

**Funktionelle Studien zur Hemmung von  
PLK1 (Polo-Like Kinase 1)  
*in vitro* und *in vivo***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Birgit Spänkuch-Schmitt  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt – 2003

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. Müller

Gutachter: Prof. Dr. H. Fasold und Prof. Dr. K. Strebhardt

Datum der Disputation:

## DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. phil. nat. Klaus Strebhardt** für die interessante und überaus aktuelle Themenstellung und die hervorragende Betreuung, Flexibilität, Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei **Herrn Prof. Dr. phil. nat. Hugo Fasold** möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Gutachtens bedanken.

Bei **Herrn Prof. Dr. med. Manfred Kaufmann** möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel im Molekularbiologischen Labor am Zentrum für Gynäkologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main bedanken.

**Herrn Prof. Dr. phil. nat. Jürgen Bereiter-Hahn** möchte ich ganz besonders für die zahlreichen wertvollen Diskussionen am Konfokalen Laserscan-Mikroskop und die damit verbundenen Anregungen und Interpretationen danken.

Bei **Frau Dr. med. Sibylle Loibl** und **Herrn PD Dr. med. Gunter von Minckwitz** möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft in allen Belangen bedanken.

**Herrn Dr. rer. nat. Hanns Ackermann** danke ich für seine hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Weiterhin möchte ich allen **Mitarbeitern am Zentrum für Gynäkologie** am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben, insbesondere den Mitarbeitern des **Molekularbiologischen Labors**: Frank Eckerdt, Dr. Juping Yuan, Lisa Kurunci-Csacsco, Brigitte Hüls, Andrea Krämer, Iris Nieratzky, Manfred Stegmüller, Anne Greiner, Yves Mattheß, Timo Faltus und Steffen Nau-

mann. Ganz besonders gilt mein Dank hier Jutta Bratengeier, Annette Mazet und Oskar Möbert.

Darüber hinaus gilt mein Dank **Frau Kirsten Frank**, **Herrn Dr. Alf Theisen** sowie **Herrn Dr. Martin Kock** aus der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, die die Durchführung der im Rahmen dieser Dissertation notwendigen Tierversuche die ganze Zeit über tatkräftig unterstützt haben und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

## PUBLIKATIONEN, BUCHBEITRÄGE, POSTER UND VORTRÄGE IM RAHMEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT

### Publikationen:

Spänkuch-Schmitt,B., Wolf,G., Solbach,C., Loibl,S., Knecht,R., Stegmüller,M., von Minckwitz,G., Kaufmann,M., Strebhardt,K. 2002. Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells. *Oncogene* 21, 3162-3171.

Spänkuch-Schmitt,B., Bereiter-Hahn,J., Kaufmann,M., Strebhardt,K. 2002. 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.

Spänkuch-Schmitt,B, Mattheß,Y., Strebhardt,K. 2003. Cancer inhibition in nude mice after systemic application of U6 promoter-driven siRNAs targeted against PLK1. *eingereicht.*

### Buchbeitrag:

Strebhardt,K., Spänkuch-Schmitt,B. 2002. Hemmung von Zellzyklus-Regulatoren in der gynäkologischen Therapie. In: Gynäkologie und Geburtshilfe Frankfurt 2002. Hrsg. Kaufmann,M., Ahr,A. symponed Verlag, München.

**Poster:**

“Repression der Aktivität der „polo-like kinase“ durch Antisense-Oligonukleotide induziert vermindertes Wachstum von Krebszellen“, Deutscher Krebskongress in Berlin vom 10. – 14.03.2002 – veröffentlicht in: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Volume 128, Supplement 1, 2002.

“Downregulation of human polo-like kinase activity by antisense oligonucleotides induces growth inhibition in cancer cells“, EMBO-Meeting in Heidelberg vom 20. – 23.04.2002.

“Inhibition of polo-like kinase 1 by antisense oligonucleotides and RNA interference“, AACR-EORTC-Meeting in Frankfurt vom 19. – 22.11.2002 – veröffentlicht in: *European Journal of Cancer*, Volume 38, Supplement 7, 2002.

