende Plasmid-DNA wurde in die Bakteriensuspension pipettiert. Durch Invertieren des Gefäßes wurde der Ansatz durchgemischt, anschließend wurde er für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation wurden die Bakterien für 60 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Im Anschluß folgte eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Danach wurden die Bakterien mit 900 μ l LB-Medium versetzt und 30-45 min bei 37 °C in einem Bakterienschrank unter Schütteleinfluß von 250 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert, der Überstand verworfen und die sich am Grunde des Gefäßes abgesetzten Bakterien in frischem LB-Medium resuspendiert. Letztendlich wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit betreffendem Selektions-Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmiden für die Analyse

Die Präparation der Plasmide wurde nach der *Boiling*-Methode (Holmes und Quigley, 1981) durchgeführt. Aus dem so gewonnenen Bakterienlysat wurde anschließend die Plasmid-DNA ausgefällt: Das neutralisierte Bakterien-Lysat wurde mit 1:10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 2,5-fachem Volumen Ethanol abs. versetzt und gemischt. Die bei RT nach etwa 10 min ausgefällte DNA wurde mit Hilfe einer Zentrifuge sedimentiert (16.000 x g, 10 min bei 4 °C) und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 50-100 μ l H₂O resuspendiert.

Alternativ wurde die Isolierung von Plasmiden aus Übernachtskulturen mit Hilfe des Qiaprep® Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Ausbeute lag bei *low-copy*-Plasmiden zwischen 100 und 300 μ g/ μ l, bei *high-copy*-Plasmiden hingegen zwischen 450 und 750 μ g/ μ l.

2.2.1.4 Isolierung von Plasmiden für Transfektionen in Säugerzellkulturen

Die Kultur der Bakterien und die Aufreinigung der Plasmide aus der Übernachtskultur erfolgte

mit dem Qiafilter™ Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden). Die Konzentration der DNA wurde photometrisch über den OD₂₆₀-Wert bestimmt (1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml DNA). Die Ausbeute lag bei *low-copy*-Plasmiden zwischen 100 und 300 µg/µl, bei *high-copy*-Plasmiden hingegen zwischen 500 und 800 µg/µl. Die Reinheit der Plasmid-DNA in bezug auf proteinäre Verunreinigungen schwankte bei einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert zwischen 1,75 und 1,9. Die Lagerung der DNA erfolgte in Aliquots bei -20 °C.

Für geringere DNA-Mengen wurde das Qiafilter™ Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden), alternativ das GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma, Taufkirchen) nach Angaben der Hersteller verwendet. Die DNA-Ausbeuten lagen hier bei 200-300 µg/µl für *low-copy*-Plasmide und bei 500-700 µg/µl bei *high-copy*-Plasmiden.

2.2.1.5 Präparation genomischer DNA aus Bakterien

2 ml Bakteriensuspension einer Übernachtskultur wurden in einem Reaktionsgefäß durch Zentrifugation sedimentiert (16.000 x g, 15 min bei 37 °C) und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Bakterien wurden mit Hilfe von 250 µl Resuspensionspuffer gelöst. Nach Zugabe von 250 µl Lysepuffer wurde das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und die Suspension 15 min lang bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer wurde die Lyse beendet. Die zur Resuspension, Lyse und Neutralisation verwendeten Puffer stammten aus dem Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). Das Lysat wurde anschließend zentrifugiert (16.000 x g, 3 min bei RT), der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit demselben Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) versetzt, gemischt und durch Zentrifugation (16.000 x g, 5 min bei RT) in drei Phasen getrennt. Die oberste wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA ausgefällt (siehe Kap. 2.2.1.3).

2.2.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Ringförmige oder lineare DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verdaut. Hierbei waren Puffergehalt, Enzymaktivität (x U Enzym / x µg DNA), Temperatur und Reaktionszeit von hinreichender Bedeutung. Restriktionsendonukleasen schneiden DNA durch Hydrolyse, indem sie kurze, definierte Nukleotidsequenzen erkennen. Es wurden ausschließlich Restriktionsendonukleasen der Klasse II verwendet. Solche Restriktionsenzyme schneiden die DNA spezifisch innerhalb der Erkennungssequenzen und benötigen für die Hydrolyse kein ATP. Im Gegensatz dazu sind Enzyme der Klassen I und III ATP-abhängig. Außerdem

schneiden Klasse III-Enzyme ca. 20-25 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt, während Klasse I-Enzyme an einer zufälligen Stelle, weit entfernt von ihrer Erkennungssequenz schneiden.

2.2.1.7 Ligation von linearen DNA-Fragmenten

Mit Hilfe von Ligase-Enzymen können 5'- oder 3'- überhängende DNA-Enden, wenn komplementär, sowie stumpfe DNA-Enden mit anderen stumpfen DNA-Enden durch kovalente Bindung verknüpft werden. Die Ligase katalysiert dabei unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiester-Brücke zwischen einer 5'-Phosphatgruppe eines Nukleotidtriphosphates und einer frei vorliegenden 3'-OH-Gruppe innerhalb doppelsträngiger DNA. Die in dieser Arbeit angesetzten Reaktionen wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase oder der Quick-T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (NEB, Frankfurt) durchgeführt.

2.2.1.8 Dephosphorylierung von linearen DNA-Fragmenten

Die 5'-Enden von linearisierten Plasmiden wurden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um deren Re-Ligation zu verhindern. Dazu wurden nach dem Restriktionsverdau 5 U alkalische Phosphatase pro µg DNA dem Reaktionsansatz zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. In dieser Arbeit wurden ausschließlich CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) und CIP (*calf intestinal phosphatase*) (NEB, Frankfurt) benutzt.

2.2.1.9 Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Enden

Klenow-Enzym (das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*) agiert als DNA-abhängige 5'-3'-Polymerase mit 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Diese Funktion wurde für das Auffüllen von 3'-überhängenden DNA-Enden angewendet, um sie dann als stumpfe Enden zu ligieren. Die Reaktion wurde mit Klenow-Enzym (NEB, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.10 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Aussagen über die Größe von linearen DNA-Fragmenten gemacht werden. Des Weiteren kann die vorliegende Struktur von Plasmiden analysiert werden. Für lineare DNA-Fragmente kleiner als 1 kb wurden 1,5-2%ige Agarose-Gele, für Fragmente bis 8 kb 1%ige Agarose-Gele und für Fragmente größer als 8 kb 0,8%ige Agarose-Gele verwendet, welche jeweils mit 1 x TAE-Puffer angesetzt wurden. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 10 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen der Gele geladen. Die Elektrophorese selbst wurde in einer speziellen

Gelelektrophoresekammer (BIO-Rad, München) bei 50-100 V im Milliamperebereich durchgeführt. Anhand der Bromphenolblau- und Xylencyanol-Färbungen im Gel konnte unter Berücksichtigung des Agarosegehalts der Gele mit Hilfe einer Normtabelle eine Aussage über den Grad der DNA-Auftrennung getroffen werden. Nach gewünschtem Auftrennungsgrad wurden die Gelläufe gestoppt, die Gele in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und auf einem Transilluminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex/F) unter UV-Licht fotografiert. Als Vergleichsgrößen dienten 1 kb-DNA-Leiter und 100 bp-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe; NEB, Frankfurt; PlasmidFactory, Bielefeld).

2.2.1.11 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die für Ligationen verwendeten linearen DNA-Fragmente wurden nach Ausschneiden aus dem Agarose-Gel mit Hilfe eines Gel Extraction Kits (Millipore, Eschborn; Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Alternativ dazu wurden DNA-Fragmente mit Hilfe der Freeze `N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (BIO-Rad, München) aufgereinigt. In einigen Fällen wurden lineare DNA-Fragmente durch einfache Ausfällung (siehe Kap. 2.2.1.3) aufgereinigt und für die anschließende Ligation eingesetzt.

2.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion werden definierte DNA-Abschnitte zwischen zwei bekannten Regionen spezifisch amplifiziert (Mullis et al., 1986). Dies geschieht mit einem sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primerpaar und einer hitzestabilen DNA-Polymerase, meist der *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) (Saiki et al., 1988). Wurde ein amplifiziertes PCR-Produkt für eine anschließende Ligation im Rahmen einer Klonierung eingesetzt, so wurde die Platinum® *Pfx*-Polymerase (aus *Thermococcus sp.*) verwendet. Diese DNA-Polymerase besitzt eine zusätzliche 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und weist durch diese Korrekturaktivität (*proofreading*) eine um ein Vielfaches geringere Fehlerquote als die *Taq*-Polymerase auf. Benutzte DNA-Polymerasen und Zubehör für die PCR-Ansätze wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe) NaTuTec (Frankfurt), und Amersham (München) bezogen. Sämtliche PCR-Ansätze wurden nach Empfehlung der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

In einigen PCR-Reaktionen wurden bestimmte Sequenzabschnitte der Matrizen-DNA im späteren Amplifikat durch alternative Sequenzen substituiert. Die so hergestellten Mutationen wurden mit Hilfe der gewählten Primer hervorgerufen, welche der Matrizen-DNA nicht zu 100% komplementär waren und sogenannte Fehlpaarungen (*mismatches*) bildeten. Je länger ein solcher *mismatch*-Bereich war, desto länger mußte die Gesamtlänge des betreffenden Primer gewählt werden, damit dieser eine spezifische Bindung mit dem komplementären

Restbereich der Matrizen-DNA eingehen konnte. Bei der Gestaltung eines solchen Primer wurde ebenso auf seine Schmelztemperatur (T_m) geachtet, welche jener des gegenläufigen Primer möglichst ähnlich sein sollte. Die Schmelztemperatur (T_m) wurde nach folgender Formel berechnet (Baldino, Jr. et al., 1989):

$$T_m = 81,5 + 16,6 \times (\log_{10} [J^+]) + 0,41 \times (\% \text{ G+C}) - (675/n) - 1,0 \times (\% \text{ mismatches}) - 0,63 \times (\% \text{ FA})$$

(J = Konzentration monovalenter Kationen in Mol/l, % G+C = Anteil der Nukleotide Guanosin und Cytidin in %, n = Anzahl der Basen im Oligonukleotid-Primer, % mismatch = Anteil der fehlgepaarten Basen in %, % FA = Anteil des Formamids im benutzten Puffer in %)

Als *annealing*-Temperatur zum Anheften der Primer wurde eine Temperatur gewählt, welche in der Regel 5 °C unter der Schmelztemperatur lag. Ein typisches verwendetes PCR-Programm lief wie folgt ab:

initiale Denaturierung:	5 min	94 °C
Denaturierung:	30 s	94 °C
<i>annealing</i> der Primer:	45 s	55-60 °C
Elongation:	90 s	72 °C / 68 °C
abschließende Elongation	5 min	72 °C / 68 °C

Die mittleren drei Schritte der PCR: Denaturierung, *annealing* der Primer und Elongation wurden als Zyklus definiert und in den meisten Fällen 30 bis 50 mal wiederholt. Durch die einmalige initiale Denaturierung wurde sichergestellt, daß zu Beginn des ersten Zyklus die Matrizen-DNA komplett in ihre Einzelstränge geschmolzen wurde, während die abschließende einmalige Elongationsphase der Beendigung der Polymerisation der synthetisierten Stränge diente. Die Elongationszeiten wurden entsprechend der Syntheserate der verwendeten DNA-Polymerasen gewählt. Dazu waren die Angaben der Hersteller (siehe oben) maßgeblich. Die Elongationstemperaturen wurden spezifisch an die Erfordernisse der verwendeten DNA-Polymerasen angepaßt: Während die *Taq*-Polymerase bei 72 °C arbeitete, erlangte die *Pfx*-Polymerase bei 68 °C volle Aktivität.

Ein typischer PCR-Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

1 µl Matrizen-DNA (10 ng/ml)
1,5 µl <i>sense</i> -Primer (10 µM)
1,5 µl <i>antisense</i> -Primer (10 µM)
5 µl 10 x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer inkl. 15 mM MgCl ₂
2 µl dNTP-Mix (40 mM)
1 µl <i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
39 µl H ₂ O

2.2.1.13 Design von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden

Das *Design* von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden erfolgte unter Berücksichtigung mehrerer Kriterien. So wurde eine generelle Länge von 21 bp inkl. 2 nt-3'-Überhänge für den fertig prozessierten siRNA-Doppelstrang gewählt. Die Länge des hybridisierten Bereichs, welcher den Doppelstrang ausmachte, betrug damit 19 bp. Die Zielsequenz innerhalb der cDNAs von EGFP und Plk1 begann an ihrem 5'-Ende mit zwei Adenosin-Nukleotiden, gefolgt von einer 19 bp langen Sequenz. Über die relative Lage der Zielsequenz innerhalb der mRNA, an welcher mRNA und *antisense*-Strang der siRNA komplementär sind, gibt es keine allgemeingültige Regel. Die Praxis zeigte jedoch, daß siRNAs, welche 5'-gelegenen Bereichen der betreffenden mRNA komplementär waren, eine sehr potente Wirkung zeigten (Tuschl et al., 1999; Elbashir et al., 2001b). Die Zielsequenzen für EGFP und Plk1 wurden aufgrund dieses Befundes so gewählt, daß sie innerhalb der ersten 300 Nukleotide der cDNA lagen. Der G/C-Gehalt der Zielsequenz wurde nach dem Kriterium gesucht, wonach er in einem Bereich von 40-60% liegen sollte (Elbashir et al., 2001b). Um eine vorzeitige, vektorbasierte Termination der Transkription der shRNA-kodierenden DNA-Sequenz zu vermeiden, wurde darauf geachtet, daß innerhalb der Zielsequenz keine Aneinanderreihung von mehr als drei Thymidinen auftrat. Die Bedingung des 3'-Überhangs von zwei Uridinen am *antisense*-Strang der siRNA konnte durch das definierte Ende der Transkription erreicht werden. Der Einbau von fünf aufeinanderfolgenden Thymidinen an das 3'-Ende der shRNA-kodierenden Sequenz sollte hierbei den Kettenabbruch des von der RNA-Polymerase III synthetisierten RNA-Strangs, welcher folgend zu shRNA hybridisierte, bewirken. Die zwei Uridine, welche den 3'-Überhang des *sense*-Strangs der prozessierten siRNA bilden sollten, wurden durch die Wahl der Schleifensequenz der shRNA-kodierenden Oligonukleotide kodiert. Die Schleife, welche *sense*-Strang und *antisense*-Strang verbindet, wurde analog der besten Wirksamkeit auf eine Länge von 9 bp festgelegt (Brummelkamp et al., 2002a). Der für die Schleife kodierende Bereich begann an 5'-Position mit zwei Thymidinen. Bei Prozessierung der exprimierten shRNA zu siRNA, konnte das Enzym Dicer durch Entfernen der restlichen sieben Nukleotide der Schleife den 3'-Überhang des *sense*-Strangs, bestehend aus zwei Uridinen, herstellen. Zur Klonierung der hybridisierten shRNA-kodierenden Oligonukleotide in 3'-Position des Promotors mußten beide Oligonukleotide sowohl an ihrem 5'- als auch an ihrem 3'-Ende mit Restriktionsschnittstellen versehen werden. Hierbei handelte es sich um Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI (5'-Position) und *Hind*III (3'-Position). Für das *Design* von siRNA-Sequenzen wurde das Programm *siRNA target finder* (Ambion, Huntingdon/GB) verwendet.

2.2.1.14 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Die beiden komplementären Oligonukleotide wurden in H₂O oder TE-Puffer so verdünnt, daß beide Lösungen die gleichen Molaritäten aufwiesen. Jeweils gleiche Volumen von *sense*- und *antisense*-Oligonukleotid wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, 1 min bei 95 °C inkubiert und anschließend 30 min bei RT aufbewahrt. Das hybridisierte DNA-Fragment wurde, wie in Kap. 2.2.1.6 beschrieben, mit Restriktionsenzymen verdaut und zur Kontrolle einige Zeit im Agarose-Gel durch Anlegen einer Spannung einlaufen gelassen, im Ethidiumbromidbad gefärbt und, wie in Kap. 2.2.1.11 beschrieben, aus dem Agarose-Gel aufgereinigt.

2.2.1.15 Aufreinigung genomischer DNA aus Säugerzellen

Für die Aufreinigung genomischer DNA aus Säugerzellen wurden betreffende Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (siehe Kap. 2.2.2.2). Die sedimentierten Zellen wurden in PBS resuspendiert. Mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden) wurde die genomische DNA der Zellen nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach Lyse von 2×10^6 Zellen betrug die Ausbeute 100-200 µg genomische DNA bei einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert (siehe Kap. 2.2.1.4) von 1,7-1,9. Die präparierte DNA wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.1.16 Aufreinigung genomischer DNA aus Tumoren

Zur Präparation genomischer DNA aus Tumoren wurden 30-50 mm³ große Gewebstücke aus gefrorenen Tumoren geschnitten, welche zuvor in flüssigem Stickstoff gelagert waren. Mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) wurde nach Anleitung des Herstellers die genomische DNA isoliert. Die Ausbeute an genomischer DNA betrug 200-400 µg bei einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert (siehe Kap. 2.2.1.4) von 1,7-1,85. Die präparierte DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.1.17 Southern-Blot

10 µg genomische DNA einer jeden Probe wurden mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *Hind*III (NEB, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers 2 h lang bei 37 °C verdaut, um DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Länge von 4 kb (Normalverteilung) zu erhalten. Verdaute DNA wurde nach Mischen mit DNA-Probenpuffer auf einem 0,8%igen Agarose-Gel bei 60 V über eine Strecke von ca. 10 cm elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nachfolgend für ca. 30 min in Depurinierungspuffer (0,25 M HCl-Lösung) gelegt. Dabei schwamm das Gel im Puffer, wodurch eine beidseitige Diffusion erreicht werden konnte. Die

Reaktion wurde 10 min, nachdem Xylencyanol einen grünen und Bromphenolblau einen gelben Farbumschlag zeigten, gestoppt. Diese beiden Farbmarker waren im DNA-Probenpuffer enthalten. Durch die Depurinierung zerbrach die DNA in kleinere Fragmente, deren Denaturierung durch Einlegen des Gels in Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl) für 30 min leichter vonstatten gehen konnte. Anschließend wurde das Gel in Neutralisationspuffer (0,5 M Tris-HCl pH 7,0 / 1,5 M NaCl) abermals für 30 min inkubiert. Die DNA wurde nun unter Ausnutzung von Kapillarkräften in 10-fachem SSC-Puffer (1,5 M NaCl / 0,15 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat, pH 7,0) auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Amersham Biosciences, München / Roche, Mannheim) über Nacht geblottet (Mülhardt, 2003b). Am nächsten Tag wurde die Apparatur abgebaut und die mit genomischer DNA behaftete Membran 2 h lang bei 80 °C in einem Trockenschrank inkubiert, wodurch die DNA fixiert wurde. Es folgte die Hybridisierung mittels radioaktiver Sonde.

2.2.1.18 Aufreinigung von RNA aus Säugierzellen

Zur Isolierung von RNA aus Säugierzellen wurden betreffende Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (siehe Kap. 2.2.2.2). Das sedimentierte Pellet wurde anschließend in PBS gewaschen. Unter Verwendung des RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) wurde nach Protokoll des Herstellers die gesamte RNA der Zellen präpariert. Nach Lyse von 2×10^6 Zellen betrug die Ausbeute der RNA 20-80 µg bei einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert (siehe Kap. 2.2.1.4) von 1,88-2,0.

2.2.1.19 Aufreinigung von RNA aus Tumoren

Zur Isolierung von RNA aus Tumoren wurde den 20-30 mm³ großen gefrorenen Gewebstücken das fünffache Volumen RLT-Puffer inkl. 1% β-Mercaptoethanol (Protokoll nach RNeasy® Mini Kit; Qiagen, Hilden) zugegeben. Die Proben wurden anschließend mit einem Ultratorrax Dispergiewerkzeug TH (OMNI international, Marietta, GA/USA) 30 s homogenisiert und auf Eis abgekühlt. Die Suspension wurde zur Aufreinigung auf Säulen (Qiasredder®; Qiagen, Hilden) pipettiert und zentrifugiert. So konnten nicht homogenisierte Fragmente extrahiert werden. Aus dem Durchfluß wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers die gesamte RNA isoliert. Die Ausbeute der RNA betrug 50-100 µg bei einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert (siehe Kap. 2.2.1.4) von 1,8-2,0.

2.2.1.20 Northern-Blot

3 µg der Gesamt-RNA einer jeden Probe wurden mit 2-fachem RNA-Probenpuffer gemischt und unter einem Abzug auf einem 1,5%igen denaturierenden Agarose-Gel bei 100 V über

eine Strecke von 6 cm elektrophoretisch auftrennt. Die RNA wurde nun unter Ausnutzung von Kapillarkräften in 20-fachem SSC-Puffer (3 M NaCl / 0,3 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat, pH 7,0) über Nacht aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Amersham Biosciences, München) übertragen (Mülhardt, 2003a). Am nächsten Tag wurde die mit RNA behaftete Membran entnommen und für 2 h bei 80 °C in einem Trockenschrank inkubiert, wodurch die RNA fixiert wurde. Es folgte die Hybridisierung mittels radioaktiver Sonde.

2.2.1.21 Herstellung von radioaktiv markierten Sonden

Zur Herstellung von radioaktiv markierten Sonden wurden PCR-Ansätze nach folgendem Muster pipettiert:

- 1 µl Matrizen-DNA (10 ng/ml)
- 1 µl *sense*-Primer (10 µM)
- 1 µl *antisense*-Primer (10 µM)
- 2,5 µl 10 x *Taq*-Polymerase-Puffer inkl. 15 mM MgCl₂
- 2,5 µl dNTP-Mix (40 mM)
- 4 µl 5'-[α-³²P]-dATP (6000 Ci/mM)
- 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl)
- 12 µl H₂O

Die PCR-Bedingungen wurden individuell gewählt. Dabei waren Länge und G/C-Gehalt der Primer für die gewählte Anheftungstemperatur verantwortlich. Die Zeit der Kettenverlängerung (Elongation) richtete sich nach Länge des zu amplifizierenden Abschnittes und der Syntheserate der benutzten DNA-Polymerase. Schließlich mußte die richtige Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase gewählt werden. Nach Beendigung der PCR-Reaktionen wurden die 25 µl-Ansätze mit 400 µl nukleinsäurefreiem H₂O gemischt und in Sephadex™G-50-Säulen (NICK™ Columns; Amersham Biosciences, München) pipettiert, wodurch ungebundene Nukleotide zurückgehalten wurden. Der Durchsatz mit der aufgereinigten Sonde wurde für die nun folgenden Hybridisierungen verwendet.

2.2.1.22 Hybridisierungen von DNA und RNA mittels radioaktiver Sonden

Fixierte Northern- oder Southern-Membranen wurden zunächst zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen in Hybridisierungspuffer QuikHyb® (Stratagene, Amsterdam/NL) 30 min lang unter sanftem Schaukeln prähybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung durch Bindung einer radioaktiven Sonde folgte daraufhin unter spezifischen Bedingungen in Hybridisierungsröhren. Die radioaktive Sonde, welche zuvor unter Verwendung von 5'-[α-³²P]-dATP (Perkin-Elmer, Köln; Amersham Biosciences, München) durch PCR amplifiziert wurde, wurde nun in oben genanntem Puffer, welcher zusätzlich 100 µg/ml einzelsträngige Heringssperma-DNA enthielt, auf die Membranen appliziert. Eine wichtige Rolle spielte in diesem Zusammenhang die Hybridisierungstemperatur von 65 °C, die innerhalb eines Drehofens (Dunn Labortechnik, Asbach) konstant gehalten wurde. In

diesem speziellen Ofen wurden die Membranen durch langsames Drehen der Röhren gleichmäßig mit der Sonde inkubiert. Für die Hybridisierungstemperatur, unter welcher eine Sonde spezifisch bindet, sind im wesentlichen Länge und G/C-Gehalt der Sequenz, die Salzkonzentration und der Formamidanteil des Puffers verantwortlich. Insgesamt dauerte der Hybridisierungsvorgang 1 h. Nach Hybridisierung wurden die Membranen gewaschen, um unspezifische Bindungen der Sonde zu lösen. Dazu wurden die Membranen für 1h mit einer geringen Stringenz in 5 x SSC / 0,1% SDS (w/v) bei 60 °C gewaschen. Nach Messen der Emissionsstrahlung der Membranen mit Hilfe eines Geigerzählers, wurde je nach Bedarf die Stringenz erhöht, indem die Salzkonzentration des Waschpuffers gesenkt wurde. Dies geschah durch Inkubation der Membranen für 1 h in 0,1 x SSC / 0,1% SDS (w/v) bei 60 °C. Nach dem Waschvorgang wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschweißt. Es folgte die Autoradiographie.

2.2.1.23 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Membranen wurden für den Nachweis der Autoradiographie in Filmkassetten (Kodak, Stuttgart; Amersham Biosciences, München) überführt und mit Klebeband fixiert. Im Dunkeln folgte das Auflegen jeweils eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences, München) pro Kassette, dessen Exposition je nach Bedarf wenige Stunden bis einige Tage dauerte. Es wurden ausschließlich Filmkassetten benutzt, welche integrierte Verstärkerfolien besaßen. Die Verstärkerfolie absorbierte Sondenstrahlung, welche in Form von Licht reflektiert wurde und erneut auf den Film traf. Um die Funktionalität der Verstärkerfolien zu wahren, und auch schwache Signale abbilden zu können, wurden die Filmkassetten während der Exposition bei -80 °C in einer Kühltruhe aufbewahrt. Nach Exposition wurden betreffende Röntgenfilme in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer Entwicklermaschine (Optimax Typ TR; MS Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Allgemeine Arbeiten mit Zellkulturen

Die Zellkulturarbeiten fanden ausschließlich an sterilen Werkbänken (Sterilbank HERAsafe und Sterilbank Lamin Air, Heraeus, Hanau) statt. Die Kultivierung von Säuger-Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Größe gezogen. In zeitlich regelmäßigen Abständen wurden die kultivierten Zellen Mycoplasmentests unterzogen. Die Inkubatoren wurden in bestimmten zeitlichen Abständen durch Erhitzen auf 300 °C sterilisiert.

2.2.2.2 Passagieren von Zellen

Vor dem Passagieren wurden adhärenz Säugetierzellen zunächst mit PBS gewaschen und danach für ca. 3 min mit Trypsin/EDTA-haltiger Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert. Die nun von der extrazellulären Matrix und untereinander gelösten Zellen wurden in serumhaltigem Medium resuspendiert, so daß das zuvor applizierte Trypsin seine Wirkung verlor. Die Zellsuspension wurde mit 250 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Zellen wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung neu ausgesät.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zentrifugierte Zellen einer konfluenten Flasche wurden in Einfriermedium, welches 40% des betreffenden Kulturmediums, 50% FCS und 10% DMSO enthielt (siehe Kapitel 2.1.8.2), resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde zu je einem Milliliter in Kryo-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt und zunächst bei -20 °C über Nacht eingefroren. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in eine Umgebungstemperatur von -80 °C überführt, ehe die langfristige Lagerung ab dem dritten Tag in flüssigem Stickstoff bei -196 °C erfolgte. Für die Überführung in Kultur wurden gefrorene Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut, in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt und zentrifugiert (250 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche ausgesät.

2.2.2.4 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion adhärenz Säugetierzellen mit Expressionsplasmiden wurden folgende Transfektionsreagenzien verwendet: FuGENE6 (Roche, Mannheim), Lipofectamin (Invitrogen, Karlsruhe) und JetPEI® (Biomol, Hamburg). Die einzelnen Transfektionen wurden nach Protokoll des jeweiligen Herstellers durchgeführt, wobei zum Zeitpunkt der Transfektion bei Anwendung mancher Transfektionsreagenzien serumfreies Kulturmedium vonnöten war, während andere Reagenzien sowohl in serumfreien, als auch in serumhaltigem Medium Anwendung fanden. Insgesamt erwies sich FuGENE6 (Roche, Mannheim) als besonders geeignet, da mit Hilfe dieses Reagenzes sowohl unter Serumentzug als auch in serumhaltigem Kulturmedium gute Transfektionseffizienzen bei den verwendeten Zelllinien erreicht wurden. Als serumfreies Medium für die einzelnen Transfektionsansätze diente Opti-MEM® (Invitrogen, Karlsruhe).

Ko-Transfektionen von Plasmiden für konstitutive Expression von d2EGFP (*enhanced green fluorescent protein* mit Halbwertszeit von 2 h) und shRNA-exprimierenden Plasmiden

wurden im Verhältnis 1:1 durchgeführt. Ko-Transfektionen von Plasmiden für konstitutive Expression von TetR und shRNA-exprimierenden Plasmiden wurden in einem Verhältnis von 3:2 durchgeführt. Für das Kulturmedium wurde ausschließlich tetrazyklinfreies FCS verwendet.

2.2.2.5 Selektion von transfizierten Zellen

Nach transienter Transfektion wurden Plasmid-tragende Zellen selektiert, um störende Einflüsse durch untransfizierte Zellen weitestgehend auszuschließen. Die transfizierten Expressionsplasmide trugen zusätzlich zu den gewünschten genetischen Elementen Selektionsmarkergene, durch deren Expression transfizierte Zellen gegen ein bestimmtes Antibiotikum resistent wurden. 24 h nach den Ko-Transfektionen von Plasmid-Vektoren für TetR und shRNA-exprimierende Einheiten wurde betreffenden Zellen 100 µg/ml Hygromycin B (BD Clontech, Heidelberg) und 600 µg/ml Geneticin (G418; Invitrogen, Karlsruhe) verabreicht. Das Selektionsmedium wurde an jedem Tag gewechselt. Nicht-transfizierte Zellen hatten keine Resistenzeigenschaften und starben unter Einfluß der Antibiotika.

2.2.2.6 Herstellung von stabilen Zellklonen

Für die stabile Integration von RNAi-Kassetten in das Genom von TetR-exprimierenden Tumorzellen wurden T-REx™-HeLa-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) mit betreffenden Plasmid-Vektoren mittels Lipofektion transfiziert (siehe Kap. 2.2.2.4). 24 h nach Lipofektion wurde mit der Selektion von Plasmid-tragenden Zellen begonnen (siehe Kap. 2.2.2.5). Dazu wurde Geneticin (G418) in einer Konzentration von 1,5 mg/ml in das Kulturmedium gegeben. 3-4 Wochen wurden die Zellen selektiert, wobei das Kulturmedium inkl. frischem Antibiotikum alle drei Tage erneuert wurde. Restliche Zellen, welche sich ab ca. 2-3 Wochen durch Teilung neu ausbreiteten und stabile Antibiotikaresistenzen aufwiesen, wurden vereinzelt, um homogene genetische Eigenschaften zu gewährleisten. Zur Vereinzlung wurden verbliebene Zellen trypsiniert und in serumhaltigem, antibiotikafreiem Medium aufgenommen. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Renner, Darmstadt) wurde die Zahl der Zellen pro Volumeneinheit bestimmt. Die Zellsuspension wurde in mehreren Schritten verdünnt, bis sich, statistisch gesehen, in 300 µl Medium eine Zelle aufhielt. Jeweils 300 µl der finalen Suspension wurden in die *Wells* einer 96er-Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen) pipettiert. Am folgenden Tag wurde das bisherige Medium durch konditioniertes Medium, welches durch Mischen von frischem Kulturmedium mit Kulturmedium von konfluenten Zellen im Verhältnis 1:1 hergestellt wurde und insgesamt mehr Wachstumsfaktoren enthielt,

ersetzt. In den folgenden Tagen und Wochen wurde das Wachstum der einzelnen Zellklone mit Hilfe eines inversen Mikroskopes IDO3 (Zeiss, Jena) verfolgt. *Wells* mit keinem oder mehr als einem Zellklon wurden außer Acht gelassen. *Wells* mit einem einzigen Zellklon wurden markiert und unterlagen fortan gesonderter Beobachtung. Klone, welche sich schnell ausbreiteten und vermehrtem Platzmangel ausgesetzt waren, wurden trypsiniert und in die *Wells* von Mikrotiterplatten mit größerer Grundfläche ausgesät. Als die Zellmenge nach exponentiellem Wachstum eine Aussaat in Zellkulturgefäße mit einer Grundfläche von mindestens 25 cm² erlaubten, wurde mit erneuter Selektion durch Applikation von 500 µg/ml Geneticin (G418) begonnen. Klone, welche fortan starben, hatten im zeitlichen Verlauf des Wachstums in antibiotikafreiem Medium ihr Resistenzgen verloren. Während Vereinzelung und folgender Teilung der Klone gab es keine Alternative zur Applikation von antibiotikafreiem und konditioniertem Medium. So zeigte die Praxis, daß sich Einzelzellen in Anwesenheit von Antibiotikakonzentrationen, welche für die Selektion notwendig sind, nicht oder kaum teilen können. Der Nachweis der korrekten Integration von funktionellen Elementen der Plasmid-DNA wurde mittels PCR (siehe Kap. 2.2.1.12) und anschließender Sequenzierung geleistet. Mit Hilfe der Southern-Blot-Technik wurde die genaue Anzahl von integrierten funktionellen Einheiten (siehe Kap. 2.2.1.17) ermittelt.

2.2.2.7 Induktion von Promotoren durch Applikation von Doxyzyklin

Die Expression von shRNA durch induzierbare Derivate des H1-Promotors wurde durch die Applikation verschiedener Doxyzyklin-Konzentrationen von 1-10 µg/ml in das Kulturmedium erreicht. In transienten Versuchen startete die Applikation 24 h nach Transfektion und dauerte insgesamt 72 h lang, wobei das Kulturmedium jeden Tag erneuert wurde. Bei Induktion stabil integrierter Promotoren begann die Applikation von Doxyzyklin in Konzentrationen von 1-10 µg/ml mit der Aussaat betreffender Zellklone und dauerte insgesamt 120 h.

2.2.2.8 Durchflußzytometrie mittels FACScan-Analyse (*fluorescence activated cell scanning*) zur Bestimmung der EGFP-Fluoreszenz und der Apoptose

Für die Ermittlung von Transfektionseffizienzen und RNAi-Effekten gegen EGFP wurde sich der Durchflußzytometrie mittels FACScan-Analyse bedient. 48 h nach Ko-Transfektion von konstitutiv EGFP-exprimierenden und konstitutiv shRNA-exprimierenden Plasmiden wurden betreffende Zellen trypsiniert, in Kulturmedium aufgenommen, und zentrifugiert (250 x g, 5 min, RT). Die sedimentierten Zellen wurden mit PBS resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert (250 x g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen abermals in PBS aufgenommen und in spezielle FACScan-Röhrchen (BD Biosciences,

Heidelberg) überführt. Die Fluoreszenzaktivität der Zellen wurde nun mit Hilfe eines FACScan-Gerätes (*fluorescence activated cell scanner* = Durchflußzytometer; BD Biosciences, Heidelberg) ermittelt. Quantitative und qualitative Analyse der fluoreszierenden Zellen erfolgte dabei mit Hilfe der Software *CellQuest* (BD Biosciences, Heidelberg).

Um den Grad der Apoptose von Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen nach obigem Muster abgelöst, gewaschen und nach Anleitung des Vybrant® Apoptosis Assay Kit #2 (Molecular Probes, Eugene, CA/USA) gefärbt. Bei dieser Prozedur wurde der Fluoreszenz-Farbstoff Propidiumiodid sowie der Marker Annexin V appliziert, wodurch bereits tote Zellen von apoptotischen Zellen unterschieden werden konnten. Quantitative und qualitative Analyse erfolgten wie oben beschrieben mittels Durchflußzytometrie .

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Säugerzellen

Den in Kulturschalen wachsenden Zellen wurde das Medium entzogen und durch kaltes PBS (4 °C) ersetzt. Der Zellrasen wurde anschließend mit einem Kunststoffspatel (Greiner, Frickenhausen) vom Untergrund der Kulturschalen gekratzt. Die daraufhin in PBS vorliegenden Zellfragmente wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Zellfragmente wurden erneut in kaltem PBS gewaschen und ein zweites Mal zentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde erneut verworfen, wobei kleine PBS-Reste mit einer Pipette abgesaugt wurden. Die trockenen Pellets wurden anschließend mit der dreifachen Menge – bezogen auf ihr eigenes Volumen – fertigem RIPA-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h auf einem Rotator bei 4 °C wurden die Lysate durch Zentrifugation (16.000 x g, 10 min, 4 °C) geklärt. Die Überstände, in welchen die Proteine im gelösten Zustand als Suspension vorliegen, wurden in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde ein Bradford-Test zur Bestimmung des Proteingehalts durchgeführt (siehe Kap. 2.2.3.3). Alternativ wurden die fertigen Proteinlysate bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Tumoren

Die zuvor bei -80 °C oder in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrten Tumoren wurden zunächst in ca. 30-50 mm³ große Stücke zerschnitten und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Jeder Tumorprobe wurde das Fünffache ihres Volumens an Proteinisolierungspuffer für Tumoren (siehe Kap. 2.1.2.5) zugegeben. Mit Hilfe eines Ultratorrax Dispergierwerkzeuges (OMNI international, Marietta, GA/USA) wurden die Proben 2 x 30 s homogenisiert und

dazwischen auf Eis abgekühlt. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C auf einem Rotator wurden die Proben für 20 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt, erneut 10 min auf einem Rotator bei 4 °C inkubiert und 20 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände bildeten nun fertige Lysate, welche für Nachweise mittels Western-Blot eingesetzt oder alternativ bei -20 °C gelagert wurden. Für den ersten Fall wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test durchgeführt (siehe Kap. 2.2.3.3).

2.2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die durch Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine hervorgerufene Veränderung ihres Absorptionsverhaltens kann bei einer OD_{595} aufgespürt und mit Hilfe eines Photometers gemessen werden (Bradford, 1976). Für die modifizierte Variante (Zor und Selinger, 1996) wurden für jeweils eine zu messende Probe 800 μ l H₂O bidest. mit 200 μ l Protein Assay-Lösung (BIO-Rad, München) oder 200 μ l Roti-Nanoquant-Lösung (Roth, Karlsruhe) in einer Einmal-Küvette (Sarstedt; Nümbrecht) gemischt. Nach Zugabe von 1 μ l Proteinlysate wurde erneut gemischt und die Absorption bei 595 nm gegen den Leerwert (ohne Protein) gemessen. Entsprechend der Eichgeraden, welche mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt wurde, entsprach eine Absorption von $OD_{595} = 0,1$ einer Proteinkonzentration von 1,79 μ g/ μ l Protein. Hierbei mußte berücksichtigt werden, daß der lineare Bereich der Eichkurve zwischen den Werten $OD_{595} = 0,1$ und $OD_{595} = 0,8$ lag. Proteinlysate, deren Werte außerhalb dieses Bereiches lagen, wurden verdünnt ($OD_{595} > 0,8$) oder eingeeengt ($OD_{595} < 0,1$). Letzteres geschah durch Zentrifugation in einem Vakuum mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge SpeedVac SVC100 (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt).

2.2.3.4 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Mit Hilfe der denaturierenden SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) können gelöste Polypeptide und Proteine aus heterogenen Suspensionen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Für dieses Prinzip spielt SDS, ein sogenanntes Detergens, eine wichtige Rolle. Das amphipatische SDS tritt durch seinen ungeladenen aliphatischen Rest mit Proteinen und gleichzeitig durch seine polare, negativ geladene Kopfregion mit wässriger Lösung in Wechselwirkung und bringt somit Proteine in Lösung. Dabei werden die Proteine in ihre Primärstruktur überführt, was bedeutet, daß eine längere Polypeptidkette mit mehr SDS-Molekülen in Wechselwirkung tritt, als eine kürzere Polypeptidkette. Es handelt sich dabei um einen proportionalen Zusammenhang. Die Nettoladung der Proteine (Ladung pro Gewichtseinheit) ist somit gleich, wodurch eine

elektrophoretische Auftrennung nach dem Größenprinzip stattfinden kann. Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-Protean III-System (BIO-Rad, München) oder das XCell *SureLock*TM Mini-Cell-System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Zusammensetzung von Tris/Glycin-Gelen wurde dem Protokoll von Sambrook (Sambrook et al., 1989), jene von Bis/Tris-Gelen der Anleitung von Invitrogen (Karlsruhe) entnommen (siehe auch Kap. 2.1.2.5). Jeweils zwei Gele wurden in den oben beschriebenen Systemen senkrecht fixiert und komplett mit Laufpuffer überschichtet. Gleiche Proteinmengen der aufzutrennenden Proben wurden in Reaktionsgefäße pipettiert, mit denaturierendem SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 95 °C auf einem Heizblock aufgekocht, und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels geladen. Die Elektrophorese selbst wurde durch Anlegen einer Spannung von 150 V (Tris/Glycin-Gele) oder 180 V (Bis/Tris-Gele) im Milliamperebereich durchgeführt.

2.2.3.5 Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie-Färbung

Betreffende Polyacrylamid-Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung (siehe 2.1.2.5) überschichtet und je nach ihrer Dicke 0,5-2 h auf einem Schüttler inkubiert. Bei tiefblauer Färbung wurde die Coomassie-Lösung entfernt und die Gele in Schnellentfärber (siehe 2.1.2.5) überführt. Je nach Dicke der Gele dauerte das Entfärben der proteinfreien Bereiche 0,5-1 h. Bereiche mit Proteinen blieben dagegen gefärbt. Schließlich wurden die durch Entfärbung geschrumpften Gele in H₂O bis zu ihrer Ausgangsgröße aufquellen gelassen und auf Whatman-Papieren in einem Gelrockner Model 583 (BIO-Rad, München) getrocknet.

2.2.3.6 Western-Blot und Immundetektion

Der Western-Blot dient dem Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf Nitrocellulose- oder PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen (Towbin et al., 1979). Durch Inkubation spezifischer Antikörper können auf solchen Membranen Proteine von Interesse markiert und detektiert werden. Zur Durchführung von Western-Blots wurde das Blot-System Mini Trans-Blot Transfer Cell (BIO-Rad, München) und alternativ das XCell IITM Blot-Modul (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Der Transfer der Proteine erfolgte je nach Zusammensetzung der Gele in speziell zugehörigem Blotpuffer (siehe 2.1.2.5). Am Blot-System Mini Trans-Blot Transfer Cell (BIO-Rad, München) wurde eine Spannung von 70 V für 2 h angelegt. Mit Hilfe des XCell IITM Blot-Moduls (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung von 35 V 1 h lang geblottet. Die in dieser Arbeit verwendeten PVDF-Membranen wurden von Millipore (Eschborn), das Whatman-Papier von Schleicher und Schüll (Dassel) bezogen. Zum Aktivieren wurde die PVDF-Membran

zunächst für 1 min in MeOH inkubiert, anschließend für 3 min in H₂O gelegt, bevor sie zusammen mit Whatman-Papieren in Blotpuffer äquilibriert wurde. Der Aufbau des Blots in einer Blot-Apparatur erfolgte nach folgendem Schema: Kathode / 2 Schwämmchen / 2 Whatman-Papiere / Gel / PVDF-Membran / 2 Whatman-Papiere / 2 Schwämmchen / Anode. Nach dem Transfer wurde die Membran für 30 min in Blockingpuffer (2% BSA in TBST) inkubiert, um freie Proteinbindestellen abzusättigen. So konnten unspezifische Bindungen von primären Antikörpern weitestgehend verhindert werden. Zur spezifischen Markierung von Proteinen folgte die Inkubation von primären Antikörpern in Blockingpuffer für 1 h. Zum Nachweis von Plk1 wurde monoklonaler anti-Plk1-Antikörper aus der Maus (Santa Cruz, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als Kontrolle wurde β -Aktin mittels eines monoklonalen anti- β -Aktin-Antikörpers aus der Maus (Sigma, Taufkirchen) markiert. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200.000 inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wurde durch Waschen der Membranen für 20 min in TBST entfernt. Der gebundene Primärantikörper wurde mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper markiert, welcher spezifisch gegen Antigene der Maus gerichtet war. Insgesamt konnten sich mehrere Zweitantikörper, deren gekoppelte Meerrettichperoxidase-Enzyme die spätere Chemi-Lumineszenz-Reaktion hervorriefen, an einen einzelnen Primärantikörper heften. Die Inkubation erfolgte in einer Verdünnung von 1:2000 in Blockingpuffer für 30 min. Abschließend folgte das Entfernen von ungebundenem Zweitantikörper durch erneutes Waschen in TBST für 20 min. Das Sichtbarmachen der markierten Proteine erfolgte durch eine Chemi-Lumineszenz-Reaktion. Dazu wurden betreffende Membranen mit ECL (enhanced chemiluminescent)-Lösung (Pierce, Bonn / alternativ selbst hergestellt (siehe Kap. 2.1.2.5)) überschichtet. ECL wurde als Substrat der Meerrettichperoxidase umgesetzt, wodurch Lichtsignale emittiert wurden, welche mittels Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, München; Kodak InSight IDS/RA, Kodak, Stuttgart) detektiert werden konnten. Die Exposition der Röntgenfilme fand in lichtundurchlässigen Filmkassetten (Hypercassette™; Amersham Biosciences, München oder X-Omatic®; Kodak, Stuttgart) statt, wobei das Auflegen der Filme unter Einfluß schwachen Rotlichts in einer Dunkelkammer erfolgte. Die Exposition der Röntgenfilme dauerte zwischen 5 und 20 min. Nach Exposition wurden betreffende Röntgenfilme in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer Entwicklermaschine (Optimax Typ TR; MS Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt.