**Vortrag:**

“Downregulation of human polo-like kinase (PLK) activity by antisense-oligonucleotides inhibits growth of cancer cells“, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) in Düsseldorf vom 10. – 14.09.2002 – veröffentlicht in: *Archives of Gynecology and Obstetrics*, Volume 267, Supplement 1, September 2002.

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis.....   | I         |
| Abbildungsverzeichnis.....  | VI        |
| Tabellenverzeichnis.....  | VIII      |
| Abkürzungsverzeichnis.....  | IX        |
| <br>  |           |
| <b>1. Einleitung und Problemstellung .....</b>  | <b>1</b>  |
| <br>  |           |
| <b>2. Theoretische Grundlagen.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>2.1 Molekulare Mechanismen der Kanzerogenese .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2.2 Der Zellzyklus und seine Kontrollpunkte.....</b>   | <b>7</b>  |
| 2.2.1 Zellzyklusphasen .....  | 7         |
| 2.2.2 Kontrollpunkte im Zellzyklusgeschehen.....  | 8         |
| 2.2.3 DNA-Replikations-Kontrollpunkt (G <sub>2</sub> /M-Transition) .....   | 9         |
| <b>2.3 Die Polo-Like Kinasen (PLK) und ihre Funktion im Zellzyklus .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2.4 Antisense-Strategien in der Anwendung .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>2.5 RNA-Interferenz (RNAi) .....</b>   | <b>21</b> |
| 2.5.1 Allgemeine Grundlagen .....   | 21        |
| 2.5.2 Der RNA-induced silencing complex (RISC) – Mechanismen des<br>Post-Transkriptionellen Gen-Silencings (PTGS) ..... | 22        |
| 2.5.3 Die Struktur der „small interfering“ RNAs (siRNAs) .....  | 23        |
| 2.5.4 Der zweistufige RNA-Interferenz-Mechanismus – DICER und RISC .....  | 24        |
| 2.5.5 Verstärkung des Gen-Silencing-Signals und Verbreitung der RNA-<br>Interferenz.....                                | 29        |
| 2.5.6 Weitere Funktionen des RNAi-Mechanismus .....   | 30        |
| 2.5.7 RNA-Interferenz auf genomischer Ebene.....  | 31        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5.8 Bedeutung der RNA-Interferenz für biologische Systeme.....                              | 32        |
| 2.5.9 Bedeutung der RNAi für die Genforschung .....   | 37        |
| 2.5.10 Funktionsweise von RNAi in Säugetierzellen .....                                       | 38        |
| 2.5.11 Die unspezifischen Antworten auf lange dsRNAs – PKR und das<br>2-5A-System.....        | 41        |
| 2.5.12 Nachteile der siRNAs bzw. Erfolge mit shRNAs .....                                     | 45        |
| 2.5.13 RNAi in Mäusen – die ersten Studien.....   | 49        |
| <b>2.6 U6-Promoter und p<i>Silencer</i><sup>TM</sup> 1.0-U6 siRNA-Expressions-Vektor.....</b> | <b>51</b> |
| <br>  |           |
| <b>3. Zielsetzung .....</b>   | <b>53</b> |
| <br>  |           |
| <b>4. Material und Methoden.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>4.1 Material .....</b>   | <b>57</b> |
| 4.1.1 Laborgeräte .....   | 57        |
| 4.1.2 Verbrauchsmaterialien.....  | 59        |
| 4.1.3 Antikörper, Chemikalien, Primer und Bakterien.....                                      | 60        |
| 4.1.3.1 Antikörper.....   | 60        |
| 4.1.3.2 Chemikalien .....   | 61        |
| 4.1.3.3 Primer .....  | 65        |
| 4.1.3.4 Bakterien .....   | 66        |
| 4.1.4 Testsubstanzen.....   | 66        |
| 4.1.4.1 Antisense-Oligonukleotide (ASOs).....   | 66        |
| 4.1.4.2 Small-interfering RNA (siRNA) .....   | 68        |
| 4.1.5 Plasmide .....  | 69        |
| 4.1.6 Zelllinien und primäre Zellen .....   | 70        |
| 4.1.7 Zellkulturmedien .....  | 70        |
| 4.1.8 Nacktmäuse.....   | 71        |
| 4.1.9 Lösungen .....  | 72        |
| 4.1.9.1 Lösungen für die Klonierung.....  | 72        |
| 4.1.9.2 Lösung für die Transfektion mit DOTAP .....   | 74        |
| 4.1.9.3 Lösungen für die Transfektion mit Plasmid-DNA .....                                   | 74        |
| 4.1.9.4 Lösungen für Western-Blots.....   | 75        |
| 4.1.9.5 Lösungen für Northern-Blots.....  | 77        |
| 4.1.9.6 Lösungen für Southern-Blots .....   | 79        |
| 4.1.9.7 Lösungen für Kinaseassays .....   | 79        |
| 4.1.9.8 Lösung für die Immunfluoreszenz.....  | 81        |
| 4.1.9.9 Lösungen für die Immunhistochemie.....  | 81        |
| <b>4.2 Methoden.....</b>  | <b>82</b> |
| 4.2.1 Zellkultur .....  | 82        |
| 4.2.2 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität.....  | 82        |
| 4.2.3 Herstellung der Plasmide zur Expression von hairpin-RNAs gegen<br>PLK1 .....            | 83        |
| 4.2.3.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....                                | 83        |
| 4.2.3.2 Annealing, Restriktionsverdau und Ligation .....                                      | 84        |



---

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.3.3 Transformation und anschließende Plasmid-Präparation .....  | 87         |
| 4.2.4 Der Nukleaseinhibitor ATA (Aurintricarboxyl-Säure) .....  | 89         |
| 4.2.5 Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden (ASOs) .....  | 90         |
| 4.2.6 Transfektion mit siRNA .....  | 91         |
| 4.2.7 Transfektion mit Expressionsplasmiden .....   | 92         |
| 4.2.8 <i>Ex vivo</i> -Inkubation von Blut aus Nacktmäusen mit der Plasmid-DNA und verschiedenen ATA-Konzentrationen .....     | 93         |
| 4.2.9 Proteinisolierung und Proteinbestimmung nach Bradford .....   | 94         |
| 4.2.10 Western-Blots .....  | 95         |
| 4.2.11 Antikörper-Behandlung der Membran .....  | 97         |
| 4.2.12 Northern-Blots .....   | 98         |
| 4.2.13 Hybridisierung .....   | 100        |
| 4.2.14 Entfernung radioaktiver Sonden von Northern-Blot-Membranen .....   | 103        |
| 4.2.15 Kinase-Assays inklusive Immunpräzipitation .....   | 103        |
| 4.2.16 Immunfluoreszenz-Färbung .....   | 106        |
| 4.2.17 FACScan-Analyse (Fluorescence activated cell sorting; Durchflusszytometrie) .....                                      | 108        |
| 4.2.18 Xenograft-Experimente .....  | 110        |
| 4.2.19 Southern-Blots .....   | 114        |
| 4.2.20 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis der Expressionsplasmide in den Tumoren .....                               | 117        |
| 4.2.21 Immunhistochemische Färbung .....  | 118        |
| 4.2.21.1 MIB-I-/Ki-67-Färbung .....   | 120        |
| 4.2.21.2 PLK1-Färbung .....   | 121        |
| 4.2.22 Quantitative Auswertung der Autoradiogramme und Gele .....   | 122        |
| 4.2.23 Statistische Methoden .....  | 124        |
| <br>  |            |
| <b>5. Ergebnisse .....</b>  | <b>127</b> |
| <b>5.1 Antisense-Oligonukleotidbehandlung verschiedener Krebszelllinien und von Xenograft-Mäusen .....</b>                    | <b>127</b> |
| 5.1.1 Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression nach ASO-Behandlung .....   | 127        |
| 5.1.2 Bestimmung der PLK1-Proteinmenge nach ASO-Behandlung .....  | 131        |
| 5.1.3 Untersuchung der Kinaseaktivität von endogenem PLK1 .....   | 137        |
| 5.1.4 Antiproliferativer Effekt der ASO-Behandlung .....  | 138        |
| 5.1.5 Durchflusszytometrie (FACScan-Analyse) zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach ASO-Behandlung .....                | 145        |
| 5.1.6 Immunfluoreszenzuntersuchung zur Detektion phänotypischer Veränderungen in ASO-behandelten Zellen .....                 | 147        |
| 5.1.7 Xenograft-Experimente .....   | 148        |
| <b>5.2 siRNA-Behandlung verschiedener Krebszelllinien, primärer humaner Mammaepithelzellen und von Xenograft-Mäusen .....</b> | <b>152</b> |
| 5.2.1 Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression nach siRNA-Behandlung .....   | 152        |
| 5.2.2 Bestimmung der PLK1-Proteinmenge nach siRNA-Behandlung .....  | 166        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.3 Bestimmung der Lamin A/C-Proteinmenge nach siRNA-Behandlung .....   | 173        |
| 5.2.4 Untersuchung der Kinaseaktivität von endogenem PLK1 .....   | 176        |
| 5.2.5 Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Detektion von morphologischen Veränderungen bei reduziertem PLK1-Proteinspiegel .....  | 177        |
| 5.2.6 Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Untersuchung der PLK1-Protein-Spiegel in MCF-7-Zellen und in HMECs .....   | 181        |
| 5.2.7 Durchflusszytometrie (FACScan-Analyse) zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung und zur Detektion von Apoptose, Apoptosenachweis mittels DNA-Färbung und Phasenkontrastmikroskopie ..... | 183        |
| 5.2.8 Antiproliferative Wirkung der siRNAs gegen PLK1 auf Krebszelllinien .....   | 188        |
| 5.2.9 Vergleich der Transfektionseffizienzen in MCF-7-Zellen und HMECs .....  | 194        |
| 5.2.10 Xenograft-Experimente mit synthetischer siRNA .....  | 197        |
| <b>5.3 <i>In vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Behandlung von HeLa S3-Zellen mit Expressionsplasmiden für hairpin-RNAs (shRNAs) .....</b>   | <b>199</b> |
| 5.3.1 Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression in HeLa S3-Zellen nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden .....  | 200        |
| 5.3.2 Ermittlung der Proliferation von HeLa S3-Zellen nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden .....  | 203        |
| 5.3.3 Vorversuch zum Xenograft-Experiment: <i>Ex vivo</i> -Bestimmung der Plasmid-DNA-Stabilität in Mäuseblut mit verschiedenen ATA-Konzentrationen .....                                     | 205        |
| 5.3.4 Xenograft-Experiment mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1 .....  | 208        |
| 5.3.5 Northern-Blot-Analyse zur Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression in den HeLa S3-Tumoren nach Beendigung der Therapie mit den Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1 .....     | 213        |
| 5.3.6 Southern-Blot-Analyse der HeLa S3-Tumoren und PCR zum Nachweis der Expressionsplasmide .....  | 215        |
| 5.3.7 Immunhistochemische Färbung von PLK1 und Ki-67 in den Tumoren nach Behandlung mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1 .....   | 216        |
| <b>6. Diskussion .....</b>  | <b>219</b> |
| <b>6.1 Die Bedeutung von PLK1 als Zielgen für die Tumorthherapie .....</b>  | <b>220</b> |
| <b>6.2 Untersuchungen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen PLK1 an verschiedenen Krebszelllinien <i>in vitro</i> und im Xenograft-Experiment</b>  | <b>221</b> |
| 6.2.1 Antisense-Ansätze .....   | 221        |