2.2.4 Quantitative Auswertung von Gelen und Autoradiogrammen

Mit Ethidiumbromid gefärbte DNA und RNA in Agarose-Gelen wurden auf einem UV-Transilluminator (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee Cedex / Frankreich) sichtbar gemacht. Mit Hilfe des Kodak-Fotodokumentationssystems 1D 3.6 (Kodak, Stuttgart) wurden die Gele abfotografiert und die Intensität der Banden als Ladekontrolle mit gleichnamiger Software quantifiziert.

Autoradiogramme von Southern-, Northern- oder Western-Blots wurden auf einem Röntgenfilmbetrachtungsgerät Planilux® (Gerätebau Felix Schulte GmbH, Warstein) gelegt, mit dem gleichen System abfotografiert und quantifiziert.

Zur quantitativen Analyse von Plk1-Transkript aus Northern-Blots wurden betreffende Werte mit ihren jeweiligen Ladekontrollen durch Bildung der Quotienten standardisiert. Als Ladekontrolle diente hier die aus den Agarose-Gelen abfotografierte 28S rRNA.

Zur quantitativen Analyse von Plk1-Protein aus Western-Blots wurden betreffende Werte nach gleichem Muster mit den zugehörigen Ladekontrollen in Beziehung gesetzt, wobei in diesem Falle β -Aktin zur Standardisierung herangezogen wurde.

Alle Durchschnittswerte aus Northern- und Western-Blots wurden an Werten orientiert, welche Plk1-Transkriptmenge bzw. Plk1-Proteinmenge *mismatch*-shRNA-exprimierender Zellen beschrieb.

2.2.5 Bestimmung von Zellzahlen

Die Wachstumsraten von transient transfizierten Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin ermittelt. Dazu wurden 6×10^5 Zellen ausgesät und am folgenden Tag mit Plasmiden für die Expression von TetR und shRNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden betreffende Zellen durch Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B und 600 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin (G418) selektiert. 48 h nach Beginn der Selektion und 72 h nach Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin induziert. Folgend wurden die Zellen 0, 24, 48, 72, 96 und 120 h nach Beginn der Induktion mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Renner, Darmstadt) ausgezählt. 192 h nach Transfektion wurde die Zahl von Kontrollzellen, welche konstitutiv *mismatch*-shRNA exprimierten, als Referenzwert (100%) bestimmt. Die Werte von proliferierenden Zellen unter den anderen Bedingungen wurden prozentual an diesem Referenzwert orientiert.

Die Proliferationsraten von stabilen Zellklonen wurden in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin bestimmt. Dazu wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und gleichzeitig durch Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin induziert. 24, 48, 72, 96 und 120 h nach Beginn der Induktion

wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Renner, Darmstadt) ausgezählt. Wildtyp-HeLa-Zellen wurden mit 5 µg/ml Doxyzyklin induziert, um den Effekt von Doxyzyklin auf die Proliferation der Zellen zu testen. Als Referenzwert (100%) wurde die Zahl von Wildtyp-HeLa-Zellen, welche nicht durch Doxyzyklin induziert wurden, 120 h nach Versuchsbeginn herangezogen. Die Zahlen für die verschiedenen Zellklone in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin wurden daran prozentual orientiert.

2.2.6 Experimente mit Xenograft-Mäusen

Für die Experimente mit Xenograft-Mäusen wurden acht Wochen alte athymische männliche Nacktmäuse mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten stabilen HeLa-Klonen inokuliert. Jeder Maus wurden pro Flanke 1×10^7 Zellen in 500 µl Kochsalzlösung subkutan verabreicht. Insgesamt 24 Tieren wurden USMM-Klone (siehe Kap. 3.5.1) in die linke Flanke, den selben 24 Tieren wurden US-Klone (siehe Kap. 3.5.1) in die rechte Flanke injiziert. Somit konnte sichergestellt werden, daß beide entstehende Tumortypen den gleichen Wachstumsbedingungen in ein und demselben Organismus ausgesetzt waren. Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in Gruppen zu jeweils 12 Tieren aufgeteilt. Ab zwei Tagen nach Inokulierung wurde einer der beiden Tiergruppen Trinkwasser mit 0,2% Doxyzyklin und 3% Sucrose gegeben. Die Kontrollgruppe dagegen bekam nur 3%ige Sucrose-Lösung ohne Doxyzyklin verabreicht. Das Trinkwasser wurde dreimal pro Woche frisch angesetzt und gewechselt. Zusätzlich wurde durch das Abschirmen der Trinkflaschen mit Alufolie sichergestellt, daß Doxyzyklin-enthaltendes Trinkwasser keiner stärkeren Lichtstrahlung ausgesetzt war. Ab Tag 23 nach Inokulierung wurden die nun auf beiden Flanken der Mäuse vorhandenen Tumoren in zwei Dimensionen, welche orthogonal zueinander angeordnet waren, gemessen. Dazu wurde eine Schieblehre benutzt, welche eine Auflösung bis 100 µm aufwies. Die Messungen erfolgten zweimal pro Woche und endeten an Tag 51 nach Inokulierung der Zellen. Unmittelbar nach der letzten Messung wurden sämtliche Mäuse durch cervikale Dislokation getötet. Die Tumoren wurden für spätere Analysen präpariert, entnommen und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Aus den beiden gemessenen Werten, welche die Ausmaße des Tumors beschrieben, wurde mit Hilfe der Formel $\pi/6 ab^2$ das Volumen des Tumors errechnet, wobei a als der größere der beiden Werte und b als der kleinere der Werte definiert war. Die Formel beschreibt das Volumen eines ellipsenförmigen Körpers. Somit konnten Näherungswerte der tatsächlichen Tumolvolumen errechnet werden. Jedes Volumen eines Tumors zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde mit dem zugehörigen anfänglichen Ausgangsvolumen in Beziehung gesetzt.

So konnten relative Tumolvolumen im Rahmen der Gesamtentwicklung ermittelt werden. Die Volumenwerte der zwölf Tumoren eines jeden Tumortyps innerhalb einer Kontrollgruppe wurden für jeden Zeitpunkt gemittelt. Für jeden der vier vorliegenden Parameter (USMM-Tumoren -Doxyzyklin; US-Tumoren -Doxyzyklin; USMM-Tumoren +Doxyzyklin; US-Tumoren +Doxyzyklin) wurden die Durchschnittswerte und Standardabweichungen in einem Größen-Diagramm gegen die Zeit aufgetragen.

2.2.7 Statistische Auswertung

Alle Durchschnittswerte, welche Northern- und Western- Blots zugrunde liegen, wurden aus mindestens fünf Einzelwerten generiert. Jedes zugehörige Zellkultur-Experiment wurde dazu mindestens dreimal durchgeführt. Durchschnittswerte aus Wachstumsexperimenten von Zellkulturen wurden aus mindestens drei Einzelwerten ermittelt. Zur Ermittlung von Signifikanzen (P) wurden gepaarte T -Tests (zweiseitig) durchgeführt. Signifikante Abweichungen ($P < 0,05$) wurden in den Diagrammen der Kap. 3.5 und 3.6 mit Sternchen gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Aufklärung von Mutationen im humanen Plk1-Gen

Aufgrund von Hinweisen über einzelne Punktmutationen im humanen Plk1-Gen verschiedener Tumorzelllinien, welche in einer Destabilisierung des Plk1-Proteins resultierten (Simizu et al., 2000), wurde das Plk1-Gen weiterer Tumorzelllinien und Primärtumoren im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Daten aus obiger Studie zeigen, daß hauptsächlich Zelllinien aus soliden Tumoren im Gegensatz zu tumorösen Suspensionszellen Mutationen des Plk1-Gens aufwiesen. Um diesem Befund nachzugehen und eine mögliche Variabilität der Plk1-Gene zu überprüfen, wurden weitere Zelllinien aus soliden Tumoren getestet. Dies geschah im Hinblick auf mögliche Auswirkungen von Mutationen auf Struktur und Funktion von Plk1 und die damit verbundene Validierung von Plk1 für mögliche RNAi-basierte Therapieansätze.

3.1.1 Analyse des Plk1-Gens in humanen Tumorzelllinien

Aufgrund der Länge und lokaler Bereiche mit extrem großem G/C-Anteil ist die Sequenz-Analyse der mRNA von Plk1 mittels PCR (*polymerase chain reaction* = Polymerase-Kettenreaktion) technisch sehr schwierig durchzuführen. Auf genomischer Ebene dagegen besteht das humane Plk1-Gen aus 10 Exons, welche die spätere Aminosäuresequenz des funktionsfähigen Proteins kodieren (Holtrich et al., 1994). Jene 10 kodierenden Exons weisen unterschiedliche Längen auf, welche zwischen 78 und 408 bp liegen (Tab 3.1).

Plk1 Exon Nr.	Länge Exon-Sequenz in bp	Länge PCR-Fragment in bp
1	408	558
2	169	266
3	145	275
4	94	252
5	220	361
6	156	271
7	78	191
8	155	305
9	183	294
10	201	609 / 232
gesamt	1809 = 603 AS	3382 / 3005

Tab. 3.1: Übersicht der Exons von Plk1: Länge der zehn für Plk1 kodierenden Exons und gewählte Länge ihrer zugehörigen DNA-Fragmente für die Amplifikation mittels PCR. bp = Basenpaare

Durch den Entwurf von *sense*- und *antisense*-Primern, welche sowohl in 5'-Richtung, als auch in 3'-Richtung mindestens 45 bp in die benachbarten Intronbereiche überlappten, konnten alle kodierenden Bereiche erfaßt werden (Tab. 3.1). Gleichzeitig wurde sichergestellt, daß auch die in den Introns lokalisierten Spleißstellen berücksichtigt wurden. Des weiteren wurden sowohl *sense*- als auch *antisense*-Primer aller zehn zu amplifizierenden Fragmente so gewählt, daß alle Fragmente gleichzeitig während eines PCR-Programms amplifiziert werden konnten. Dazu waren einheitliche Schmelztemperaturen (T_m) der Primer erforderlich. Extrem große Unterschiede in der Länge der einzelnen Exon-Fragmente lagen nicht vor, so daß auch in diesem Zusammenhang ein einheitliches PCR-Programm kein Hindernis darstellte. Für die Amplifikation mittels PCR diente die genomische DNA folgender Zelllinien als Matrizen-DNA: BT-474, ein humanes epitheliales Mamma-Karzinom; HeLaS3, ein humanes Cervix-Karzinom; MCF-7, ein humanes epitheliales Mamma-Adenokarzinom und SK-BR-3, ein humanes Mamma-Adenokarzinom.

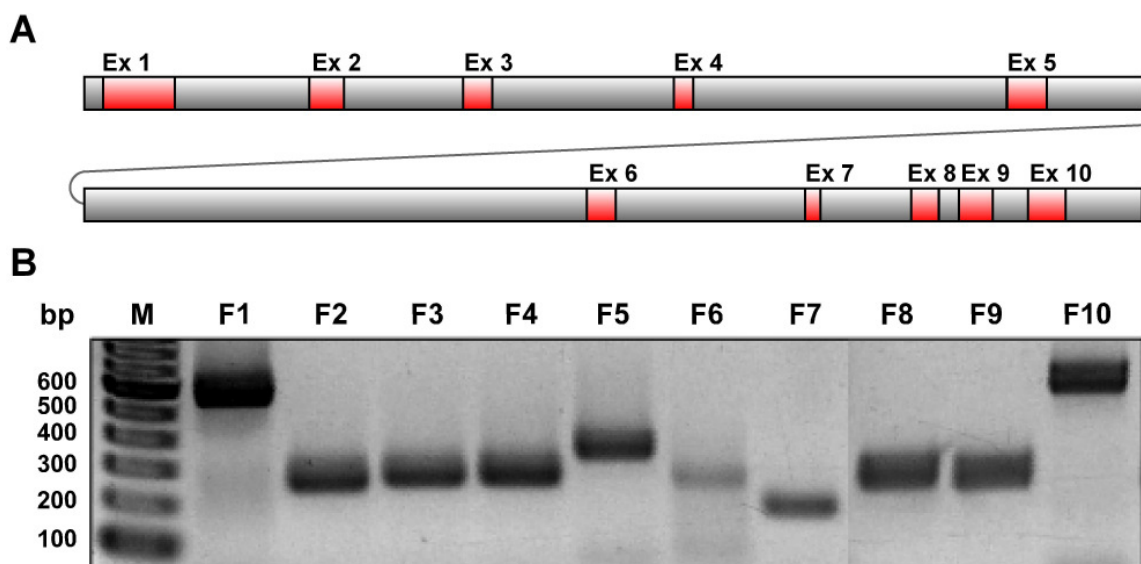


Abb. 3.1: Verteilung der Exons von Plk1. (A) Lage der kodierenden Exon-Bereiche in der prä-mRNA von Plk1 (rot dargestellt). Nicht-kodierende Introns sind grau dargestellt. (B) Amplifizierte PCR-Fragmente der zehn für Plk1 kodierenden Exons nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5%igen Agarose-Gel und Färbung der DNA in Ethidiumbromid. bp = Basenpaare, Ex = Exon, F = Exon-überspannendes DNA-Fragment, M = DNA-Größenmarker

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, in Ethidiumbromid gefärbt (Abb. 3.1B), aus dem Gel aufgereinigt und nachfolgend mit Hilfe der Kettenabbruchreaktion nach *Sanger* (Sanger et al., 1977) durch Verwendung sowohl von *sense*- als auch von *antisense*-Primern beidseitig sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Software-Programms *Lalign*, eines Algorithmus zum Vergleich von DNA-Sequenzen (Huang et al., 1991) (siehe Kap. 2.1.11), den Wildtyp-Sequenzen der zugehörigen Plk1-Exons (GeneID: 5347) durch ein *alignment* zum Vergleich

gegenübergestellt (Abb. 3.2B). Die *antisense*-Sequenzen wurden zuvor unter Verwendung des Software-Programms *Reverse Complement* (Stothard, 2000) (siehe Kap. 2.1.11) in ihre reversen komplementären Basenabfolgen umformatiert.

Durch die Gegenüberstellung beider DNA-Stränge mit der Wildtyp-Sequenz konnte ein größeres Maß an Sicherheit für die Aufklärung von Mutationen gewonnen werden. Zusätzlich wurden die Absorptionsspektren der einzelnen Basen, sowohl von *sense*-, als auch von *antisense*-Sequenzen durch Verwendung des Programms *Chromas Version 1.45* (McCarthy, 2001) (siehe Kap. 2.1.11) visualisiert, um mögliche Überlagerungen einzelner Basen feststellen zu können (Abb 3.2A). Solche Überlagerungen der Absorptionsmaxima zweier verschiedener Basen an derselben Position könnten durch eine heterozygote Mutation nur eines Allels bedingt sein.

Amplifikation und Sequenzierung des Exon 10-umfassenden DNA-Fragments verliefen zunächst nicht in allen PCR-Reaktionen erfolgreich. Dieses Phänomen war auf die spezifische DNA-Struktur zurückzuführen, welche einen lokal begrenzten hohen G/C-Gehalt aufwies. Dieser hohe G/C-Gehalt bewirkte speziell bei Amplifikation des *antisense*-Stranges einen oftmaligen Kettenabbruch der DNA-Polymerase. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein alternatives Fragment zur Amplifikation von Exon 10 definiert, welches in seiner ursprünglichen Länge von 609 bp auf 232 bp verkürzt wurde (Tab. 3.1). Die Folge war eine problemlose Amplifikation und Sequenzierung des betreffenden Fragments ohne Abbruch der PCR.

Nach Auswertung aller zehn kodierender Exonstrukturen inkl. der zugehörigen Spleißstellen gab es im Hinblick auf genomische Mutationen des Plk1-Gens in der Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLaS3 sowie in den Mamma-Karzinom-Zelllinien BT-474, MCF-7 und SK-BR-3 keinerlei Hinweise. Dies konnte durch die 100%ige Übereinstimmung von *sense*- und *antisense*-Sequenzen mit den zugehörigen Wildtyp-Sequenzen in einzelnen Gegenüberstellungen festgestellt werden. Insgesamt betrachtet, konnten sowohl Punktmutationen, als auch Verschiebungen des Leserasters ausgeschlossen werden. Des Weiteren gab es keine Anzeichen für die Überlagerung zweier verschiedener Basen, wodurch heterozygote Mutationen nur eines Allels ausgeschlossen werden konnten.

3.1.2 Analyse des Plk1-Gens in humanen Mamma- und Ovarialkarzinomen

Nach Sequenzanalyse des Plk1-Gens der einzelnen Tumorzelllinien, entschlossen wir uns, primäres humanes Tumormaterial in bezug auf mögliche Mutationen zu analysieren. Im Gegensatz zu Tumorzelllinien, welche *in vitro* eine genetische Einheit darstellen und keiner

Konkurrenzsituation ausgesetzt sind, unterliegen Zellen eines Primärtumors einem *in vivo*-Selektionsdruck. Während des Prozesses der Tumorprogression *in vivo* sind entartende Gewebszellen auf Mutationsereignisse angewiesen, um sich langfristig gegenüber gesunden Zellen in bezug auf ihr Wachstumsverhalten durchsetzen zu können. Nach unseren Überlegungen bestand somit eine Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Mutationen in Primärtumoren. Zu diesem Zwecke wurde die genomische DNA aus insgesamt 15 Mamma-Karzinomen und 11 Ovarial-Karzinomen präpariert. Jede Tumor-DNA-Probe wurde als Matrize für die Amplifikation aller Plk1-Exons in jeweils zehn PCR-Reaktionen eingesetzt.

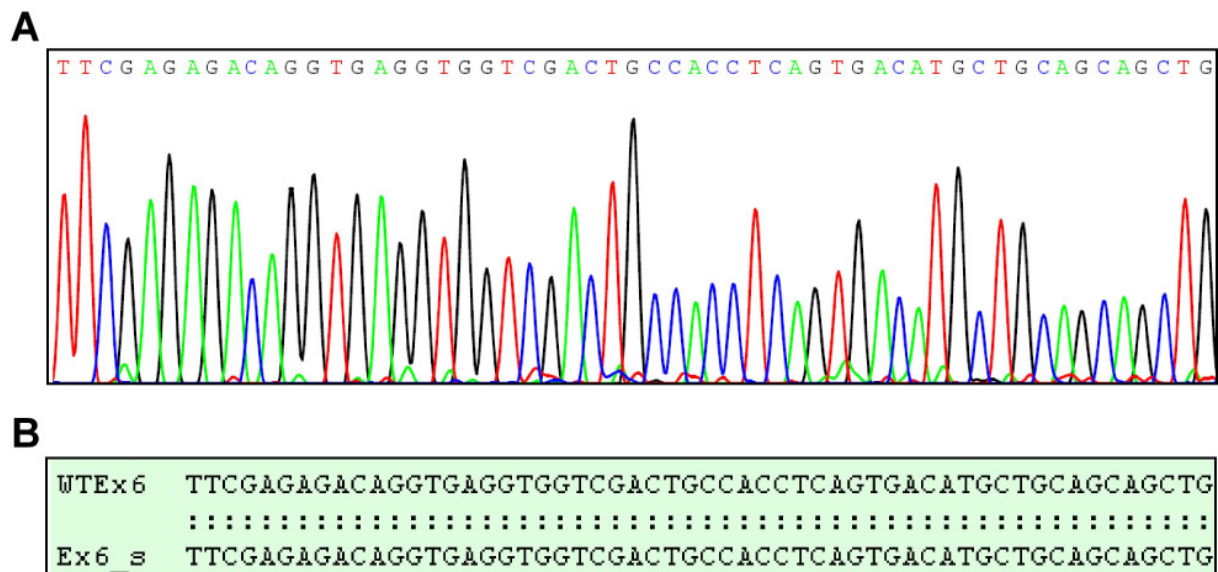


Abb. 3.2: Sequenzierung und *alignment* von Exonsequenzen. (A) Ausschnitt aus dem Chromatogramm eines sequenzierten DNA-Abschnitts aus Exon 6 von Plk1, welches mit dem *sense*-Primer sequenziert wurde (Kettenabbruchmethode nach Sanger). Die farbig dargestellten Amplituden beschreiben die Lage der einzelnen Nukleotide: A = Adenosin (grün), C = Cytidin (blau), G = Guanodin (schwarz), T = Thymin (rot). (B) *alignment* des sequenzierten DNA-Abschnitts aus (A) mit der zugehörigen Wildtyp-Sequenz. Beide Sequenzen stimmen zu 100% überein. Ex6_s = Bereich des sequenzierten PCR-Produktes aus Exon 6 von Plk1 (*sense*-Primer), WTEx6 = Bereich der zugehörigen Wildtyp-Sequenz aus Exon 6 von Plk1.

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in gleicher Weise wie die Fragmente aus den Tumorzelllinien aufgereinigt, sequenziert und ausgewertet. Analog der Ergebnisse aus den Tumorzelllinien konnten sowohl für Mamma-, als auch für Ovarial-Karzinome keine genomischen Mutationen innerhalb der kodierenden Bereiche und innerhalb der in Introns hineinragenden Spleißstellen der untersuchten Plk1-Gene festgestellt werden. Ebenso konnten heterozygote Mutationen, welche nur ein Allel der beiden Kopien des Plk1-Gens betreffen würden, ausgeschlossen werden.

Faßt man die Ergebnisse zusammen, so wurde deutlich, daß die Plk1-Gene in den untersuchten Zelllinien und soliden Primärtumoren keiner Variabilität unterlagen. Aufgrund dieser kontinuierlichen genetischen Voraussetzungen erschien die Anwendung der RNA-

Interferenz als eine sehr geeignete Methode zur Unterdrückung der Genexpression von Plk1. Zum einen, um mittels Grundlagenforschung mitotische Zusammenhänge zu studieren, zum anderen für mögliche Ansätze für die Krebstherapie.

3.2 Herstellung von Plasmid-Vektoren zur Expression von shRNA

3.2.1 Klonierung des parentalen Wildtyp-H1-Promotors

Zum Zwecke einer zeitlich länger andauernden und wirkungsvollen Unterdrückung von Genen durch RNA-Interferenz (RNAi) wurde – als Alternativstrategie zur Applikation von siRNA aus chemischer Synthese – ein Vektor-basiertes System zur konstitutiven Expression von shRNA entwickelt. Als konstitutiver Promotor wurde der parentale Promotor des H1-Gens, welches die RNA-Komponente der humanen nukleären RNase P kodiert, benutzt. Der H1-Promotor wurde bezüglich seiner Eigenschaften bereits genauer untersucht und beschrieben (Hannon et al., 1991; Myslinski et al., 2001). Das H1-Gen besitzt einen genau definierten Transkriptionsstart, sowie einen definierten Transkriptionsstopp. Die Termination der Transkription erfolgt an fünf aufeinanderfolgenden Thymidin-Basen (Abb. 3.3A). Daher ist der H1-Promotor für die Expression nicht-kodierender kurzer RNA-Stränge hervorragend geeignet. In einer ersten Studie zur Vektor-vermittelten konstitutiven Expression von shRNA wurde der parentale H1-Promotor bereits in Säugerzellen erfolgreich eingesetzt. Dabei wurde die beabsichtigte Unterdrückung von Zielgenen mittels RNAi erreicht (Brummelkamp et al., 2002a). Aus diesen und den in Kap. 1.6.3 aufgeführten Gründen wurde der H1-Promotor gewählt, denn er schien für die Ziele dieser Arbeit, mittels Etablierung von induzierbaren Derivaten potente konditionelle RNAi-Effekte zu erreichen, besser geeignet zu sein, als der U6 snRNA-Promotor. Für die spätere Klonierung wurde der parentale H1-Promotor zunächst mittels PCR aus genomischer DNA humaner Zellen amplifiziert. Dabei wurde in den überlappenden Bereich des 5'-Primers eine *XhoI*-Schnittstelle eingebaut. In den 3'-Primer wurde eine *BamHI*-Schnittstelle inseriert, welche die letzten sechs Nukleotide des H1-Promotors substituierte. Zusätzlich wurde in den 3'-Primer eine stromabwärts der *BamHI*-Schnittstelle gelegene *HindIII*-Schnittstelle eingebaut. Die in 3'-Richtung des Promotors liegenden *BamHI*- und *HindIII*-Schnittstellen dienten der späteren Insertion von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden. Das Amplifikat wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* verdaut.

3.2.2 Klonierung von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden

Für die Vektor-vermittelte Expression von shRNA wurden kodierende Sequenzen entworfen, welche gegen Zielsequenzen in EGFP (*enhanced green fluorescent protein* = verstärktes grün fluoreszierendes Protein, einer modifizierten Version des ursprünglich aus *Aequorea victoria* stammenden GFP) und Plk1 gerichtet waren (Tab. 3.2, Abb. 3.3). Die Implementierung erfolgte unter Berücksichtigung der in Kapitel 2.2.1.13 beschriebenen Kriterien mit Hilfe des Programms *siRNA target finder* (Ambion, Huntingdon/GB). Für Referenzversuche wurden zwei zusätzliche Sequenzen entworfen, welche für die Expression von Kontroll-shRNAs vorgesehen waren. Es handelte sich hierbei um zwei *mismatch*-Sequenzen, welche von den EGFP- und Plk1-spezifischen Sequenzen abgeleitet waren. Sie unterschieden sich von ihren zugehörigen spezifischen Sequenzen durch den willkürlichen Austausch von drei Basenpaaren in einem Bereich nahe der geometrischen Mitte der Zielsequenz, wie von Tuschl und Kollegen gefordert (Elbashir et al., 2001b) (Abb. 3.3). Die den shRNAs zugehörigen Zielsequenzen sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt. Zur Vermeidung von unspezifischen Nebeneffekten wurden alle vier Sequenzen mittels *BLAST*-Algorithmus (Altschul et al., 1990) (siehe Kap. 2.1.11), eines heuristischen Suchalgorithmus, gegen die Gendatenbank abgeglichen. Dabei konnten keine signifikanten Übereinstimmungen mit kodierenden Exons im humanen Genom gefunden werden.

shRNA	Zielsequenz
shRNA/EGFP	AAGCTGACCCTGAAGTTCATC
shRNA/EGFPMM	AAGCTGACCCACTAGTTCATC
shRNA/Plk1	AAGTGCTTCGAGATCTCGGAC
shRNA/Plk1MM	AAGTGCCTGAGATCTCGGAC

Tab. 3.2: Übersicht über die Zielsequenzen der verwendeten shRNAs. shRNA/EGFP = spezifische gegen EGFP gerichtete Sequenz; shRNA/EGFPMM = von shRNA/EGFP abgeleitete *mismatch*-Sequenz; shRNA/Plk1 = spezifische gegen Plk1 gerichtete Sequenz; shRNA/Plk1MM = von shRNA/Plk1 abgeleitete *mismatch*-Sequenz. *mismatches* sind rot dargestellt.

Die shRNA-kodierenden *sense*- und *antisense*-Oligonukleotide wurden mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI (5'-Bereich) und *Hind*III (3'-Bereich) versehen. Die *Bam*HI-Schnittstelle grenzte dabei direkt an die shRNA-kodierende Region. Zusätzlich wurde sowohl stromaufwärts der späteren 5'-Schnittstelle, als auch stromabwärts der späteren 3'-Schnittstelle jeweils ein 3 nt langer Nukleotidblock angeheftet, wodurch eine intramolekulare Hybridisierung der jeweiligen Einzelstränge ausgeschlossen werden konnte. Die entworfenen Oligonukleotide wurden hybridisiert, mit den betreffenden Enzymen verdaut und aufgereinigt.

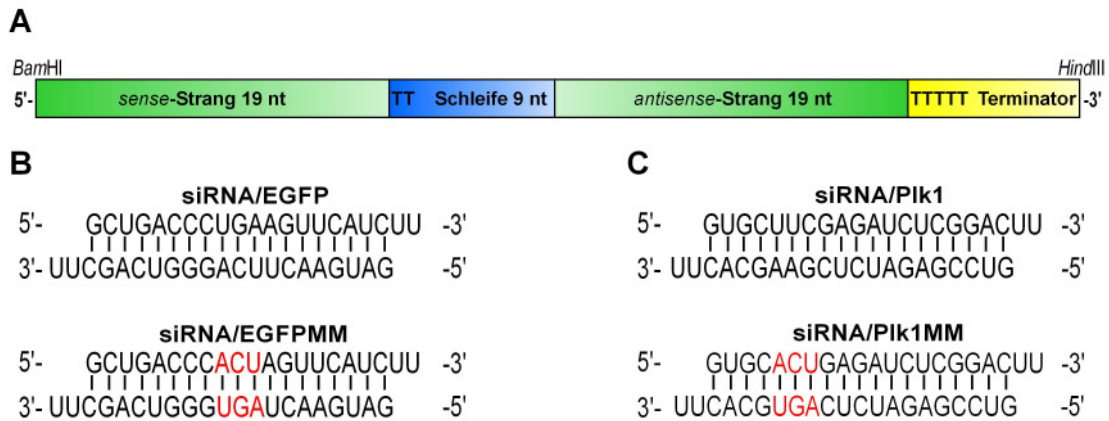


Abb. 3.3: shRNA-kodierende Oligonukleotide und prozessierte siRNAs. (A) Schematische Darstellung klonierter shRNA-kodierender Oligonukleotide. *sense*- und *antisense*-Strang (grün dargestellt), haben jeweils eine Länge von 19 Nukleotiden und bilden den späteren siRNA-Doppelstrang. Die ersten beiden Thymidine, welche an 5'-Position der Schleifensequenz (blau dargestellt) und an 5'-Position der Terminator-Sequenz (gelb dargestellt) lokalisiert sind, kodieren für die an den 3'-Positionen überlappenden Uridine der prozessierten siRNAs. (B) spezifische siRNA gegen EGFP (siRNA/EGFP) und ihre *mismatch*-Variante (siRNA/EGFPMM) nach Prozessierung durch Dicer (C) spezifische siRNA gegen Plk1 (siRNA/Plk1) und ihre *mismatch*-Variante (siRNA/Plk1MM). Die *mismatch*-Varianten wurden durch willkürlichen Austausch von jeweils drei Basenpaaren (rot dargestellt) entworfen.

3.2.3 Klonierung von Plasmiden zur konstitutiven Expression von shRNA

Für die Herstellung von konstitutiv shRNA-exprimierenden Plasmiden wurde ein geeigneter Plasmid-Vektor (pEGFP-C2; BD Clontech, Heidelberg), welcher ein eukaryotisches Resistenzgen gegen Neomycin / Geneticin trug, verwendet. Zuvor wurde das EGFP-Gen samt Promotor aus dem Plasmid ausgeschnitten und die in der MCS (*multiple cloning site*) befindliche *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle deletiert. Das re-ligierte Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Hind*III geschnitten, elektrophoretisch getrennt und aufgereinigt. Es folgte die Ligationsreaktion von Plasmid-Vektor und H1-Promotor-Fragment. Plasmide, welche den H1-Promotor trugen, wurden nun mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten, worauf die verschiedenen *Bam*HI/*Hind*III-geschnittenen shRNA-kodierenden Oligonukleotide in einzelnen Ligationsreaktionen inseriert wurden. Die jeweilige shRNA-kodierende Sequenz lag nun unmittelbar stromabwärts (3') des H1-Promotors. Durch eine Sequenzanalyse wurde die korrekte Klonierung sichergestellt. Die hergestellten Plasmid-Vektoren wurden folgendermaßen benannt:

Plasmid	Beschreibung
pwtH1shRNA/EGFP	Plasmid-Vektor für die konstitutive Expression von shRNA gegen EGFP unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors
pwtH1shRNA/EGFPMM	Plasmid-Vektor für die konstitutive Expression von <i>mismatch</i> -shRNA unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors
pwtH1shRNA/Plk1	Plasmid-Vektor für die konstitutive Expression von shRNA gegen Plk1 unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors
pwtH1shRNA/Plk1MM	Plasmid-Vektor für die konstitutive Expression von <i>mismatch</i> -shRNA unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors

Eine schematische Darstellung des kompletten Aufbaus betreffender Plasmid-Vektoren befindet sich in Abbildung 3.5.

3.2.4 Klonierung von Tetrazyklin-induzierbaren Derivaten des H1-Promotors

Zur Schaffung von Tetrazyklin-induzierbaren Varianten des H1-Promotors wurden drei verschiedene Derivate des parentalen Wildtyp-H1-Promotors entworfen. Dabei wurde(n) eine oder zwei palindromische Tet-Operatorsequenz(en) aus der Kontrollregion des Tet-Operons (Hillen et al., 1984) in benachbarte Regionen der TATA-Box inseriert. Diese sogenannte TetO-Sequenz wird aufgrund ihrer Struktur in Abwesenheit des Antibiotikums Tetrazyklin von TetR (Tetrazyklin-Repressor) besetzt (Abb. 3.8A), wodurch die Transkription des nachfolgend kodierten Genabschnitts unterdrückt werden soll. Die TetO-Sequenz ist 19 Nukleotide lang und lautet: ACT CTA TCA TTG ATA GAG T (Abb. 3.4). Im ersten induzierbaren Promotor-Derivat, dem US-Typ, wurde eine TetO-Sequenz in 5'-Richtung der TATA-Box inseriert und substituierte die ursprünglich im Wildtyp-H1-Promotor vorliegende Sequenz, welche PSE- und TATA-Box verbindet, komplett (Abb. 3.4). Im DS-Typ, dem zweiten entwickelten Derivat, wurde die TetO-Sequenz in 3'-Richtung der TATA-Box inseriert und substituierte einen Teil der Wildtyp-Sequenz zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart des ursprünglich stromabwärts liegenden H1-Gens (Abb. 3.4). In einer dritten induzierbaren Variante des H1-Promotors wurden zwei TetO-Sequenzen, welche die TATA-Box flankieren, in den Wildtyp-Promotor inseriert (Abb. 3.4). In allen drei induzierbaren Derivaten wurden somit Original-Länge des Wildtyp-Promotors und relative Lage seiner einzelnen für die Transkription wichtigen Elemente konstant gehalten.

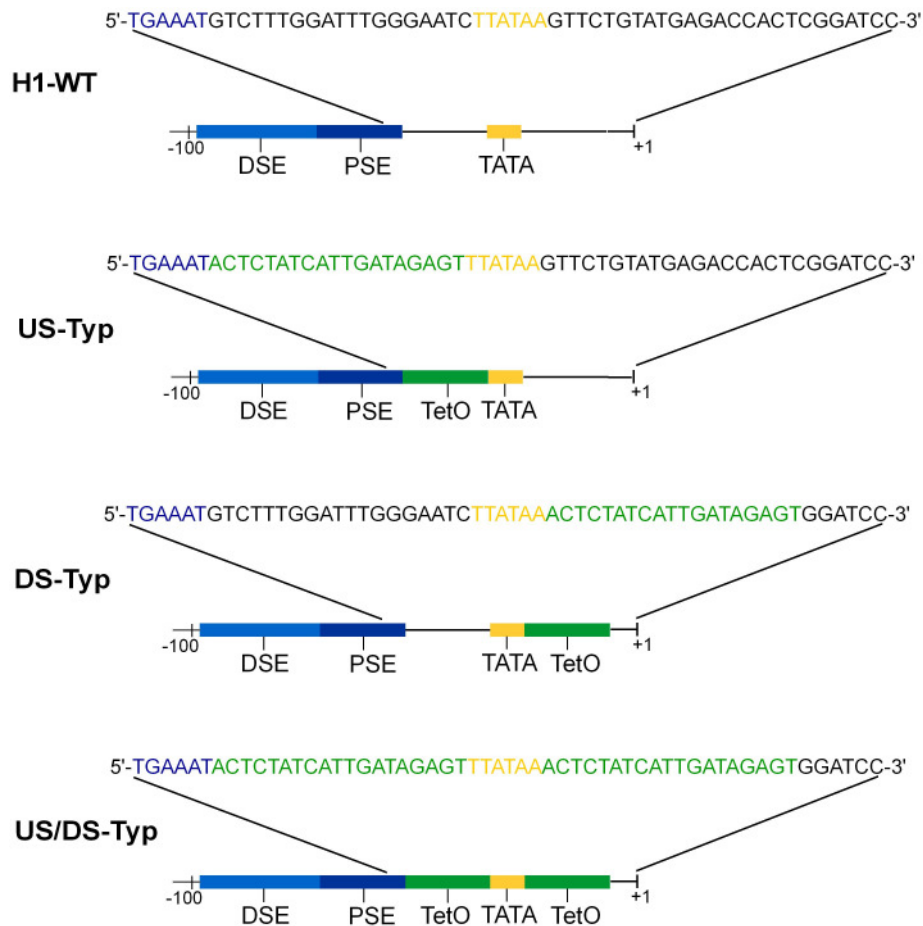


Abb. 3.4: Induzierbare Derivate des H1-Promotors. Durch Insertion von einer oder zwei TetO-Sequenz(en) an verschiedene Positionen des Wildtyp-H1-Promotors wurden Bindungsstellen für den bakteriellen Tet-Repressor (TetR) geschaffen. **H1-WT:** Wildtyp-H1-Promotor; **US-Typ:** induzierbarer H1-Promotor mit TetO-Sequenz in 5'-Position der TATA-Box; **DS-Typ:** induzierbarer H1-Promotor mit TetO-Sequenz in 3'-Position der TATA-Box; **US/DS-Typ:** induzierbarer H1-Promotor mit zwei die TATA-Box flankierenden TetO-Sequenzen; **DSE:** distales Sequenz-Element (hellblau dargestellt), bestehend aus Oktamer-Motiv und *staf binding site*; **PSE:** proximales Sequenz-Element (dunkelblau dargestellt); **TATA:** TATA-Box (gelb dargestellt); **TetO:** Tetrazyklin-Operatorsequenz (grün dargestellt); +1 gibt die Position des Transkriptionsstartpunktes an.

Die Herstellung der einzelnen induzierbaren Derivate des H1-Promotors erfolgte durch Amplifikation mittels PCR. Als Matrizen-DNA wurde die cDNA des Wildtyp-H1-Promotors eingesetzt. Die Substitution der ursprünglichen Elemente durch die beschriebenen TetO-Sequenzen wurde durch die Beschaffenheit der jeweiligen *antisense*-Primer erreicht, welche die einzelnen TetO-Sequenzen aufwiesen und somit gegenüber der DNA-Sequenz des Wildtyp-Promotors Basen-Fehlpaarungen bildeten. Der *sense*-Primer hingegen wurde in allen drei PCR-Reaktionen konstant gehalten. Alle Promotorkonstrukte wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* geschnitten. Zur Überprüfung wurden die hergestellten Fragmente einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Promotoren wurden wie folgt benannt:

Promotor	Promotorstruktur	Namensherkunft
US-Typ	tetO-T-H1	TetO-Sequenz in 5'-Richtung (<i>upstream</i>) der TATA-Box
DS-Typ	tetT-O-H1	TetO-Sequenz in 3'-Richtung (<i>downstream</i>) der TATA-Box
US/DS-Typ	tetO-T-O-H1	TetO-Sequenzen in 5'-Richtung (<i>upstream</i>) und in 3'-Richtung (<i>downstream</i>) der TATA-Box

3.2.5 Klonierung von Plasmiden zur konditionellen Expression von shRNA

Alle drei induzierbaren Promotor-Derivate (US-, DS- und US/DS-Typ) wurden in *XhoI/HindIII*-geschnittene Plasmide, welche auch für die Insertion des parentalen H1-Promotors benutzt wurden (siehe Kap. 3.2.3), ligiert. Die shRNA-kodierenden Oligonukleotide wurden daraufhin *BamHI/HindIII* kloniert. Insgesamt wurden Plasmid-Vektoren mit H1-Promotor-Derivaten und shRNA-kodierenden Oligonukleotiden in folgenden Kombinationen kloniert, durch Sequenzanalyse überprüft und benannt:

Plasmid	Plasmidstruktur
pUS	ptetO-T-H1shRNA/Plk1
pUSMM	ptetO-T-H1shRNA/Plk1MM
pDS	ptetT-O-H1shRNA/Plk1
pDSMM	ptetT-O-H1shRNA/Plk1MM
pUS/DS	ptetO-T-O-H1shRNA/Plk1
pUS/DSMM	ptetO-T-O-H1shRNA/Plk1MM

Eine schematische Darstellung des kompletten Aufbaus betreffender Plasmid-Vektoren befindet sich in Abbildung 3.5.

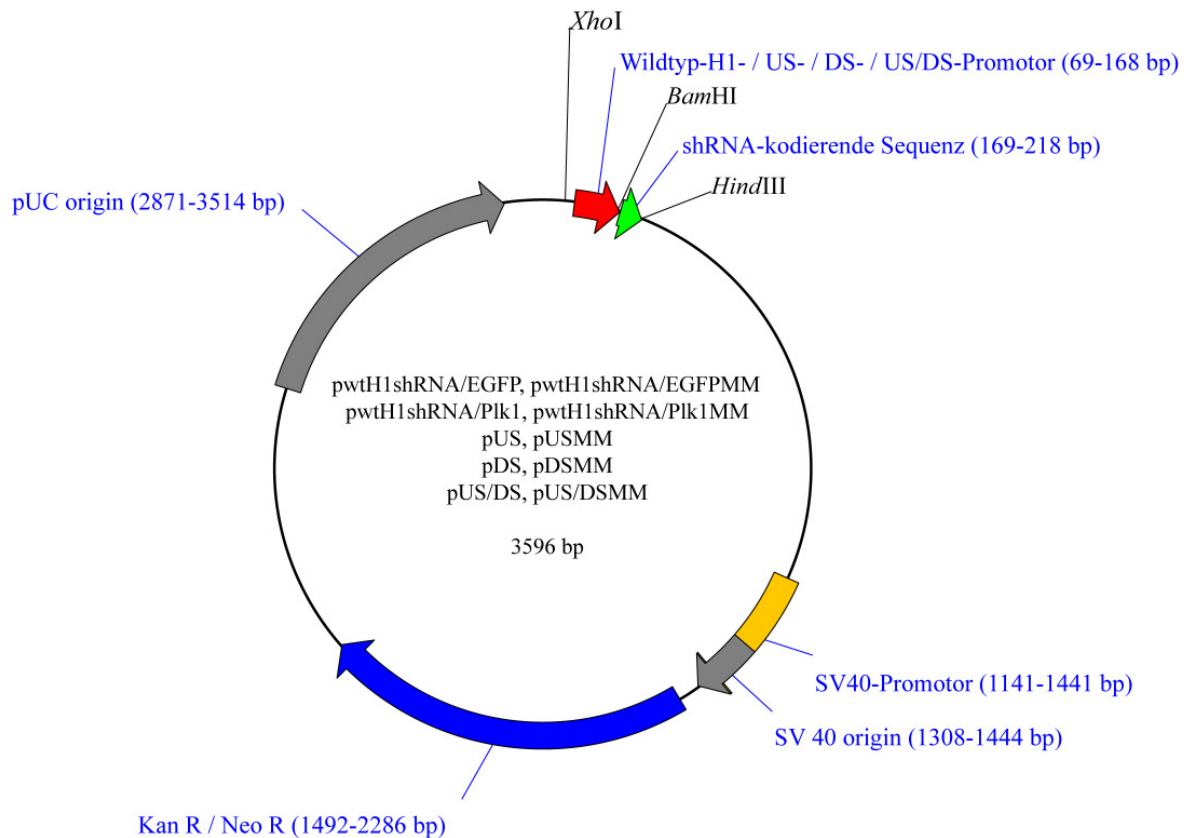


Abb. 3.5: Schematische Darstellung von Aufbau und Struktur der verwendeten Plasmid-Vektoren für konstitutive / induzierbare Expression von shRNA. Wildtyp-H1-Promotor oder induzierbare H1-Promotor-Derivate (rot dargestellt) wurden mit den Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *BamHI* kloniert, shRNA-kodierende Oligonukleotide (grün dargestellt) wurden unmittelbar stromabwärts *BamHI/HindIII* inseriert. Alle Plasmide für die Expression von shRNA trugen ein eukaryotisches Resistenzgen gegen Neomycin / Geneticin (G418) bzw. ein prokaryotisches Resistenzgen gegen Kanamycin (dunkelblau dargestellt) unter Kontrolle eines SV40-Promotors (gelb und grau dargestellt). Die verschiedenen Plasmid-Vektoren besitzen jeweils einen Sequenzabschnitt für ihre eigene Replikation in *E. coli* (pUC origin) (grau dargestellt). Die in Klammern aufgeführten Zahlen beschreiben Länge (in bp) und relative Lage betreffender Sequenzabschnitte innerhalb der Plasmid-Vektoren.