---

|  |            |
|--|------------|
| 6.2.2 Hemmung der PLK1-Funktion – Spezifität der ASOs.....   | 222        |
| 6.2.3 Der Vorteil von PLK1 in der Antisense-Therapie von humanen<br>Tumorzellen .....  | 224        |
| 6.2.4 Schwierigkeiten bei der Anwendung von ASOs .....   | 225        |
| 6.2.5 Fazit aus den Studien mit Antisense-Oligonukleotiden gegen<br>PLK1 .....   | 227        |
| <b>6.3 Untersuchungen mit siRNAs an Krebszelllinien und an primären<br/>humanen Mammaepithelzellen <i>in vitro</i> und im Xenograft-<br/>Experiment.....</b> | <b>228</b> |
| 6.3.1 Bedeutung von siRNAs für die Hemmung von PLK1 .....  | 228        |
| 6.3.2 Vorteile, Spezifität und differentielle Wirkung von siRNAs gegen<br>PLK1 .....   | 228        |
| 6.3.3 Neue Gesichtspunkte über die Funktion von PLK1 in mitotischen<br>Zellen .....  | 231        |
| 6.3.4 Anwendbarkeit von siRNAs <i>in vivo</i> und mögliche Modifikationen<br>zur Verbesserung der Stabilität .....   | 233        |
| <b>6.4 Untersuchungen mit Expressionsplasmiden an HeLa S3-Zellen <i>in vitro</i><br/>und im Xenograft-Experiment .....</b>                                   | <b>236</b> |
| 6.4.1 Anwendung der Expressionsplasmide für shRNAs gegen PLK1 <i>in<br/>vitro</i> .....  | 237        |
| 6.4.2 Kombination der rekombinanten Plasmide mit ATA <i>ex vivo</i> .....  | 238        |
| 6.4.3 Anwendung der Expressionsplasmide für shRNAs gegen PLK1 <i>in<br/>vivo</i> .....   | 239        |
| 6.4.4 Fazit aus der Vektor-basierten Expression von shRNAs gegen<br>PLK1 .....   | 241        |
| <b>6.5 Schlussfolgerung und Perspektive.....</b>   | <b>242</b> |
| <br>   |            |
| <b>7. Zusammenfassung.....</b>   | <b>245</b> |
| <br>   |            |
| <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>247</b> |

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|               |   |     |
|---------------|---|-----|
| Abbildung 1:  | Mögliche Mechanismen für die Verhinderung von Initiation, Promotion, Progression und Metastasierung.....                                    | 6   |
| Abbildung 2:  | Kontrollpunkte in der Mitose.....   | 9   |
| Abbildung 3:  | Die Familie der Polo-Like Kinasen.....  | 11  |
| Abbildung 4:  | Expressionsmuster von PLK1 im Vergleich zu den Cyclinen.....  | 13  |
| Abbildung 5:  | Lokalisation von PLK1 in sich teilenden HeLa-Zellen.....  | 14  |
| Abbildung 6:  | Multiple Rollen der Polo-Like Kinasen in der Mitose.....  | 15  |
| Abbildung 7:  | Die Rolle von PLK1 an der G <sub>2</sub> /M-Transition.....   | 16  |
| Abbildung 8:  | Das Wirkprinzip der Antisense-Oligonukleotide.....  | 18  |
| Abbildung 9:  | Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotid.....   | 19  |
| Abbildung 10: | Struktur der Domänen von Dicer.....   | 26  |
| Abbildung 11: | Dicer und RISC – der RNAi-Mechanismus.....  | 28  |
| Abbildung 12: | Vergleich stRNA – siRNA.....  | 35  |
| Abbildung 13: | Erweitertes Modell des RNAi-Mechanismus.....  | 37  |
| Abbildung 14: | Gen-Silencing „tools“ in differenzierten kultivierten Zellen.....   | 39  |
| Abbildung 15: | Der PKR-Pathway und das 2-5A-System.....  | 44  |
| Abbildung 16: | Lageplan der verschiedenen gegen PLK1 gerichteten ASOs.....   | 67  |
| Abbildung 17: | Struktur des p <i>Silence</i> <sup>TM</sup> 1.0-U6-Vektors mit Schnittstellen und siRNA sowie Sequenzen für shRNA/PLK1 und shRNA/PLK1S..... | 87  |
| Abbildung 18: | Elutionsprofil der Sonde über die Nick <sup>TM</sup> -Säulen.....   | 102 |
| Abbildung 19: | Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung.....  | 107 |
| Abbildung 20: | Die ABC-Methode zum immunhistochemischen Nachweis von Proteinen ...   | 119 |
| Abbildung 21: | Reduktion der PLK1-mRNA in MDA-MB-435-Zellen durch ASOs.....  | 128 |
| Abbildung 22: | Reduktion der PLK1-mRNA in HeLa S3-Zellen durch ASOs.....   | 129 |
| Abbildung 23: | Reduktion der PLK1-mRNA in A549-Zellen durch ASOs.....  | 130 |
| Abbildung 24: | Reduktion des PLK1-Proteins in MDA-MB-435-Zellen durch verschiedene ASOs.....   | 132 |
| Abbildung 25: | Reduktion des PLK1-Proteins in HeLa S3-Zellen durch ASOs.....   | 133 |
| Abbildung 26: | Reduktion des PLK1-Proteins in A549-Zellen durch ASOs.....  | 134 |
| Abbildung 27: | Konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins in MDA-MB-435-Zellen durch P12.....   | 135 |
| Abbildung 28: | Konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins in HeLa S3-Zellen durch P12.....  | 136 |
| Abbildung 29: | Kinaseassay mit PLK1 aus HeLa S3-Zellen nach ASO-Behandlung.....  | 138 |
| Abbildung 30: | Antiproliferative Wirkung von ASOs auf MDA-MB-435-Zellen.....   | 139 |
| Abbildung 31: | Antiproliferative Wirkung von ASOs auf HeLa S3-Zellen.....  | 141 |
| Abbildung 32: | Antiproliferative Wirkung von ASOs auf A549-Zellen.....   | 142 |
| Abbildung 33: | Konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung von P12 auf MDA-MB-435-Zellen im Vergleich zum HSV-ASO.....                               | 143 |
| Abbildung 34: | Konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung von P12 auf HeLa S3-Zellen im Vergleich zum HSV-ASO.....                                  | 144 |
| Abbildung 35: | Immunfluoreszenzfärbung von A549-Zellen [grün: $\gamma$ -Tubulin].....  | 148 |
| Abbildung 36: | Hemmung des Tumorwachstums im humanen Xenograft-Modell (A549).....  | 149 |
| Abbildung 37: | Immunhistochemische Färbung von PLK1 und MIB-I.....   | 151 |
| Abbildung 38: | Reduktion der PLK1-mRNA in MCF-7-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA.....   | 156 |
| Abbildung 39: | Reduktion der PLK1-mRNA in HeLa S3-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA.....   | 159 |
| Abbildung 40: | Reduktion der PLK1-mRNA in SW-480-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA.....  | 162 |
| Abbildung 41: | Reduktion der PLK1-mRNA in A549-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA.....  | 164 |