3.2.6 Klonierung der cDNA von Tet-Repressor und TetR-KRAB-

Fusionsprotein

Die für den Tet-Repressor (TetR) kodierende DNA-Sequenz wurde aus Transposon 10 (Tn.10) des *E. coli*-Stamms HT115 mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden mit den Restriktionsschnittstellen für *NheI* (*sense*-Primer) und *XhoI* (*antisense*-Primer) versehen. Nach Verdau mit entsprechenden Enzymen wurde das Fragment in den *NheI/XhoI*-geschnittenen pcDNA3.1Hygro⁺-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert, so daß der offene Leseraster (*accession no*: X00694) unter Kontrolle eines CMV-Promotors stand. Der Plasmid-Vektor trug ein eukaryotisches Resistenzgen gegen Hygromycin B, so daß bei Ko-Transfektion eines induzierbaren shRNA-exprimierenden Plasmids eine gleichzeitige Doppelselektion gegen Geneticin (G418) und Hygromycin B durchgeführt werden konnte.

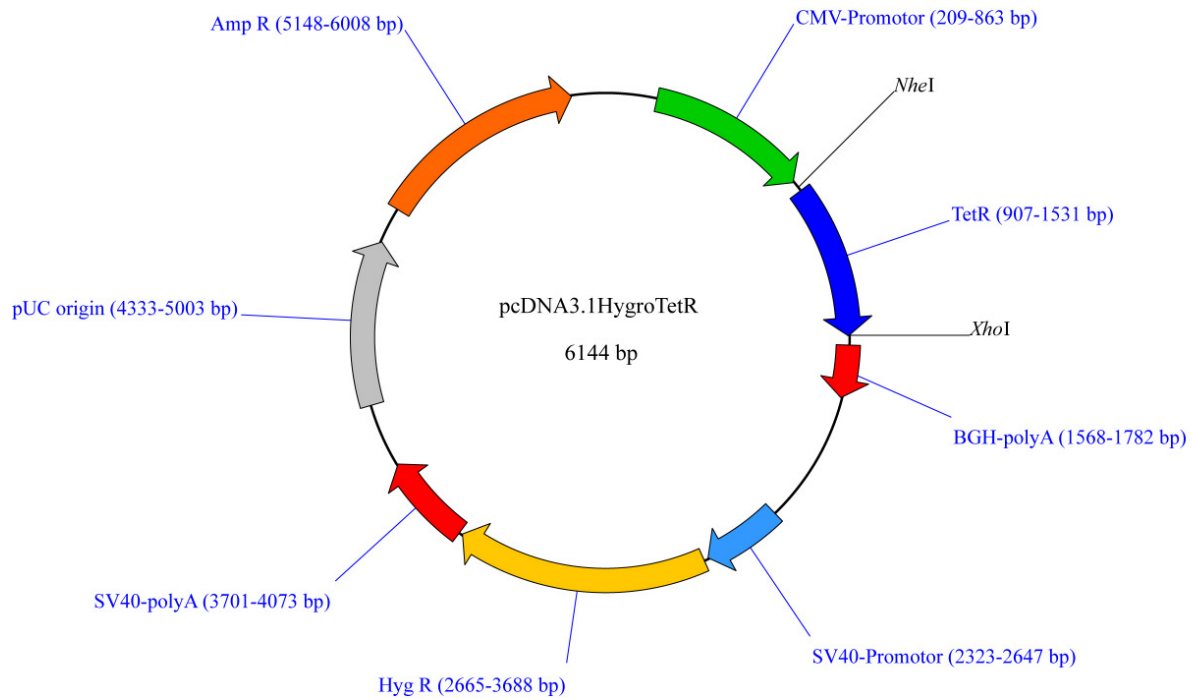


Abb. 3.6: Schematische Darstellung von Aufbau und Struktur des verwendeten Plasmid-Vektors für die konstitutive Expression von TetR. TetR (dunkelblau dargestellt) wurde unmittelbar stromabwärts eines CMV-Promotors (grün dargestellt) mit den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *XhoI* kloniert. Der Plasmid-Vektor besitzt ein eukaryotisches Resistenzgen für Hygromycin B (gelb dargestellt) unter Kontrolle eines SV40-Promotors (hellblau dargestellt) und ein prokaryotisches Resistenzgen gegen Ampicillin (hellrot dargestellt), sowie einen Sequenzabschnitt für die eigene Replikation in *E. coli* (pUC origin) (grau dargestellt). Die beiden polyA-Motive, welche stromabwärts der TetR-kodierenden Region (BGH-polyA) und stromabwärts des Resistenzgens gegen Hygromycin B (SV40-polyA) lokalisiert sind (beide rot dargestellt), terminieren die Transkription der jeweiligen stromaufwärts liegenden Gene. Die in Klammern aufgeführten Zahlen beschreiben Länge (in bp) und relative Lage betreffender Sequenzabschnitte innerhalb des Plasmid-Vektors.

In einer zweiten Klonierung wurde in den auf die gleiche Weise geöffneten pcDNA3.1Hygro⁺-Vektor die cDNA für das Fusionsprotein TetR-KRAB mit den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *XhoI* ligiert. Jenes DNA-Fragment wurde zuvor mittels PCR von einem bezogenen Plasmid (Prof. Dr. H.-J. Thiesen, Universität Rostock) amplifiziert, wobei die gleichen Restriktionsschnittstellen (*NheI* mittels *sense*-Primer und *XhoI* mittels *antisense*-Primer) eingebaut wurden. Das TetR-KRAB-Fusionsprotein ist ein chimäres Protein, bestehend aus dem Tet-Repressor (aus Tn.10 von *E. coli*) und der aus dem humanen Kox1-Gen (*accession no*: NM_015394) abgeleiteten KRAB-Domäne (Deuschle et al., 1995). Bei Zusammenkunft mit genomischer DNA bildet die KRAB-Domäne in der Umgebung von bis zu 3 kb Heterochromatin (Margolin et al., 1994; Pengue et al., 1994; Witzgall et al., 1994; Moosmann et al., 1997), wodurch die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren in benachbarten Regionen unterdrückt wird (siehe auch Kap. 1.5.3). Die klonierten Plasmide wurden einer Sequenzanalyse unterzogen und wie folgt benannt:

pcDNA3.1HygroTetR und pcDNA3.1HygroTetR-KRAB

3.3 Inhibition der Genexpression durch Vektor-basierte RNAi

3.3.1 Suppression der EGFP-Expression durch Transfektion von Plasmid-Vektoren zur konstitutiven Expression von shRNA

Um die RNAi-vermittelte Suppression der Genexpression zu testen, wählten wir zunächst das verstärkte grün fluoreszierende Protein (EGFP) als Zielgen aus. EGFP, eine Modifikation des GFP, hatte den Vorteil, nicht nur über Western-Blot-Analyse, sondern auch aufgrund seiner Eigenfluoreszenz infolge spezifischer Anregung durch monochromatisches Licht von 488 nm Wellenlänge mittels Durchflußzytometrie quantitativ detektiert werden zu können. Für die Untersuchungen wurden Ko-Transfektionen von HeLa-Zellen durchgeführt. Mittels Lipofektion wurden zum einen konstitutiv EGFP-exprimierende Plasmid-Vektoren (pCMS-d2EGFP), und zum anderen konstitutiv shRNA/EGFP-exprimierende Plasmide (pwtH1shRNA/EGFP), welche unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors standen, in einem Verhältnis von 1:1 transfiziert. Um den besten Zeitpunkt für eine potente RNAi-vermittelte Inhibition von EGFP zu finden, wurde d2EGFP benutzt, eine Variante des verstärkten grün fluoreszierenden Proteins, welche gegenüber dem herkömmlichen Protein EGFP (Halbwertszeit von 18 h) destabilisiert ist und eine Halbwertszeit von 2 h aufweist. Um die Spezifität von RNAi zu zeigen, wurde als Negativkontrolle das Plasmid pwtH1shRNA/EGFPMM, welches die konstitutive Expression von *mismatch*-shRNA vermittelt, zusammen mit pCMS-d2EGFP ko-transfiziert. Als weitere Kontrolle wurden HeLa-Zellen mit Transfektionsreagenz ohne DNA behandelt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und einer FACScan-Analyse (*fluorescence activated cell scanning*) unterzogen. Die Transfektionskontrolle, deren Reaktionsansatz keine DNA enthielt, zeigte keine grüne Fluoreszenz (Abb. 3.7A). 57% der HeLa-Zellen, welche mit pCMS-d2EGFP- und pwtH1shRNA/EGFPMM-Plasmiden ko-transfiziert wurden, zeigten EGFP-Fluoreszenz (Abb. 3.7B). Dieser Wert konnte durch Erfahrungswerte mit der vorliegenden Transfektionseffizienz gleichgesetzt werden. Dagegen wiesen nur 13% der HeLa-Zellen, welche mit pCMS-d2EGFP- und pwtH1shRNA/EGFP-Plasmiden ko-transfiziert wurden, Fluoreszenzeigenschaften auf (Abb. 3.7C). Vernachlässigt man nicht-transfizierte Zellen, indem man den Wert von 57% transfizierten Zellen mit 100% gleichsetzt und stellt den Wert der mit Wirkplasmiden behandelten HeLa-Zellen (13%) in Beziehung, so kann die durch RNAi hervorgerufene Unterdrückung von EGFP auf ca. 77% angegeben werden (Abb. 3.7D). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Ergebnissen aus vorherigen Studien, in welchen die

Genexpression mittels konstitutiver H1-Promotor-vermittelter shRNA-Expression um ca. 80% unterdrückt werden konnte (McManus et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002a).

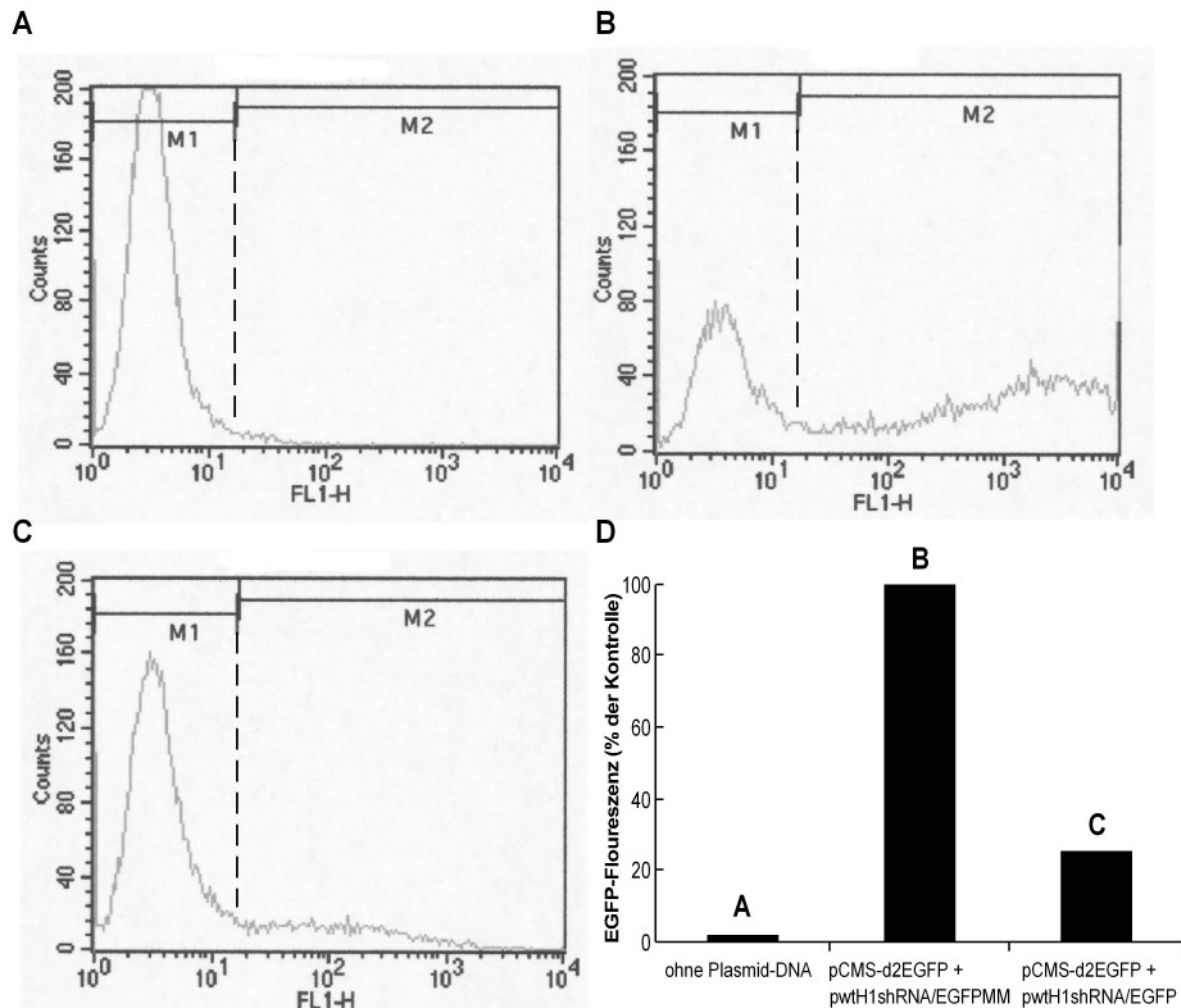


Abb. 3.7: Nachweis der EGFP-Fluoreszenz mittels Durchflußzytometrie (FACS-Analyse). In den Histogrammen A-C beschreibt die x-Achse die Fluoreszenzintensität der gemessenen Zellen in logarithmischer Auftragung. Zur Trennung von nicht-transfizierten und EGFP-exprimierenden Zellen wurde der Bereich der x-Achse in zwei Intervalle gegliedert (M1 und M2). M1 = Fluoreszenz-negativ, M2 = Fluoreszenz-positiv. Die y-Achse der Histogramme A-C beschreibt die Häufigkeit der einzelnen Ereignisse. Insgesamt wurden 48 h nach Transfektion 20.000 Zellen pro Experiment gemessen. (A) Transfektionskontrolle ohne Plasmid-DNA. (B) Ko-Transfektion von pCMS-d2EGFP und pwtH1shRNA/EGFPMM. (C) Ko-Transfektion von pCMS-d2EGFP und pwtH1shRNA/EGFP. (D) Statistischer Vergleich der gemessenen EGFP-Fluoreszenzen aus A-C. Dabei wurden die Werte prozentual an pwtH1shRNA/EGFPMM-transfizierten Kontrollzellen (100%) aus Versuch B orientiert.

3.4 Funktionelle Studien induzierbarer RNAi-Systeme im transienten Zustand

3.4.1 Konditionelle Inhibition der Plk1-Expression durch Vektor-basierte, Doxyzyklin-induzierbare RNAi

Um die RNAi-vermittelte Unterdrückung der Plk1-Expression konditionell auslösen zu können, wurden drei induzierbare Derivate des H1-Promotors auf Basis des prokaryotischen

Tet-Systems entwickelt (siehe Abb. 3.4). Zum Studium der unterschiedlichen Eigenschaften dieser drei Konstrukte in bezug auf die Auslösung einer wirksamen RNAi-Antwort wurde darauf die Inhibition der Plk1-Expression in HeLa-Zellen als Antwort auf die Zugabe des Effektors Doxyzyklin (Dox) untersucht. Es wurde bereits gezeigt, daß Doxyzyklin, ein synthetisches Derivat des Tetrazyklins, den Tetrazyklin-Repressor (TetR) mit hoher Affinität bindet und somit einen potenten Effektor der Genexpression darstellt (Gossen et al., 1995) (Abb. 3.8B). Dagegen bindet in Abwesenheit des Antibiotikums TetR an die zugehörige Operatorsequenz (TetO) und blockiert die RNA-Polymerase III-vermittelte Expression von shRNA (Abb. 3.8A).

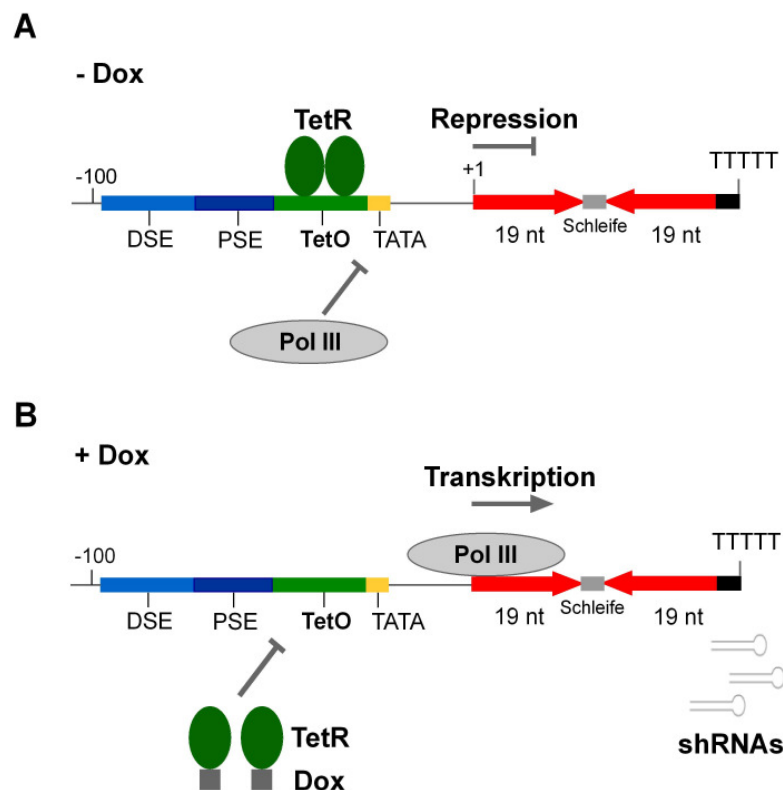


Abb. 3.8: Wirkungsweise eines Tetrazyklin-induzierbaren Promotors in Abwesenheit und Anwesenheit von Doxyzyklin. (A) In Abwesenheit des synthetischen Tetrazyklin-Derivates Doxyzyklin (Dox) bindet der Tet-Repressor (TetR) an die Tetrazyklin-Operatorsequenz (TetO), wodurch eine RNA-Polymerase III (Pol III)-vermittelte Expression von shRNA reprimiert wird. (B) Unter Einfluß von Dox erfährt der Tet-Repressor eine Änderung seiner Konformation, wodurch eine Bindung an seine Operatorsequenz verhindert wird. Somit kann die Pol III-abhängige Expression von shRNA stattfinden. **DSE:** distales Sequenzelement; **PSE:** proximales Sequenzelement; **TATA:** TATA-Box

Um die Doxyzyklin-vermittelte Antwort der induzierbaren Derivate des H1-Promotors zu quantifizieren, wurden Ko-Transfektionen durchgeführt. Dazu wurden Plasmid-Vektoren, welche den offenen Leseraster des TetR unter Kontrolle eines CMV-Promotors kodierten, und Plasmid-Vektoren, welche einen bestimmten Typen des H1-Promotors zur Expression von shRNA gegen Plk1 enthielten, in einem Verhältnis von 3:2 transfiziert. Aus mindestens fünf

unabhängigen Experimenten pro Versuchsansatz wurde mittels Northern- und Western-Blot-Nachweisen die Expression von Plk1-mRNA und -Protein bewertet. 96 h nach Transfektion der Plasmid-DNA mit dem Wildtyp-H1-Promotor, welcher die Expression von shRNA/Plk1 steuerte, nahm die Menge endogener Plk1-mRNA signifikant auf einen Wert von 25% ab ($P < 0,001$) (Abb. 3.9A, Spalte 2). Als Referenz diente dabei der Wildtyp-H1-Promotor, welcher die konstitutive Expression von shRNA/Plk1MM (*mismatch-shRNA*) steuerte (Plk1-mRNA = 100%) (Abb. 3.9A, Spalte 1). Dabei zeigten unbehandelte Tumorzellen mit exponentiellem Wachstumsverhalten die gleiche Menge an Plk1-mRNA wie Zellen, welche konstitutiv shRNA/Plk1MM exprimierten (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, daß das Vorhandensein von drei veränderten Nukleotiden innerhalb der Zielsequenz (*mismatches*) die Spezifität von wirksamer gegen Plk1 gerichteter shRNA aufhebt.

Zur Analyse der einzelnen H1-Promotor-Varianten (US-Typ, DS-Typ und US/DS-Typ) wurden HeLa-Zellen ko-transfiziert und ab 24 h nach Transfektion für insgesamt 72 h mit Hygromycin B und Geneticin (G418) selektiert. Zeitgleich mit Beginn der Selektion wurde Doxyzyklin in einer Konzentration von 5 µg/ml ins Kulturmedium appliziert, wobei das Kulturmedium jeden Tag erneuert wurde. Für Referenzwerte wurden jeweils die gleichen Transfektionsansätze durchgeführt, diese jedoch in Abwesenheit von Doxyzyklin belassen. Als Kontrolle dienten HeLa-Zellen welche mit konstitutiv shRNA/Plk1MM-exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden. 72 h nach Induktion durch Doxyzyklin, was einem Zeitpunkt von 96 h nach Transfektion entsprach, zeigten pUS-, pDS- und pUS/DS-transfizierte Zellen einen jeweils unterschiedlichen, reduzierten Plk1-mRNA-Gehalt, welcher zwischen 27% und 54% lag, verglichen mit konstitutiv shRNA/Plk1MM-exprimierenden Zellen ($P < 0,001$ in allen drei Fällen) (Abb. 3.9A, Spalten 1, 4, 6 und 8). In Abwesenheit von Doxyzyklin zeigten pUS-, pDS- und pUS/DS-transfizierte Zellen dagegen einen jeweils höheren Gehalt an Plk1-Transkript (Abb. 3.9A, Spalten 3, 5 und 7). Dies deutet darauf hin, daß die Zugabe von Doxyzyklin die Expression spezifischer shRNA gegen Plk1, welche im nicht-induzierten Zustand durch Bindung von TetR an die jeweilige(n) Operatorsequenz(en) der Promotoren behindert wurde, induzierte (Abb. 3.8B). Insgesamt betrachtet, zeigte die Promotor-Variante des DS-Typs die größte Basalaktivität (*leakiness*) in Abwesenheit von Doxyzyklin, sichtbar in einem gegenüber shRNA/Plk1MM-exprimierenden Zellen deutlich verminderten Plk1-Transkriptgehalt (Abb. 3.9A, Spalte 5). Während der Unterschied im Gehalt an Plk1-Transkript für den Promotor des US/DS-Typs zwischen nicht-induziertem und induziertem Zustand weniger deutlich ausfiel ($P = 0,08$), zeigten die beiden anderen H1-Promotor-Derivate des US- und DS-Typs jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied in bezug

auf die Menge ihrer Plk1-Transkripte zwischen nicht-induziertem und induziertem Zustand ($P < 0,01$) (Abb. 3.9A, Spalten 3-6).

Als nächstes gingen wir der Frage nach, ob die durch shRNA gegen Plk1 hervorgerufene Senkung des Plk1-mRNA-Gehalts 72 h nach Induktion mit einer zu erwartenden Abnahme des zugehörigen Plk1-Proteins korrelierte. Tatsächlich wurde analog zur Abnahme des Plk1-Transkripts infolge Induktion spezifischer shRNA-Expression – im Vergleich zu shRNA/Plk1MM exprimierenden Zellen – eine signifikante Abnahme der Expression des 66 kD-Proteins Plk1 festgestellt (Abb. 3.9B, Spalte 2). Nach Induktion durch Doxyzyklin wurde die Expression des Plk1-Proteins durch den Promotor des US-Typs auf 62% ($P < 0,001$), durch den DS-Typ auf 22% ($P < 0,001$) und durch den US/DS-Typ auf 50% ($P < 0,01$) gesenkt, jeweils verglichen mit der Menge des Plk1-Proteins von shRNA/Plk1MM exprimierenden Zellen (100%) (Abb. 3.9B, Spalten 1, 4, 6 und 8).

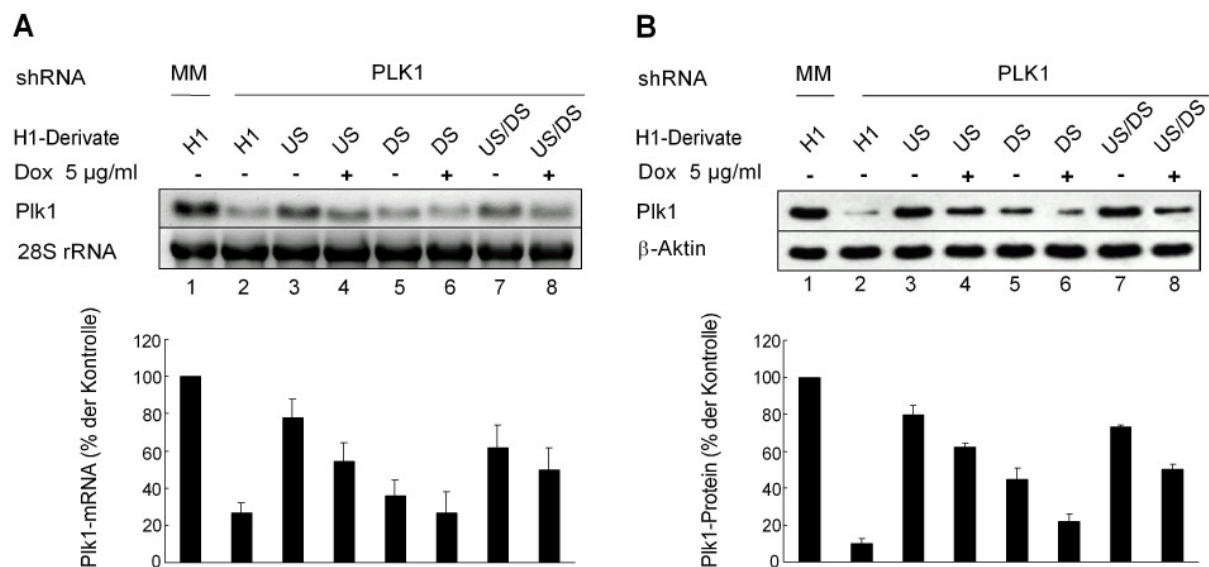


Abb. 3.9: Konditionelle Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein als Antwort auf die Doxyzyklin (Dox)-abhängige Expression von shRNA/Plk1, vermittelt von verschiedenen induzierbaren Derivaten des H1-Promotors. (A) Northern-Blot-Analyse der Plk1-mRNA-Expression 96 h nach Transfektion. Zur Standardisierung wurde die Ethidiumbromid-Färbung der 28S rRNA gewählt. Die resultierenden Plk1-mRNA-Mengen wurden prozentual an der Plk1-mRNA-Menge von Kontrollzellen orientiert, welche konstitutiv *mismatch*-shRNA (shRNA/Plk1MM) exprimierten. **(B)** Western-Blot-Analyse der Plk1-Proteinexpression 96 h nach Transfektion. Zur Standardisierung wurde die Expression von β-Aktin gewählt. Resultierende Plk1-Proteinmengen wurden prozentual an der Proteinmenge von Kontrollzellen orientiert, welche konstitutiv *mismatch*-shRNA (shRNA/Plk1MM) exprimierten.

Das Ziel dieser Experimente war die Identifizierung eines induzierbaren Promotor-Typs, welcher wenig Basalaktivität im nicht-induzierten Zustand aufwies, gleichzeitig aber unter induzierten Bedingungen infolge der Applikation von Doxyzyklin eine Expressionsrate von shRNA zeigte, welche zu einer deutlichen Reduktion von Plk1 Transkript und Protein

genügte. Sowohl Northern- als auch Western-Blot Studien bekräftigten, daß der Promotor des DS-Typs, dessen einzige TetO-Sequenz stromabwärts (3') der TATA-Box lokalisiert war, eine sehr große Basalaktivität aufwies. Die Expression des Plk1-Proteins wurde unter Kontrolle des DS-Promotors im nicht-induzierten Zustand auf 45% gesenkt (Abb. 3.9B, Spalte 5). Dieser Wert bezog sich auf den Vergleichswert von 100% Plk1-Protein in shRNA/Plk1MM exprimierenden Zellen. Das Hauptziel der Studien im transienten Zustand war die Identifikation eines induzierbaren Promotors, welcher eine geringe Basalaktivität unter nicht-induzierten Bedingungen zeigte, dennoch eine beachtliche Inhibition der Plk1-Expression nach Induktion durch Doxyzyklin bewirkte. Aufgrund seiner hohen Basalaktivität erfüllte der Promotor des DS-Typs das für die Ziele dieser Arbeit erforderliche Hauptkriterium nicht und schied dadurch für weitere Studien im transienten Zustand aus.

3.4.2 Analyse der konzentrationsabhängigen Aktivität Doxyzyklin-induzierbarer Derivate des H1-Promotors

Die induzierbaren Varianten des H1-Promotors vom US- und US/DS-Typ, welche im Gegensatz zum DS-Typ eine geringere Abnahme der Plk1-Expression im nicht-induzierten Zustand zeigten und somit eine geringe Basalaktivität hatten, wurden durch weitere Experimente im Detail genauer untersucht. Mit Hilfe der Northern-Blot-Technik wurden Doxyzyklin-abhängige Konzentrations-Kinetiken erstellt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den Plasmid-Vektoren pUS und pUS/DS transfiziert und folglich mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen behandelt. Die Studie begann mit der Analyse des Plk1-Transkriptgehalts von Zellen, deren Expression von shRNA/Plk1 unter Kontrolle des Promotors vom US/DS-Typ stand. Der US/DS-Typ zeigte in den vorherigen Versuchen eine Basalaktivität, welche zwischen jener der Promotoren vom DS-Typ und US-Typ lag. In Doxyzyklin-freiem Medium konnte eine Reduktion der Plk1-mRNA auf 60% beobachtet werden – im Vergleich zu shRNA/Plk1MM exprimierenden Zellen (Abb. 3.10A, Spalten 1 und 3). Mit zunehmenden Konzentrationen des Antibiotikums nahm der Gehalt an Plk1-mRNA ab. Die Applikation von 10 µg/ml Doxyzyklin führte dabei zu einer Abnahme des Plk1-Transkripts auf 8% ($P = 0,001$) (Abb. 3.10A, Spalte 7), bezogen auf das Transkript aus shRNA/Plk1MM exprimierenden Zellen. Die Feststellung, daß eine Konzentration von 10 µg/ml Doxyzyklin zu einer effizienten Unterdrückung des Transkriptes von Plk1 notwendig war, kann durch die starke Expression von TetR erklärt werden, welche von einem CMV-Promotor gesteuert wird und hohe Konzentrationen des Antibiotikums erforderlich macht. Um herauszufinden, ob eine Unterdrückung des Transkripts eine in gleichem Maße

verminderte Proteinexpression hervorruft, wurden Western-Blot-Nachweise durchgeführt. In pUS/DS-transfizierten Zellen unter Dox-Entzug nahm die Menge an endogenem Plk1-Protein auf 56% ab ($P = 0,01$) (Abb. 3.10B, Spalte 3), verglichen mit shRNA/Plk1MM exprimierenden Zellen. Nach Induktion durch Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Dox nahm die Menge des Plk1-Proteins signifikant auf einen Wert von 2% ab ($P = 0,001$) (Abb. 3.10B, Spalte 7), verglichen mit Plk1-Protein aus shRNA/Plk1MM exprimierenden Zellen.

Folglich wurde der H1-Promotor des US-Typs, welcher unter nicht-induzierten Bedingungen die geringste Basalaktivität aller induzierbaren Derivate zeigte, für weitere funktionelle Analysen herangezogen. Durch Induktion des US-Promotors zur Expression von shRNA/Plk1 wurde die Menge des Plk1-Transkripts deutlich reduziert. Unter steigenden Dox-Konzentrationen (1-10 $\mu\text{g/ml}$) wurde eine stufenweise Abnahme des Plk1-Transkripts festgestellt. Im nicht-induzierten Zustand betrug der Plk1-mRNA-Gehalt 80%, während das Plk1-Transkript unter Einwirkung von 10 $\mu\text{g/ml}$ Dox auf 14% abnahm ($P < 0,001$) (Abb. 3.11A, Spalten 3-7), verglichen mit der Transkriptmenge von shRNA/Plk1MM-exprimierenden Zellen. Ob diese potente Repression auf Ebene des Transkripts, welche durch Expression von shRNA/Plk1 unter Kontrolle des US-Typ-Promotors induziert wurde, mit einer Repression des Plk1-Proteins korrelierte, wurde im nächsten Schritt getestet.

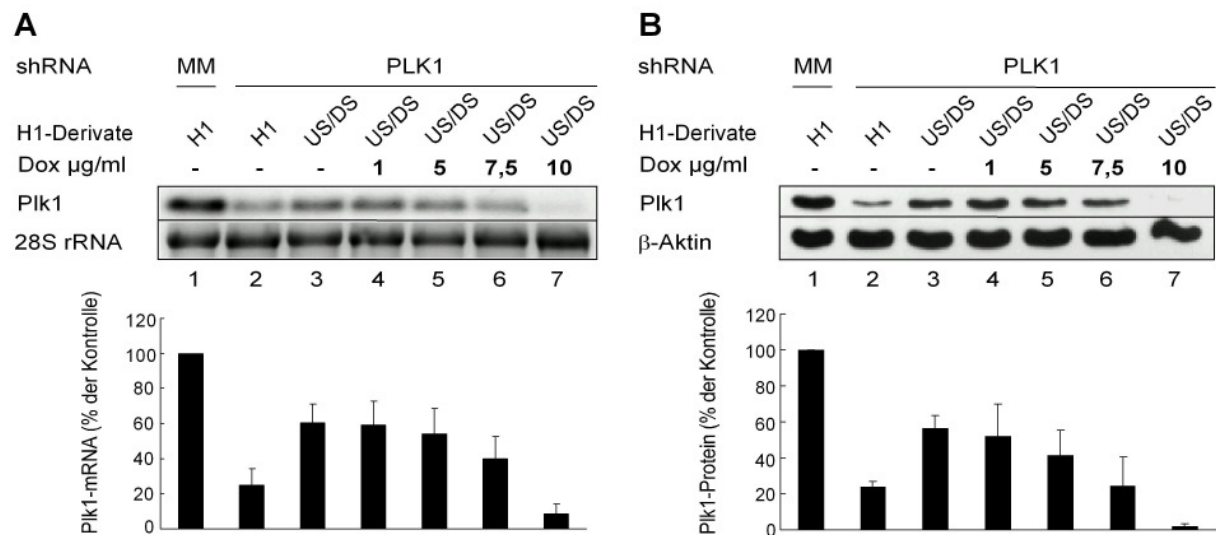


Abb. 3.10: Konditionelle Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein als Antwort auf die Doxyzyklin (Dox)-abhängige Expression von shRNA/Plk1, vermittelt durch den induzierbaren Promotor vom US/DS-Typ. (A) Northern-Blot-Analyse der Plk1-mRNA-Expression 96 h nach Transfektion in Abhängigkeit unterschiedlicher Doxyzyklin-Konzentrationen (0-10 $\mu\text{g/ml}$, Spalten 3-7). Zur Standardisierung wurde die Ethidiumbromid-Färbung der 28S rRNA gewählt. (B) Western-Blot-Analyse der Plk1-Proteinexpression 96 h nach Transfektion. Zur Standardisierung wurde die Proteinexpression von β -Aktin gewählt.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit pUS oder pwtH1/shRNAPlk1MM transfiziert. 96 h nach Transfektion wurden die Mengen von Plk1-Protein mittels Western-Blot quantifiziert. In

ähnlichem Maße wie bei HeLa-Zellen, welche mit pUS transfiziert wurden und infolge der Induktion durch 10 µg/ml Doxyzyklin eine starke Suppression ihres Plk1-mRNA-Gehalts zeigten, konnte eine statistisch signifikante Abnahme des Plk1-Proteingehalts auf 22% ($P < 0,001$) festgestellt werden (Abb. 3.11B, Spalte 7), verglichen mit pwtH1/shRNAPlk1MM-transfizierten Zellen. Im nicht-induzierten Zustand ohne Doxyzyklin zeigten pUS-transfizierte Zellen dagegen einen Plk1-Proteingehalt von 93%, welcher gegenüber pwtH1/shRNAPlk1MM-transfizierten Zellen nur unwesentlich abnahm (Abb. 3.11B, Spalte 3).

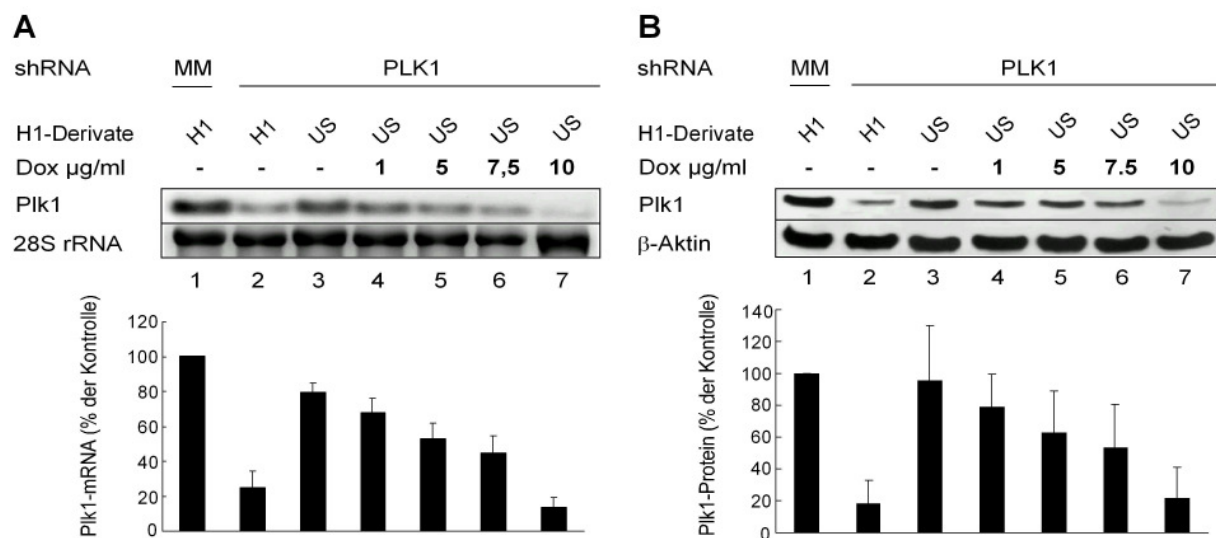


Abb. 3.11: Konditionelle Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein als Antwort auf die Doxyzyklin (Dox)-abhängige Expression von shRNA/Plk1, vermittelt durch den induzierbaren Promotor vom US-Typ. (A) Northern-Blot-Analyse der Plk1-mRNA-Expression 96 h nach Transfektion in Abhängigkeit unterschiedlicher Doxyzyklin-Konzentrationen (0-10 µg/ml, Spalten 3-7). Zur Standardisierung wurde die Ethidiumbromid-Färbung der 28S rRNA gewählt. **(B)** Western-Blot-Analyse der Plk1-Proteinexpression 96 h nach Transfektion. Zur Standardisierung wurde die Proteinexpression von β-Aktin gewählt.

3.4.3 Inhibition der Proliferation von Tumorzellen durch konditionelle Suppression von Plk1

In früheren Studien wurde gezeigt, daß eine *antisense*- oder RNAi-basierte Suppression der Plk1-Expression die Proliferation von Krebszellen inhibiert (Liu und Erikson, 2002; Spankuch-Schmitt et al., 2002a; Spankuch-Schmitt et al., 2002b; Liu et al., 2003; Spankuch et al., 2004). Dabei stellte sich heraus, daß hohe intrazelluläre Konzentrationen von *antisense*-Oligonukleotiden oder siRNA *per se* einen toxischen Effekt auf Zellen ausüben können. Des weiteren unterliegt die Wirkungsweise konstitutiver shRNA-exprimierender Plasmide einem „Alles-oder-nichts-Gesetz“. Dies bedeutet, daß Expressions-Plasmide bei Betreten des Intrazellulärraums umgehend mit der shRNA-Expression beginnen, welche fortan nicht beeinflussbar ist. Ein regulierbarer Eingriff ist dagegen für das Studium zellulärer

Zusammenhänge unabdingbar. Somit bestand die Frage, ob das entwickelte induzierbare, gegen Plk1 gerichtete RNAi-System geeignet ist, die Proliferation von Krebszellen zu kontrollieren. Die Promotor-Variante vom US-Typ, welche die gewünschten Eigenschaften einer geringen Basalaktivität (*leakiness*) und einer starken Suppression der Plk1-Expression nach Induktion durch Doxyzyklin aufwies, wurde dazu folgend im Detail untersucht. Als Positivkontrolle für die Inhibition der Zellproliferation wurde der Plasmid-Vektor pwtH1/shRNAPlk1 zur Transfektion benutzt. Die Expression von shRNA gegen Plk1 unter Kontrolle des konstitutiven H1-Promotors inhibierte die Proliferation von HeLa-Zellen 192 h nach Transfektion auf 16,3% ($P < 0,05$), verglichen mit pwtH1/shRNAPlk1MM-transfizierten HeLa-Zellen, welche der konstitutiven Expression von *mismatch*-shRNA ausgesetzt waren (Abb. 3.12). Zellen, welche mit *mismatch*-Plasmiden transfiziert wurden, wurden als Referenz benutzt, da ihr Proliferationsverhalten jenem von nicht-transfizierten Zellen glich. Die Verabreichung von 5 µg/ml Doxyzyklin auf nicht-transfizierte Zellen (Daten nicht gezeigt) oder zu shRNA/Plk1MM-exprimierenden Zellen hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Zellproliferation (Abb. 3.12). HeLa-Zellen, welche mit pUS transfiziert wurden, zeigten keine statistisch signifikante Inhibition der Zellproliferation in Abwesenheit von Doxyzyklin ($P = 0,1$). Die Zugabe von Doxyzyklin zu pUS-transfizierten HeLa-Zellen führte dagegen zu einer signifikanten Inhibition der Zellproliferation auf 32,8%, verglichen mit der Proliferation von pwtH1shRNA/Plk1MM-transfizierten Zellen (100%, $P < 0,05$) (Abb. 3.12). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Doxyzyklin-induzierten Suppression der Plk1-Expression, die einen starken antiproliferativen Effekt in HeLa-Zellen hervorruft.