|               |  |     |
|---------------|--|-----|
| Abbildung 42: | Reduktion der PLK1-mRNA in HMECs 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA .....  | 165 |
| Abbildung 43: | Reduktion des PLK1-Proteins in MCF-7-Zellen nach Transfektion mit siRNA.....   | 167 |
| Abbildung 44: | Reduktion des PLK1-Proteins in HeLa S3-, SW-480- und A549-Zellen nach Transfektion mit siRNA.....  | 170 |
| Abbildung 45: | Konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins in MCF-7-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1, siRNA4 bzw. siRNA4S ..... | 172 |
| Abbildung 46: | Reduktion des Lamin A/C-Proteins in MCF-7-Zellen und HMECs 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1 .....                               | 175 |
| Abbildung 47: | Kinaseassay mit PLK1 aus MCF-7-Zellen nach siRNA-Behandlung .....  | 177 |
| Abbildung 48: | Immunfluoreszenzfärbung von SW-480-Zellen nach Behandlung mit siRNAs .....   | 179 |
| Abbildung 49: | DAPI-Färbung der MCF-7-Zellen aus den Kulturüberständen .....  | 180 |
| Abbildung 50: | Immunfluoreszenzfärbung von HMECs nach Behandlung mit siRNAs .....   | 181 |
| Abbildung 51: | PLK1-Färbung in MCF-7-Zellen und in HMECs .....  | 183 |
| Abbildung 52: | Zellzyklusverteilung der Krebszelllinien und der primären humanen Mammaepithelzellen nach siRNA-Behandlung .....                           | 185 |
| Abbildung 53: | DNA-Färbung von MCF-7-Zellen und HMECs zum Nachweis von apoptotischen Zellen nach siRNA-Behandlung .....                                   | 186 |
| Abbildung 54: | Phasenkontrastaufnahme von siRNA4-behandelten MCF-7-Zellen.....  | 187 |
| Abbildung 55: | Antiproliferative Wirkung von siRNAs gegen PLK1 in MCF-7-Zellen .....  | 189 |
| Abbildung 56: | Konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation durch siRNA4 in MCF-7-Zellen .....   | 190 |
| Abbildung 57: | Antiproliferative Wirkung von siRNAs gegen PLK1 in SW-480-, HeLa S3- und A549-Zellen.....  | 193 |
| Abbildung 58: | Proliferation von HMECs nach Transfektion mit aufsteigenden Konzentrationen von siRNA4, siRNA1 bzw. siRNA4S .....                          | 194 |
| Abbildung 59: | Oligofectamin-vermittelte Aufnahme Fluorescein-markierter siRNA4 in MCF-7-Zellen verglichen mit HMECs.....                                 | 196 |
| Abbildung 60: | Reduktion der PLK1-mRNA-Expression in HeLa S3-Zellen nach der Transfektion mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1 .....   | 202 |
| Abbildung 61: | Proliferation der HeLa S3-Zellen nach der Transfektion mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1 .....                       | 204 |
| Abbildung 62: | <i>Ex vivo</i> -Analyse der stabilisierenden Wirkung von ATA auf Plasmid-DNA in Mäuseblut mittels Southern-Blot.....                       | 207 |
| Abbildung 63: | Hemmung des Tumorwachstums durch pBS/U6/shRNA/PLK1 <i>in vivo</i> im humanen HeLa S3-Xenograft-Modell .....                                | 210 |
| Abbildung 64: | HeLa S3-Tumorgröße einer pBS/U6/shRNA/PLK1-behandelten Maus [A] im Vergleich zu einer pBS/U6-behandelten Maus [B].....                     | 212 |
| Abbildung 65: | Reduktion der PLK1-mRNA-Expression in HeLa S3-Tumoren nach Behandlung mit dem rekombinanten Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1 .....                | 214 |
| Abbildung 66: | Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der Expressionsplasmide in den Tumoren.....   | 215 |
| Abbildung 67: | PCR zum Nachweis der Expressionsplasmide in den Tumoren .....  | 216 |
| Abbildung 68: | Immunhistochemische Färbung von PLK1 und Ki-67.....  | 218 |