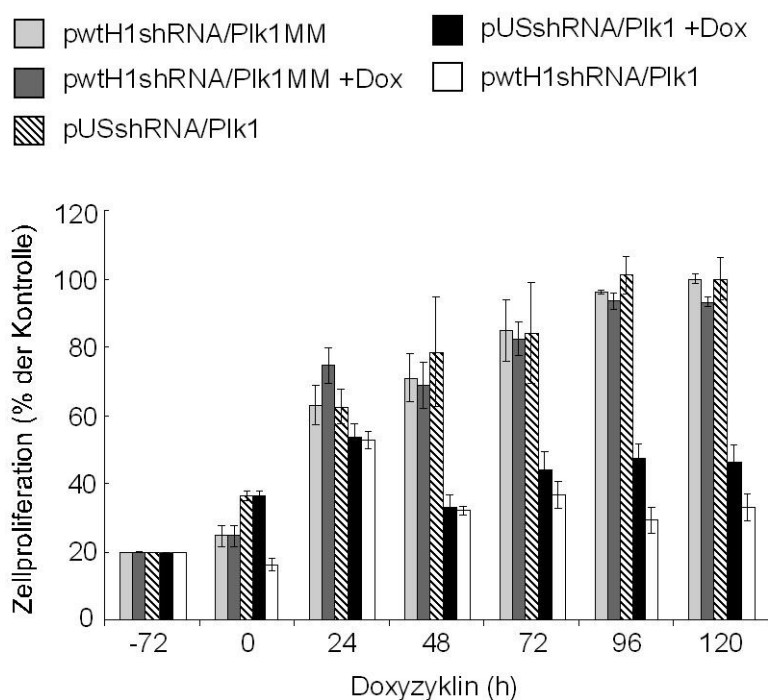


Abb. 3.12: Proliferation von HeLa-Zellen nach Transfektion unterschiedlicher Plasmid-Vektoren. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt -72 h transfiziert und folgend selektiert. Zum Zeitpunkt 0 begann die Induktion mittels Zugabe von 5 µg/ml Doxyzyklin (Dox) ins Kulturmedium. Die Zellzahlen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe eines Hämazytometers bestimmt. Die Anzahl der überlebenden Zellen ist prozentual an der Zahl von Kontroll- Zellen orientiert, welche *mismatch*-shRNA exprimierten, 192 h nach Transfektion des Plasmides pwtH1shRNA/PIk1MM.

3.5 Funktionelle Studien induzierbarer RNAi-Systeme im stabilen Zustand

3.5.1 Etablierung stabiler Zellklone durch Integration induzierbarer RNAi-Kassetten in das Genom von Tumorzellen

Infolge der transienten Charakterisierung der induzierbaren Varianten des H1-Promotors mit einer erfolgreichen konditionellen Unterdrückung der Plk1-Expression, welche eine Inhibierung der Zellproliferation bewirkte, entschlossen wir uns, die entwickelten induzierbaren Systeme in stabilem Zustand zu testen. Dies geschah im Hinblick auf die Etablierung phänotypisch unveränderter Tumorzellen durch genomische Integration von zunächst „stillen“ RNAi-Kassetten. Mit Hilfe der hergestellten stabilen Klone sollte das Potential der einzelnen RNAi-Kassetten unter nicht-induzierten und induzierten Bedingungen präzise bestimmt werden. Im Gegensatz zur transienten Situation, in welcher betreffende Konstrukte in unbekannter intrazellulärer Anzahl vorliegen und meist innerhalb einiger Tage durch Nuklease-Abbau degradiert werden, ist es in der stabilen Situation möglich, die genaue Anzahl von Integrationen zu bestimmen. Des weiteren sollten unspezifische Nebeneffekte, welche teilweise durch Transfektionen hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden. Zunächst wurden die verschiedenen Promotor-Derivate in Kombination mit den beiden Einheiten, welche für shRNA/Plk1 und shRNA/Plk1MM kodierten, als RNAi-Kassetten stabil in das Genom von TetR-exprimierenden HeLa-Zellen integriert. Dazu wurden T-REx™-HeLa-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) welche den bakteriellen Tet-Repressor bereits stabil unter Kontrolle eines konstitutiven CMV-Promotors exprimierten, mit den einzelnen Plasmiden pUS, pUSMM, pDS, pDSMM, pUS/DS und pUS/DSMM transfiziert.

generierte T-REx™-HeLa-Klone	transfizierte Plasmide
MM-Klon	pwtH1shRNA/Plk1MM
US-Klon	ptet O-T-H1 shRNA/Plk1 (pUS)
USMM-Klon	ptet O-T-H1 shRNA/Plk1MM (pUSMM)
DS-Klon	ptet T-O-H1 shRNA/Plk1 (pDS)
DSMM-Klon	ptet T-O-H1 shRNA/Plk1MM (pDSMM)
US/DS-Klon	ptet O-T-O-H1 shRNA/Plk1 (pUS/DS)
US/DSMM-Klon	ptet O-T-O-H1 shRNA/Plk1MM (pUS/DSMM)

Tab. 3.3: Bezeichnungen der generierten HeLa-Zellklone mit stabil ins Genom integrierten RNAi-Kassetten in einer Gegenüberstellung mit ihren zuvor transfizierten Plasmid-Vektoren.

Zusätzlich wurde das Plasmid pwtH1shRNA/PIk1MM, welches die *mismatch*-Sequenz unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors konstitutiv exprimiert, in T-REx™-HeLa-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 1,5 mg/ml Geneticin (G418) in das Kulturmedium selektiert. Insgesamt dauerte die Selektionsphase 25 Tage, wobei das Kulturmedium samt Geneticin (G418) alle drei Tage erneuert wurde. Folgend wurden die Geneticin-resistenten Klone vereinzelt und übereinstimmend mit ihren zuvor transfizierten RNAi-Kassetten benannt (Tab. 3.3).

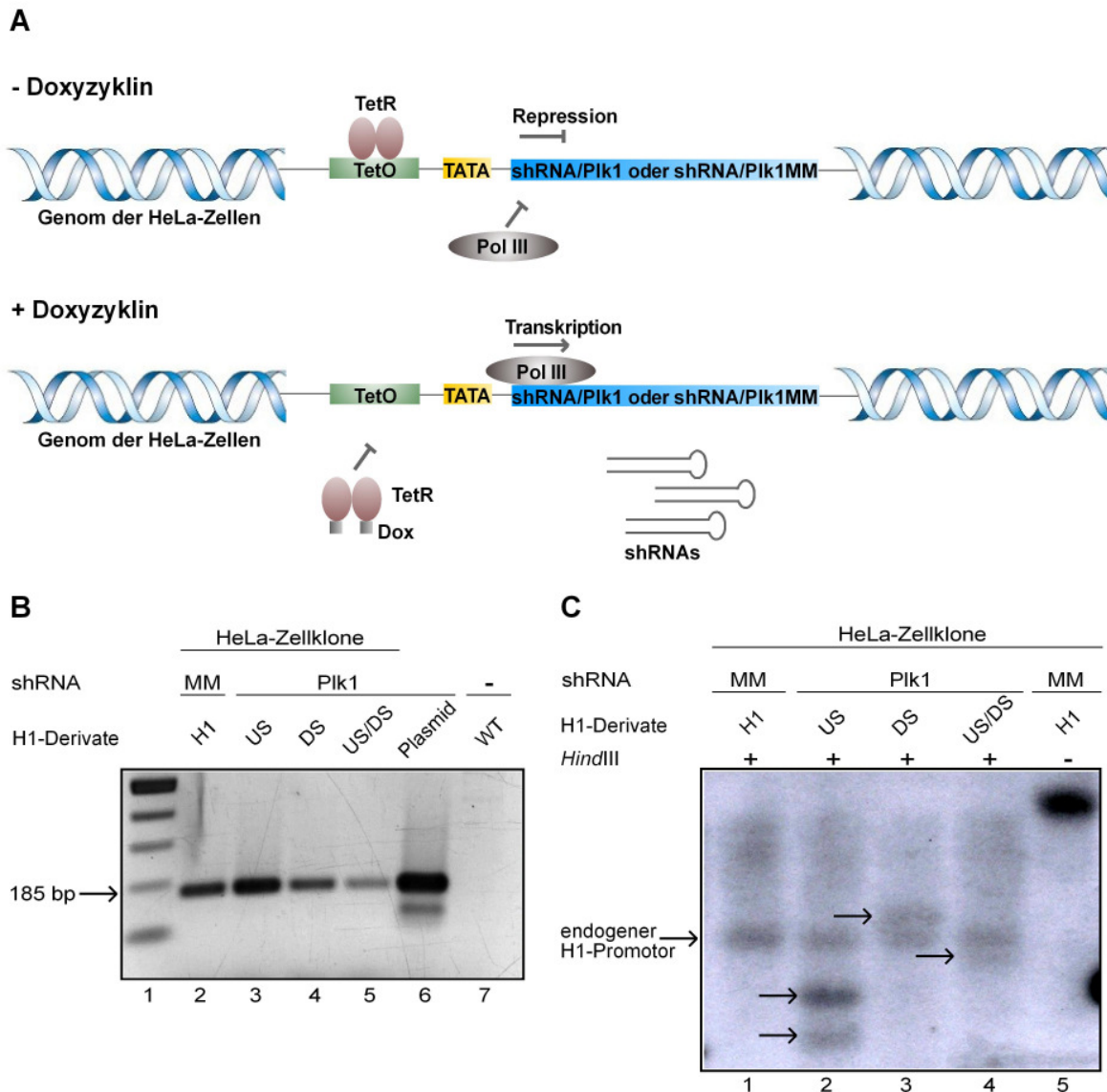


Abb. 3.13: Genomisch integrierte RNAi-Kassetten für die konstitutive oder Tetrazyklin (Tet)-induzierbare Expression von shRNA. (A) Schematische Darstellung der Promotor-Funktion in Abwesenheit und Anwesenheit von Doxyzyklin (Dox). (B) Detektion der genomisch integrierten RNAi-Kassetten im Genom von HeLa-Zellen. Mittels PCR wurden 185 bp lange Fragmente amplifiziert, welche den Bereich des jeweiligen Promotors und ihrer zugehörigen shRNA-kodierenden Sequenz umfaßten. Mittels Sequenzanalyse wurde die korrekte Integration der verschiedenen RNAi-Kassetten bestätigt. Genomische DNA aus Wildtyp-HeLa-Zellen wurde als Negativkontrolle benutzt (Spalte 7), rekombinante Plasmid-DNA diente als Positivkontrolle (Spalte 6). (C) Mittels Southern-Blot-Analyse wurde die Anzahl der integrierten RNAi-Kassetten ermittelt (Pfeile). Dafür wurde eine spezifische radioaktive Sonde, welche gegen die RNAi-Kassetten gerichtet war, verwendet.

Es folgte die Analyse der genomischen Integration der beschriebenen RNAi-Kassetten. Zunächst wurde mittels PCR-Technik die Integration der RNAi-Kassetten in das Genom eines jeden Zellklons untersucht (Abb. 3.13B). Eine folgende Sequenzanalyse der PCR-Produkte ergab die korrekte und vollständige Anwesenheit der jeweiligen RNAi-Kassetten, bestehend aus Promotor und shRNA-kodierender Sequenz. Des Weiteren wurde die Zahl der Integrationen von Elementen für die einzelnen Klone bestimmt. Eine Analyse mittels Southern-Blot offenbarte dabei zwei Integrationen von RNAi-Kassetten für den US-Klon (Abb. 3.13C, Spalte 2), hingegen wurden für den DS- und den US/DS-Klon die Integration von jeweils einer Kopie der RNAi-Kassetten festgestellt (Abb. 3.13C, Spalten 3-4).

3.5.2 Doxyzyklin-abhängige Inhibition der zellulären Plk1-Expression mittels genomisch integrierter, induzierbarer RNAi-Kassetten

Um die Antwort der einzelnen generierten Zellklone, welche die verschiedenen induzierbaren RNAi-Kassetten in genomisch integriertem Zustand trugen, auf die Zugabe von Doxyzyklin zu testen, wurde zunächst der Plk1-mRNA-Gehalt betreffender Zellklone (US-Klon, DS-Klon und US/DS-Klon) mittels Northern-Blot-Nachweis analysiert. Für die effiziente Induktion der Expression von shRNA wählten wir aufsteigende Konzentrationen von 1 µg/ml bis 10 µg/ml Doxyzyklin, die im gleichen Bereich wie jene der transienten Versuche lagen. Hintergrund war erneut die hohe Expressionsrate des Tet-Repressors, welcher unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors stand. Dabei machte der Hersteller (Invitrogen, Karlsruhe) keine Angabe über die Anzahl von integrierten Kopien. 120 h nach Induktion durch 10 µg/ml Doxyzyklin wurde der Gehalt an Plk1-mRNA infolge der shRNA/Plk1-Expression durch den US-Klon auf 3% ($P < 1 \times 10^{-4}$), durch den DS-Klon auf 3% ($P = 3 \times 10^{-4}$) und durch den US/DS-Klon auf 9% ($P = 0,002$) reguliert, jeweils verglichen mit dem Plk1-mRNA-Gehalt des Klons, welcher konstitutiv die *mismatch*-Sequenz exprimiert (Abb. 3.14A, Spalten 1, 5, 9 und 13). Um sicherzustellen, daß die Reduktion der Plk1-mRNA durch die Spezifität der exprimierten shRNA-Sequenz begründet ist, testeten wir jene Klone, welche *mismatch*-shRNA unter Kontrolle aller drei induzierbaren Promotoren exprimierten. Dazu wiederholten wir die Expressions-Analyse unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben. Eine signifikante Abweichung des endogenen Plk1-mRNA-Gehalts durch Induktion der *mismatch*-shRNA-Expression wurde bei allen drei Promotor-Varianten nicht beobachtet (Abb. 3.14A, Spalten 14-22). Somit scheint die Unterdrückung des endogenen Plk1-Transkripts auch in stabiler Situation durch den RNAi-vermittelten Mechanismus,

welcher gezielt gegen das Plk1-Transkript gerichtet ist, hervorgerufen zu werden. Während die Promotoren des US- und US/DS-Typs in Abwesenheit von Doxyzyklin keine Basalaktivität (*leakiness*) zeigten, wurde der Plk1-mRNA-Gehalt vom Promotor des DS-Typs im nicht-induzierten Zustand auf 65% reduziert (Abb. 3.14A, Spalte 6). Unter Berücksichtigung des Zusammenhangs, daß alle drei Zellklone mit ihren jeweiligen integrierten Promotor-Typen zur induzierbaren Expression von shRNA gegen Plk1 eine signifikante Reduktion des Plk1-Transkriptes als Antwort auf steigende Konzentrationen von Doxyzyklin zeigten, wurde die Frage aufgeworfen, ob durch shRNA/Plk1-vermittelte Unterdrückung des endogenen Transkriptes auch in stabiler Situation eine Reduktion des zugehörigen Plk1-Proteins hervorgerufen wird.

Der US-Klon zeigte 120 h nach Zugabe von 10 µg/ml Doxyzyklin einen sehr niedrigen Plk1-Proteingehalt von 14% ($P < 1 \times 10^{-4}$) (Abb. 3.14B, Spalte 5), verglichen mit dem Plk1-Gehalt des Klones, welcher konstitutiv *mismatch*-shRNA exprimiert (MM-Klon) (Abb. 3.14B, Spalte 1). Der MM-Klon zeigte einen Plk1-Proteingehalt, welcher jenem von Wildtyp-HeLa-Zellen gleich (Daten nicht gezeigt), wodurch wiederum die hohe Spezifität des RNAi-Systems gezeigt wurde. In Abwesenheit von Doxyzyklin zeigte der US-Klon einen Proteingehalt von 92% gegenüber jenem Klon, welcher konstitutiv *mismatch*-shRNA exprimiert (Abb. 3.14B, Spalten 1 und 2).

Die Expression von *mismatch*-shRNA unter Kontrolle aller drei induzierbarer Promotoren beeinflusste den endogenen Plk1-Proteingehalt nicht signifikant (Abb. 3.14B, Spalten 14-22). Die Analyse zeigte somit für den US-Klon ein breites Spektrum zur Regulation von Plk1 unter Einfluß verschiedener Doxyzyklin-Konzentrationen.

Unter Einfluß von 10 µg/ml Doxyzyklin zeigte der US/DS-Klon im Vergleich mit dem US-Klon ähnliche Eigenschaften. Obwohl der Plk1-Proteingehalt im nicht-induzierten Zustand bei 95% lag, verglichen mit Kontroll-Zellen des MM-Klons (Abb. 3.14B, Spalte 10), wurde im induzierten Zustand unter Einfluß von 10 µg/ml Doxyzyklin eine signifikante Inhibierung der Expression festgestellt, welche zu einer Reduktion des Plk1-Proteins auf 15% führte ($P = 1 \times 10^{-4}$) (Abb. 3.14B, Spalte 13). Bei einer Konzentration von 1 µg/ml Doxyzyklin verhielten sich US- und US/DS-Klon dagegen unterschiedlich. Während der US/DS-Klon keine signifikante Reduktion des Plk1-Proteins im Vergleich zum nicht-induzierten Zustand aufwies (90%, $P > 0,5$) (Abb. 3.14B, Spalte 11), zeigte der US-Klon eine signifikante Reduktion seines Plk1-Proteins auf 67% ($P < 0,05$) (Abb. 3.14B, Spalte 3).

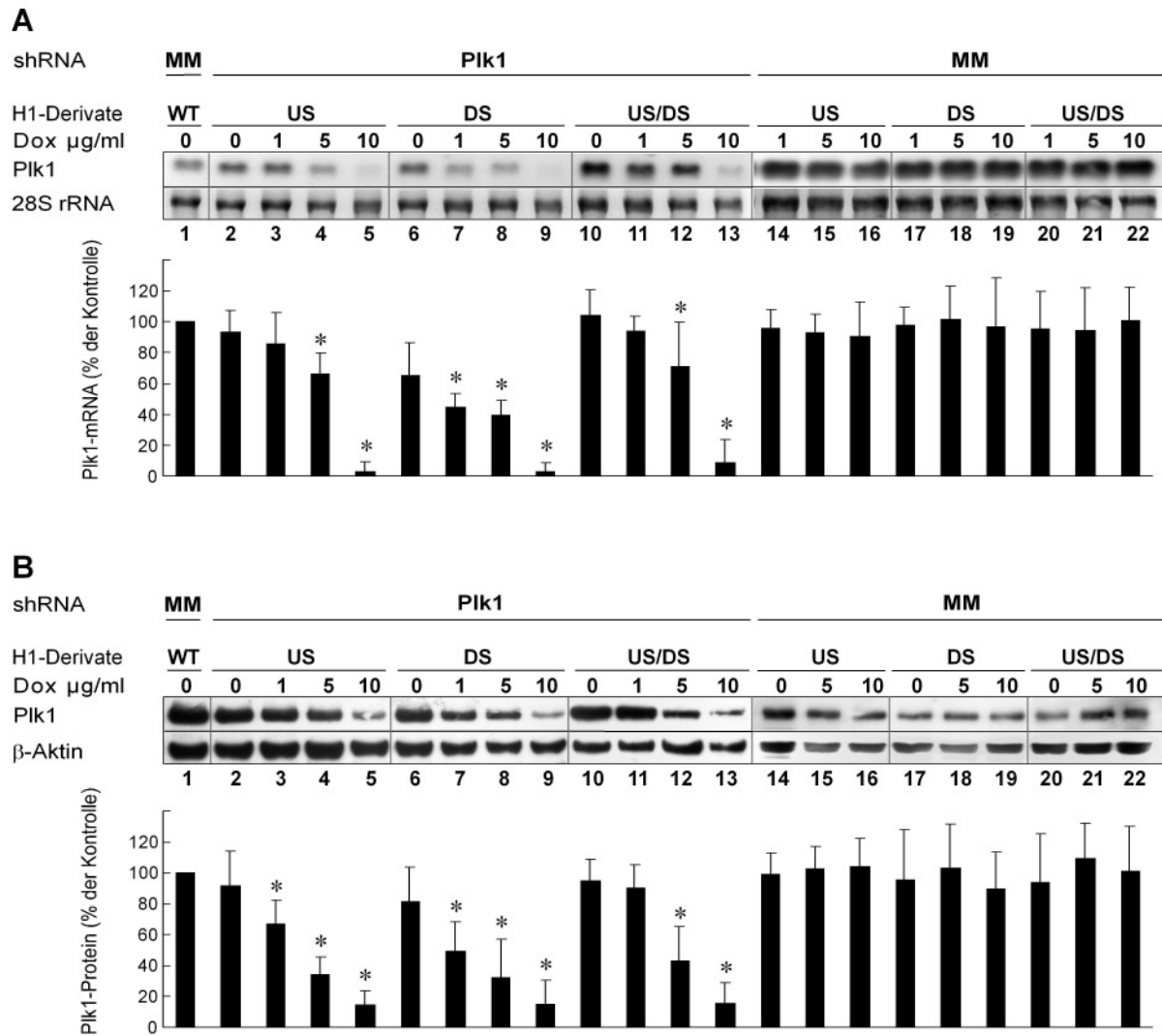


Abb. 3.14: Unterdrückung von Plk1-mRNA und Protein durch Tetrazyklin (Tet)-induzierbare Expression von shRNA/Plk1, vermittelt durch Derivate des H1-Promotors, welche stabil ins Genom von HeLa-Zellen integriert wurden. (A) Northern-Blot-Analyse der Plk1-mRNA. Ein HeLa-Zellklon, welcher die konstitutive Expression von *mismatch*-shRNA (MM) unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors steuert, wurde als Kontrolle benutzt (Spalte 1); Plk1-mRNA-Expression in einem Tet-induzierbaren Klon, welcher shRNA gegen Plk1 unter Kontrolle des Promotors vom US-Typ exprimiert (Spalten 2-5); Plk1-mRNA-Expression in einem Tet-induzierbaren Klon, welcher shRNA gegen Plk1 unter Kontrolle des Promotors vom DS-Typ exprimiert (Spalten 6-9); Plk1-mRNA-Expression in einem Tet-induzierbaren Klon, welcher shRNA gegen Plk1 unter Kontrolle des Promotors vom US/DS-Typ exprimiert (Spalten 10-13); Plk1-mRNA-Expression in Tet-induzierbaren Klonen, welche *mismatch*-shRNA unter Kontrolle der Promotoren vom US-, DS- und US/DS-Typ (Spalten 14-22) exprimieren. Induktion durch die einzelnen Doxyzyklin (Dox)-Konzentrationen dauerte insgesamt 120 h. Zur Standardisierung wurde die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA gewählt. Der jeweilige Gehalt an Plk1-mRNA wurde prozentual am Plk1-mRNA-Gehalt des Klons, welcher konstitutiv *mismatch*-shRNA exprimiert, orientiert. **(B)** Western-Blot-Analyse der Plk1-Proteinexpression. Es liegt die gleiche graphische Einteilung wie in (A) vor. Zur Standardisierung wurde die Expression von β-Aktin gewählt. Der jeweilige Gehalt an Plk1-Protein wurde prozentual am Plk1-Proteingehalt des Klons, welcher konstitutiv *mismatch*-shRNA exprimiert, orientiert. Signifikante Reduktionen ($P < 0,05$) sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Der DS-Klon zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion des Plk1-Proteins auf 15% in Anwesenheit von 10 µg/ml Doxyzyklin ($P = 1 \times 10^{-4}$) (Abb. 3.14B, Spalte 9). Ein begrenztes

Maß an Basalaktivität (*leakiness*) konnte im nicht-induzierten Zustand festgestellt werden (81% Plk1-Protein) (Abb. 3.14B, Spalte 6). Insgesamt gesehen, stellte sich heraus, daß durch Benutzen von US- oder US/DS-Klon für die Expression von shRNA gegen Plk1, die Expression sowohl des Plk1-Transkripts als auch jene des Plk1-Proteins in einem breiteren Spektrum gesteuert werden konnte, als unter Verwendung des DS-Klons.

3.5.3 Inhibition der Proliferation von Tumorzellen durch konditionelle Unterdrückung der Plk1-Expression mittels stabil integrierter RNAi-Kassetten

Durch zahlreiche Studien wurde die begrenzte Dauer der RNAi-vermittelten Unterdrückung der Genexpression infolge Applikation von siRNA oder transients Transfektion von shRNA-exprimierenden Plasmid-Vektoren verdeutlicht. Dies ist der hauptsächliche Nachteil von exogen zu verabreichenden RNAi-auslösenden Substanzen. Aus diesem Grund führten diese Techniken nur zu einer transienten Inhibition der Proliferation von Tumorzellen infolge der Unterdrückung von Plk1 (Liu et al., 2002; Spankuch-Schmitt et al., 2002a; Liu et al., 2003; Spankuch et al., 2004). Um die RNAi-vermittelten Effekte gegen Plk1 zeitlich auszudehnen und zu verstärken, wurden die beschriebenen induzierbaren RNAi-Kassetten ins Genom von TetR-exprimierenden HeLa-Zellen integriert (siehe auch Kap. 3.5.1) und auf ihre Fähigkeit hin getestet, im stabilen Zustand die Proliferation von Tumorzellen zu steuern. Zu diesem Zwecke wurden alle sieben etablierten Zellklone in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin kultiviert.

Zellen des US-Klons zeigten unter nicht-induzierten Bedingungen 120 h nach Aussaat die höchste Proliferationsrate von 78%, verglichen mit Wildtyp-HeLa-Zellen (Abb. 3.15A). Zellen des DS-Klons und jene des US/DS-Klons zeigten dazu im Vergleich eine jeweils reduzierte Proliferationsrate von 54% (DS-Klon) bzw. 68% (US/DS-Klon) in Abwesenheit von Doxyzyklin, verglichen mit Wildtyp-HeLa-Zellen (Abb. 3.15B und C).

Im Gegensatz dazu wurden die Proliferationsraten aller drei Zellklone nach Zugabe von Doxyzyklin gegenüber dem nicht-induzierten Zustand signifikant inhibiert: jene des US-Klons auf 33% ($P = 3 \times 10^{-4}$), jene des DS-Klons auf 20% ($P = 2 \times 10^{-4}$), jene des US/DS-Klons auf 17% ($P = 6 \times 10^{-4}$) (Abb. 3.15A-C). Um herauszufinden, ob der Effekt der inhibierten Proliferation nicht durch die alleinige Wirkung von Doxyzyklin begründet war, wurden Wildtyp-HeLa-Zellen 120 h lang in Anwesenheit von 5 µg/ml Doxyzyklin kultiviert.

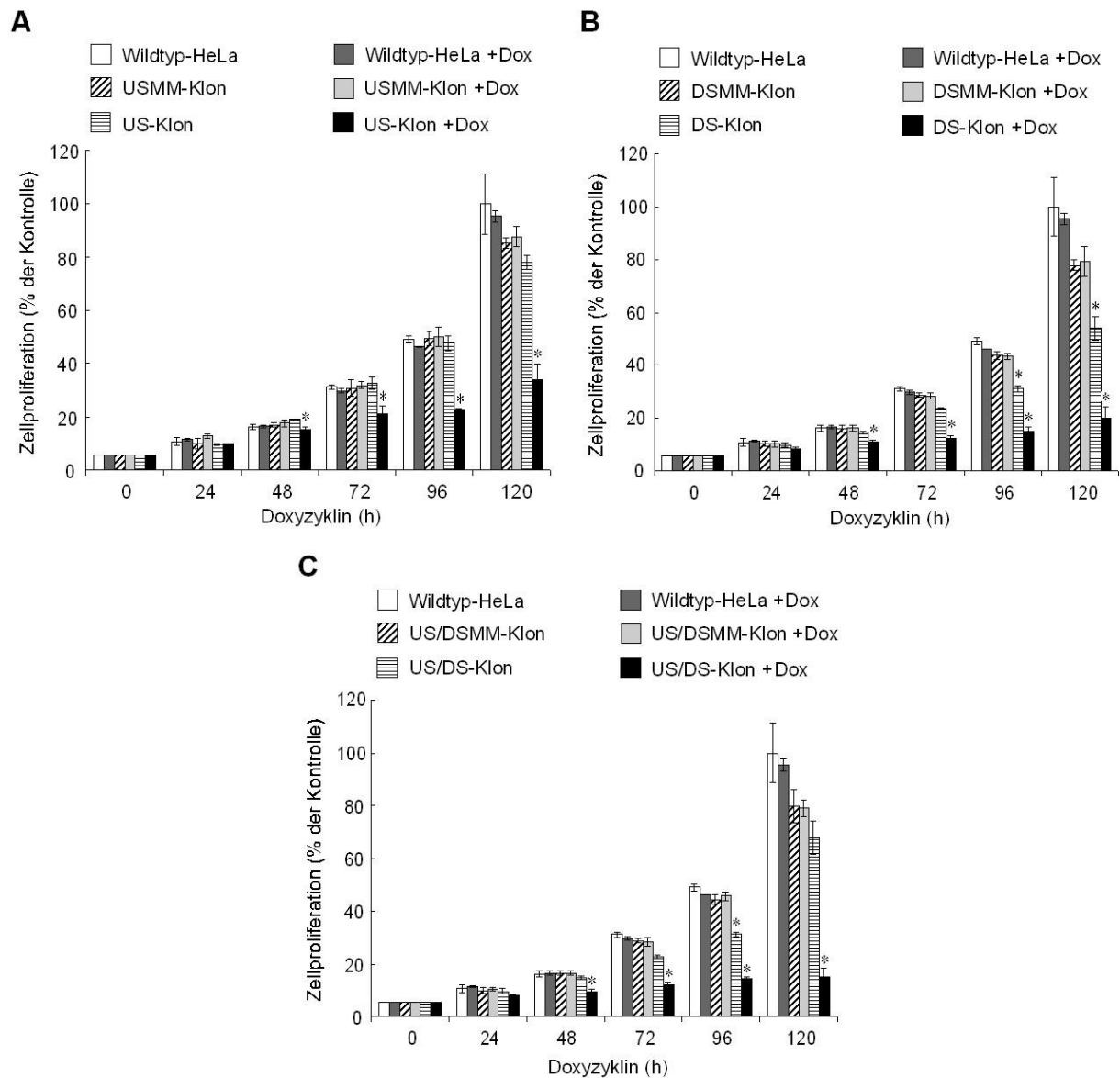


Abb. 3.15: Proliferationsraten von shRNA/Pik1MM (*mismatch*-shRNA)- und shRNA/Pik1-exprimierenden induzierbaren HeLa-Klonen. HeLa-Klone mit stabil integrierten Derivaten des H1-Promotors wurden für die Expression von shRNA/Pik1MM oder shRNA/Pik1 durch Zugabe von 5 µg/ml Doxyzyklin (Dox) ins Kulturmedium induziert. **(A)** Proliferationsraten von Klonen deren induzierbares System zur Expression von shRNA/Pik1MM (USMM-Klon) oder shRNA/Pik1 (US-Klon) unter Kontrolle des Promotors vom US-Typ steht. **(B)** Proliferationsraten von Klonen deren induzierbares System zur Expression von shRNA/Pik1MM (DSMM-Klon) oder shRNA/Pik1 (DS-Klon) unter Kontrolle des Promotors vom DS-Typ steht. **(C)** Proliferationsraten von Klonen deren induzierbares System zur Expression von shRNA/Pik1MM (US/DSMM-Klon) oder shRNA/Pik1 (US/DS-Klon) unter Kontrolle des Promotors vom US/DS-Typ steht. Die Werte wurden prozentual an den Werten von Wildtyp-HeLa-Zellen orientiert. Signifikante Inhibitionen des Wachstums ($P < 0,05$) sind durch Sternchen gekennzeichnet.

Die Wildtyp-HeLa-Zellen zeigten dabei keine signifikanten Abweichungen in bezug auf ihr Teilungswachstum, verglichen mit HeLa-Zellen, welche in Abwesenheit von Doxyzyklin kultiviert wurden ($P > 0,5$) (Abb. 3.15A-C). Die durch alle drei induzierbaren Promotor-Typen gesteuerte Expression von *mismatch*-shRNA beeinflusste die Zellproliferation ihrer

zugehörigen Klone weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Doxyzyklin signifikant, verglichen mit der Wachstumsrate von Kontrollzellen (Abb. 3.15A-C).

3.6 *In vivo*-Studien eines induzierbaren RNAi-Systems anhand eines Xenograft-Modells

3.6.1 Etablierung von immunsupprimierten Nacktmäusen mit humanen Tumoren

Tetrazyklin-induzierbare Expressionssysteme wurden bereits weit verbreitet für das Studium der Funktion von Genen in Mausmodellen benutzt (Gossen und Bujard, 2002). Nach der gewonnenen Erkenntnis der möglichen Einflußnahme auf die Proliferation von Zellen in Kultur, testeten wir in den folgenden Versuchen, ob die Unterdrückung der Genexpression durch Induktion stabil ins Genom integrierter RNAi-Elemente das Potential besitzt, neoplastisches Wachstum von Tumoren in Xenograft-Modellen zu inhibieren. Des weiteren sollten durch die Testung der entwickelten Systeme *in vivo* erste Eindrücke über deren Eignung im Hinblick auf die Etablierung transgener Tiere gewonnen werden. Zunächst wurden acht Wochen alte athymische Nacktmäuse mit den etablierten HeLa-Klonen der Typen US und USMM inokuliert. Die Injektion der beiden Klon-Typen in jeweils dieselben Mäuse erlaubte einen direkten Vergleich der beiden sich gegenüberliegend entwickelnden Tumoren unter gleichen Wachstumsbedingungen, entweder in Abwesenheit, oder in Anwesenheit von Doxyzyklin.

Insgesamt wurden jeweils 1×10^7 Klone des USMM-Typs in die linke und jeweils 1×10^7 Klone des US-Typs in die rechte Flanke von insgesamt 24 Nacktmäusen subkutan gespritzt. Darauf wurden zwei Tiergruppen, bestehend aus jeweils 12 Individuen, willkürlich zusammengestellt. Die eine Gruppe der Mäuse bekam Trinkwasser mit 3% Sucrose und 0,2% Doxyzyklin verabreicht. Die Kontrollgruppe dagegen bekam ausschließlich 3% Sucrose ohne Doxyzyklin ins Trinkwasser gemischt.

3.6.2 Konditionelle Inhibition des Tumorwachstums durch Doxyzyklin-abhängige Induktion stabil integrierter RNAi-Kassetten

In einer Zeitspanne von 28 Tagen, beginnend an Tag 23 und endend an Tag 51 nach Inokulierung der Zellklone, wurden zweimal pro Woche Näherungswerte der Volumina von sich entwickelnden Tumoren ermittelt. Die einzelnen Durchschnittswerte von zwölf Xenograft-RNAi-Tumoren pro Kontrollgruppe sind als relative Wachstumsraten in

Abb. 3.16A gegen die Zeit aufgetragen. Mäuse, welche durch ihr Trinkwasser Doxyzyklin verabreicht bekamen, zeigten ein differentielles Wachstum ihrer beiden Tumoren, welche zum einen aus Klonen des USMM-Typs und zum andern aus Klonen des US-Typs hervorgingen: Tumoren, welche aus Zellen des US-Klons hervorgingen, wiesen gegenüber *mismatch*-shRNA-exprimierenden Tumoren, welche aus Zellen des USMM-Klons hervorgingen, in Anwesenheit von 0,2% Doxyzyklin eine um 53% auf 47% gesunkene Wachstumsrate an Tag 51 nach Inokulierung der Zellen auf ($P = 0,006$) (Abb. 3.16A). Die Wachstumsraten, sowohl der beiden nicht-induzierten Tumoren (USMM-Klon und US-Klon) als auch der durch Doxyzyklin induzierten USMM-Tumoren, zeigten untereinander keinerlei signifikante Abweichungen ($P > 0,5$) (Abb. 3.16A).

3.6.3 Konditionelle Inhibition der Plk1-Expression durch Doxyzyklin-abhängige Induktion stabil integrierter RNAi-Kassetten

Um zu überprüfen, ob die festgestellte Inhibition des Tumorwachstums ursächlich in der RNAi-vermittelten Unterdrückung von Plk1 begründet war, wurde die gesamte RNA von USMM- und US-abgeleiteten Tumoren, welche auf Mäusen sowohl mit als auch ohne Doxyzyklin-Behandlung wuchsen, mittels Northern-Blot analysiert. Übereinstimmend mit der Erkenntnis der Wachstumsinhibition von US-abgeleiteten Tumoren in Anwesenheit von Doxyzyklin wurde der durchschnittliche Plk1-mRNA-Gehalt betreffender Tumoren auf 73% reduziert ($P = 0,034$) (Abb. 3.16B), verglichen mit dem mRNA-Gehalt aus *mismatch*-shRNA exprimierenden Tumoren der gleichen Mäuse, welche der Wirkung von Doxyzyklin ausgesetzt wurden (Abb. 3.16B).

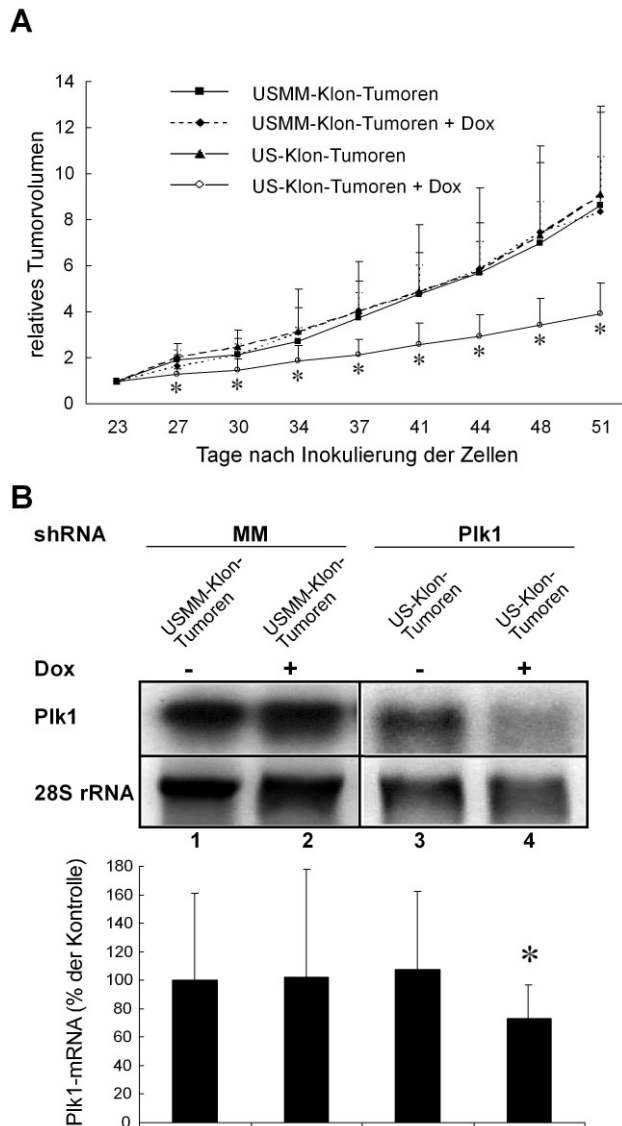


Abb. 3.16: Tumorwachstum in Nacktmäusen nach Doozyzyklin-induzierter Expression von shRNA/Plk1MM oder shRNA/Plk1. Die Mäuse bekamen 1×10^7 HeLa-Klone pro Flanke inokuliert. HeLa-Klone zur induzierbaren Expression von shRNA/Plk1MM wurden in die linke Flanke inokuliert, Klone zur induzierbaren Expression von shRNA/Plk1 wurden in die rechte Flanke inokuliert. **(A)** Relative Tumolvolumina von Xenograft-HeLa-Tumoren aus US-Klonen, welche induzierbar shRNA/Plk1MM oder shRNA/Plk1 unter Kontrolle des Promotors vom US-Typ exprimierten, sowohl nach Induktion durch Doozyzyklin (Dox), als auch in Abwesenheit des Antibiotikums, beginnend an Tag 23 nach Inokulierung. Signifikante Inhibition des Tumorwachstums ist durch Sternchen gekennzeichnet. **(B)** Northern-Blot-Analyse der Plk1-mRNA unter dem Einfluß von shRNA/Plk1MM- oder shRNA/Plk1-Expression. Plk1-mRNA-Expression in US-Typ-Promotor-abgeleiteten HeLa-Tumoren in Abwesenheit von Doozyzyklin (Spalten 1 und 3) im Vergleich zur Plk1-mRNA-Expression in US-Typ-Promotor abgeleiteten HeLa-Tumoren unter Doozyzyklineinfluß (Spalten 2 und 4). Zur Standardisierung wurde die Ethidiumbromidfärbung der 28S rRNA gewählt. Signifikante Reduktion ($P < 0,05$) ist durch ein Sternchen gekennzeichnet.

3.7 Versuche zur Etablierung induzierbarer RNAi-Systeme in transgenen Mäusen

3.7.1 Allgemeine Strategien zur genomischen Integration von DNA-Elementen in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) transgener EGFP-exprimierender Mäuse

Im Hinblick auf das Studium der *in vivo*-Funktion von Plk1 in Geweben adulter Organismen sollten als Fernziel transgene Tiere etabliert werden, welche die bereits *in vitro* charakterisierten induzierbaren RNAi-Systeme gegen Plk1 als integrale genomische Elemente aufweisen. Unter Berücksichtigung der Einflußnahme seitens Plk1 auf essentielle mitotische Prozesse, welche Voraussetzung für eine erfolgreiche Embryogenese sind, schien die

Entwicklung von transgenen Tieren mit integrierten RNAi-Kassetten, welche auf Plk1 zielten, ein Wagnis zu sein. Vielmehr sollte zunächst ein Modellsystem geschaffen werden, mit dessen Hilfe es möglich sein sollte, induzierbare RNAi-Antworten in gesamten Organismen auszulösen. Zur Überprüfung der Tragfähigkeit dieses Modellsystems (*proof of principle*), eine gezielte und regulierte Unterdrückung der Gen-Expression mit Hilfe der entwickelten induzierbaren RNAi-Systeme zu erreichen, eignete sich ein exogen eingebrachtes Zielgen. In diesem Zusammenhang erwies es sich als günstig, daß vor einigen Jahren durch genomische Integration des EGFP-Gens in Maus-ES-Zellen Tiere generiert wurden, welche nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge grün fluoreszierten (Hadjantonakis et al., 1998). Gezielte konditionelle Unterdrückung des EGFP-Reportergens stellte in unseren Augen eine elegante Möglichkeit dar, die Eignung der induzierbaren RNAi-Systeme für eine später erfolgende, mögliche *in vivo*-Anwendung gegen Plk1 zu bewerten. In Kooperation mit der Firma Murinus GmbH (Hamburg) wurde eine Strategie entworfen, mit deren Hilfe die notwendigen DNA-Elemente in das Genom embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) der Maus integriert werden sollten. Für die zunächst erfolgende stabile Integration des TetR-KRAB-Fusionsproteins und die anschließende Integration eines bestimmten Typs der entwickelten induzierbaren RNAi-Kassetten war jeweils ein individuelles Resistenzgen pro transfiziertem Plasmid-Vektor für die spätere Selektion von ES-Zellklonen notwendig. Die bereits EGFP-exprimierenden ES-Zellklone wurden unter Einfluß von 3 µg/ml Puromycin selektiert und kultiviert. Somit konnte das bereits klonierte Plasmid pcDNA3.1HygroTetR-KRAB, welches ein Resistenzgen gegen Hygromycin B besaß, und die Plasmide für induzierbare Expression von shRNA, welche eukaryotische Resistenzgene gegen Geneticin (G418) besaßen, für Transfektionen der EGFP-exprimierenden Maus-ES-Zellen verwendet werden.

3.7.2 Integration von Plasmid-DNA in das Genom von ES-Zellen transgener EGFP-exprimierender Mäuse zur konstitutiven Expression von TetR-KRAB / Analyse von Klonen

Für die stabile Integration von Plasmid-DNA, welche das TetR-KRAB-Fusionsprotein kodierte, wurden EGFP-exprimierende ES-Zellen der Maus mit betreffendem, zuvor linearisiertem Plasmid mittels Lipofektion transfiziert. Nach Selektion durch Zugabe von 100 µg/ml Hygromycin ins Kulturmedium wurden die Zellen selektiert und resistente Klone schließlich vereinzelt. Anschließend wurden insgesamt 80 ES-Zellklone in bezug auf die Expression des TetR-KRAB-Fusionsproteins mittels Western-Blot-Analyse untersucht. HeLa-Zellen, welche TetR-KRAB transient exprimierten, wurden zum Nachweis des

38 kD-Proteins als Positivkontrolle benutzt. Dabei konnte unter Verwendung sowohl eines monoklonalen, als auch eines polyklonalen Antikörpers gegen TetR in keinem der 80 resistenten Klone die Expression des Fusionsproteins nachgewiesen werden (Abb. 3.17A). Durch Markierung mittels polyklonaler Seren gegen Kox-Linker-Domänen konnte ebenso für keinen der 80 Klone ein Nachweis der Genexpression von TetR-KRAB erbracht werden. Mittels PCR-Analyse konnte dagegen in 19 von 22 Klonen die genomische Integration der für TetR-KRAB kodierenden cDNA inkl. CMV-Promotor nachgewiesen werden (Abb. 3.17B). Vorherige Versuche zur stabilen Expression des bakteriellen TetR in ES-Zellen der Maus scheiterten ebenfalls (Daten nicht gezeigt).

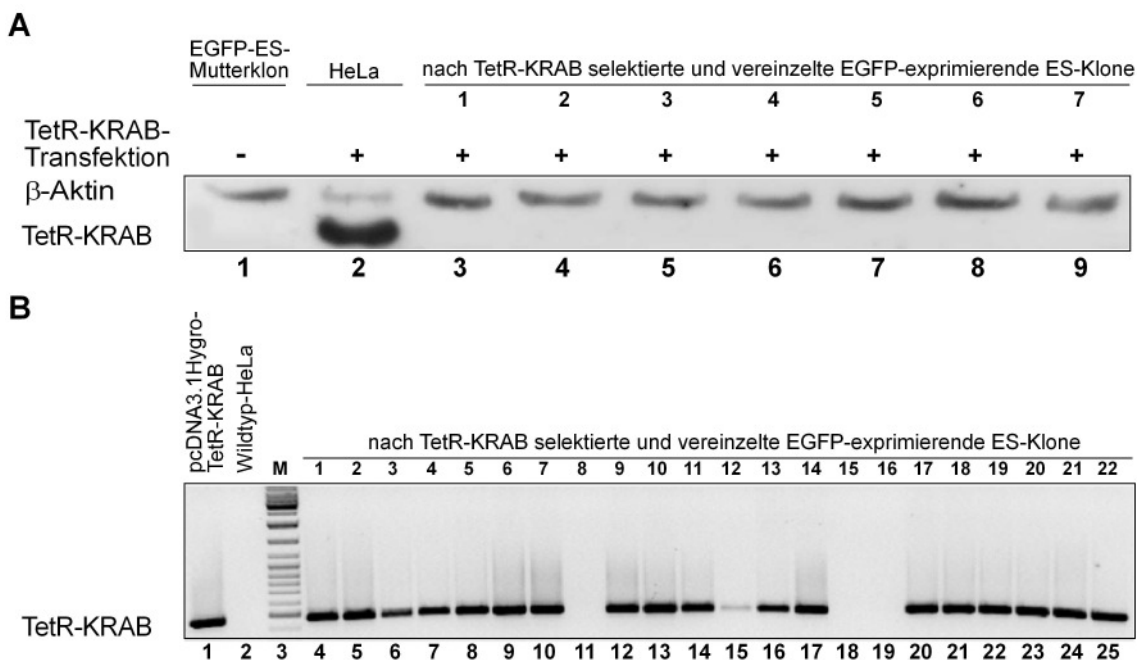


Abb. 3.17: Stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom von EGFP-exprimierenden ES-Zellen der Maus zur konstitutiven Expression von TetR-KRAB. EGFP-exprimierende Maus-ES-Zellen wurden mit linearisiertem Plasmid pcDNA3.1HygroTetR-KRAB transfiziert und selektiert. Nach Isolierung von 80 resistenten Einzelklonen wurden diese in bezug auf die Expression von TetR-KRAB analysiert. **(A)** Western-Blot-Analyse der Expression des TetR-KRAB-Fusionsproteins in resistenten EGFP-exprimierenden ES-Zellklonen der Maus (Spalten 3-9). Ein nicht-transfizierter EGFP-ES-Mutterklon wurde als Negativkontrolle verwendet (Spalte 1), als Positivkontrolle dienten transient TetR-KRAB-exprimierende HeLa-Zellen (Spalte 2). Zur Standardisierung wurde die Expression von β -Aktin gewählt. Insgesamt wurden 80 Klone getestet. **(B)** PCR-Analyse der genomischen Integration der für TetR-KRAB kodierenden cDNA inkl. CMV-Promotor nach Auftrennung im 1,5%igen Agarose-Gel. Insgesamt wurden 22 Klone analysiert (Spalten 4-25). Als Positivkontrolle wurde eine PCR mit dem in ES-Zellen transfizierten Plasmid als Matrizen-DNA durchgeführt (Spalte 1). Für die Negativkontrolle wurde der gleiche PCR-Ansatz mit genomischer DNA von Wildtyp-HeLa-Zellen als Matrizen-DNA durchgeführt (Spalte 2). M = DNA-Größenmarker

3.7.3 Genomische Integration eines konstitutiven RNAi-Systems in ES-Zellen transgener EGFP-exprimierender Mäuse

Aufgrund der fehlenden stabilen Expression von TetR oder TetR-KRAB in EGFP-exprimierenden ES-Zellen der Maus, stellte sich die Frage, ob grundsätzlich mit Hilfe von konstitutiven shRNA-exprimierenden Kassetten die Auslösung einer RNAi-Antwort in ES-Zellen und damit auch in der adulten Maus möglich sei. So wurde der Versuch unternommen, betreffende RNAi-Kassetten zur konstitutiven shRNA-Expression gegen EGFP, welche unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors standen, in das Genom von ES-Zellen der Maus zu integrieren. Der Plasmid-Vektor pwtH1shRNA/EGFP wurde nach Linearisierung mittels Lipofektion in EGFP-exprimierende ES-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1,5 mg/ml Geneticin (G418) in das Kulturmedium selektiert. Resistente Klone wurden nachfolgend vereinzelt und im Hinblick auf ihre EGFP-Expression mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.18, Spalten 1-8). Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte EGFP-exprimierende Stammzellen (Abb. 3.18, Spalte 9). Insgesamt betrachtet, zeigten sechs von acht getesteten Klonen eine Reduktion ihrer EGFP-Expression. Dabei befand sich in einigen Fällen die EGFP-Expression knapp über der Nachweisgrenze (Abb. 3.18, Spalten 4, 7 und 8).

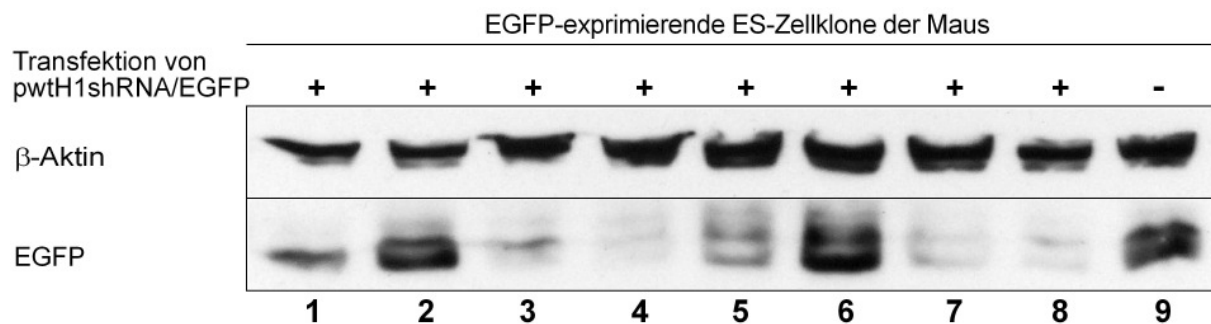


Abb. 3.18: Stabile genomische Integration von RNAi-Kassetten zur konstitutiven Expression von shRNA/EGFP durch den Wildtyp-H1-Promotor. EGFP-exprimierende ES-Zellen der Maus wurden durch Lipofektion mit Plasmid-Vektoren transfiziert, welche RNAi-Kassetten zur konstitutiven Expression von shRNA gegen EGFP unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors aufwiesen. Nach Selektion wurden einige resistente Klone isoliert und im Hinblick auf ihre EGFP-Expression untersucht (Spalten 1-8). Der nicht-transfizierte Mutterklon diente als Kontrolle (Spalte 9). Zur Standardisierung wurde die Expression von β -Aktin gewählt.

4 DISKUSSION

4.1 Analyse des Plk1-Gens im Hinblick auf die Eignung einer RNAi-basierten Strategie zur Unterdrückung der Genexpression

Die genomische Sequenzanalyse des Plk1-Gens führte bereits vor einiger Zeit zur Aufspürung und Entdeckung einzelner Punktmutationen in humanen Tumorzelllinien (Simizu et al., 2000). Dabei fiel auf, daß Punktmutationen der DNA, welche einzelne Aminosäuren des Proteins austauschten, ausschließlich im Bereich, welcher den C-Terminus kodiert, auftraten. Eine weitere Auffälligkeit bestand darin, daß die beschriebenen Mutationen in Zelllinien solider Tumoren auftraten, welche gegenüber tumorösen Suspensionszellen einen moderaten Gehalt an Plk1-Protein aufwiesen. Dies ließ darauf schließen, daß C-terminale Mutationen in einer Instabilität des Plk1-Proteins resultierten. Tatsächlich wurde durch Ko-Immunoprecipitationen eine Interaktion zwischen Plk1 und Hsp90 (*heat shock protein 90*) gefunden, welche Plk1 stabilisiert und vor Abbau schützt (Simizu et al., 2000). Durch Inhibition von Hsp90 mittels Geldanamycin konnte eine Destabilisierung des Wildtyp-Plk1-Proteins erreicht werden, mutiertes Plk1-Protein jedoch hatte eine konstante Stabilität.

Aufgrund dieser Befunde analysierten wir zunächst die genomische DNA aus vier soliden Tumorzelllinien im Hinblick auf die Aufspürung möglicher Mutationen des Plk1-Gens und deren Auswirkungen auf das Plk1-Protein. Die Analyse der kodierenden Exonbereiche und deren zugehöriger Spleißstellen im Plk1-Gen deckte jedoch in keiner der insgesamt vier getesteten Cervix-Karzinom- oder Mamma-Karzinom-Zelllinien Mutationen im offenen Leseraster auf, was insofern verwundert, daß nahezu alle zuvor in der Literatur getesteten adhärennten Tumorzelllinien Mutationen im Plk1-Gen aufwiesen, welche den Austausch mindestens einer Aminosäure im C-Terminus des Proteins bewirkten (Simizu et al., 2000). In unseren weiteren Überlegungen spielte deshalb die Analyse primären Tumormaterials eine wichtige Rolle. So sind *in vitro*-wachsende Zelllinien im Gegensatz zu Tumoren, genetisch gleich und müssen keine Wachstumskonkurrenz fürchten. Tumoren hingegen unterliegen dynamischen Mutationsprozessen und müssen sich gegenüber anderen Zelltypen durchsetzen, was durch das Erwerben und die Ausnutzung eines Wachstumsvorteils geschieht. Die Heterogenität der in einem wachsenden Tumor befindlichen Zellen machte das Auftreten von Mutationen zusätzlich wahrscheinlich. In den genetischen Analysen der humanen Primärtumoren – es wurden insgesamt 15 Mamma- und 11 Ovarial-Karzinome getestet – wurden jedoch übereinstimmend mit der Analyse des Plk1-Gens in adhärennten Zelllinien

keinerlei Mutationen in kodierenden Exons, auch nicht in den für Spleißstellen kodierenden Bereichen der Introns gefunden. Dieses Phänomen war aufgrund des Auftretens von Mutationen in den bisher untersuchten adhären Zellen nicht unbedingt erwartet worden. So hätte das Vorhandensein von systematisch auftretenden Mutationen eine Charakteristik von Plk1-spezifischen Verhaltensweisen während der Tumorprogression ermöglichen können. Durch die Zelltyp- und Organismus-übergreifenden Befunde wird dagegen eine gewisse Stabilität von Plk1 auf genomischer Ebene deutlich. Im Gegensatz zu Onkogenen wie z. B. Ras (Kinzler et al., 1996) oder diverser mitotischer Kinasen, deren Überaktivität oftmals durch Mutationen auf genomischer Ebene begründet ist, wurde durch unsere Experimente deutlich, daß die Sequenz des Plk1-Gens in Tumorzellen sowie in Primärtumoren hoch konserviert ist. Strategien, welche auf sequenzspezifischer Inhibition der Genexpression beruhen, z. B. die Hemmung der Translation mittels Oligonukleotiden oder die Degradierung von mRNA-Transkripten mittels RNA-Interferenz vorsehen, erlangen somit eine große Bedeutung als geeignete Techniken für Forschungsexperimente. Zudem wird im Hinblick auf eine voranschreitende Tumorprogression, in welcher betreffende Zellen zahlreichen Mutationsereignissen Zellzyklus-relevanter Gene unterworfen sind (Vogelstein und Kinzler, 2004), die therapeutische Relevanz von Plk1 als Zielgen deutlich. So könnten zukünftige medikamentöse Therapien auf RNAi-basierten, gegen Plk1 gerichteten Strategien beruhen. Zellzyklus-relevante Gene, welche häufig auftretenden Mutationsereignissen unterworfen sind, würden dagegen als Angriffspunkte für Gentherapien schwer greifbar sein.

4.2 Transiente Vektor-basierte RNA-Interferenz

4.2.1 Wirkung konstitutiver Expression von shRNA

Die Entdeckung der RNA-Interferenz zur post-translationalen Inhibition der Genexpression eröffnete im Hinblick auf eine Unterdrückung der Expression von Genen ungeahnte Möglichkeiten. Die Auslösung der RNAi-vermittelten Degradierung von Gen-Transkripten aufgrund intrazellulärer Synthese von shRNA infolge der Applikation von Plasmid-Vektoren stellte bislang einen großen Fortschritt für eine längerfristige Auslösung von RNAi dar. So konnte die Wirkungsdauer einer einfachen Applikation chemisch synthetisierter siRNA, welche in der Regel nach einigen Tagen verflogen ist, durch Transfektion von RNAi-auslösenden Plasmid-Vektoren und folgender genomischer Integration deutlich übertroffen werden (Brummelkamp et al., 2002b).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Plasmid-Vektoren für die konstitutive Expression von shRNAs gegen EGFP unter Kontrolle des Wildtyp-H1-Promotors, einem Vertreter der

RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren, konstruiert. Zur Veranschaulichung diente zunächst das exogen in Zellen eingebrachte Gen EGFP (*enhanced green fluorescent protein* = verstärktes grün fluoreszierendes Protein) als Zielgen. Im Vergleich zu HeLa-Zellen, welche mit Kontrollplasmiden (konstitutiv shRNA/EGFPMM-exprimierend) transfiziert wurden (100%), zeigten nur 23% der HeLa-Zellen, die mit Wirkplasmiden (konstitutiv shRNA gegen EGFP exprimierend) transfiziert wurden, EGFP-Fluoreszenz (Abb 3.7D). Die Reduktionsrate des EGFP-Proteins in der Gesamtheit der untersuchten Zellen konnte damit im Mittel auf 77% beziffert werden. Dieser Befund steht in Einklang mit Ergebnissen anderer Studien, bei welchen durch Verwendung eines H1-Promotors zur konstitutiven Expression von spezifischer shRNA die Expression von Genen in Säugerzellen um ca. 80% reduziert werden konnte (McManus et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002a). Die verbliebene Restaktivität ist darauf zurückzuführen, daß nicht alle Zellen, deren EGFP-Gehalt in das Ergebnis mit einfließt, unter transienten Bedingungen mit einer ausreichenden Anzahl von shRNA/EGFP-exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden. So ist bei Ko-Transfektion von EGFP-exprimierendem Plasmid und shRNA-exprimierendem Plasmid davon auszugehen, daß der überwiegende Teil transfizierter Zellen mit beiden Plasmiden in einem ähnlichen Verhältnis transfiziert wird. Der restliche Teil erhält ein ungleiches Verhältnis der beiden Plasmide. Dies bedeutet im Fall des Überschusses von EGFP-exprimierendem Plasmid, daß shRNA-exprimierendes Plasmid mit der Produktion von genügend shRNA, welche für die Transkript-Degradierung ausreicht, nicht nachkommt. Nach Transfektion konstitutiv shRNA/Plk1-exprimierender Plasmide konnte in den einzelnen Versuchen ein Plk1-Proteingehalt von 15%-25% festgestellt werden (Abb. 3.10 und 3.11), was im Vergleich zu Zellen, welchen *mismatch*-Kontrollplasmide transfiziert wurden, Reduktionsraten von 75%-85% entspricht. Diese Werte stehen in Einklang mit jenen, welche die Unterdrückung der EGFP-Expression beschreiben. Höhere Reduktionsraten konnten aufgrund mangelnder Transfektionseffizienzen und einer suboptimalen Selektionsrate auch hier nicht erreicht werden. So mußte ein sehr begrenztes Zeitfenster gefunden werden, in welchem transiente RNAi-Effekte ein hohes Ausmaß erlangten, gleichzeitig aber die Selektion so weit vorangeschritten war, daß störende Einflüsse durch nicht-transfizierte Zellen ausgeschlossen wurden. Durch Experimente, in welchen viral-vermittelte stabile Integrationen konstitutiv siRNA/shRNA-exprimierender Konstrukte erreicht wurden, konnten dagegen sehr potente RNAi-Effekte gezeigt werden (Brummelkamp et al., 2002b; Tiscornia et al., 2003). In diesen Fällen konnten die Nachteile transienter Transfektionen, wie etwa schlechte Transfektionseffizienz und heterogene Verteilung der Konstrukte, weitestgehend umgangen werden.

4.2.2 Bessere Eignung des H1-Promotors gegenüber dem U6 snRNA-Promotor für die konstitutive Expression von shRNA

In zahlreichen Studien wurde mittels konstitutiver Expression wirksamer shRNAs die spezifische Degradierung von mRNA gezeigt (Paddison et al., 2002; Yu et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002a). Hierbei wurde in den meisten Fällen der U6 snRNA-Promotor benutzt, dessen funktionelle Eigenschaften bereits früh charakterisiert wurden (Lobo et al., 1990). Eigenschaften wie ein genau definierter Beginn und ein definiertes Ende der Transkription, zusammen mit der Erkenntnis, daß alle für die Transkription wichtigen regulatorischen Elemente in 5'-Richtung des Transkriptionsstarts liegen, ließen den U6 snRNA-Promotor als den am meisten geeigneten Promotor erscheinen. Eine negative Eigenschaft des U6 snRNA-Promotors wurde jedoch durch den Befund deutlich, wonach erhöhte Aktivität von U6 snRNA-Promotoren, welche durch vermehrte Einschleusung von Plasmidkonstrukten in Zellen bewirkt wurde, keine Erhöhung des Gehalts an U6-Transkript bewirkte, sondern vielmehr eine Degradierung des U6-Transkriptes zur Folge hatte (Noonberg et al., 1996). Unter Verwendung des U6 snRNA-Promotors für die Vermittlung von RNA-Interferenz könnte dieses als Promotor-Interferenz bezeichnete Phänomen einen großen Nachteil darstellen, da für eine potente Degradierung von Transkripten dafür notwendige intrazelluläre Konzentrationen an siRNA/shRNA exprimiert werden müssen. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, daß leere Plasmid-Vektoren mit kodierten U6 snRNA-Promotoren ohne eine definierte zu exprimierende Sequenz die endogene Genexpression durch unspezifische Effekte negativ beeinflusst (invivogen.com, 2002). Des Weiteren stimmt die Sequenz des humanen U6 snRNA-Promotors mit jener des murinen U6 snRNA-Promotors nur zu 56,2% überein. Daraus könnte ein Nachteil für Spezies-übergreifende Experimente entstehen, da voraussichtlich nur der jeweilige Promotor in Zellen des betreffenden Organismus erfolgreich angewendet werden kann. Der direkte Vergleich zwischen U6 snRNA-Promotor und H1-Promotor zeigte eine geringere Effektivität bei Verwendung des U6 snRNA-Promotors zur Auslösung der RNAi-Antwort, wodurch die bessere Eignung des H1-Promotors zur Expression von shRNA verdeutlicht wurde (Zhang et al., 2003). Tatsächlich wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit anfänglich der U6 snRNA-Promotor zur konstitutiven Expression von shRNA unter transienten Bedingungen getestet. Der Vergleich mit dem H1-Promotor in bezug auf Auslösung der RNAi-Antwort fiel für den U6 snRNA-Promotor negativ aus. So konnte bei Verwendung des U6 snRNA-Promotors zur konstitutiven Expression von shRNA/EGFP im Vergleich zum

H1-Promotor ein schwächerer Effekt bei der Gen-Unterdrückung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der H1-Promotor mußte nun auf die Art und Weise kloniert werden, daß shRNA-kodierende Oligonukleotide unmittelbar an die Position des Transkriptionsstarts angefügt werden konnten. Dies ließ sich nur über den Einbau einer Restriktionsschnittstelle innerhalb des 3'-Endes des Promotors realisieren, wodurch der definierte Transkriptionsstart, welcher ursprünglich in 25 bp Entfernung der TATA-Box liegt, gewahrt wurde. Des Weiteren konnte die Länge des zu exprimierenden Einzelstrangs, welcher zu shRNA mit einer intramolekularen Schleife hybridisiert, auf 49 nt festgelegt werden. Zuvor wurde in Mutationsstudien festgestellt, daß sich Veränderungen kurz vor Beginn des Transkriptionsstarts nicht negativ auf die Expressionsaktivität des H1-Promotors auswirkten (Myslinski et al., 2001). Wie auch in einigen anderen Studien berichtet wurde, beeinflusste die Integration von Restriktionsschnittstellen kurz vor Transkriptionsstart die Expressionsaktivität des H1-Promotors nicht negativ (Hasuwa et al., 2002; Kunath et al., 2003; Tiscornia et al., 2003; Hasuwa und Okabe, 2004). Somit war davon auszugehen, daß die Wirkungsweise des parentalen H1-Promotors durch Insertion von nur einer Restriktionsschnittstelle konstant blieb.

4.2.3 Verschiedene Parameter beeinflussen die Wirksamkeit von shRNA

Die wirkungsvolle Degradierung der Transkripte von EGFP und Plk1 konnte durch Expression von 49 nt langen RNA-Einzelsträngen ausgelöst werden. Nach einer gängigen Modellvorstellung hybridisieren diese RNA-Einzelstränge durch Ausbildung einer intramolekularen Schleife zu shRNAs und werden folgend durch das Enzym Dicer zu wirkungsvollen siRNAs prozessiert. Da die willkürliche Veränderung dreier Basen des shRNA-Doppelstranges (6 bp der exprimierten Einzelstrang-RNA) keinerlei Effekte gegenüber unbehandelten Zellen bewirkte, mußte die RNAi-vermittelte Degradierung von EGFP und Plk1 auf die Sequenz-spezifische Struktur der wirksamen shRNAs zurückzuführen sein. Vor Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, daß die Applikation von 21 nt langen Nukleotiden Sequenz-spezifische Degradierung von Transkripten in Säugerzellen auslösen kann (Elbashir et al., 2001a). Im Laufe nachfolgender Studien, welche eine Anwendung mit potenter Transkript-Degradierung zum Ziel hatten, wurde deutlich, daß nicht nur siRNAs, sondern auch durch Plasmid-Vektoren exprimierte shRNAs einige Eigenschaften erfüllen mußten, um eine potente RNAi-Antwort auszulösen (Paddison et al., 2002; Paul et al., 2002). Die Länge des *sense*-Strangs der Vektor-generierten shRNA, wurde analog der Länge wirksamer siRNAs auf 21 nt festgelegt. Dies kam durch einen 19 nt langen Sequenzbereich

zustande, welcher in der später hybridisierten und prozessierten siRNA Basenpaarungen einging, und zusätzlich durch einen 2 nt langen 3'-Überhang, bestehend aus zwei Uridinen. Die intramolekulare Schleife, welche *sense*-Strang und *antisense*-Strang innerhalb der shRNA verbinden sollte und den erwähnten, aus zwei Uridinen bestehenden Überhang am 3'-Ende des *sense*-Stranges der prozessierten siRNA gewährleisten sollte, wurde auf eine Länge von 9 nt festgelegt. Dies wurde bereits zuvor als optimale Voraussetzung für eine gute Wirksamkeit von shRNA beschrieben (Brummelkamp et al., 2002a). Da der *antisense*-Strang auf eine Länge von 21 nt festgelegt werden sollte, mußte er außer den 19 Nukleotiden, welche dem *sense*-Strang revers komplementär waren, noch zwei Uridine umfassen, die den 3'-Überhang bildeten. Die *mismatch*-Sequenzen wurden von den Wirksequenzen abgeleitet, indem drei Basenpaare pro Einzelstrang willkürlich ausgetauscht wurden. Bereits zuvor konnte gezeigt werden, daß der Austausch von nur einem Basenpaar die spezifische RNAi-Antwort verhindern kann (Brummelkamp et al., 2002b). Der Verlust der Spezifität von siRNA ist dabei um so größer, je zentraler eine der Zielsequenz nicht komplementäre Base (*mismatch*) innerhalb des *antisense*-Strangs der siRNA vorliegt (Elbashir et al., 2001b; Jackson et al., 2003). Die hier präsentierten Daten bestätigen somit die hohe Spezifität des RNAi-Mechanismus. So ist es wahrscheinlich, daß prozessierte *mismatch*-siRNAs auf die gleiche Weise wie spezifische siRNAs in den RISC-Komplex inkorporiert werden, schließlich aber aufgrund der nicht 100%igen Komplementarität zu mRNAs keine Wirkung erzielen und schließlich auf noch unbekannte Weise degradiert werden. siRNAs, deren Sequenz der Zielsequenz von mRNAs zu 100% komplementär ist, lösen dagegen den RNAi-Mechanismus aus, sichtbar in Degradierung kognitiver mRNA-Sequenzen. Unterstützt wird die These der hohen Spezifität von RNAi durch die große Übereinstimmung der in dieser Arbeit verwendeten siRNA-Sequenzen mit den allgemein beobachteten Eigenschaften von hoch wirksamen siRNA-Sequenzen (Elbashir et al., 2001b; Naito et al., 2004; Wang und Mu, 2004). Der G/C-Gehalt der verwendeten siRNA-Sequenzen gegen EGFP (47,6%) und Plk1 (52,4%) befand sich in beiden Fällen nahe 50%. Diese Eigenschaft wurde für eine gute Wirksamkeit von siRNAs zunächst gefordert (Tuschl et al., 1999; Elbashir et al., 2001b). Aufgrund neuer Algorithmen bei der Suche nach geeigneten Zielsequenzen hätten beide siRNAs jedoch weitere wichtige Eigenschaften erfüllen müssen, um eine potentere Wirkung zu erzielen (Reynolds et al., 2004). Die als günstig beschriebene Eigenschaft, daß siRNA-Doppelstränge im 5'-Bereich ihres *antisense*-Strangs eine geringere Thermostabilität aufweisen sollten, als im 3'-Bereich, wurde durch die siRNA-Sequenz gegen EGFP erfüllt. Die verwendete siRNA-Sequenz gegen Plk1 zeigte dagegen eine relativ ausgeglichene

Thermostabilität. Aufgrund der begrenzten Länge der kognitiven mRNAs von EGFP und Plk1 war die Auswahl geeigneter Zielsequenzen jedoch limitiert.

Ein weiterer Grund, welcher eine potentere Hemmung der Expression verhinderte, bestand wohl darin, daß nicht alle Zellen, welche in das Ergebnis mit einfließen, transfiziert wurden, da erfahrungsgemäß nach 72 h nicht von einer vollständigen Selektion auszugehen war. Erschwerend kam im Fall der Regulation von Plk1 hinzu, daß Zellen, welche aufgrund von Plk1-Degradierung möglicherweise in die Apoptose übergingen (Liu et al., 2003) und nachfolgend im Kulturmedium schwammen, nicht in das Ergebnis einfließen. Die transiente Wirkungsweise von Vektor-vermittelter RNAi kann somit nur einen der Realität angenäherten Zustand in einem bestimmten zeitlichen Abschnitt beschreiben. Die stabile Integration einer RNAi-Kassette zur konstitutiven Expression von shRNA, welche eine potentere Degradierung von Plk1 hätte bewirken können, scheiterte, weil vereinzelt Zellen mit dem beschriebenen System nicht proliferierten. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß ein Plk1-negativer Phänotyp Apoptose auslöst (Spankuch-Schmitt et al., 2002a) und somit nicht überlebensfähig wäre. Die Entwicklung und Etablierung der induzierbaren RNAi-Systeme schuf in diesem Falle Abhilfe. Bevor es jedoch zu einer stabilen Integration kam, wurden die verschiedenen Promotor-Varianten unter transienten Bedingungen getestet und charakterisiert.

4.2.4 Bewertungen der induzierbaren RNAi-Systeme im transienten

Zustand

Zu Beginn dieser Arbeit war eine durch induzierbare Promotoren vermittelte konditionelle Expression von shRNA noch nicht gezeigt worden. Durch Verwendung von Tetrazyklin-Operatorsequenzen aus Transposon 10 von *E. coli*, konnten drei induzierbare Derivate des humanen H1-Promotors entwickelt werden, welche die Expression von shRNA gegen Plk1 steuerten. So konnte nicht nur der intrazelluläre Plk1-Gehalt, sondern auch die Proliferation von Tumorzellen negativ beeinflusst werden. Jedes der drei induzierbaren Promotor-Derivate hatte dabei spezielle Eigenschaften in bezug auf Basalaktivität im nicht-induzierten Zustand und die Expressionsrate im induzierten Zustand. Diese Eigenschaften konnten nachfolgend charakterisiert werden.

Bisherige Entwicklungen von Tet-induzierbaren RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren für die konditionelle Genexpression

Um RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren induzierbar zu machen und dadurch ihre Expressionsraten kontrollieren zu können, wurden schon in der Vergangenheit verschiedene

Repressor-Operator-Systeme benutzt. So wurde das prokaryotische TetO-TetR-System bereits in einer frühen Studie verwendet, um die Expressionsaktivität eines tRNA-exprimierenden RNA-Polymerase III-Promotors in *Saccharomyces cerevisiae* zu induzieren (Dingermann et al., 1992a; Dingermann et al., 1992b). In einer alternativen Studie wurde gezeigt, daß ein Lac (Lactose)-Repressor-Operator-System für die Expressionskontrolle eines U6 snRNA-Promotors verwendet werden kann (Luukkonen und Seraphin, 1998). In jüngerer Vergangenheit setzte sich jedoch das bakterielle TetO-TetR-System für die Kontrolle speziell von RNA-Polymerase III-Promotoren durch. Eine Studie, welche die ersten induzierbaren RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren für Expressionsstudien in Säugerzellen anwendete, wurde im Jahr 2000 veröffentlicht (Ohkawa et al., 2000).

Derivate des U6 snRNA-Promotors als erste Tet-induzierbare Varianten eines Pol III-abhängigen Promotors zur konditionellen Expression von *antisense*-RNA

Es handelte sich dabei um Tetrazyklin-induzierbare Derivate des U6 snRNA-Promotors, welcher für die konditionelle Expression von *antisense*-RNA-Oligonukleotiden gegen ein GFP-EGFR-Hybridprotein eingesetzt wurde. Unterschiede der drei Promotor-Derivate bestanden in der Lokalisation ihrer TetO-Sequenz(en). Der erste induzierbare Promotor-Typ hatte eine integrierte TetO-Sequenz, welche in 5'-Richtung der TATA-Box lokalisiert war. Im zweiten induzierbaren Promotortyp befand sich die TetO-Sequenz in 3'-Richtung der TATA-Box und substituierte die Wildtyp-Sequenz zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart. Das dritte induzierbare Konstrukt beheimatete schließlich zwei TetO-Sequenzen, jeweils eine in 5'- und eine in 3'-Richtung der TATA-Box. Der Promotortyp mit 5'-gelegener TetO-Sequenz zeigte eine extrem geringe Basalaktivität, nach Induktion aber trotzdem die größte Expressionsrate der induzierbaren Derivate. Der Promotortyp mit 3'-gelegener TetO-Sequenz hatte im nicht-induzierten Zustand eine gering höhere Basalaktivität als der Promotor mit 5'-gelegener TetO-Sequenz, im induzierten Zustand jedoch eine geringere Expressionsrate. So war die Bandbreite des Induktionsbereiches für den Promotor mit 5'-gelegener TetO-Sequenz etwas größer als jene des Promotors mit 3'-gelegener TetO-Sequenz. Der induzierbare Promotortyp mit zwei TetO-Sequenzen, welche die TATA-Box flankierten, zeigte im Gegensatz zu den beiden anderen Typen keine Basalaktivität. Er war aber auch nicht induzierbar, was durch eine nicht vorhandene Expression nach Zugabe von Doxozyklin sichtbar wurde. Die Ergebnisse dieser Charakteristik ließen den Schluß zu, daß die relative Lage der TetO-Sequenz innerhalb des U6 snRNA-Promotors einen kritischen Einfluß auf die Basalaktivität und Induzierbarkeit des Promotors hat. Zwei TetO-Sequenzen dagegen verhinderten eine Induzierbarkeit durch eine stringente Blockade des Promotors.

Entwickelte Tet-induzierbare Derivate des H1-Promotors im Vergleich zu Tet-induzierbaren Derivaten des U6 snRNA-Promotors

Vergleicht man die charakteristischen Eigenschaften der Derivate des U6 snRNA-Promotors mit den Eigenschaften der induzierbaren H1-Promotor-Derivate, welche dieser Arbeit zugrunde liegen, so lassen sich einige Gemeinsamkeiten feststellen. Der H1-Promotor des US-Typs aus dieser Arbeit, dessen TetO-Lokalisation jener des U6 snRNA-Promotors vom 5'-Typ (Ohkawa et al., 2000) entsprach, zeigte eine sehr geringe Basalaktivität. Im Gegensatz dazu zeigte der H1-Promotor vom DS-Typ analog dem Promotor des U6 snRNA-3'-Typ (Ohkawa et al., 2000) eine höhere Basalaktivität (*leakiness*), welche durch den niedrigeren Plk1-Gehalt betreffender Zellen im nicht-induzierten Zustand deutlich wurde. Die unterschiedlichen Basalaktivitäten können durch den Befund erklärt werden, daß Mutationen im Wildtyp-H1-Promotor, welche den stromaufwärts (5') der TATA-Box gelegenen Bereich betreffen, in einer deutlich geringeren Promotoraktivität resultierten. Hingegen hatten Sequenzveränderungen stromabwärts (3') der TATA-Box keinen negativen Einfluß auf die Expressionsaktivität (Myslinski et al., 2001). Die geringe Basalaktivität des Promotors vom US-Typ kann damit nicht nur auf die Bindung des Tet-Repressors an seine kognitive Sequenz zurückgeführt werden, sondern auch auf eine im geöffneten, induzierten Zustand geringere Expressionsaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Promotor. Die Insertion der TetO-Sequenz in den 5' der TATA-Box liegenden Bereich scheint somit die Promotorfunktion *per se* zu beeinflussen, vielleicht durch Schaffung einer speziellen DNA-Konformation. Es ist des weiteren nicht davon auszugehen, daß alle Promotoren im nicht-induzierten Zustand von Tet-Repressoren besetzt sind. Die *leakiness* des prokaryotischen Tet-Systems wird daher besser durch den induzierbaren H1-Promotor des DS-Typs beschrieben, da dieser Promotor-Typ in Abwesenheit von TetR der Expressionsaktivität des Wildtyp-H1-Promotors am nächsten ist (Myslinski et al., 2001). Ein großer Unterschied zwischen den Eigenschaften der induzierbaren U6 snRNA-Promotoren und den in dieser Arbeit geschaffenen induzierbaren H1-Promotorkonstrukten besteht jedoch in der Bewertung des jeweiligen Promotortyps mit zwei die TATA-Box flankierenden TetO-Sequenzen. Während der U6 snRNA-Promotor mit TATA-Box-flankierenden TetO-Sequenzen keine Basalaktivität zeigte und auch nicht induzierbar war (Ohkawa et al., 2000), zeigte der H1-Promotor des US/DS-Typs eine Basalaktivität, welche zwischen jener der H1-Promotoren vom US-Typ und DS-Typ lag. Diese Unterschiede zwischen den Basalaktivitäten mögen darin begründet sein, daß die beiden TATA-Box-flankierenden palindromischen TetO-Regionen im U6 snRNA-Promotor eine Entfernung von sieben dazwischen liegenden Basenpaaren aufwies, in welchen die

TATA-Box lokalisiert war. Im H1-Promotor des US/DS-Typs waren die beiden TetO-Sequenzen hingegen nur um sechs Basenpaare voneinander getrennt. Dies mag eine Erklärung für die nicht mögliche Induzierbarkeit des U6 snRNA-Promotorkonstruktes sein, da hier vermutlich zwei gleichzeitig bindende Tet-Repressoren die Expressionsaktivität unterdrückten. Aufgrund des um ein Nukleotid geringeren Abstand der TetO-Sequenzen im H1-Promotor vom US/DS-Typ, mag ein sterischer Konflikt entstanden sein, welcher die gleichzeitige Bindung zweier Tet-Repressoren an die jeweiligen TetO-Sequenzen verhindert. So scheinen die molekularen Ausmaße der dimerisierten TetR-Proteine hierfür zu groß zu sein. Als Indiz dafür kann die Beobachtung angeführt werden, daß die Basalaktivität des H1-Promotors vom US/DS-Typ im nicht-induzierten Zustand zwischen jenen der beiden H1-Promotoren vom US- und DS-Typ lag. Im ersten Fall scheint der H1-Promotor des US/DS-Typs im nicht-induzierten Zustand an seiner 5'-TetO-Sequenz von einem Tet-Repressor gebunden zu werden, wodurch er die charakteristische Basalaktivität des Promotors vom US-Typ aufweist. Im zweiten Fall scheint der H1-Promotor des US/DS-Typs im nicht-induzierten Zustand an seiner 3'-TetO-Sequenz von einem Tet-Repressor gebunden zu werden, wodurch er die charakteristische Basalaktivität des Promotors vom DS-Typ erlangt. Durch diese vorhandene Konkurrenzsituation liegt die Basalaktivität des H1-Promotors vom US/DS-Typ zwischen denjenigen des US-Typs und des DS-Typs. Die Hypothese, daß eine Insertion zweier TetO-Sequenzen zur kompletten Unterdrückung der Basalaktivität des US/DS-Promotors im nicht-induzierten Zustand führt, konnte somit nicht bestätigt werden. Auf der anderen Seite ließ die Anordnung der für die Transkription funktionell wichtigen Strukturen innerhalb des Wildtyp-H1-Promotors keine weitere Möglichkeit einer alternativen Insertion von zwei TetO-Sequenzen zu, welche weiter als sechs Basenpaare voneinander entfernt lagen. So substituierte die 19 bp lange TetO-Sequenz die 19 Basenpaare der ursprünglichen Sequenz, welche im Wildtyp-H1-Promotor zwischen PSE und TATA-Box lag, komplett. Die zweite TetO-Sequenz, welche 19 Basenpaare zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart substituierte, wurde unmittelbar an die TATA-Box angrenzend inseriert. Dies war zwingend erforderlich, da im Wildtyp-H1-Promotor zwischen TATA-Box und definiertem Transkriptionsstart 25 Basenpaare liegen und davon sechs Basenpaare für eine Restriktionsschnittstelle innerhalb des 3'-Endes des Promotors dienen mußten. Diese Restriktionsschnittstelle war für die Insertion von shRNA-kodierenden Oligonukleotiden notwendig. Für die Entwicklung eines H1-Promotors mit zwei TetO-Sequenzen, welche die TATA-Box flankieren und einen größeren Abstand als 6 bp aufweisen, hätte es nur eine Möglichkeit gegeben, ohne die für die Transkription wichtigen Sequenzabschnitte zu

verändern. Diese Möglichkeit hätte in einer Verlängerung der Promotorsequenz zwischen PSE und TATA-Box bestanden, wodurch die relative Lage der für die Transkription wichtigen Elemente innerhalb des H1-Promotors verändert worden wäre. Eine solche Veränderung der relativen Lage wichtiger Elemente innerhalb des H1-Promotors hätte ein nicht kalkulierbares Risiko im Hinblick auf einen möglichen Verlust der Aktivität des Promotors bedeutet. Ein solches Risiko sollte möglichst umgangen werden.

Parallel entwickelte Tet-induzierbare Pol III-Promotoren für shRNA/siRNA-Expression

Im Zuge der Entdeckung von RNAi im Säugersystem (Elbashir et al., 2001a) und der Entwicklung konstitutiv shRNA-exprimierender Plasmide (Paddison et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002a), wurde nicht nur bei der strategischen Konzeption dieser Arbeit das Ziel verfolgt, RNAi induzierbar auszulösen. Parallel zu dieser Arbeit wurden einige Studien über induzierbare Expression von shRNA veröffentlicht. Dabei wurden fast ausschließlich induzierbare RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren, in erster Linie der U6 snRNA-Promotor und der H1-Promotor, auf Basis des prokaryotischen Tet-Systems entwickelt. Die erste publizierte Studie zur konditionellen Auslösung von RNAi bediente sich eines Tet-induzierbaren H1-Promotors zur Expression von shRNA gegen β -Catenin in kolorektalen Tumorzellen (van de Wetering et al., 2003). Es handelte sich dabei um einen induzierbaren H1-Promotor, welcher eine TetO-Sequenz zwischen TATA-Box und Transkriptionsstart aufwies. Eine hohe Basalaktivität, die diesem Promotor nach den bisherigen Erkenntnissen zugrunde liegen müßte, konnte nicht beobachtet werden, was höchstwahrscheinlich daran lag, daß betreffender Promotor im stabilen Zustand getestet wurde. So wurden auch im Rahmen dieser Promotionsarbeit im stabilen Zustand geringere Basalaktivitäten der beteiligten Promotoren festgestellt als im transienten Zustand. Dieser Zusammenhang ist Gegenstand der Diskussion in Kapitel 4.3.1.

In einer weiteren Studie, welche kurze Zeit später veröffentlicht wurde, wurde zum ersten Mal ein induzierbarer U6 snRNA-Promotor für die konditionelle Auslösung von RNAi angewendet (Matsukura et al., 2003). Es handelte sich dabei um den zuvor von Ohkawa und Kollegen für die Expression von *antisense*-Oligonukleotiden entwickelten induzierbaren U6 snRNA-Promotor, welcher eine TetO-Sequenz in 5'-Richtung der TATA-Box aufwies und im Vergleich zu anderen Derivaten die größte Induktionsspanne zeigte (Ohkawa et al., 2000). Der Promotor selbst wurde für die induzierbare Expression von shRNA gegen DNMT1 (DNA-Methyltransferase 1) in Tumorzellen verwendet. Durch Applikation von Doxyzyklin konnte eine Inhibition des Zellwachstums bewirkt werden. Zusätzlich wurde zum ersten Mal die Reversibilität der Tet-induzierbaren Gen-Unterdrückung gezeigt. 120 h nach Entfernen

von Doxyzyklin aus dem Kulturmedium wurde die Expression von DNMT1 nicht länger unterdrückt, die Expression des Proteins stieg auf das gleiche Niveau wie vor Induktion der shRNA-Expression.

Strategien zur Verringerung der Basalaktivitäten von Tet-induzierbaren Pol III-Promotoren

Um eine hohe Basalaktivität im nicht-induzierten Zustand, wie sie beispielsweise vom H1-Promotor des DS-Typs innerhalb dieser Arbeit offenbart wurde, zu umgehen, wurden indes verschiedene Strategien für die Entwicklung induzierbarer Promotoren verfolgt.

Ein Ansatz bestand in der Überlegung, mehrere TetO-Sequenzen an verschiedene Positionen innerhalb betreffender Promotoren zu inserieren. So sollte durch Bindung mehrerer Repressoren die RNA-Polymerase III-abhängige Transkription unterdrückt werden. Entsprechendes Vorhaben wurde durch Entwicklung eines induzierbaren U6 snRNA-Promotors für die konditionelle RNAi-vermittelte Unterdrückung von CXCR4 (*chemokine (C-X-C-motif) receptor 4*) umgesetzt, wodurch die Migration und Invasion von Brusttumorzellen *in vitro* inhibiert werden konnte (Chen et al., 2003). Durch Insertion von einer, zweier oder mehrerer TetO-Sequenzen, zum Teil in Tandem-Struktur, wurden verschiedene induzierbare Promotorkonstrukte geschaffen, welche in bezug auf ihre Basalaktivität und Induzierbarkeit getestet wurden. Dabei war die Insertion von neun TetO-Sequenzen notwendig, um die Basalaktivität des betreffenden Promotors im nicht-induzierten Zustand fast vollständig zu unterdrücken. Bei diesem Promotorkonstrukt wurde jeweils eine TetO-Sequenz sowohl zwischen PSE und TATA-Box als auch zwischen DSE und PSE inseriert. Die restlichen sieben TetO-Sequenzen wurden als Tandem-Struktur unmittelbar stromaufwärts des DSE eingefügt. Trotz dieser insgesamt neun vorliegenden TetO-Sequenzen und der minimierten Basalaktivität zeichnete sich dieser Promotor durch eine gute Induzierbarkeit aus. Diese gute Induzierbarkeit wurde durch den Befund deutlich, nach welchem der beschriebene induzierbare Promotor im angeschalteten Zustand die gleiche Expressionsaktivität zeigte, wie der Wildtyp-U6 snRNA-Promotor.

Die Länge des U6 snRNA-Promotors von über 300 bp und die relative Lage der charakteristischen Sequenzmotive TATA-Box, PSE und DSE bieten somit viele Möglichkeiten für alternative Insertionen von TetO-Sequenzen. Im Gegensatz dazu unterliegt der H1-Promotor im Vergleich zum U6 snRNA-Promotor deutlichen Einschränkungen in bezug auf die Entwicklung induzierbarer Promotor-Derivate. Durch die kompakte Struktur von nur 100 bp und das direkte Angrenzen von PSE und DSE war es durch die vorliegenden

Rahmenbedingungen nicht möglich, induzierbare Promotor-Derivate zu entwickeln, welche TetO-Sequenzen an alternativen Positionen innerhalb der Promotorsequenz aufweisen.

In einem weiteren Ansatz wurde dennoch eine alternative Möglichkeit zur Entwicklung eines Tet-induzierbaren H1-Promotors gefunden und umgesetzt. Diese zusätzliche Möglichkeit bestand in der Insertion einer TetO-Sequenz in eine dem Promotor benachbarte 5'-Region. Entsprechender Promotor zur induzierbaren Expression von shRNA wurde durch Infektion mittels Lentiviren in die Zielzellen integriert. (Wiznerowicz und Trono, 2003). Durch Verwendung des TetR-KRAB-Fusionsproteins (siehe Kapitel 1.5.3), welches im nicht-induzierten Zustand an die in 5'-Richtung des Promotors lokalisierte TetO-Sequenz band und bis zu einer Entfernung von 3 kb durch Bildung von Heterochromatin die Transkription inhibierte, konnte die Expression des Promotors komplett unterdrückt werden. Die Verwendung des TetR-KRAB-Fusionsproteins zur Minimierung der Basalaktivität birgt jedoch Risiken. So könnte bei ungerichteter genomischer Integration von TetO-beihaltenden Promotorkonstrukten die Expression benachbarter Gene mit essentiellen Funktionen unterdrückt werden, was nicht kalkulierbare Folgen für betreffende Zellen haben könnte.

Beurteilung der zur Induktion der H1-Promotor-Derivate verwendeten Doxyzyklin-Konzentrationen

Die Doxyzyklin-Konzentrationen, welche zur Induktion der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten H1-Promotor-Derivate verwendet wurden, liegen im gleichen Bereich wie diejenigen zahlreicher anderer Studien zur Induktion ähnlicher Tet-induzierbarer Promotoren. Während Matsukura und Kollegen für ihren induzierbaren U6 snRNA-Promotor Konzentrationen bis zu 10 µg/ml Doxyzyklin benutzten, um eine signifikante RNAi-Antwort auslösen zu können (Matsukura et al., 2003), beobachteten van de Wetering und Kollegen eine potente Induktion ihres entwickelten induzierbaren H1-Promotors bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml Doxyzyklin, dies allerdings in stabiler Situation (van de Wetering et al., 2003).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Doxyzyklin-Konzentration von 5 µg/ml, welche notwendig war, um eine potente RNAi-Antwort auszulösen, erscheint relativ hoch, läßt sich jedoch einfach erklären. Der Tet-Repressor, welcher zusammen mit den induzierbaren H1-Promotorkonstrukten im Verhältnis 3:2 ko-transfiziert wurde, befand sich unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Dieser CMV-Promotor ist für seine hohe Expressionsrate bekannt, welche um ein Vielfaches höher liegt als die Expressionsrate eines gewöhnlichen konstitutiven Promotors, der die Expression eines Haushaltsgens steuert. So war eine erhöhte Antibiotikakonzentration erforderlich, um die in hoher intrazellulärer Konzentration

vorliegenden freien TetR-Moleküle anzusprechen, damit sie von TetO-Sequenzen ferngehalten wurden und damit eine erfolgreiche Induktion der RNA-Polymerase III-abhängigen Reaktion erfolgen konnte. Das Transfektionsverhältnis von 3:2 zugunsten der Plasmid-DNA, welche TetR kodiert, wurde gewählt, um geöffnete aktive Zustände der Promotoren in Abwesenheit von Doxyzyklin zu verhindern. Es mußte hierbei bedacht werden, daß unmittelbar nach Einschleusung der Plasmid-DNA beider benötigter Komponenten eines jeden Tet-induzierbaren Systems, shRNA-Expressionskassetten sofort wirksam waren und mit der Expression beginnen konnten. Hingegen mußten die zur Besetzung der TetO-Sequenzen erforderlichen Tet-Repressoren erst exprimiert werden, was einige Stunden in Anspruch nahm. Insofern darf die durch die Versuchsergebnisse analysierte *leakiness* aller drei induzierbarer Promotorkonstrukte unter den gegebenen Umständen kritisch betrachtet werden.

Indirekter Nachweis der Promotor-Aktivität nach Induktion durch Heranziehen des Plk1-Gehalts nach RNAi-Antwort

Schließlich muß bedacht werden, daß es sich bei den in dieser Arbeit erstellten Promotor-Kinetiken um indirekte Nachweise handelt. Diese geben nicht Auskunft über die Expressionsaktivitäten der jeweiligen Promotoren in verschiedenen Zuständen, sondern liefern ein inverses Abbild, welches die Auswirkungen der exprimierten shRNA auf die Expression von Plk1 beschreibt. Um die tatsächliche Expressionsaktivität der einzelnen Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten qualitativ beschreiben zu können, müßte man in zukünftigen Studien die Menge der shRNA bestimmen, welche durch die Promotoren exprimiert wird. Einen kritischen Einfluß auf die erstellten indirekten Nachweise hat die spezifische Wirkung der exprimierten shRNA-Sequenz. So könnte durch Verwendung einer wirkungsvolleren Ziel-Sequenz gegen Plk1, sowohl Plk1-Transkript, als auch Plk1-Protein höchstwahrscheinlich bei geringeren Induktionsraten unterdrückt werden, wofür geringere Doxyzyklin-Konzentrationen ausreichend sind. Für das Finden geeigneter Zielsequenzen spielen ständig optimierte Algorithmen eine wichtige Rolle. Des weiteren wurde bislang der Zusammenhang zwischen shRNA-Expression und Transkript-Degradierung nur unzureichend beschrieben. Es ist daher nicht sichergestellt, ob es sich hierbei um eine linear proportionale Korrelation handelt.

Entwicklungen alternativer induzierbarer Systeme für konditionelle RNAi

Im Laufe der letzten Jahre wurde die Entwicklung und Anwendung induzierbarer Systeme zur konditionellen Auslösung von RNAi permanent vorangetrieben. So entstanden alleine seit der ersten Veröffentlichung eines Tetrazyklin-induzierbaren Systems im Jahr 2003 über 20

Publikationen, in welchen Tetrazyklin-induzierbare RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren zur konditionellen Expression von shRNA benutzt wurden. Einige von diesen induzierbaren Promotoren, welche eine ähnliche Struktur wie die in dieser Arbeit entwickelten H1-Promotor-Derivate besitzen, sind mittlerweile kommerziell erhältlich.

Im Gegensatz zur häufigen Anwendung des Tetrazyklin-induzierbaren RNA-Polymerase III-Systems wurden nur wenige alternative Strategien verfolgt. Dazu gehörte die Verwendung eines Steroidhormon-induzierbaren Systems. Gupta und Kollegen zeigten unter Verwendung eines Ecdyson-induzierbaren U6 snRNA-Promotors die konditionelle RNAi-vermittelte Inhibition von p53, welche in stabiler Situation reversibel war (Gupta et al., 2004). Unter Verwendung des Lac-Repressors konnte ein veränderter H1-Promotor für die Expression von shRNA gegen SHP-2, einer Tyrosinphosphatase, induziert werden (Higuchi et al., 2004). Ein weiterer alternativer Ansatz bestand in der Verwendung eines Hitzeschock-Promotors, mit welchem konditionelle RNA-Interferenz, allerdings nur in Pflanzen, gezeigt werden konnte (Masclaux et al., 2004). Einschränkungen bei der Anwendung solcher Systeme sind meistens durch ein hohes Maß an Basalaktivität beteiligter Promotoren im nicht-induzierten Zustand begründet. Des Weiteren werden die Induktionsmechanismen solcher Systeme oftmals von pleiotropen Effekten begleitet. In einer weiteren Studie konnte durch Verwendung des CRE-loxP-Systems ein muriner U6 snRNA-Promotor entwickelt werden (Tiscornia et al., 2004). Dazu wurde eine durch zwei modifizierte loxP-Regionen flankierte Sequenz zwischen PSE und Transkriptionstart des Promotors eingefügt, wodurch der Promotor zunächst inaktiv war. Durch Transfektion der CRE-Rekombinase wurde die eingefügte Sequenz so herausgeschnitten, daß eine modifizierte loxP-Region im Promotor verblieb, welche eine TATA-Box imitierte. Folgend konnte die shRNA-Expression starten. In einem parallelen Ansatz wurde ein sehr ähnlicher CRE-lox-regulierter humaner U6 snRNA-Promotor entwickelt (Ventura et al., 2004). Ein großer Nachteil von CRE-lox-regulierter RNAi liegt in ihrer Irreversibilität. Ist der umgestaltete Promotor durch die CRE-vermittelte Umstrukturierung erst aktiviert, kann die Expression von shRNA nicht nachträglich unterdrückt werden.

Insgesamt gesehen wird jedoch durch die Häufigkeit der Anwendung von RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren in Kombination mit dem ursprünglichen prokaryotischen Tet-System für die konditionelle Auslösung der RNAi-Antwort der große strategische Erfolg dieser Systeme deutlich.

4.2.5 Bewertung der transienten konditionellen Plk1-Inhibition in bezug auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen

In Abwesenheit des Induktors Doxyzyklin zeigten die drei im Rahmen dieser Arbeit entwickelten induzierbaren Promotorkonstrukte, wie bereits ausführlich beschrieben, unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer Basalaktivitäten und der Induzierbarkeiten. Verglichen mit dem H1-Promotor vom US-Typ, führte die shRNA/Plk1-Expression der H1-Promotor-Typen DS und US/DS zu erheblicher Reduktion sowohl des Transkriptes, als auch des Proteins von Plk1 im nicht-induzierten Zustand. Im Hinblick auf das Vorhaben dieser Arbeit, der funktionellen Analyse eines Gens, welches für Mitose und das Überleben von Zellen essentiell wichtig ist, bestand somit ein großer Nachteil für die Promotoren vom DS- und vom US/DS-Typ.

Induzierbarer H1-Promotor vom US-Typ hat aufgrund seiner geringen Basalaktivität die besten Voraussetzungen, die Zellproliferation in einem breiten Spektrum zu steuern

Daher wurde das größte Augenmerk auf die Analyse des H1-Promotors vom US-Typ gelegt. Die Auswertungen für dieses Konstrukt ergaben, daß transfizierte Zellen unter nicht-induzierten Bedingungen eine Plk1-Expression zeigten, die nahezu jener von Kontrollzellen entsprach, welche *mismatch*-shRNA unter Kontrolle des konstitutiven Wildtyp-H1-Promotors exprimierten. Das zweite Hauptargument für die Verwendung dieses Promotor-Typs bestand in seiner guten Induzierbarkeit trotz minimaler Basalaktivität. So konnte bei voller Induktion der Gehalt an Plk1-Transkript und -Protein auf ein geringes Niveau gesenkt werden. Dieses Niveau entsprach ungefähr jenem, welches unter Einwirkung des konstitutiv shRNA/Plk1-exprimierenden Wildtyp-H1-Promotors erreicht wurde. Für das Eingreifen in das Proliferationsverhalten von Tumorzellen hatte der H1-Promotor vom US-Typ somit die besten Voraussetzungen. Die geringe Basalaktivität des betreffenden Promotors im nicht-induzierten Zustand, welche auf Transkript- und Proteinebene beobachtet wurde, wirkte sich nicht negativ auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen aus. So zeigten nicht-induzierte Tumorzellen, welche das induzierbare System unter Kontrolle des H1-Promotors vom US-Typ trugen, die gleiche Wachstumsrate wie Kontrollzellen, welche *mismatch*-shRNA exprimierten. Um dagegen die Proliferation von Tumorzellen aufzuhalten, mußte die Inhibition der Plk1-Expression höchstwahrscheinlich so weit voranschreiten, daß ein angenommener endogener Plk1-Gehalt unterschritten wurde. Dies war nach Applikation von 5 µg/ml Doxyzyklin der Fall. Die Zahl induzierter Zellen befand sich ab dem Zeitpunkt der Induktion geringfügig über der Zahl von Zellen mit konstitutiver shRNA/Plk1-Expression.

Die Zellproliferation nahm im Vergleich zu Kontrollzellen, welche mit Plasmiden zur konstitutiven Expression von shRNA/Plk1MM transfiziert wurden, 120 h nach Induktion um ca. zwei Drittel ab. Im gleichen Sinne, wie es eine obere Grenze des intrazellulären Plk1-Gehalts zu geben scheint, welche zum Auftreten von phänotypischen Effekten unterschritten werden muß, scheint es auch eine untere Grenze der Plk1-Konzentration zu geben, welche nach Unterschreiten weitreichende Konsequenzen für die Zelle hat. Hierbei ist die Auslösung der Apoptose gemeint.

Keine Beobachtung der signifikanten Auslösung von Apoptose infolge der durch Promotor-Induktion hervorgerufenen Inhibition der Plk1-Expression

Es wurde bereits gezeigt, daß die Inhibition der Plk1-Expression auf sehr niedrige intrazelluläre Konzentrationen bzw. die komplette Unterdrückung der Plk1-Expression die Apoptose beteiligter Zellen auslöst (Spankuch-Schmitt et al., 2002a; Liu et al., 2003). Dieses Phänomen trat im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht signifikant auf, da ein vermutlich existierender Schwellenwert anscheinend nicht unterschritten wurde. Ein solcher hypothetischer Schwellenwert könnte über einen äußerst niedrigen endogenen Plk1-Gehalt der Zellen, welcher nahe null liegen dürfte, definiert sein. Außerdem könnte eine sehr kurze Zeitspanne, in welcher der intrazelluläre Plk1-Gehalt unter einen vermuteten Schwellenwert sinken muß, für die Auslösung der Apoptose verantwortlich sein. Im Gegensatz zur Applikation chemisch synthetisierter siRNA gegen Plk1, welche nach Betreten der Zelle sofort wirksam ist und Apoptose der Zellen auslösen konnte (Spankuch-Schmitt et al., 2002a), benötigt die Expression von shRNA nach Induktion des Promotors durch Doxzyklin einige Zeit. Zusätzlich muß bedacht werden, daß exprimierte shRNA durch das Enzym Dicer zu wirksamer siRNA prozessiert werden muß, was ebenfalls Zeit in Anspruch nimmt. Durch all diese zeitlichen Verzögerungen bei Auslösung des RNAi-Effektes könnten sich betreffende Zellen an einen langsam sinkenden endogenen Plk1-Gehalt adaptieren und so den Eintritt in die Apoptose umgehen.

Die klare Erkenntnis, daß mit Hilfe des entwickelten induzierbaren Systems eine konditionelle Auslösung der RNAi-Antwort hervorgerufen werden konnte und somit im Falle der Unterdrückung von Plk1 der Eingriff in das Proliferationsverhalten von Tumorzellen möglich war, ließen die Überlegungen reifen, betreffende Systeme stabil in das Genom von Tumorzellen zu integrieren. Durch Etablierung von Zellklonen sollte unter Umgehung transientser Bedingungen, welche unterschiedliche Voraussetzungen für beteiligte Zellen zur Folge hatten, die Wirkungsweise der Systeme präziser ermittelt werden. Vorliegende stabile Klone sollten den Vorteil besitzen, genetisch gleiche Voraussetzungen zu tragen, was für die

Charakterisierung und Bewertung der entwickelten Systeme einen großen Vorteil bieten sollte.

4.3 Stabile induzierbare RNA-Interferenz durch Etablierung von Zellklonen

4.3.1 Bewertungen der induzierbaren RNAi-Systeme im stabilen Zustand

Durch Integration der im transienten Zustand ausführlich charakterisierten induzierbaren RNA-Polymerase III-abhängigen Systeme zur konditionellen Expression von shRNA gegen Plk1 konnten die individuellen Eigenschaften der einzelnen Konstrukte im stabilen Zustand genauer bestimmt werden als in der transienten Situation. Für das Vorhaben, stabile Klone zu schaffen, wurden TetR-exprimierende Tumorzellen mit den drei aus den transienten Versuchen bekannten induzierbaren Expressionssystemen transfiziert und danach durch Vereinzelung Klone isoliert, welche stabile, integrale RNAi-Kassetten trugen.

Präzise Bestimmung der individuellen Eigenschaften der induzierbaren Derivate des H1-Promotors unter Umgehung von transienten Nebeneffekten

In der stabilen Situation konnten Begleiteffekte, wie sie transienten Transfektionen zugrunde liegen, umgangen werden. Dazu gehörte das Vorhandensein nicht-transfizierter Zellen und eine ungleiche Verteilung transfizierter Plasmid-Vektoren. Aufgrund der klonalen Selektion haben beteiligte Zellen dieselben genetischen Voraussetzungen. Ein weiterer Vorteil der stabilen Integration beider System-immanenter Komponenten – zum einen die genetische Information für konstitutive Expression von TetR, zum anderen die DNA eines Promotors zur induzierbaren Expression von shRNA gegen Plk1 – bestand darin, daß der konstitutiv exprimierte Tet-Repressor permanent in einer hohen intrazellulären Konzentration vorlag. Im Gegensatz zur transienten Situation, bei der genügend TetR-Moleküle exprimiert werden mußten, bevor die zunächst im geöffneten Zustand vorliegenden induzierbaren Promotor-Systeme durch Bindung der TetO-Sequenz(en) geschlossen werden konnten, hatten die induzierbaren Derivate des H1-Promotors in der stabilen Situation keinen Vorlauf.

Die Verschiedenheit der drei verwendeten Promotortypen in bezug auf die Lokalisation ihrer TetO-Sequenz(en) machte sich ähnlich wie im transienten Zustand auch in der stabilen Situation bemerkbar. Als integrale Elemente des Genoms zeigten die Promotoren des US- und des US/DS-Typs im nicht-induzierten Zustand eine minimale bis nicht vorhandene Basalaktivität, messbar in der Quantität der Transkripte (93-104%) und Proteine (92-95%) von Plk1, welche mit Kontrollzellen (100%) verglichen wurden. Der induzierbare

H1-Promotor vom DS-Typ zeigte dagegen im nicht-induzierten Zustand eine ungleich höhere Basalaktivität, was durch niedrigere intrazelluläre Konzentrationen der Transkripte (65%) und der Proteine (81%) von Plk1 reflektiert wurde. Die Applikation von Doxyzyklin führte zu einer sehr wirkungsvollen Reduzierung der Plk1-Transkripte (3-9%) und des Plk1-Proteins (14-15%), unabhängig vom benutzten Promotor-Derivat. Die in der transienten Situation gemachten Beobachtungen wurden somit im Trend bestätigt. Mutationen in 5'-Richtung der TATA-Box schwächten die Expressionsaktivität des Wildtyp-H1-Promotors deutlich ab, hingegen beeinflusste eine Veränderung in der stromabwärts der TATA-Box liegenden 3'-Sequenz den Wildtyp-H1-Promotor kaum (Myslinski et al., 2001).

Geringere Basalaktivitäten der induzierbaren Derivate des H1-Promotors im stabilen Zustand gegenüber der transienten Situation

Ein großer Unterschied gegenüber den in den transienten Experimenten gemachten Beobachtungen bestand dennoch. In der stabilen Situation trat die Basalaktivität aller induzierbarer Promotor-Derivate wesentlich schwächer zutage als in der transienten Situation. Dieser Unterschied könnte mit der erhöhten Kopienzahl von Plasmiden in der transienten Situation zusammenhängen. Verglichen mit dieser großen Anzahl von Plasmiden wurden für die stabilen Klone nur eine (DS-Typ und US/DS-Typ) oder zwei Kopien (US-Typ) der jeweiligen RNAi-Kassette pro Genom gefunden. Einzelne RNAi-Kassetten waren trotzdem in der Lage, durch Induktion mittels 10 µg/ml Doxyzyklin die Konzentration von Plk1-Transkripten auf 3-9% zu reprimieren. Es scheint so, als ob eine Vielzahl von Kopien gegenüber der Anwesenheit einer oder zweier Kopien den Effekt der Transkript-Degradierung unter induzierten Bedingungen nicht verstärken kann, dagegen aber eine unerwünschte *leakiness* im nicht-induzierten Zustand hervorruft.

Vergleich der Reduzierung von Plk1-Transkript gegenüber dem Reduzierungseffekt des Plk1-Proteins nach Induktion der Promotoren: hypothetische Wirkung von shRNA als miRNA

Die in stabiler Situation beobachteten Effekte verdeutlichen eine Gemeinsamkeit der Ergebnisse bei Verwendung aller drei Promotor-Typen. Diese bestand in einem Zusammenhang, wonach die unterdrückte Genexpression in Induktionsbereichen von 1-5 µg/ml Doxyzyklin stärkere Reduzierungen auf Ebene des Plk1-Proteins zur Folge hatte als auf der Ebene des zugehörigen Transkriptes. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie, wonach die Plasmid-Vektor-vermittelte konstitutive Expression von shRNA eine wirkungsvollere Unterdrückung

auf Plk1-Proteinebene bewirkte als auf Transkriptebene (Spankuch et al., 2004). Dagegen verhielten sich Plk1-Transkript und -Protein nach Applikation synthetischer siRNAs proportional zueinander (Spankuch-Schmitt et al., 2002a), obwohl die applizierte siRNA gegen dieselbe Zielsequenz innerhalb des Plk1-Transkripts gerichtet war wie die durch Plasmid-Vektoren exprimierte shRNA (Spankuch et al., 2004). Aus diesem Zusammenhang konnte die Vermutung abgeleitet werden, daß exprimierte shRNAs durch das Enzym Dicer nicht vollständig zu siRNAs prozessiert wurden, welche wiederum in der Lage waren, die Degradierung der Plk1-Transkripte einzuleiten. So fungierten einige unprozessierte shRNAs vermutlich als miRNAs (*micro RNAs*), wodurch eine Hemmung der Translation gegenüber einer Transkript-Degradierung bevorzugt wurde.

miRNAs sind im Gegensatz zu siRNAs kleine einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-23 nt, die durch Prozessierung aus Vorläufer-Molekülen, welche endogen kodiert sind, hergestellt werden (He und Hannon, 2004). Diese Vorläufermoleküle sind in 3'-gelegenen Introns von RNA-Polymerase II-abhängigen Genen kodiert und weisen nicht selten nach Transkription eine Länge von mehreren hundert Basenpaaren auf. In der Regel bilden sie durch partielle Basenpaarungen mehrere Schleifenstrukturen in unregelmäßigen Abständen aus. Aus diesen ausschließlich im Zellkern auftretenden Vorläufer-Molekülen werden nun vom RNase III-Enzym Drosha kurze prä-miRNA-Sequenzen prozessiert. Nach ihrem Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma über Exportin-5 werden prä-miRNAs nicht zu Proteinen umgeschrieben, sondern durch das aus dem RNAi-Signalweg bekannte RNase III-Protein Dicer zu funktioneller miRNA prozessiert. Nach allgemeinen Erkenntnissen stellen miRNAs einen der jeweiligen Zelle eigenen Mechanismus der Genregulation dar. So sind sie auf vielfältige Weise in die Regulation endogener Gene eingebunden. Dies hängt damit zusammen, daß miRNAs nicht nur die Degradierung kognitiver mRNAs durch Aktivierung des RISC-Komplexes auslösen können, sondern vielmehr einen Translationsarrest der kognitiven mRNAs bewirken. Dies wurde zuerst aufgrund der Beobachtung vermutet, wonach die miRNA von lin-4 die Expression des zugehörigen lin-14-Proteins in *C. elegans* inhibierte, während die Konzentration des lin-14-Transkriptes konstant blieb (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Diese Vermutungen wurden im folgenden durch Beobachtungen in Säugerzellen verstärkt, wonach trotz konstanter Transkript-Konzentrationen Reduzierungen der zugehörigen Proteine festgestellt wurden (Poy et al., 2004; Cimmino et al., 2005). Des weiteren wurde durch Verwendung von mRNA-Reporter-Systemen die Translationshemmung in Säugerzellen veranschaulicht, welche sowohl durch endogene als auch durch exogen eingebrachte miRNA hervorgerufen

wurde (Doench et al., 2003; Saxena et al., 2003). miRNAs können somit verschiedene Signalwege auslösen. Der durch RISC-vermittelte RNAi-Signalweg auf der einen Seite und die Hemmung der Translation auf der anderen Seite befinden sich somit in einer Konkurrenz-Situation. Maßgeblich für die Einleitung eines dieser beiden alternativen Signalwege sind die strukturellen Eigenschaften der miRNAs. Weisen sie eine Länge von 21 nt auf und sind der kognitiven mRNA zu 100% komplementär, üben sie die Funktion von siRNA aus, indem sie den RNAi-Signalweg einleiten. Sind sie der kognitiven mRNA durch inhomologe Sequenzbereiche nicht zu 100% komplementär und weisen nicht die für siRNA typische Struktur auf, so kommt es zu einer Hemmung der Translation.

Interessanterweise wurde nach Induktion der stabil integrierten RNAi-Kassetten durch die Zugabe von 10 µg/ml Doxyzyklin eine sehr potente Degradierung der Plk1-Transkripte beobachtet (3–9%), die noch wirkungsvoller erschien als die Protein-Degradierung (14–15%). Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß höhere shRNA-Konzentrationen vermutlich für die vermehrte Prozessierung zu siRNAs verantwortlich sind. Ein anderer Grund könnte eine nicht linear proportionale Aktivität des RNase III-Enzyms Dicer sein. So könnte eine geringe intrazelluläre shRNA-Konzentration eine schwache Aktivität von Dicer bewirken. Nimmt die intrazelluläre Konzentration von shRNA infolge gesteigerter Expression zu, so könnte es zu einer exponentiellen Steigerung der Aktivität von Dicer kommen, woraus eine vermehrte Prozessierung zu wirksamen siRNAs resultiert.

4.3.2 Bewertung der stabilen konditionellen Plk1-Inhibition in bezug auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen

Die Möglichkeit, durch Induktion der integralen RNAi-Kassetten eine Degradierung des Plk1-Proteins auszulösen, konnte zur Inhibition der Proliferation betreffender Zellen ausgenutzt werden. So wurde, ähnlich wie in der transienten Situation, nach Zugabe von Doxyzyklin eine signifikante Abnahme der Zellteilungsrate beobachtet. In transientser Situation wurde für die Steuerung der Proliferation ausschließlich der Promotor des US-Typs verwendet, da die beiden alternativen Promotoren im nicht-induzierten Zustand jeweils eine sehr große Basalaktivität zeigten, welche zu einer immensen Reduzierung des Plk1-Proteins führte. Da die hohen Basalaktivitäten der Promotoren vom US/DS- und DS-Typ in stabiler Situation ungleich schwächer waren, bzw. gar nicht zutage traten, konnte für den nicht-induzierten Zustand der entsprechenden Klone ein gegenüber Kontrollzellen wenig verändertes Proliferationsverhalten erwartet werden. Tatsächlich zeigten US- und US/DS-Klon analog ihrer Plk1-Expression (92-95%) kein signifikant verlangsamtes Teilungsverhalten gegenüber

Kontrollzellen (100% Plk1-Protein). Dagegen wies der DS-Klon gegenüber Kontrollzellen eine etwas verlangsamte Teilungsrate auf, was ebenso durch seinen reduzierten Plk1-Gehalt (81% Plk1-Protein) unter nicht-induzierten Bedingungen erklärt werden konnte. Insgesamt gesehen, konnte das Teilungswachstum aller drei spezifischer Klone durch Zugabe von Doxyzyklin deutlich verringert werden. Die Induktion der Expression von *mismatch*-shRNA unter Kontrolle derselben Promotoren hatte dagegen keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten betreffender Zellen. Durch diesen Befund wurde einmal mehr die Spezifität von RNAi verdeutlicht. Eine Auslösung der Apoptose infolge der inhibierten Plk1-Expression, wie es unter transienten Bedingungen der Fall war, wurde in stabiler Situation ebenfalls nicht beobachtet. An dieser Stelle kann erneut die Hypothese angeführt werden, daß beteiligte Zellen durch die langsame Reduzierung des Plk1-Proteins sich adaptierten und so den Apoptose-Signalweg umgingen (siehe Kap. 4.2.5).

Die stabilen Zellklone, welche durch genomische Integration der induzierbaren RNAi-Kassetten etabliert wurden, wurden im Rahmen einer Interaktionsstudie von Plk1 und Pin1 bereits erfolgreich eingesetzt (Eckerdt et al., 2005a). Pin1, eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase, welche durch Affektion mitotischer Zielproteine in die Regulation des Zellzyklus eingebunden ist, konnte so als Zielprotein von Plk1 ermittelt werden. Reduzierte Phosphorylierung von Pin1 aufgrund der induzierten Inhibition der Plk1-Expression führte zu vermehrter Ubiquitinierung von Pin1, gefolgt von dessen Abbau.

4.3.3 Bewertung eines der induzierbaren Systeme *in vivo* durch

Etablierung eines Xenograft-Modells

Zusätzlich zur funktionellen Charakterisierung der stabilen genomischen RNAi-Kassetten, durch welche die Möglichkeit gegeben wurde, die Plk1-Expression zu kontrollieren, bestand die Frage, ob dieser Ansatz für eine effiziente Unterdrückung der Genexpression *in vivo* geeignet sei. Dazu wurde ein Xenograft-Modell entwickelt, im Rahmen dessen immunsupprimierte Nacktmäuse mit Tumorzellen, welche stabil integrierte induzierbare RNAi-Kassetten trugen, inokuliert wurden. Bislang wurden nur wenige solcher konditionellen RNAi-Systeme *in vivo* angewendet. In einer ersten Studie konnte die PI 3-Kinase, welche wichtige Funktionen im zellulären Energiestoffwechsel übernimmt, in einem orthotopen Mausmodell konditionell inhibiert werden (Czauderna et al., 2003). Dazu wurden stabil TetR-exprimierende Tumorzellen der Prostata mit RNAi-Kassetten unter Kontrolle von induzierbaren 7SK- und U6 snRNA-Promotoren stabil transfiziert und in die Prostata von Nacktmäusen injiziert. Obwohl nach Induktion der Systeme durch Doxyzyklin, welches die

Mäuse über das Trinkwasser aufnehmen, keine Inhibierung des Tumorwachstums erreicht werden konnte, wurde eine reduzierte Invasivität der Tumoren festgestellt, welche zu geringerer Metastasenbildung führte. In einer weiteren *in vivo*-Studie konnte durch Induktion die Expression von KILLER/DR5, einem potentiellen Tumorsuppressorgen, unterdrückt werden. KILLER/DR5 wird als „Todes-Rezeptor“ bezeichnet, dessen Expression infolge DNA-Schädigungen durch den p53-regulierten Signalweg induziert wird. Er wird durch Bindung des Liganden TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) besetzt, welcher einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Krebstherapie darstellt. Bislang ist seine Rolle bei der Inhibition des Tumorwachstums und der Chemosensitivität jedoch weitestgehend unbekannt. Induzierbare durch Doxyzyklin ausgelöste Inhibition der Expression von KILLER/DR5 führte zu verstärktem Wachstum von biolumineszierenden Xenograft-Tumoren und verlieh diesen Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (Wang und El Deiry, 2004). Im Gegensatz zu dieser Studie, in welcher Tumorwachstum durch Induktion ausgelöst wurde, konnte in neueren Studien durch Verwendung Tet-induzierbarer RNAi-Systeme das Wachstum von Xenograft-Tumoren erfolgreich inhibiert werden. Als Zielgene dienten dabei Onkogene, wie HIF-1 α (*hypoxia inducible factor-1 α*), B-Raf, oder der Met-Rezeptor (Li et al., 2005; Taulli et al., 2006; Hoeflich et al., 2006). Durch all diese Befunde wurde verdeutlicht, daß induzierbare RNAi-Systeme ein nützliches Werkzeug für das Studium und die Bewertung potentieller Zielgene *in vivo* darstellen. Sowohl in der Studie von Wang und Kollegen als auch in den Arbeiten von Hoeflich et al. und Taulli et al. wurden für die Umsetzung des Vorhabens, RNAi in Tumoren zu induzieren, ausschließlich Tet-induzierbare H1-Promotoren verwendet, wodurch die sehr gute Eignung dieses Promotors für die Expression von shRNA nachhaltig bestätigt wurde. Insgesamt gesehen gibt es jedoch bislang keine Studie, in welcher Vor- und Nachteile des H1-Promotors durch einen direkten *in vivo*-Vergleich mit dem induzierbaren U6 snRNA-Promotor dargestellt wurden.

Um einen direkten Vergleich der Auswirkungen induzierbarer Expression von gegen Plk1 gerichteter shRNA und *mismatch*-shRNA unter Kontrolle des gleichen Promotortyps (US-Typ) zu gewinnen, wurde im Rahmen dieser Arbeit denselben Mäusen beide betreffenden Zellklone in die jeweils gegenüberliegenden Flanken inokuliert. So spielten individuelle Unterschiede der Tiere, wie Stoffwechselaktivität, Homöostase und Aufnahme von Nahrung und Doxyzyklin keine Rolle. Tatsächlich konnte bei Mäusen, welchen Doxyzyklin durch das Trinkwasser verabreicht wurde, eine deutliche Inhibition des Wachstums von Tumoren beobachtet werden, welche spezifische shRNA gegen Plk1

exprimierten. Dagegen wuchsen Tumoren der jeweils selben Mäuse, in welchen Expression von *mismatch*-shRNA induziert wurde, ungebremst. Ihr Wachstum glich jenem der Tumoren von Mäusen, welchen kein Doxyzyklin verabreicht wurde. Durch quantitative Analyse der Plk1-Transkripte wurde in induzierten Tumoren, welche RNAi-Kassetten für die Expression Plk1-spezifischer shRNA aufwiesen, im Gegensatz zu Kontroll-Tumoren reduzierte Transkript-Konzentrationen gefunden (71% gegenüber 100%). Dieser Effekt fiel im Vergleich zum in Zellkultur beobachteten Effekt, welcher durch Induktion von 10 µg/ml Doxyzyklin hervorgerufen wurde (3% Transkript), deutlich schwächer aus. Dies kann durch die in den Tierexperimenten nicht vorhandene Selektion von stabilen Zellen begründet werden. So konnte nicht ausgeschlossen werden, daß inokulierte Zellen während der langen Zeit der Tumorprogression von 51 Tagen teilweise ihre integralen RNAi-Elemente verloren. Um die beobachteten inhibitorischen Effekte zu verstärken, könnten in zukünftigen Experimenten Zellklone verwendet werden, welche mehrere integrale genomische Kopien der RNAi-Kassetten beheimaten, die potentiell zu einer wirkungsvolleren Unterdrückung von Plk1 führen. Ebenso könnte durch eine gezielte Integration der RNAi-Kassetten an einen Genlocus mit hoher Expressionsrate, z. B. dem *rosa26*-Lokus, der Versuch unternommen werden, größere shRNA-Expressionsraten zu erreichen, welche einen wirkungsvolleren Effekt herbeiführen. So könnten für diesen Fall eventuell geringere als die verwendeten Konzentrationen des Induktors Doxyzyklin ausreichen, um Effekte mit gleicher Potenz hervorzurufen.

4.4 Ausblicke

Plk1, welches ein Schlüsselenzym für essentielle mitotische Funktionen darstellt, ist in nahezu allen Tumorarten überexprimiert und besitzt prognostisches Potential für den Patienten. Darüber hinaus verdichten zahlreiche Hinweise die Eignung von Plk1 als therapeutisches Zielgen (Strebhardt und Ullrich, 2006). In vielen Studien wurde die Inhibition von Plk1 durch Verwendung von spezifischen Antikörpern (Lane et al., 1996), dominant-negativen Plk1-Konstrukten (Cogswell et al., 2000), *antisense*-Oligonukleotiden (Spankuch-Schmitt et al., 2002b), chemisch synthetisierten siRNAs (Spankuch-Schmitt et al., 2002a) und Plasmid-Vektor-exprimierten shRNAs (Spankuch et al., 2004) analysiert. Da diese Techniken zur Regulierung von Plk1 ausnahmslos transiente Wirkung erzielten, konnten einige Zusammenhänge, für deren Aufklärung eine präzise Regulation der Plk1-Expression Voraussetzung ist, nicht geklärt werden. So wäre es interessant, Effekte, welche durch längerfristige Unterdrückung von Plk1 bewirkt werden, zwischen Tumorzellen und primären

Zellen zu vergleichen. Des Weiteren sind die Mechanismen, welche von Plk1 ausgehend die Signaltransduktion im Hinblick auf die Auslösung der Apoptose beeinflussen, weitestgehend unbekannt. Als weiterer Punkt bleibt die Frage, auf welche Weise der verspätete Eintritt in die Mitose, welcher durch die Unterdrückung der Plk1-Expression hervorgerufen wird, mit der Auslösung von Apoptose korreliert. All diese Fragen können nur schwerlich durch Experimente im transienten Zustand beantwortet werden, in welchem die Zellen oftmals unter unerwünschten Nebeneffekten leiden, die durch Transfektionen hervorgerufen werden. Ein stabiles System, welches die Regulation der Plk1-Aktivität erlaubt, stellt somit ein nützliches Werkzeug dar, wodurch die Rolle von Plk1 während des Zellzyklus präziser charakterisiert werden kann. Durch eine Inhibition der Expression von Plk1 mit Hilfe der entwickelten Systeme könnten auch hinreichende Erfahrungen bezüglich längerfristiger zellulärer Antworten gewonnen werden. Diese könnten im Hinblick auf die Verwendung von RNAi-basierten Strategien für klinische Anwendungen von großer Relevanz sein. Zusammenfassend weisen die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse darauf hin, daß mittels induzierbarer RNAi-Systeme, welche spezifisch gegen essentielle Zielgene gerichtet sind, defiziente Phänotypen mit Funktionsverlust *in vitro* und *in vivo* hergestellt werden können. Dies wiederum ist die Bedingung für das Studium der Gene während der Tumorgenese.

Um die Auswirkungen länger andauernder Plk1-Degradierung in Zellen eines gesamten Organismus zu beobachten, wurde der Versuch unternommen, transgene Mäuse zu etablieren, welche die entwickelten Systeme genomisch beheimateten. In einem Modellsystem, mit dessen Hilfe die Funktionalität der induzierbaren RNAi-Kassetten in transgenen Tieren überprüft werden sollte, wurde versucht, die Expression von EGFP transgener Mäuse zu inhibieren. Das Projekt scheiterte jedoch beim Versuch, funktionalen TetR in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus zu exprimieren. So gelang zwar nachweislich die genomische Integration betreffender Plasmid-DNA, eine erfolgreiche Expression des Proteins konnte aber nicht erreicht werden. Diese Erkenntnis steht in Einklang mit neueren Beobachtungen, wonach eine Expression des ursprünglich aus Bakterien stammenden TetR in ES-Zellen nur unzureichend möglich war (Bujard, 2004). Der Befund, nach welchem bislang in der Literatur keine transgenen Mäuse beschrieben wurden, welche auf Basis des prokaryotischen Tet-Systems shRNA-Expression induzieren konnten, weist auf Probleme hin, welche der TetR-Expression in ES-Zellen zugrunde liegen. Dagegen konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels konstitutiver Expression von shRNA gegen EGFP eine erfolgreiche RNAi-Antwort in ES-Zellen ausgelöst werden.

Zur induzierbaren Inhibition von Genen in transgenen Mäusen kristallisierte sich das CRE/loxP-System als interessantes alternatives System heraus. So wurde zunächst in ES-Zellen der Maus ein CRE-induzierbarer U6 snRNA-Promotor für die Expression von shRNA eingesetzt (Coumoul et al., 2004). So konnte die Expression sowohl von exogenen Genen wie EGFP, als auch von endogenen Genen wie *Fgfr2* (*fibroblast growth factor receptor 2*) und Survivin unterdrückt werden. Die Expression der CRE-Rekombinase stand dabei unter Kontrolle eines Tamoxifen-induzierbaren RNA-Polymerase II-Promotors. In einer nachfolgenden Studie konnten Mäuse generiert werden, welche oben beschriebene inaktive RNAi-Kassetten trugen. Durch Kreuzung dieser Mäuse mit Mäusen, welche CRE-Rekombinase unter Kontrolle von gewebsspezifischen Promotoren exprimierten, entstanden in der Folgegeneration Mäuse, deren Extremitäten aufgrund der unterdrückten *Fgfr2*-Expression unterentwickelt waren (Coumoul et al., 2005). In einer aktuellen Studie konnte durch gewebsspezifische Expression von CRE wirkungsvolle RNAi in entsprechenden Geweben ausgelöst werden (Yu und McMahon, 2006). Eine alternative Studie befaßte sich mit dem Sonderfall einer Kombination von CRE/loxP und eukaryotischem Tet-On-System (Chang et al., 2004). So stand die shRNA-Expression unter Kontrolle eines CRE-regulierten U6 snRNA-Promotors, während die CRE-Expression durch Bindung des Transaktivators rtTA infolge der Zugabe von Doxzyklin induziert wurde. Ein großer Nachteil des CRE/loxP-Systems liegt, wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, in seiner Irreversibilität und in der nicht vorhandenen Möglichkeit, die Expression von shRNA präzise zu regulieren. Aktiviert die CRE-Rekombinase den für shRNA-Expression zuständigen Promotor, so verhält sich letztgenannter wie ein konstitutiver Promotor. Dennoch wird durch Verwendung des CRE/loxP-Systems die herausragende Rolle von induzierbaren RNAi-Systemen als Werkzeuge für das *in vivo*-Studium der Funktionalität von Genen verdeutlicht.

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten *in vivo*-Effekte einer Inhibition des Tumorwachstums als Folge der gezielten Unterdrückung der Plk1-Expression unterstützen die Anwendung von RNAi-basierten Strategien gegen Plk1 für eine potentielle Anwendung in der Krebstherapie (Nogawa et al., 2005) und stellen abermals die Bedeutung von Plk1 als Zielgen bei der Krebsbekämpfung in den Vordergrund (Dai und Cogswell, 2003; Eckerdt et al., 2005b). Im Hinblick auf die Entwicklung von Therapien für den Menschen wurden mittlerweile einige Inhibitoren von Plk1 auf Proteinebene getestet. Dabei wurde ein kleines Molekül als potenter Inhibitor gefunden, welches die Kinasefunktion von Plk1 inhibierte und neoplastisches Zellwachstum erfolgreich eindämmen konnte (Gumireddy et al., 2005). Im Gegensatz zu solchen auf Proteinebene wirkenden Inhibitoren, welche die Kinasefunktion von

Plk1 hemmen oder die Substratbindung durch Blockade von Teilbereichen der Polo-Box-Domäne verhindern, hat die gegen das Plk1-Transkript gerichtete RNAi-basierte Strategie bereits ihre hohe Spezifität bewiesen und eine potente Wirkung gezeigt. Plk1-Inhibitoren auf Proteinebene könnten dagegen möglicherweise durch Bindung an weitere Vertreter der Plk-Familie oder an strukturell verwandte Kinasen mit ähnlicher Kristallstruktur deren Wirkungsweise beeinflussen und somit unerwünschte Nebeneffekte herbeiführen. Diese Nebeneffekte würden das Erfassen und Bewerten von molekularbiologischen Zusammenhängen innerhalb der Signaltransduktion erschweren. Die induzierbaren RNAi-Systeme gegen Plk1, welche im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, stellen dagegen gute genetische Werkzeuge dar, mit deren Hilfe grundlegende mitotische Zusammenhänge wesentlich leichter studiert und verstanden werden können. Nicht zuletzt kann so die Eignung von Plk1 als Zielgen für Therapien bewertet werden.

Eine große Herausforderung bei der Etablierung von Therapien besteht in der gezielten Überbringung von Wirkstoffen. So sollten wirksame Substanzen möglichst spezifisch in Tumorzellen eingeschleust werden, ohne gesunde Zellen zu beeinflussen. Im Hinblick auf diese Thematik konnte in einer aktuellen Studie eine gerichtete tumorspezifische Aufnahme von siRNA gegen Plk1 erreicht werden (McNamara et al., 2006). Man bediente sich dazu spezieller Aptamere, welche aus reinen RNA-Strukturen bestanden. Diese chimären Vorläufer-RNAs bestanden aus jeweils einer Rezeptor-Bindedomäne und einem kurzen RNA-Doppelstrang mit Zielsequenz gegen Plk1. Die extrazelluläre Bindung an PSMA (*prostate-specific membrane antigen*)-Rezeptoren, welche in der Membran von Tumorzellen der Prostata überexprimiert wurden, bewirkte eine differentielle Internalisierung betreffender Aptamer-Konstrukte durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Durch intrazelluläre Abspaltung des RNA-Doppelstrangs und Prozessierung zu wirksamer siRNA konnte eine erfolgreiche RNAi-Antwort gegen Plk1 ausgelöst werden. Im Gegensatz dazu wurde in Zellen, welche keine PSMA-Rezeptoren exprimierten, keine Aufnahme der Aptamere festgestellt. Die Degradierung von Plk1-Transkript verursachte in jenem Ansatz eine Auslösung der Apoptose *in vitro* und eine Inhibition des Tumorwachstums eines *in vivo*-Xenograft-Modells.

Die Applikation von siRNAs gegen Plk1 in Maus-Experimenten wurde bereits getestet (Guan et al., 2005). Darüber hinaus liefern die im Rahmen dieser Promotionsarbeit gewonnenen Ergebnisse wesentliche zusätzliche Einblicke in die Wirkungsweise von RNAi-basierten integralen genomischen Elementen für die Induktion der Expression von shRNA gegen Plk1. Damit wurde eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von RNAi-basierten transgenen Mausmodellen geschaffen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

RNA-Interferenz (RNAi) erlangte eine herausragende Bedeutung zum Studium der Genfunktion, nachdem auch in Säugersystemen gezeigt wurde, daß durch Applikation von 21 nt langen siRNAs (*small interfering RNAs*) eine Sequenz-spezifische Degradierung der mRNA-Transkripte kognitiver Gene erreicht werden konnte. Im Gegensatz zur *antisense*-Technologie erwies sich die Wirkung von siRNA im Hinblick auf die Hemmung der Genexpression um ein Vielfaches potenter und hoch spezifisch. Für eine längerfristige Unterdrückung von Genen kristallisierte sich die Methode der Plasmid-Vektor-vermittelten intrazellulären Expression von shRNA (*short hairpin RNA*) heraus, welche transient oder stabil angewendet werden kann. Diese exprimierte shRNA wird intrazellulär enzymatisch zu wirksamer siRNA prozessiert, welche den eigentlichen Enzym-vermittelten RNAi-Mechanismus der Degradierung von mRNA-Transkripten kognitiver Gene auslöst.

Die Anwendung von RNA-Polymerase III-abhängigen Promotoren für die stabile konstitutive Expression von shRNA stellte ein großes Problem für behandelte Zellen dar, wenn es sich bei dem zu unterdrückenden Zielgen um ein Gen mit essentiellen Funktionen für die Zelle handelte. Im Falle der Polo-like Kinase 1 (Plk1), einer in vielen Spezies hoch konservierten Serin/Threonin-Kinase mit essentiellen mitotischen Funktionen, bedeutete eine dauerhafte und stringente Unterdrückung einen veränderten Phänotyp beteiligter Zellen, welcher sich durch Defekte bei mitotischen Ereignissen bemerkbar machte. Plk1 ist in zahlreiche mitotische Prozesse, wie den Eintritt der Zellen in die Mitose, die Segregation der Chromosomen und die Aktivierung des APC/C (*anaphase promoting complex / cyclosome*), eingebunden. Darüber hinaus ist bekannt, daß Plk1 in nahezu allen Tumorarten überexprimiert vorliegt und die Prognose von Tumorwachstum und Metastasierungspotential über den Plk1-Gehalt definiert werden kann. Des weiteren bewirkte eine RNAi-vermittelte Unterdrückung der Plk1-Expression bei Tumorzellen eine Hemmung der Zellproliferation mit Auslösung der Apoptose. Hingegen konnte bei gesunden primären Zellen weder eine signifikante Hemmung der Proliferation noch die Auslösung der Apoptose beobachtet werden, was die große Bedeutung von Plk1 als Ansatzpunkt für eine Krebstherapie hervorhebt. Um die Funktion von Plk1 im Hinblick auf molekularbiologische Zusammenhänge besser studieren zu können, war es notwendig, den intrazellulären Plk1-Gehalt zu variieren.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden dazu induzierbare RNAi-Elemente entwickelt, mit deren Hilfe die intrazelluläre Plk1-Expression konditionell inhibiert werden konnte. Unter Verwendung des prokaryotischen Tet-Systems wurden auf Basis des RNA-Polymerase III-

abhängigen H1-Promotors durch Insertion von einer oder zwei Operatorsequenzen (TetO) für den Tetrazyklin-Repressor (TetR) an verschiedene Orte innerhalb der Sequenz des H1-Promotors drei induzierbare Promotor-Derivate geschaffen. Die drei entwickelten H1-Promotor-Derivate wurden zur Expression von shRNA gegen Plk1 eingesetzt und in bezug auf die Auslösung der RNAi-Antwort getestet und untereinander verglichen. Zu diesem Zwecke wurde der endogene Plk1-Gehalt von HeLa-Tumorzellen auf Transkript- und auf Proteinebene bestimmt. Die Zellen wurden zuvor mit Plasmid-Vektoren für konstitutive TetR-Expression und jeweils einer der verschiedenen shRNA-Expressions-Kassetten ko-transfiziert. Als Kontrollen dienten dabei Wildtyp-H1-Promotoren, welche zur konstitutiven Expression von shRNA gegen Plk1 und einer unwirksamen Kontroll-shRNA eingesetzt wurden. Mit Hilfe des synthetischen Tetrazyklin-Analogons Doxyzyklin, welches einen potenten Aktivator für TetR darstellt, konnten die hergestellten Promotor-Derivate induziert werden, was durch einen reduzierten intrazellulären Plk1-Gehalt sichtbar wurde. Dabei fiel auf, daß alle drei Promotor-Typen unterschiedliche Eigenschaften im nicht-induzierten Zustand wie auch im induzierten Zustand unter Anwesenheit von Doxyzyklin aufwiesen. Für die Basalaktivität in Abwesenheit von Doxyzyklin (*leakiness*) war die relative Lage der TetO-Sequenz(en) innerhalb des Promotors verantwortlich. So veränderte die Insertion einer TetO-Sequenz in 3'-Richtung der TATA-Box die Eigenschaften des Wildtyp-H1-Promotors weniger als die Insertion einer TetO-Sequenz in 5'-Richtung der TATA-Box. Zum Studium von Plk1 als Zielgen in der Krebstherapie wurde das Proliferationsverhalten von HeLa-Tumorzellen als Antwort auf die Doxyzyklin-vermittelte Induktion der shRNA-Expression unter Kontrolle eines der induzierbaren Promotoren ermittelt. Dabei konnte die Proliferation von Tumorzellen durch einen reduzierten Plk1-Gehalt, welcher durch die Doxyzyklin-induzierte Auslösung der RNAi-Antwort vermittelt wurde, erfolgreich inhibiert werden. Zur Überprüfung der Eignung entwickelter Systeme, Tumorstadium *in vivo* inhibieren zu können, wurden die entwickelten RNAi-Kassetten in das Genom von TetR-exprimierenden HeLa-Zellen integriert und so stabile Klone geschaffen. Stabile HeLa-Klone zur induzierbaren Expression von Plk1-spezifischer shRNA, wie auch zur induzierbaren Expression von einer Kontroll-shRNA, wurden in die gegenüberliegenden Flanken von immunsupprimierten Nacktmäusen inokuliert, um anhand von Xenograft-Modellen einen direkten Vergleich des Tumorstadiums unter gleichen äußeren Bedingungen zu ermöglichen. Einem Teil der Mäuse wurde Doxyzyklin ins Trinkwasser gegeben, während Kontrollmäuse kein Doxyzyklin verabreicht bekamen. Das Tumorstadium von Xenograft-Tumoren, welche aus Klonen zur Expression von shRNA gegen Plk1 hervorgingen, konnte in

Doxyzyklin-behandelten Mäusen um 53% auf 47% an Tag 51 nach Inokulierung der Zellen inhibiert werden. Tumoren nicht-induzierter Mäuse, sowie Tumoren aus induzierten Mäusen, welche Kontroll-shRNA exprimierten, wuchsen dagegen unverändert in gleichem Maße.

Anhand der in dieser Arbeit entwickelten induzierbaren H1-Promotor-Derivate zur konditionellen Auslösung von RNAi wurden wertvolle genetische Werkzeuge geschaffen, welche für das Studium der Genfunktion eingesetzt werden können. Im Falle der Unterdrückung von Plk1 können mit ihrer Hilfe sowohl grundlegende molekularbiologische Zusammenhänge studiert als auch die Bewertung von Plk1 als Zielgen in der Krebstherapie bewertet werden. Im Gegensatz zu kürzlich entwickelten Kinase-Inhibitoren, welche auf Proteinebene gegen Plk1 gerichtet sind und aufgrund ihrer bislang nicht nachgewiesenen Spezifität verwandte Kinasen in ihrer Wirkungsweise beeinflussen könnten, ist eine RNAi-basierte Strategie hoch spezifisch und verspricht eine große Relevanz für zukünftige therapeutische Ansätze. Voraussetzung für erfolgversprechende RNAi-basierte Strategien ist eine hohe Konservierung der Sequenz beteiligter Zielgene. Im Falle von Plk1 konnte eine hohe Konservierung durch Sequenzanalyse der Plk1-Gene von 15 Mamma-Karzinomen, 11 Ovarial-Karzinomen und mehrerer Tumorzelllinien bestätigt werden.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aminosäuren:

Ala	Alanin	(A)
Arg	Arginin	(R)
Asp	Aspartat	(D)
Gln	Glutamin	(Q)
Glu	Glutamat	(E)
Gly	Glycin	(G)
His	Histidin	(H)
Lys	Lysin	(K)
Phe	Phenylalanin	(F)
Pro	Prolin	(P)
Ser	Serin	(S)
Thr	Threonin	(T)
Trp	Tryptophan	(W)
Tyr	Tyrosin	(Y)
Val	Valin	(V)
X	beliebige Aminosäure	

Nukleotide:

A	Adenosin
ATP	Adenosin-Triphosphat
C	Cytidin
dNTP-Mix	Desoxynukleotid-Triphosphat-Mix, bestehend aus desoxyribonukleären Adenosin-, Cytidin-, Guanosin- und Thymidin-Triphosphaten
G	Guanosin
GDP	Guanosin-Diphosphat
GTP	Guanosin-Triphosphat
T	Thymidin
U	Uridin

Sonstige Abkürzungen und Bezeichnungen:

<i>a</i>	größere der beiden gemessenen Dimensionen eines Xenograft-Tumors
A	Ampere
Abb.	Abbildung(en)
abs.	absolut
Ac	Acetat
<i>ad</i>	auf
Amp	Ampicillin
Amp R	Resistenzgen gegen Ampicillin
APC/C	<i>anaphase promoting complex / cyclosome</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
<i>_as</i>	<i>antisense</i> (innerhalb einer Oligonukleotid- oder Primer-Bezeichnung)
ASO	<i>antisense</i> -Oligonukleotid
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia</i> -mutiertes Gen (<i>ataxia telangiectasia-mutated gene</i>)
<i>b</i>	kleinere der beiden gemessenen Dimensionen eines Xenograft-Tumors

Bcl-2	anti-apoptotisches Gen, welches als zweites seiner Familie ursprünglich im B-Zell-Lymphom identifiziert wurde (<i>B-cell lymphoma-2</i>)
BER	Basen-Exzisionsreparatur (<i>base excision repair</i>)
BGH-polyA	polyadenyliertes Signal des BGH-Gens (<i>bovine growth hormone gene</i>)
bidest.	<i>bidestillata</i> (zweimal destilliert)
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BLM	<i>bloom syndrome mutated gene</i>
bp	Basenpaar(e)
B-Raf	Proto-Onkogen, welches B-Isoform der Serin/Threonin-Kinase Raf kodiert
BRCA1	<i>breast cancer susceptibility gene 1</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BT-474	humane Zelllinie aus duktalem Mamma-Karzinom der Brustdrüse
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
Cak	Cdk-aktivierende Kinase (<i>Cdk-activating kinase</i>)
CCT	<i>chaperonin containing TCP1 (t-complex polypeptide-1)-complex</i>
Cdc	<i>cell division cycle</i>
CDH1	<i>cell division homology 1</i>
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
Ci	Curie
CIAP	Alkalische Phosphatase aus dem Darmepithel des Kalbes (<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>)
CIP	Phosphatase aus dem Darmepithel des Kalbes (<i>calf intestinal phosphatase</i>)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CMS	Bezeichnung eines Plasmides, auf welchem ein CMV- und ein SV40-Promotor lokalisiert sind
CMV	Cytomegalovirus
CRE	CRE-Rekombinase (<i>causes recombination</i>)
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4 (<i>chemokine (C-X-C-motif) receptor 4</i>)
CYLD	<i>cylindromatosis susceptibility gene</i>
Da	Dalton
D-Box	Degron-Box
d2EGFP	destabilisiertes EGFP mit einer Halbwertszeit von 2h
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease (<i>Deoxyribonuclease</i>)
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1
Dox	Doxyzyklin
DS	<i>downstream</i>
DSE	distales Sequenzelement
dsRNA	doppelsträngige RNA (<i>double-stranded RNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz-Lösung (<i>Enhanced Chemiluminescent Solution</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> -Bakterien, benannt nach dem Entdecker Theodor Escherich
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E2F1	Bezeichnung eines aktivierenden Transkriptionsfaktors der E2F-Familie
E2F4	Bezeichnung eines reprimierenden Transkriptionsfaktors der E2F-Familie

EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglykol-Bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELF2a	Elongationsfaktor 2a (<i>elongation factor 2a</i>)
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen (<i>embryonic stem cells</i>)
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
Ex	Exon
F	DNA-Fragment (Abb. 3.2)
FA	Anteil des Formamids im benutzten Puffer in %
Fa.	Firma
FACScan	<i>fluorescence activated cell scanning</i> (Durchflußzytometrie) oder <i>fluorescence activated cell scanner</i> (Durchflußzytometer)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Fgfr2	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
Fnk	<i>fibroblast growth factor inducible kinase</i> , Synonym für Plk3
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G ₀ -Phase	<i>Gap₀</i> -Phase
G ₁ -Phase	<i>Gap₁</i> -Phase
G ₂ -Phase	<i>Gap₂</i> -Phase
G/C-Gehalt	Guanosin/Cytidin-Gehalt
GeneID	Identifikationsnummer eines Gens innerhalb des Genoms
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein), isoliert aus <i>Aequorea victoria</i>
GRASP65	<i>Golgi reassembly stacking protein 65</i>
h	Stunde(n)
H1	Gen, welches die RNA-Komponente der humanen nukleären RNaseP kodiert
HAM's-F12	Bezeichnung eines Kulturmediums, verwendet für HeLaS3-Zellen, ursprünglich entwickelt für <i>chinese hamster ovary cells</i>
HeLa	Cervix-Karzinom-Zelllinie, entnommen von <i>Henrietta Lacks</i>
HeLaS3	Subklon 3 der HeLa-Zelllinie
Hepes	N-2-hydroxyethyl-1-piperazin-N'-2-ethanschwefelsäure
Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2 / neuroglioblastoma</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia inducible factor-1α</i>
HO-1	Häm-Oxygenase 1
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
Hs68	Fibroblasten aus dem Präputium von <i>Homo sapiens</i> , entnommen im Jahr 1968
Hsp90	Hitzeschock-induziertes Protein, 90 kD (<i>heat shock protein, 90 kD</i>),
HSV-TK-polyA	polyadenyliertes Signal der Thymidinkinase aus Herpes-Simplex-Virus
Hyg R	Resistenzgen gegen Hygromycin B
Hygro	Hygromycin B
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas, Experimente außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	Experimente im lebenden Organismus
J	Konzentration monovalenter Kationen in Mol/l
k	Kilo

Kana	Kanamycin
Kan R	Resistenzgen gegen Kanamycin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KILLER/DR5	<i>KILLER/death receptor 5</i>
konz.	konzentriert
KRAB	<i>Krüppel-associated box</i>
K-Ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> , Mitglied der Ras-Familie der humanen Proto-Onkogene
l	Liter
LacR	Lactose-Repressor
LB	<i>luria bertani</i>
lin-4	Bezeichnung einer miRNA aus <i>C. elegans</i>
lin-14	Protein aus <i>C. elegans</i>
loxP	<i>locus of crossingover</i> , aus dem Phagen P1
Lsg.	Lösung
m	Meter oder Milli
M	molar / DNA-Marker (Abb. 3.1)
M1	Bereich Fluoreszenz-negativer Zellen bei der FACScan-Analyse (Abb. 3.7)
M2	Bereich EGFP-fluoreszierender Zellen bei der FACScan-Analyse (Abb. 3.7)
M-Phase	Mitose-Phase
Mat1	<i>menage a trois 1</i> , (dritte Komponente bei der Zusammenlagerung von Cdk7 und Cyclin H zu Cak)
MCF-7	Zelllinie aus humanem, epithelalem Mamma-Adenokarzinom der Brustdrüse
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MeOH	Methanol
Met-Rezeptor	Synonym für HGFR (<i>hepatocyte growth factor receptor</i>), eine Rezeptor-Tyrosinkinase, welche in einigen Tumoren überexprimiert ist
mg	Milligramm
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
min	Minute(n)
miRNA	<i>micro RNA</i>
MKLP	mitotisches Kinesin-ähnliches Protein (<i>mitotic kinesin like protein</i>)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	millimolar
MM	Fehlpaarung (<i>mismatch</i>)
MMR	<i>mismatch-Reparatur (mismatch repair)</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPF	<i>mitosis / M-Phase / maturation promoting factor</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
min	Minute(n)
miRNA	<i>micro RNA</i>

Myt1	Bezeichnung einer inhibitorischen Kinase des Zellzyklus
N	normal
N-	Amino-
n	Nano / Anzahl
Neo R	Resistenzgen gegen Neomycin / Geneticin (G418)
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur (<i>nucleotide excision repair</i>)
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NLS	Kern-Lokalisierungs-Signal (<i>nuclear localization signal</i>)
nM	nanomolar
no	Nummer (<i>number</i>)
NP-40	Nonidet® P-40 (Nonylphenyl-Polyethylenglycol, Fa. Sigma)
nt	Nukleotid(e)
NudC	<i>nuclear distribution gene C</i>
O	Kürzel für eine TetO-Sequenz innerhalb einer Plasmidbezeichnung
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leseraster (<i>open reading frame</i>)
p	Pico / Plasmid
P	Phosphatrest (Abb. 1.2)
<i>P</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit
p53	Bezeichnung eines Tumorsuppressorgens (Molekulargewicht von 53 kD)
p.a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PB	Polo-Box
PBD	Polo-Box-Domäne (<i>polo box domain</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>) inkl. Tween-20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PEI	Polyethylenimin
pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der H ⁺ -Ionen)
PI 3-Kinase	Phosphatidyl-inositol 3-OH Kinase
Pin1	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase 1
PKA	Proteinkinase A (<i>cAMP-dependent protein kinase</i>)
PKR	Proteinkinase R (<i>dsRNA-dependent protein kinase</i>)
Plks	Polo-like Kinasen (<i>polo-like kinases</i>)
Plk1	Polo-like Kinase 1 (<i>polo-like kinase 1</i>)
Plk2	Polo-like Kinase 2, bekannt auch unter Snk
Plk3	Polo-like Kinase 3, bekannt auch unter Fnk oder Prk
Plk4	Polo-like Kinase 4, bekannt auch unter Sak
Plo1	Plk1-Homolog aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Plx1	Plk1-Homolog aus <i>xenopus laevis</i>
Plx2	Plk2-Homolog aus <i>xenopus laevis</i>
Plx3	Plk3-Homolog aus <i>xenopus laevis</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylsäure
Pol III	RNA-Polymerase III
polo	Plk1-Homolog aus <i>Drosophila</i> , erster entdeckter Vertreter der Polo-Familie
polyA	PolyA-Signal (polyadenyliertes 3'-Ende einer mRNA)
prä-miRNA	Vorläufermolekül der miRNA (<i>micro RNA</i>)

prä-mRNA	Vorläufermolekül der mRNA (<i>messenger RNA</i>)
Prk	Synonym für Plk3
PSE	proximales Sequenz-Element
PSMA	Prostata-spezifisches Membran-Antigen (<i>prostate-specific membrane antigen</i>)
PTF	PSE-bindender Transkriptionsfaktor
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
®	eingetragenes, geschütztes Produkt (<i>registered</i>)
Ras	Familie von humanen Proto-Onkogenen, benannt nach viralem Onkogen aus <i>Rasheed-Retrovirus</i>
RB	Laufpuffer (<i>running buffer</i>)
RB-Gen	Retinoblastom-Gen
RB-Protein	Retinoblastom-Protein
RdRP	<i>RNA-directed RNA-Polymerase</i>
RIPA	Radioimmunopräzipitation (<i>radioimmunoprecipitation</i>)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz (<i>RNA interference</i>)
RNase	Ribonuklease
RNaseP	Ribonuklease P
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raum-Temperatur (20-25 °C)
rtTA	reverser transkriptioneller Transaktivator (<i>reverse transcriptional transactivator</i>)
rtTA-M2	reverser transkriptioneller Transaktivator M2 (<i>reverse transcriptional transactivator M2</i>)
rtTA-S2	reverser transkriptioneller Transaktivator S2 (<i>reverse transcriptional transactivator S2</i>)
s	Sekunde(n)
_s	<i>sense</i> (innerhalb einer Oligonukleotid- oder Primer-Bezeichnung)
Sak	Synonym für Plk4
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SHP-2	SH2 (src-Homologie)-Domäne enthaltende Protein-Tyrosinphosphatase
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
7SK	Bezeichnung eines RNA-kodierenden Gens mit Polymerase III-abhängigem Promotor vom Typ III
SK-BR-3	humane Zelllinie aus Mamma-Adenokarzinom der Brustdrüse
Slk	<i>human STE20-like kinase</i>
Snk	<i>serum inducible kinase</i> , Synonym für Plk2
S-Phase	Synthese-Phase
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat (<i>sodium chloride/sodium citrate</i>)
Stk10	<i>serine/threonine kinase 10</i>
SV-40	<i>simian virus-40</i>
SV-40-polyA	polyadenyliertes Signal aus <i>simian virus 40</i>
T	Temperatur / Kürzel für TATA-Box innerhalb einer Plasmidbezeichnung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TATA-Box	Motiv aus Thyminen und Adenosinen, welches innerhalb eines Promotors für die Initiation der Transkription wichtig ist
TBP	TATA-Box-bindendes Protein (<i>TATA-box binding protein</i>)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>) inkl. Tween-20
TCTP	translationell kontrolliertes Tumorprotein (<i>translational controlled tumor protein</i>)
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethan
Tet	Tetrazyklin
TetA	Tetrazyklin-Antiporter
TetO	Tetrazyklin-Operatorsequenz
Tet-Off	Tetrazyklin-Off; Expressionssystem, aktiv in Abwesenheit von Tetrazyklin
Tet-On	Tetrazyklin-On; Expressionssystem, aktiv in Anwesenheit von Tetrazyklin
TetR	Tetrazyklin-Repressor
TetR-KRAB	Tetrazyklin-Repressor- <i>Krüppel-associated box</i>
TFIIIB	Transkriptionsfaktor III B
TFB	Puffer zur Herstellung chemokompetenter Bakterien (<i>transformation buffer</i>)
TM	Geschütztes Warenzeichen (<i>trade mark</i>)
Tn.	Transposon
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
T-REx TM -HeLa	TetR-exprimierende HeLa-Zelllinie, geschütztes Warenzeichen
Tris (Base)	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	transfer RNA
T-Schleife	Threonin-Motiv innerhalb einer Proteinstruktur
tTA	transkriptioneller Transaktivator (<i>transcriptional transactivator</i>)
tTA2	transkriptioneller Transaktivator 2 (<i>transcriptional transactivator 2</i>)
tTR	transkriptioneller Transrepressor; engl.: tTS = <i>transcriptional trans-silencer</i>
tTS	<i>transcriptional trans-silencer</i>
U	Unit(s)
U6 snRNA	Gen, welches die RNA der Untereinheit 6 des Spleißosoms kodiert
UC	<i>University of California</i>
US	<i>upstream</i>
US/DS	<i>upstream / downstream</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
VP16	<i>virion protein 16</i> aus Herpes-Simplex-Virus
Wee1	Bezeichnung einer inhibitorischen Kinase des Zellzyklus
wt	Kürzel für Wildtyp-Promotor innerhalb einer Plasmidbezeichnung
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
w/w	Gewicht pro Gewicht (<i>weight per weight</i>)
x	-fach (z. B. 10 x = 10-fach)

7 LITERATUR

- Abrieu,A., Brassac,T., Galas,S., Fisher,D., Labbe,J.C. und Doree,M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.*, **111** (Pt 12), 1751-1757.
- Adams,R.R., Tavares,A.A., Salzberg,A., Bellen,H.J. und Glover,D.M. (1998). pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev.*, **12**, 1483-1494.
- Ahr,A., Karn,T., Solbach,C., Seiter,T., Strebhardt,K., Holtrich,U. und Kaufmann,M. (2002). Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet*, **359**, 131-132.
- Akagi,K., Kanai,M., Saya,H., Kozu,T. und Berns,A. (2001). A novel tetracycline-dependent transactivator with E2F4 transcriptional activation domain. *Nucleic Acids Res*, **29**, E23.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W. und Lipman,D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2005. (2006). Internet Communication
- Arnaud,L., Pines,J. und Nigg,E.A. (1998). GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma*, **107**, 424-429.
- Ashley,R.L., Corey,L., Dalessio,J., Wilson,P., Remington,M., Barnum,G. und Trethewey,P. (1994). Protein-specific cervical antibody responses to primary genital herpes simplex virus type 2 infections. *J. Infect. Dis.*, **170**, 20-26.
- Aumais,J.P., Williams,S.N., Luo,W., Nishino,M., Caldwell,K.A., Caldwell,G.A., Lin,S.H. und Yu-Lee,L.Y. (2003). Role for NudC, a dynein-associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis. *J. Cell Sci.*, **116**, 1991-2003.
- Baer,M., Nilsen,T.W., Costigan,C. und Altman,S. (1990). Structure and Transcription of A Human-Gene for H1 Rna, the Rna Component of Human Rnase-P. *Nucleic Acids Research*, **18**, 97-103.
- Bai,L., Wang,Z., Yoon,J.B. und Roeder,R.G. (1996). Cloning and characterization of the beta subunit of human proximal sequence element-binding transcription factor and its involvement in transcription of small nuclear RNA genes by RNA polymerases II and III. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5419-5426.
- Baldino,F., Jr., Chesselet,M.F. und Lewis,M.E. (1989). High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol.*, **168**, 761-777.
- Bark,C., Weller,P., Zabielski,J., Janson,L. und Pettersson,U. (1987). A distant enhancer element is required for polymerase III transcription of a U6 RNA gene. *Nature*, **328**, 356-359.
- Baron,U. und Bujard,H. (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.*, **327**, 401-421.
- Baron,U., Gossen,M. und Bujard,H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2723-2729.

- Baron,U., Schnappinger,D., Helbl,V., Gossen,M., Hillen,W. und Bujard,H. (1999). Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 1013-1018.
- Bellefroid,E.J., Poncelet,D.A., Lecocq,P.J., Revelant,O. und Martial,J.A. (1991). The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 3608-3612.
- Berg,C.M., Liu,L., Wang,B. und Wang,M.D. (1988). Rapid identification of bacterial genes that are lethal when cloned on multicopy plasmids. *J. Bacteriol.*, **170**, 468-470.
- Berns,K., Hijmans,E.M., Mullenders,J., Brummelkamp,T.R., Velds,A., Heimerikx,M., Kerkhoven,R.M., Madiredjo,M., Nijkamp,W., Weigelt,B., Agami,R., Ge,W., Cavet,G., Linsley,P.S., Beijersbergen,R.L. und Bernards,R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, **428**, 431-437.
- Bernstein,E., Denli,A.M. und Hannon,G.J. (2001). The rest is silence. *RNA*, **7**, 1509-1521.
- Bertrand,K.P., Postle,K., Wray,L.V., Jr. und Reznikoff,W.S. (1984). Construction of a single-copy promoter vector and its use in analysis of regulation of the transposon Tn10 tetracycline resistance determinant. *J. Bacteriol.*, **158**, 910-919.
- Bettencourt-Dias,M., Rodrigues-Martins,A., Carpenter,L., Riparbelli,M., Lehmann,L., Gatt,M.K., Carmo,N., Balloux,F., Callaini,G. und Glover,D.M. (2005). SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr. Biol.*, **15**, 2199-2207.
- Bohl,D., Naffakh,N. und Heard,J.M. (1997). Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat. Med.*, **3**, 299-305.
- Booher,R.N., Holman,P.S. und Fattaey,A. (1997). Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22300-22306.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brauninger,A., Strebhardt,K. und Rubsamen-Waigmann,H. (1995). Identification and functional characterization of the human and murine polo-like kinase (Plk) promoter. *Oncogene*, **11**, 1793-1800.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R. und Agami,R. (2002a). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R. und Agami,R. (2002b). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, **2**, 243-247.
- Brummelkamp,T.R., Berns,K., Hijmans,E.M., Mullenders,J., Fabius,A., Heimerikx,M., Velds,A., Kerkhoven,R.M., Madiredjo,M., Bernards,R. und Beijersbergen,R.L. (2004). Functional identification of cancer-relevant genes through large-scale RNA interference screens in mammalian cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **69**, 439-445.
- Bujard, H. Insufficient expression of bacterial TetR in ES-cells of mice. (2004).
Personal Communication
- Carbon,P., Murgo,S., Ebel,J.P., Krol,A., Tebb,G. und Mattaj,I.W. (1987). A Common Octamer Motif Binding-Protein Is Involved in the Transcription of U6 Snrna by Rna Polymerase-Iii and U2 Snrna by Rna Polymerase-Ii. *Cell*, **51**, 71-79.

- Carmell, M.A., Zhang, L., Conklin, D.S., Hannon, G.J. und Rosenquist, T.A. (2003). Germline transmission of RNAi in mice. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 91-92.
- Carmena, M., Riparbelli, M.G., Minestrini, G., Tavares, A.M., Adams, R., Callaini, G. und Glover, D.M. (1998). Drosophila polo kinase is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **143**, 659-671.
- Chang, H.S., Lin, C.H., Chen, Y.C. und Yu, W.C. (2004). Using siRNA technique to generate transgenic animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown. *Am. J. Pathol.*, **165**, 1535-1541.
- Chase, D., Serafinas, C., Ashcroft, N., Kosinski, M., Longo, D., Ferris, D.K. und Golden, A. (2000). The polo-like kinase PLK-1 is required for nuclear envelope breakdown and the completion of meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis*, **26**, 26-41.
- Chen, J., Dai, G., Wang, Y.Q., Wang, S., Pan, F.Y., Xue, B., Zhao, D.H. und Li, C.J. (2006). Polo-like kinase 1 regulates mitotic arrest after UV irradiation through dephosphorylation of p53 and inducing p53 degradation. *FEBS Lett.*, **580**, 3624-3630.
- Chen, Y., Stamatoyannopoulos, G. und Song, C.Z. (2003). Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res*, **63**, 4801-4804.
- Cheng, K.Y., Lowe, E.D., Sinclair, J., Nigg, E.A. und Johnson, L.N. (2003). The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. *EMBO J.*, **22**, 5757-5768.
- Choudhury, A., Charo, J., Parapuram, S.K., Hunt, R.C., Hunt, D.M., Seliger, B. und Kiessling, R. (2004). Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. *Int. J. Cancer*, **108**, 71-77.
- Chrast-Balz, J. und Hooft, v.H. (1996). Bi-directional gene switching with the tetracycline repressor and a novel tetracycline antagonist. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2900-2904.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. und Croce, C.M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 13944-13949.
- Clay, F.J., McEwen, S.J., Bertoncello, I., Wilks, A.F. und Dunn, A.R. (1993). Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 4882-4886.
- Clemens, M.J. und Elia, A. (1997). The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J. Interferon Cytokine Res*, **17**, 503-524.
- Cleveland, D.W., Mao, Y. und Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*, **112**, 407-421.
- Cogswell, J.P., Brown, C.E., Bisi, J.E. und Neill, S.D. (2000). Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. *Cell Growth Differ.*, **11**, 615-623.
- Coumoul, X., Li, W., Wang, R.H. und Deng, C. (2004). Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res*, **32**, e85.

- Coumoul,X., Shukla,V., Li,C., Wang,R.H. und Deng,C.X. (2005). Conditional knockdown of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Res*, **33**, e102.
- Czauderna,F., Santel,A., Hinz,M., Fechtner,M., Durieux,B., Fisch,G., Leenders,F., Arnold,W., Giese,K., Klippel,A. und Kaufmann,J. (2003). Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e127.
- Dai,W. und Cogswell,J.P. (2003). Polo-like kinases and the microtubule organization center: targets for cancer therapies. *Prog. Cell Cycle Res.*, **5**, 327-334.
- Danzeiser,D.A., Urso,O. und Kunkel,G.R. (1993). Functional characterization of elements in a human U6 small nuclear RNA gene distal control region. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4670-4678.
- Das,G., Henning,D. und Reddy,R. (1987). Structure, organization, and transcription of Drosophila U6 small nuclear RNA genes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 1187-1193.
- Davies,H., Bignell,G.R., Cox,C., Stephens,P., Edkins,S., Clegg,S., Teague,J., Woffendin,H., Garnett,M.J., Bottomley,W., Davis,N., Dicks,E., Ewing,R., Floyd,Y., Gray,K., Hall,S., Hawes,R., Hughes,J., Kosmidou,V., Menzies,A., Mould,C., Parker,A., Stevens,C., Watt,S., Hooper,S., Wilson,R., Jayatilake,H., Gusterson,B.A., Cooper,C., Shipley,J., Hargrave,D., Pritchard-Jones,K., Maitland,N., Chenevix-Trench,G., Riggins,G.J., Bigner,D.D., Palmieri,G., Cossu,A., Flanagan,A., Nicholson,A., Ho,J.W., Leung,S.Y., Yuen,S.T., Weber,B.L., Seigler,H.F., Darrow,T.L., Paterson,H., Marais,R., Marshall,C.J., Wooster,R., Stratton,M.R. und Futreal,P.A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, **417**, 949-954.
- Dernburg,A.F., Zalevsky,J., Colaiacovo,M.P. und Villeneuve,A.M. (2000). Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes Dev.*, **14**, 1578-1583.
- Descombes,P. und Nigg,E.A. (1998). The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J.*, **17**, 1328-1335.
- Deuschle,U., Hipskind,R.A. und Bujard,H. (1990). RNA polymerase II transcription blocked by *Escherichia coli* lac repressor. *Science*, **248**, 480-483.
- Deuschle,U., Meyer,W.K. und Thiesen,H.J. (1995). Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 1907-1914.
- Deuschle,U., Pepperkok,R., Wang,F.B., Giordano,T.J., McAllister,W.T., Ansorge,W. und Bujard,H. (1989). Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 5400-5404.
- Dingermann,T., Frank-Stoll,U., Werner,H., Wissmann,A., Hillen,W., Jacquet,M. und Marschalek,R. (1992a). RNA polymerase III catalysed transcription can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by the bacterial tetracycline repressor-operator system. *EMBO J.*, **11**, 1487-1492.
- Dingermann,T., Werner,H., Schutz,A., Zundorf,I., Nerke,K., Knecht,D. und Marschalek,R. (1992b). Establishment of a system for conditional gene expression using an inducible tRNA suppressor gene. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 4038-4045.
- Doench,J.G., Petersen,C.P. und Sharp,P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.*, **17**, 438-442.
- Dougherty,W.G., Lindbo,J.A., Smith,H.A., Parks,T.D., Swaney,S. und Proebsting,W.M. (1994). RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **7**, 544-552.

- Draetta,G. und Eckstein,J. (1997). Cdc25 protein phosphatases in cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1332**, M53-M63.
- Duncan,P.I., Pollet,N., Niehrs,C. und Nigg,E.A. (2001). Cloning and characterization of Plx2 and Plx3, two additional Polo-like kinases from *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res*, **270**, 78-87.
- Eckerdt,F. und Strebhardt,K. (2006). Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis. *Cancer Res*, **66**, 6895-6898.
- Eckerdt,F., Yuan,J., Saxena,K., Martin,B., Kappel,S., Lindenau,C., Kramer,A., Naumann,S., Daum,S., Fischer,G., Dikic,I., Kaufmann,M. und Strebhardt,K. (2005a). Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. *J. Biol. Chem.*, **280**, 36575-36583.
- Eckerdt,F., Yuan,J. und Strebhardt,K. (2005b). Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene*, **24**, 267-276.
- Eckert,B. und Beck,C.F. (1989). Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J. Bacteriol.*, **171**, 3557-3559.
- El Deiry,W.S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.*, **8**, 345-357.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., und Tuschl,T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W. und Tuschl,T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, **20**, 6877-6888.
- Elia,A.E., Cantley,L.C. und Yaffe,M.B. (2003a). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science*, **299**, 1228-1231.
- Elia,A.E., Rellos,P., Haire,L.F., Chao,J.W., Ivins,F.J., Hoepker,K., Mohammad,D., Cantley,L.C., Smerdon,S.J. und Yaffe,M.B. (2003b). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell*, **115**, 83-95.
- Ellinger-Ziegelbauer,H., Karasuyama,H., Yamada,E., Tsujikawa,K., Todokoro,K. und Nishida,E. (2000). Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells. *Genes Cells*, **5**, 491-498.
- Elmayan,T. und Vaucheret,H. (1996). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant Journal*, **9**, 787-797.
- Faltus,T., Yuan,J., Zimmer,B., Kramer,A., Loibl,S., Kaufmann,M. und Strebhardt,K. (2004). Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia.*, **6**, 786-795.
- Faryar,K. und Gatz,C. (1992). Construction of a tetracycline-inducible promoter in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, **21**, 345-349.
- Fenton,B. und Glover,D.M. (1993). A conserved mitotic kinase active at late anaphase-telophase in syncytial *Drosophila* embryos. *Nature*, **363**, 637-640.
- Fire,A., Xu,S.Q., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E. und Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.

- Fisher,R.P. und Morgan,D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, **78**, 713-724.
- Fode,C., Motro,B., Yousefi,S., Heffernan,M. und Dennis,J.W. (1994). Sak, a murine protein-serine/threonine kinase that is related to the Drosophila polo kinase and involved in cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **91**, 6388-6392.
- Friedberg,E.C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, **421**, 436-440.
- Gatz,C., Kaiser,A. und Wendenburg,R. (1991). Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, **227**, 229-237.
- Gatz,C. und Quail,P.H. (1988). Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **85**, 1394-1397.
- Geiduschek,E.P. und Kassavetis,G.A. (1995). Comparing transcriptional initiation by RNA polymerases I and III. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 344-351.
- Golan,A., Yudkovsky,Y. und Hershko,A. (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15552-15557.
- Golsteyn,R.M., Mundt,K.E., Fry,A.M. und Nigg,E.A. (1995). Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.*, **129**, 1617-1628.
- Golsteyn,R.M., Schultz,S.J., Bartek,J., Ziemiecki,A., Ried,T. und Nigg,E.A. (1994). Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases Drosophila polo and Saccharomyces cerevisiae Cdc5. *J. Cell Sci.*, **107 (Pt 6)**, 1509-1517.
- Goomer,R.S. und Kunkel,G.R. (1992). The transcriptional start site for a human U6 small nuclear RNA gene is dictated by a compound promoter element consisting of the PSE and the TATA box. *Nucleic Acids Res*, **20**, 4903-4912.
- Goss,K.H., Risinger,M.A., Kordich,J.J., Sanz,M.M., Straughen,J.E., Slovek,L.E., Capobianco,A.J., German,J., Boivin,G.P. und Groden,J. (2002). Enhanced tumor formation in mice heterozygous for Blm mutation. *Science*, **297**, 2051-2053.
- Gossen,M., Bonin,A.L. und Bujard,H. (1993). Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 471-475.
- Gossen,M. und Bujard,H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **89**, 5547-5551.
- Gossen,M. und Bujard,H. (2002). Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu. Rev. Genet.*, **36**, 153-173.
- Gossen,M., Freundlieb,S., Bender,G., Muller,G., Hillen,W. und Bujard,H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Graham,L.D. (2002). Ecdysone-controlled expression of transgenes. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **2**, 525-535.
- Grill,M.A., Bales,M.A., Fought,A.N., Rosburg,K.C., Munger,S.J. und Antin,P.B. (2003). Tetracycline-inducible system for regulation of skeletal muscle-specific gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res*, **12**, 33-43.

- Grishok,A., Pasquinelli,A.E., Conte,D., Li,N., Parrish,S., Ha,I., Baillie,D.L., Fire,A., Ruvkun,G. und Mello,C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, **106**, 23-34.
- Guan,R., Tapang,P., Levenson,J.D., Albert,D., Giranda,V.L. und Luo,Y. (2005). Small interfering RNA-mediated Polo-like kinase 1 depletion preferentially reduces the survival of p53-defective, oncogenic transformed cells and inhibits tumor growth in animals. *Cancer Res.*, **65**, 2698-2704.
- Gumireddy,K., Reddy,M.V., Cosenza,S.C., Boominathan,R., Baker,S.J., Papathi,N., Jiang,J., Holland,J. und Reddy,E.P. (2005). ON01910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent. *Cancer Cell*, **7**, 275-286.
- Guo,S. und Kemphues,K.J. (1995). *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, **81**, 611-620.
- Gupta,S., Schoer,R.A., Egan,J.E., Hannon,G.J. und Mittal,V. (2004). Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 1927-1932.
- Hadjantonakis,A.K., Gertsenstein,M., Ikawa,M., Okabe,M. und Nagy,A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.*, **76**, 79-90.
- Hamanaka,R., Maloid,S., Smith,M.R., O'Connell,C.D., Longo,D.L. und Ferris,D.K. (1994). Cloning and characterization of human and murine homologues of the *Drosophila polo* serine-threonine kinase. *Cell Growth Differ.*, **5**, 249-257.
- Hamanaka,R., Smith,M.R., O'Connor,P.M., Maloid,S., Mihalic,K., Spivak,J.L., Longo,D.L. und Ferris,D.K. (1995). Polo-like kinase is a cell cycle-regulated kinase activated during mitosis. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21086-21091.
- Hamann,L., Buss,H. und Tannich,E. (1997). Tetracycline-controlled gene expression in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **84**, 83-91.
- Hamilton,A.J. und Baulcombe,D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.
- Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D. und Hannon,G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hanks,S.K. und Quinn,A.M. (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.*, **200**, 38-62.
- Hanks,S.K., Quinn,A.M. und Hunter,T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Hannon,G.J. (2002). RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Hannon,G.J., Chubb,A., Maroney,P.A., Hannon,G., Altman,S. und Nilsen,T.W. (1991). Multiple cis-acting elements are required for RNA polymerase III transcription of the gene encoding H1 RNA, the RNA component of human RNase P. *J. Biol. Chem.*, **266**, 22796-22799.

- Hasuwa,H., Kaseda,K., Einarsdottir,T. und Okabe,M. (2002). Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett.*, **532**, 227-230.
- Hasuwa,H. und Okabe,M. (2004). RNAi in living mice. *Methods Mol. Biol.*, **252**, 501-508.
- He,L. und Hannon,G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 522-531.
- Heins,L., Frohberg,C. und Gatz,C. (1992). The Tn10-encoded Tet repressor blocks early but not late steps of assembly of the RNA polymerase II initiation complex in vivo. *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 328-331.
- Hemann,M.T., Fridman,J.S., Zilfou,J.T., Hernando,E., Paddison,P.J., Cordon-Cardo,C., Hannon,G.J. und Lowe,S.W. (2003). An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat. Genet.*, **33**, 396-400.
- Henry,R.W., Sadowski,C.L., Kobayashi,R. und Hernandez,N. (1995). A TBP-TAF complex required for transcription of human snRNA genes by RNA polymerase II and III. *Nature*, **374**, 653-656.
- Higuchi,M., Tsutsumi,R., Higashi,H. und Hatakeyama,M. (2004). Conditional gene silencing utilizing the lac repressor reveals a role of SHP-2 in cagA-positive *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Cancer Sci.*, **95**, 442-447.
- Hillen,W., Schollmeier,K. und Gatz,C. (1984). Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance operon. II. Interaction of RNA polymerase and TET repressor with the tet operon regulatory region. *J. Mol. Biol.*, **172**, 185-201.
- Hoeflich,K.P., Gray,D.C., Eby,M.T., Tien,J.Y., Wong,L., Bower,J., Gogineni,A., Zha,J., Cole,M.J., Stern,H.M., Murray,L.J., Davis,D.P. und Seshagiri,S. (2006). Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models. *Cancer Res*, **66**, 999-1006.
- Hoffmann,A., Villalba,M., Journot,L. und Spengler,D. (1997). A novel tetracycline-dependent expression vector with low basal expression and potent regulatory properties in various mammalian cell lines. *Nucleic Acids Res*, **25**, 1078-1079.
- Holmes,D.S. und Quigley,M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**, 193-197.
- Holtrich,U., Wolf,G., Brauninger,A., Karn,T., Bohme,B., Rubsamen-Waigmann,H. und Strebhardt,K. (1994). Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **91**, 1736-1740.
- Holtrich,U., Wolf,G., Yuan,J., Bereiter-Hahn,J., Karn,T., Weiler,M., Kauselmann,G., Rehli,M., Andreesen,R., Kaufmann,M., Kuhl,D. und Strebhardt,K. (2000). Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages. *Oncogene*, **19**, 4832-4839.
- Hsieh,A.C., Bo,R., Manola,J., Vazquez,F., Bare,O., Khvorova,A., Scaringe,S. und Sellers,W.R. (2004). A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res*, **32**, 893-901.
- Huang,X.Q. und Miller,W. (1991). A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm. *Advances in Applied Mathematics*, **12**, 337-357.
- invivogen.com. silencing efficiency of 7SK-based psiRNA. invivogen.com . (2002).
Internet Communication

- Jackman,M., Lindon,C., Nigg,E.A. und Pines,J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat. Cell Biol.*, **5**, 143-148.
- Jackson,A.L., Bartz,S.R., Schelter,J., Kobayashi,S.V., Burchard,J., Mao,M., Li,B., Cavet,G. und Linsley,P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 635-637.
- Jackson,A.L. und Linsley,P.S. (2004). Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.*, **20**, 521-524.
- Jang,Y.J., Ma,S., Terada,Y. und Erikson,R.L. (2002). Phosphorylation of threonine 210 and the role of serine 137 in the regulation of mammalian polo-like kinase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44115-44120.
- Jones,L., Ratcliff,F. und Baulcombe,D.C. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.*, **11**, 747-757.
- Jorgensen,R. (1990). Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.*, **8**, 340-344.
- Jorgensen,R.A., Cluster,P.D., English,J., Que,Q. und Napoli,C.A. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 957-973.
- Karn,T., Holtrich,U., Wolf,G., Hock,B., Strebhardt,K. und RubsamenWaigmann,H. (1997). Human SAK related to the PLK/polo family of cell cycle kinases shows high mRNA expression in testis. *Oncology Reports*, **4**, 505-510.
- Kelm,O., Wind,M., Lehmann,W.D. und Nigg,E.A. (2002). Cell cycle-regulated phosphorylation of the *Xenopus* polo-like kinase Plx1. *J. Biol. Chem.*, **277**, 25247-25256.
- Ketting,R.F., Fischer,S.E., Bernstein,E., Sijen,T., Hannon,G.J. und Plasterk,R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.*, **15**, 2654-2659.
- Khvorova,A., Reynolds,A. und Jayasena,S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209-216.
- Kinzler,K.W. und Vogelstein,B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-170.
- Kinzler,K.W. und Vogelstein,B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science*, **280**, 1036-1037.
- Kistner,A., Gossen,M., Zimmermann,F., Jerecic,J., Ullmer,C., Lubbert,H. und Bujard,H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **93**, 10933-10938.
- Kitada,K., Johnson,A.L., Johnston,L.H. und Sugino,A. (1993). A multicopy suppressor gene of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cell cycle mutant gene *dbf4* encodes a protein kinase and is identified as CDC5. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4445-4457.
- Knecht,R., Elez,R., Oechler,M., Solbach,C., von Ilberg,C. und Strebhardt,K. (1999). Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res*, **59**, 2794-2797.
- Knecht,R., Oberhauser,C. und Strebhardt,K. (2000). PLK (polo-like kinase), a new prognostic marker for oropharyngeal carcinomas. *Int. J. Cancer*, **89**, 535-536.

- Kneisel,L., Strebhardt,K., Bernd,A., Wolter,M., Binder,A. und Kaufmann,R. (2002). Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J. Cutan. Pathol.*, **29**, 354-358.
- Knight,S.W. und Bass,B.L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **293**, 2269-2271.
- Koretz,K., Schlag,P. und Moller,P. (1990). Expression of epidermal growth factor receptor in normal colorectal mucosa, adenoma, and carcinoma. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, **416**, 343-349.
- Kumagai,A. und Dunphy,W.G. (1996). Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science*, **273**, 1377-1380.
- Kunath,T., Gish,G., Lickert,H., Jones,N., Pawson,T. und Rossant,J. (2003). Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 559-561.
- Kunkel,G.R. und Pederson,T. (1988). Upstream elements required for efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used. *Genes Dev.*, **2**, 196-204.
- Kunkel,G.R. und Pederson,T. (1989). Transcription of a human U6 small nuclear RNA gene in vivo withstands deletion of intragenic sequences but not of an upstream TATATA box. *Nucleic Acids Res*, **17**, 7371-7379.
- Labow,M.A., Baim,S.B., Shenk,T. und Levine,A.J. (1990). Conversion of the lac repressor into an allosterically regulated transcriptional activator for mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 3343-3356.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lake,R.J. und Jelinek,W.R. (1993). Cell cycle- and terminal differentiation-associated regulation of the mouse mRNA encoding a conserved mitotic protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 7793-7801.
- Lane,H.A. und Nigg,E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.*, **135**, 1701-1713.
- Layzer,J.M., McCaffrey,A.P., Tanner,A.K., Huang,Z., Kay,M.A. und Sullenger,B.A. (2004). In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA*, **10**, 766-771.
- Lederer,T., Kintrup,M., Takahashi,M., Sum,P.E., Ellestad,G.A. und Hillen,W. (1996). Tetracycline analogs affecting binding to Tn10-Encoded Tet repressor trigger the same mechanism of induction. *Biochemistry*, **35**, 7439-7446.
- Lee,K.S. und Erikson,R.L. (1997). Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 3408-3417.
- Lee,K.S., Grenfell,T.Z., Yarm,F.R. und Erikson,R.L. (1998). Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**, 9301-9306.
- Lee,K.S., Yuan,Y.L., Kuriyama,R. und Erikson,R.L. (1995). Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 7143-7151.

- Lee,N.S., Dohjima,T., Bauer,G., Li,H., Li,M.J., Ehsani,A., Salvaterra,P. und Rossi,J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 500-505.
- Lee,R.C., Feinbaum,R.L. und Ambros,V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
- Lemoine,N.R. (1994). Molecular biology of breast cancer. *Ann. Oncol.*, **5 Suppl 4**, 31-37.
- Leppa,S. und Sistonen,L. (1997). Heat shock response--pathophysiological implications. *Ann. Med.*, **29**, 73-78.
- Lescure,A., Carbon,P. und Krol,A. (1991). The different positioning of the proximal sequence element in the *Xenopus* RNA polymerase II and III snRNA promoters is a key determinant which confers RNA polymerase III specificity. *Nucleic Acids Res*, **19**, 435-441.
- Lewis,D.L., Hagstrom,J.E., Loomis,A.G., Wolff,J.A. und Herweijer,H. (2002). Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat. Genet.*, **32**, 107-108.
- Li,L., Lin,X., Staver,M., Shoemaker,A., Semizarov,D., Fesik,S.W. und Shen,Y. (2005). Evaluating hypoxia-inducible factor-1alpha as a cancer therapeutic target via inducible RNA interference in vivo. *Cancer Res*, **65**, 7249-7258.
- Lin,C.Y., Madsen,M.L., Yarm,F.R., Jang,Y.J., Liu,X. und Erikson,R.L. (2000). Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **97**, 12589-12594.
- Lipardi,C., Wei,Q. und Paterson,B.M. (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, **107**, 297-307.
- Liu,F., Stanton,J.J., Wu,Z. und Piwnicka-Worms,H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 571-583.
- Liu,X. und Erikson,R.L. (2002). Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **99**, 8672-8676.
- Liu,X. und Erikson,R.L. (2003). Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 5789-5794.
- Liu,X., Lei,M. und Erikson,R.L. (2006). Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 2093-2108.
- Liu,X., Lin,C.Y., Lei,M., Yan,S., Zhou,T. und Erikson,R.L. (2005). CCT chaperonin complex is required for the biogenesis of functional Plk1. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 4993-5010.
- Liu,X., Zhou,T., Kuriyama,R. und Erikson,R.L. (2004). Molecular interactions of Polo-like-kinase 1 with the mitotic kinesin-like protein CHO1/MKLP-1. *J. Cell Sci.*, **117**, 3233-3246.
- Llamazares,S., Moreira,A., Tavares,A., Girdham,C., Spruce,B.A., Gonzalez,C., Karess,R.E., Glover,D.M. und Sunkel,C.E. (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **5**, 2153-2165.
- Lobo,S.M., Ifill,S. und Hernandez,N. (1990). cis-acting elements required for RNA polymerase II and III transcription in the human U2 and U6 snRNA promoters. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2891-2899.

- Love,J., Allen,G.C., Gatz,C. und Thompson,W.F. (2002). Differential Top10 promoter regulation by six tetracycline analogues in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1871-1877.
- Luukkonen,B.G. und Seraphin,B. (1998). Construction of an in vivo-regulated U6 snRNA transcription unit as a tool to study U6 function. *RNA*, **4**, 231-238.
- Margolin,J.F., Friedman,J.R., Meyer,W.K., Vissing,H., Thiesen,H.J. und Rauscher,F.J., III (1994). Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **91**, 4509-4513.
- Mark,C., Abrink,M. und Hellman,L. (1999). Comparative analysis of KRAB zinc finger proteins in rodents and man: Evidence for several evolutionarily distinct subfamilies of KRAB zinc finger genes. *Dna and Cell Biology*, **18**, 381-396.
- Marshall,C.J. (1994). Signal transduction. Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature*, **367**, 686.
- Martinez,L.A., Naguibneva,I., Lehrmann,H., Vervisch,A., Tchenio,T., Lozano,G. und Harel-Bellan,A. (2002). Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **99**, 14849-14854.
- Masclaux,F., Charpentreau,M., Takahashi,T., Pont-Lezica,R. und Galaud,J.P. (2004). Gene silencing using a heat-inducible RNAi system in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 364-369.
- Matsukura,S., Jones,P.A. und Takai,D. (2003). Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e77.
- McCaffrey,A.P., Meuse,L., Pham,T.T., Conklin,D.S., Hannon,G.J. und Kay,M.A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature*, **418**, 38-39.
- McCarthy, C. Chromas Version 1.45. [1.45]. (2001). School of Health Sciences, Griffith University, Southport/AUS. Computer Program
- McCoy,M.L., Mueller,C.R. und Roskelley,C.D. (2003). The role of the breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in sporadic epithelial ovarian cancer. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **1**, 72.
- McInnes,C., Mazumdar,A., Mezna,M., Meades,C., Midgley,C., Scaerou,F., Carpenter,L., Mackenzie,M., Taylor,P., Walkinshaw,M., Fischer,P.M. und Glover,D. (2006). Inhibitors of Polo-like kinase reveal roles in spindle-pole maintenance. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 608-617.
- McManus,M.T., Petersen,C.P., Haines,B.B., Chen,J. und Sharp,P.A. (2002). Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA*, **8**, 842-850.
- McMurry,L., Petrucci,R.E., Jr. und Levy,S.B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **77**, 3974-3977.
- McNamara,J.O., Andrechek,E.R., Wang,Y., Viles,K.D., Rempel,R.E., Gilboa,E., Sullenger,B.A. und Giangrande,P.H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1005-1015.
- Meister,G., Landthaler,M., Dorsett,Y. und Tuschl,T. (2004). Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*, **10**, 544-550.

- Mikloska,Z. und Cunningham,A.L. (1998). Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J. Gen. Virol.*, **79** (Pt 2), 353-361.
- Milde-Langosch,K. (2005). The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur. J. Cancer*, **41**, 2449-2461.
- Minakuchi,Y., Takeshita,F., Kosaka,N., Sasaki,H., Yamamoto,Y., Kouno,M., Honma,K., Nagahara,S., Hanai,K., Sano,A., Kato,T., Terada,M. und Ochiya,T. (2004). Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*, **32**, e109.
- Mittal,V., Cleary,M.A., Herr,W. und Hernandez,N. (1996). The Oct-1 POU-specific domain can stimulate small nuclear RNA gene transcription by stabilizing the basal transcription complex SNAPc. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1955-1965.
- Molinari,M. (2000). Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.*, **33**, 261-274.
- Moosmann,P., Georgiev,O., Thiesen,H.J., Hagmann,M. und Schaffner,W. (1997). Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor. *Biol. Chem.*, **378**, 669-677.
- Moshe,Y., Boulaire,J., Pagano,M. und Hershko,A. (2004). Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **101**, 7937-7942.
- Mülhardt,C. (2003a). Northern Blot. In Mülhardt,C. (Ed.), *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, pp. 69-70.
- Mülhardt,C. (2003b). Southern Blot. In Mülhardt,C. (Ed.), *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, pp. 65-68.
- Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G. und Erlich,H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Mundt,K.E., Golsteyn,R.M., Lane,H.A. und Nigg,E.A. (1997). On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **239**, 377-385.
- Murphy,S., Di Liegro,C. und Melli,M. (1987). The in vitro transcription of the 7SK RNA gene by RNA polymerase III is dependent only on the presence of an upstream promoter. *Cell*, **51**, 81-87.
- Murphy,S., Pierani,A., Scheidereit,C., Melli,M. und Roeder,R.G. (1989). Purified octamer binding transcription factors stimulate RNA polymerase III--mediated transcription of the 7SK RNA gene. *Cell*, **59**, 1071-1080.
- Murphy,S., Yoon,J.B., Gerster,T. und Roeder,R.G. (1992). Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 3247-3261.

- Myslinski,E., Ame,J.C., Krol,A. und Carbon,P. (2001). An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2502-2509.
- Naito, Y., Yamada, T., Ui-Tei, K., Morishita, S. und Saigo, K. (2004). siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res*, **32**, W124-W129.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. und Nishida, E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.*, **278**, 25277-25280.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E. A., Mayer, T. U. und Barr, F. A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **162**, 863-875.
- Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Tanaka, M., Kuroda, J., Sato, K., Yokota, A., Segawa, H., Toda, Y., Kageyama, S., Yoshiki, T., Okada, Y. und Maekawa, T. (2005). Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J. Clin. Invest.*, **115**, 978-985.
- Noonberg, S. B., Scott, G. K. und Benz, C. C. (1996). Evidence of post-transcriptional regulation of U6 small nuclear RNA. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10477-10481.
- Ohkawa, J. und Taira, K. (2000). Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. *Hum. Gene Ther.*, **11**, 577-585.
- Ohkura, H., Hagan, I. M. und Glover, D. M. (1995). The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.*, **9**, 1059-1073.
- Ohno-Matsui, K., Hirose, A., Yamamoto, S., Saikia, J., Okamoto, N., Gehlbach, P., Duh, E. J., Hackett, S., Chang, M., Bok, D., Zack, D. J. und Campochiaro, P. A. (2002). Inducible expression of vascular endothelial growth factor in adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment. *Am. J. Pathol.*, **160**, 711-719.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. und Hinrichs, W. (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 215-219.
- Ouyang, B., Pan, H., Lu, L., Li, J., Stambrook, P., Li, B. und Dai, W. (1997). Human Prk is a conserved protein serine/threonine kinase involved in regulating M phase functions. *J. Biol. Chem.*, **272**, 28646-28651.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J. und Conklin, D. S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, **16**, 948-958.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. und Birchler, J. A. (1997). Cosuppression in *Drosophila*: gene silencing of Alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell*, **90**, 479-490.
- Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M. und Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.*, **16**, 4738-4745.
- Parker, L. L., Atherton-Fessler, S. und Piwnicka-Worms, H. (1992). p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 2917-2921.

- Paul,C.P., Good,P.D., Winer,I. und Engelke,D.R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 505-508.
- Paule,M.R. und White,R.J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1283-1298.
- Pengue,G., Calabro,V., Bartoli,P.C., Pagliuca,A. und Lania,L. (1994). Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2908-2914.
- Peters,J.M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell*, **9**, 931-943.
- Peters,U., Cherian,J., Kim,J.H., Kwok,B.H. und Kapoor,T.M. (2006). Probing cell-division phenotype space and Polo-like kinase function using small molecules. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 618-626.
- Poy,M.N., Eliasson,L., Krutzfeldt,J., Kuwajima,S., Ma,X., Macdonald,P.E., Pfeffer,S., Tuschl,T., Rajewsky,N., Rorsman,P. und Stoffel,M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, **432**, 226-230.
- Preisinger,C., Korner,R., Wind,M., Lehmann,W.D., Kopajtich,R. und Barr,F.A. (2005). Plk1 docking to GRASP65 phosphorylated by Cdk1 suggests a mechanism for Golgi checkpoint signalling. *EMBO J.*, **24**, 753-765.
- Prins,J., De Vries,E.G. und Mulder,N.H. (1993). The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res*, **13**, 1373-1385.
- Que,Q., Wang,H.Y., English,J.J. und Jorgensen,R.A. (1997). The Frequency and Degree of Cosuppression by Sense Chalcone Synthase Transgenes Are Dependent on Transgene Promoter Strength and Are Reduced by Premature Nonsense Codons in the Transgene Coding Sequence. *Plant Cell*, **9**, 1357-1368.
- Reagan-Shaw,S. und Ahmad,N. (2005). Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer. *FASEB J.*, **19**, 611-613.
- Reynolds,A., Leake,D., Boese,Q., Scaringe,S., Marshall,W.S. und Khvorova,A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 326-330.
- Romano,N. und Macino,G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.*, **6**, 3343-3353.
- Roshak,A.K., Capper,E.A., Imburgia,C., Fornwald,J., Scott,G. und Marshall,L.A. (2000). The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal.*, **12**, 405-411.
- Rossi,F.M., Guicherit,O.M., Spicher,A., Kringstein,A.M., Fatyol,K., Blakely,B.T. und Blau,H.M. (1998). Tetracycline-regulatable factors with distinct dimerization domains allow reversible growth inhibition by p16. *Nat. Genet.*, **20**, 389-393.
- Rubinson,D.A., Dillon,C.P., Kwiatkowski,A.V., Sievers,C., Yang,L., Kopinja,J., Rooney,D.L., Ihrig,M.M., McManus,M.T., Gertler,F.B., Scott,M.L. und Van Parijs,L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat. Genet.*, **33**, 401-406.

- Ryu,J.R., Olson,L.K. und Arnosti,D.N. (2001). Cell-type specificity of short-range transcriptional repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**, 12960-12965.
- Saez,E., No,D., West,A. und Evans,R.M. (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 608-616.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B. und Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. und Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- Sanger,F., Nicklen,S. und Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **74**, 5463-5467.
- Saxena,S., Jonsson,Z.O. und Dutta,A. (2003). Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 44312-44319.
- Schiebel,W., Pelissier,T., Riedel,L., Thalmeir,S., Schiebel,R., Kempe,D., Lottspeich,F., Sanger,H.L. und Wassenegger,M. (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell*, **10**, 2087-2101.
- Schlegel,J., Stumm,G., Brandle,K., Merdes,A., Mechttersheimer,G., Hynes,N.E. und Kiessling,M. (1994). Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J. Neurooncol.*, **22**, 201-207.
- Schraml,P., Bucher,C., Bissig,H., Nocito,A., Haas,P., Wilber,K., Seelig,S., Kononen,J., Mihatsch,M.J., Dirnhofer,S. und Sauter,G. (2003). Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. *J. Pathol.*, **200**, 375-382.
- Schwarz,D.S., Hutvagner,G., Du,T., Xu,Z., Aronin,N. und Zamore,P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, **115**, 199-208.
- Seong,Y.S., Kamijo,K., Lee,J.S., Fernandez,E., Kuriyama,R., Miki,T. und Lee,K.S. (2002). A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 32282-32293.
- Sijen,T., Fleenor,J., Simmer,F., Thijssen,K.L., Parrish,S., Timmons,L., Plasterk,R.H. und Fire,A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, **107**, 465-476.
- Silva,J.M., Sachidanandam,R. und Hannon,G.J. (2003). Free energy lights the path toward more effective RNAi. *Nat. Genet.*, **35**, 303-305.
- Simizu,S. und Osada,H. (2000). Mutations in the Plk gene lead to instability of Plk protein in human tumour cell lines. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 852-854.
- Simmons,D.L., Neel,B.G., Stevens,R., Evett,G. und Erikson,R.L. (1992). Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 4164-4169.
- Skroch,P., Buchman,C. und Karin,M. (1993). Regulation of human and yeast metallothionein gene transcription by heavy metal ions. *Prog. Clin Biol. Res*, **380**, 113-128.

- Smardon,A., Spoecker,J.M., Stacey,S.C., Klein,M.E., Mackin,N. und Maine,E.M. (2000). EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr. Biol.*, **10**, 169-178.
- Song,E., Zhu,P., Lee,S.K., Chowdhury,D., Kussman,S., Dykxhoorn,D.M., Feng,Y., Palliser,D., Weiner,D.B., Shankar,P., Marasco,W.A. und Lieberman,J. (2005). Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 709-717.
- Soutschek,J., Akinc,A., Bramlage,B., Charisse,K., Constien,R., Donoghue,M., Elbashir,S., Geick,A., Hadwiger,P., Harborth,J., John,M., Kesavan,V., Lavine,G., Pandey,R.K., Racie,T., Rajeev,K.G., Rohl,I., Toudjarska,I., Wang,G., Wuschko,S., Bumcrot,D., Kotliansky,V., Limmer,S., Manoharan,M. und Vornlocher,H.P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, **432**, 173-178.
- Spankuch,B., Matthes,Y., Knecht,R., Zimmer,B., Kaufmann,M. und Strebhardt,K. (2004). Cancer inhibition in nude mice after systemic application of U6 promoter-driven short hairpin RNAs against PLK1. *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 862-872.
- Spankuch-Schmitt,B., Bereiter-Hahn,J., Kaufmann,M. und Strebhardt,K. (2002a). Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **94**, 1863-1877.
- Spankuch-Schmitt,B., Wolf,G., Solbach,C., Loibl,S., Knecht,R., Stegmuller,M., von Minckwitz,G., Kaufmann,M. und Strebhardt,K. (2002b). Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene*, **21**, 3162-3171.
- Stankovic,T., Stewart,G.S., Byrd,P., Fegan,C., Moss,P.A. und Taylor,A.M. (2002). ATM mutations in sporadic lymphoid tumours. *Leuk. Lymphoma*, **43**, 1563-1571.
- Stebbins,M.J., Urlinger,S., Byrne,G., Bello,B., Hillen,W. und Yin,J.C. (2001). Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 10775-10780.
- Steeg,P.S. und Zhou,Q. (1998). Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, **52**, 17-28.
- Stothard,P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, **28**, 1102-+.
- Strebhardt,K., Kneisel,L., Linhart,C., Bernd,A. und Kaufmann,R. (2000). Prognostic value of pololike kinase expression in melanomas. *JAMA*, **283**, 479-480.
- Strebhardt,K. und Ullrich,A. (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 321-330.
- Sui,G., Soohoo,C., Affar,e.B., Gay,F., Shi,Y., Forrester,W.C. und Shi,Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 5515-5520.
- Sumara,I., Gimenez-Abian,J.F., Gerlich,D., Hirota,T., Kraft,C., de la,T.C., Ellenberg,J. und Peters,J.M. (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr. Biol.*, **14**, 1712-1722.
- Sumara,I., Vorlauffer,E., Stukenberg,P.T., Kelm,O., Redemann,N., Nigg,E.A. und Peters,J.M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell*, **9**, 515-525.

- Sun,C.H. und Tai,J.H. (2000). Development of a tetracycline controlled gene expression system in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **105**, 51-60.
- Sunkel,C.E. und Glover,D.M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.*, **89 (Pt 1)**, 25-38.
- Takahashi,M., Altschmied,L. und Hillen,W. (1986). Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. Evidence for divalent metal ion requirement and energy transfer. *J. Mol. Biol.*, **187**, 341-348.
- Takahashi,T., Sano,B., Nagata,T., Kato,H., Sugiyama,Y., Kunieda,K., Kimura,M., Okano,Y. und Saji,S. (2003). Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci.*, **94**, 148-152.
- Taulli,R., Scuoppo,C., Bersani,F., Accornero,P., Forni,P.E., Miretti,S., Grinza,A., Allegra,P., Schmitt-Ney,M., Crepaldi,T. und Ponzetto,C. (2006). Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*, **66**, 4742-4749.
- Thiesen,H.J., Bellefroid,E., Revelant,O. und Martial,J.A. (1991). Conserved KRAB protein domain identified upstream from the zinc finger region of Kox 8. *Nucleic Acids Res*, **19**, 3996.
- Timmons,L. und Fire,A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, **395**, 854.
- Tiscornia,G., Singer,O., Ikawa,M. und Verma,I.M. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 1844-1848.
- Tiscornia,G., Tergaonkar,V., Galimi,F. und Verma,I.M. (2004). CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 7347-7351.
- Towbin,H., Staehelin,T. und Gordon,J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **76**, 4350-4354.
- Toyoshima-Morimoto,F., Taniguchi,E. und Nishida,E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.*, **3**, 341-348.
- Toyoshima-Morimoto,F., Taniguchi,E., Shinya,N., Iwamatsu,A. und Nishida,E. (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature*, **410**, 215-220.
- Tuschl,T., Zamore,P.D., Lehmann,R., Bartel,D.P. und Sharp,P.A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.*, **13**, 3191-3197.
- Urlinger,S., Baron,U., Thellmann,M., Hasan,M.T., Bujard,H. und Hillen,W. (2000a). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **97**, 7963-7968.
- Urlinger,S., Helbl,V., Guthmann,J., Pook,E., Grimm,S. und Hillen,W. (2000b). The p65 domain from NF-kappaB is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system. *Gene*, **247**, 103-110.
- van de Wetering,M., Oving,I., Muncan,V., Pon Fong,M.T., Brantjes,H., van Leenen,D., Holstege,F.C., Brummelkamp,T.R., Agami,R. und Clevers,H. (2003). Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.*, **4**, 609-615.

- van Vugt,M.A., Bras,A. und Medema,R.H. (2004a). Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol. Cell*, **15**, 799-811.
- van Vugt,M.A., van de Weerd,B.C., Vader,G., Janssen,H., Calafat,J., Klompmaker,R., Wolthuis,R.M. und Medema,R.H. (2004b). Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 36841-36854.
- Ventura,A., Meissner,A., Dillon,C.P., McManus,M., Sharp,P.A., Van Parijs,L., Jaenisch,R. und Jacks,T. (2004). Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 10380-10385.
- Vogelstein,B. und Kinzler,K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.*, **10**, 789-799.
- Vogelstein,B., Lane,D., und Levine,A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Vogt,P.K. (2001). Jun, the oncoprotein. *Oncogene*, **20**, 2365-2377.
- Walter,S.A., Cutler,R.E., Jr., Martinez,R., Gishizky,M. und Hill,R.J. (2003). Stk10, a new member of the polo-like kinase family highly expressed in hematopoietic tissue. *J. Biol. Chem.*, **278**, 18221-18228.
- Wan,P.T., Garnett,M.J., Roe,S.M., Lee,S., Niculescu-Duvaz,D., Good,V.M., Jones,C.M., Marshall,C.J., Springer,C.J., Barford,D. und Marais,R. (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, **116**, 855-867.
- Wang,L. und Mu,F.Y. (2004). A Web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. *Bioinformatics*, **20**, 1818-1820.
- Wang,S. und El Deiry,W.S. (2004). Inducible silencing of KILLER/DR5 in vivo promotes bioluminescent colon tumor xenograft growth and confers resistance to chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, **64**, 6666-6672.
- Wasch,R. und Engelbert,D. (2005). Anaphase-promoting complex-dependent proteolysis of cell cycle regulators and genomic instability of cancer cells. *Oncogene*, **24**, 1-10.
- Watanabe,N., Arai,H., Nishihara,Y., Taniguchi,M., Watanabe,N., Hunter,T. und Osada,H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 4419-4424.
- Weichert,W., Kristiansen,G., Winzer,K.J., Schmidt,M., Gekeler,V., Noske,A., Muller,B.M., Niesporek,S., Dietel,M. und Denkert,C. (2005). Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch.*, **446**, 442-450.
- Weinstat-Saslow,D., Merino,M.J., Manrow,R.E., Lawrence,J.A., Bluth,R.F., Wittenbel,K.D., Simpson,J.F., Page,D.L. und Steeg,P.S. (1995). Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nat. Med.*, **1**, 1257-1260.
- Welsh,P.L. und King,M.C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 705-713.
- Wells,K.D., Foster,J.A., Moore,K., Pursel,V.G. und Wall,R.J. (1999). Codon optimization, genetic insulation, and an rtTA reporter improve performance of the tetracycline switch. *Transgenic Res.*, **8**, 371-381.

- Wightman,B., Ha,I. und Ruvkun,G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, **75**, 855-862.
- Williams,B.R. (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 509-513.
- Witzgall,R., O'Leary,E., Leaf,A., Onaldi,D. und Bonventre,J.V. (1994). The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 4514-4518.
- Wiznerowicz,M. und Trono,D. (2003). Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.*, **77**, 8957-8961.
- Wolf,G., Elez,R., Doermer,A., Holtrich,U., Ackermann,H., Stutte,H.J., Altmannsberger,H.M., Rubsamen-Waigmann,H. und Strebhardt,K. (1997). Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, **14**, 543-549.
- Xia,H., Mao,Q., Paulson,H.L. und Davidson,B.L. (2002). siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1006-1010.
- Xie,S., Xie,B., Lee,M.Y. und Dai,W. (2005). Regulation of cell cycle checkpoints by polo-like kinases. *Oncogene*, **24**, 277-286.
- Yaffe,M.B. und Cantley,L.C. (2000). Mapping specificity determinants for protein-protein association using protein fusions and random peptide libraries. *Methods Enzymol.*, **328**, 157-170.
- Yamaguchi,A., Iwasaki-Ohba,Y., Ono,N., Kaneko-Ohdera,M. und Sawai,T. (1991). Stoichiometry of metal-tetracycline/H⁺ antiport mediated by transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **282**, 415-418.
- Yamaguchi,A., Udagawa,T. und Sawai,T. (1990). Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4809-4813.
- Yan,S., Myler,P.J. und Stuart,K. (2001). Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **112**, 61-69.
- Yano,J., Hirabayashi,K., Nakagawa,S., Yamaguchi,T., Nogawa,M., Kashimori,I., Naito,H., Kitagawa,H., Ishiyama,K., Ohgi,T. und Irimura,T. (2004). Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 7721-7726.
- Yao,F., Svensjo,T., Winkler,T., Lu,M., Eriksson,C. und Eriksson,E. (1998). Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.*, **9**, 1939-1950.
- Yarden,Y. und Ullrich,A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 443-478.
- Yarm,F.R. (2002). Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 6209-6221.
- Yoon,J.B., Murphy,S., Bai,L., Wang,Z. und Roeder,R.G. (1995). Proximal sequence element-binding transcription factor (PTF) is a multisubunit complex required for transcription of both RNA polymerase II- and RNA polymerase III-dependent small nuclear RNA genes. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 2019-2027.

- Yu,J. und McMahon,A.P. (2006). Reproducible and inducible knockdown of gene expression in mice. *Genesis.*, **44**, 252-261.
- Yu,J.Y., DeRuiter,S.L. und Turner,D.L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 6047-6052.
- Yuan,J., Eckerdt,F., Bereiter-Hahn,J., Kurunci-Csacsco,E., Kaufmann,M. und Strebhardt,K. (2002). Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene*, **21**, 8282-8292.
- Yuan,J., Horlin,A., Hock,B., Stutte,H.J., Rubsamen-Waigmann,H. und Strebhardt,K. (1997). Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am. J. Pathol.*, **150**, 1165-1172.
- Zamore,P.D., Tuschl,T., Sharp,P.A. und Bartel,D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zhang,L., Yang,N., Mohamed-Hadley,A., Rubin,S.C. und Coukos,G. (2003). Vector-based RNAi, a novel tool for isoform-specific knock-down of VEGF and anti-angiogenesis gene therapy of cancer. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **303**, 1169-1178.
- Zhang,X., Shan,P., Jiang,D., Noble,P.W., Abraham,N.G., Kappas,A. und Lee,P.J. (2004). Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 10677-10684.
- Zhou,T., Aumais,J.P., Liu,X., Yu-Lee,L.Y. und Erikson,R.L. (2003). A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis. *Dev. Cell*, **5**, 127-138.
- Zor,T. und Selinger,Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.*, **236**, 302-308.

8 PUBLIKATIONEN

Matthess, Y., **Kappel, S.***, Spänkuch, B., Zimmer, B., Kaufmann, M. und Strebhardt, K. (2005). Conditional inhibition of cancer cell proliferation by tetracycline-responsive H1 promoter-driven silencing of PLK1. **Oncogene** 24 (18), 2973-2980. * equal contribution

Eckerdt, F., Yuan, J., Saxena, K., Martin, B., **Kappel, S.**, Lindenau, C., Krämer, A., Naumann, S., Daum, S., Fischer, G., Dikic, I., Kaufmann, M. und Strebhardt, K. (2005). Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. **Journal of Biological Chemistry** 280 (44), 36575-36583.

Kappel, S., Matthess, Y., Zimmer, B., Kaufmann, M. und Strebhardt, K. (2006). Tumor inhibition by genomically integrated inducible RNAi-cassettes. **Nucleic Acids Research** 34 (16), 4527-4536.

9 DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt für das mir entgegengebrachte Vertrauen beim Überlassen des Themas dieser Arbeit. Seine hervorragende Betreuung und seine kritischen Denkanstöße unterstützten ein erfolgreiches Umsetzen des Projektes. Weiterhin gebührt ihm großer Dank für die Finanzierung des Projektes in wirtschaftlich schwierigeren Phasen.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bereiter-Hahn möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung dieser Arbeit im Rahmen des Fachbereichs Biologie der Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt und für das Erstellen des Gutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Manfred Kaufmann danke ich sehr für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel, wodurch die Möglichkeit bestand, diese Arbeit im molekularbiologischen Labor des Zentrums für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitäts-Klinik Frankfurt durchführen zu können.

Besonderer Dank gebührt Herrn Diplom-Biologe Yves Matthess, dessen projektspezifische Zusammenarbeit entscheidende Denkanstöße gab. Für die Durchführung dieser Arbeit stellte dies eine große Hilfe dar.

Bei Frau Brigitte Zimmer möchte ich mich sehr herzlich für die technische Umsetzung zahlreicher Versuche bedanken. Ihre Erfahrung beim Arbeiten mit radioaktiven Isotopen, gepaart mit einem geschickten Händchen, trugen sehr zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die Betreuung der Mäuse aus den Xenograft-Versuchen möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeitern der Zentralen Forschungseinrichtung des Universitäts-Klinikums Frankfurt bedanken. Besonderer Dank an Frau Christa Tandi und Frau Kirsten Frank für ihre Assistenz bei der Anästhesie der Tiere und der Inokulierung von Tumorzellen.

Des weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitgliedern des molekularbiologischen / onkologischen Labors der Frauenklinik des Uni-Klinikums Frankfurt bedanken, ohne deren Mitwirken die Durchführung eines solchen Projektes nicht möglich gewesen wäre. An dieser Stelle möchte ich die Arbeit der Technischen Assistentinnen

hervorheben, deren unermüdlicher Einsatz den größten Teil zum Funktionieren eines wissenschaftlichen Labors beiträgt. In diesem Zusammenhang einen besonderen Dank an Frau Andrea Krämer. Der unterstützende Beitrag anderer Arbeitsgruppenmitglieder soll dadurch in keiner Weise geschmälert werden. Deshalb vielen herzlichen Dank an Dr. rer. nat. Bernd Martin, Dr. med. Juping Yuan, Dr. phil. nat. Birgit Spänkuch, Dr. phil. nat. Frank Eckerdt, Dr. phil. nat. Monika Raab, Diplom-Biologe Kai Kleiber, Diplom-Biologe Mourad Sanhaji, Elisabeth Kurunci-Csacsco, Christine Lindenau, Annetraut Greiner, Susanne Roth, Katharina Brinkmann, Rita Hilbig-Bartsch, Steffen Naumann, Katharina Sommer, Marvin Ponnath, Aresu Gorgin, Annabelle Wiesner, Marc Roller, Timo Faltus, Ilja Androic, Nina Kreis, Christina Anthes und an alle, die ich an dieser Stelle vergessen habe.

Den von mir im Rahmen dieser Arbeit betreuten Praktikanten Sarah Keppner und Jörn Barth gebührt ebenso Dank für ihre Unterstützung.

Ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie aussprechen. In erster Linie gebührt meinen Eltern großer Dank. Sie hielten mir über die Jahre hinweg in jeder Beziehung den Rücken frei. Ihre große Unterstützung in guten wie auch in schwierigen Zeiten war eine sehr wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches Studium mit anschließender Promotion.

Abschließend möchte ich mich sehr bei Herrn Diplom-Biologe Matthias Hofmann bedanken, dessen jahrelange Freundschaft mir sehr viel bedeutet. Seine Anwesenheit während unseres parallelen Studiums und die räumliche Nähe seines Arbeitsplatzes während der Promotion waren sowohl für Projekt-bezogene als auch persönliche Angelegenheiten sehr förderlich. In diesem Zusammenhang auch ein herzliches Dankeschön an die Mitarbeiter des B-Labors aus dem Zentrum für Dermatologie und Venerologie der Uni-Klinik Frankfurt. Besonderen Dank an Herrn Dr. phil. nat. Stefan Kippenberger, dessen rührenden Bemühungen ich es zu verdanken habe, in die Arbeitsgruppe von Prof. Strebhardt gelangt zu sein.

Zuletzt möchte ich all meinen Freunden außerhalb des Labors großen Dank aussprechen, die jederzeit für ein tolles Umfeld sorgten und eine wichtige Rolle in meinem Leben spielen.

SVEN KAPPEL

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

- Geburtsdatum: 09. 6. 1977
- Geburtsort: Gelnhausen
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

- 1983-1987** Philipp-Reis-Schule (Grund- und Hauptschule), Gelnhausen
- 1987-1996** Grimmelshausen-Schule (Realgymnasium), Gelnhausen
- Juni 1996** Abitur

ZIVILDIENTST

- 1996-1997** Reha-Klinik Bellevue, Bad Soden-Salmünster

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

- 1997-1999** Grundstudium der Biologie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- August 1999** Diplom-Vorprüfung (Note 1)
- 1999-2001** Hauptstudium der Biologie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- September 2001** Diplomprüfung mit den Schwerpunktfächern: Neurobiologie, Zell- und Entwicklungsbiologie, Tierphysiologie
- 2001-2002** Diplomarbeit mit dem Thema: „Cytomechanische und ionale Faktoren bei der Volumenregulation von Zellen in Kultur“, durchgeführt am Zoologischen Institut, AK Kinematische Zellforschung bei Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn
- Juni 2002** Abschluß des Studiums der Diplom-Biologie (Note 1,1)
- seit Februar 2003** Doktorand im Fachbereich Biowissenschaften am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, in der Arbeitsgruppe Molekulare Gynäkologie unter Leitung von Prof. Dr. Klaus Strebhardt

WISSENSCHAFTLICHE NEBENTÄTIGKEITEN

- 2000-2002** Studentische Hilfskraft für die Veranstaltungen Struktur- und Funktion von Organismen; Tierphysiologischer Kurs
- 2005-2007** Dozent an der Staatlichen Schule für die Ausbildung von Medizinisch-Technischen Assistenten Frankfurt am Main, für das Fach Molekularbiologie (WS 2005/2006 und WS 2006/2007)

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, daß ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 19. 01. 2007

Sven Kappel

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Entwicklung und Etablierung von induzierbaren
RNAi-Systemen zur Regulierung der Expression von
Polo-like Kinase 1 (Plk1) *in vitro* und *in vivo*“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 19. 01. 2007

Sven Kappel