## TABELLENVERZEICHNIS

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Tabelle 1: | Verschiedene klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden ..... | 20  |
| Tabelle 2: | Einsatz von synthetischen siRNAs in Mammalia-Zellen.....            | 41  |
| Tabelle 3: | Silencing-Konstrukte .....  | 48  |
| Tabelle 4: | Sequenzen der eingesetzten ASOs gegen PLK1 und HSV.....             | 68  |
| Tabelle 5: | Zellzyklus-Verteilung in MDA-MB-435-, HeLa S3- und A549-Zellen..... | 146 |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|             |   |
|-------------|---|
| 2-5A        | 2',5'-Oligoadenylat   |
| Abb.        | Abbildung   |
| ABC-Methode | Avidin-Biotin-Enzym-Komplexmethode                                |
| ADP         | Adenosindiphosphat  |
| AEC         | 3-Amino-9-Ethylcarbazol   |
| AGT         | Adenin-Guanin-Cytidin   |
| AK          | Antikörper  |
| ANOVA       | Analysis of Variance  |
| APC         | Anaphase Promoting Complex  |
| ASO         | Antisense-Oligonukleotid  |
| Asp         | Abnormal spindle protein  |
| ATA         | Aurintricarboxylsäure   |
| ATP         | Adenosintriphosphat   |
| BSA         | Bovine Serum Albumine   |
| bp          | Basenpaare  |
| ca.         | circa   |
| Cdc         | Cyclin-dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)                 |
| Ci          | Curie   |
| CI          | Konfidenzintervall  |
| CMV         | Cytomegalovirus   |
| cpm         | counts per minute   |
| CRS         | Cytoplasmic Retention Signal (Cyclin B1)                          |
| CTP         | Cytosintriphosphat  |
| D           | Asparaginsäure  |
| deion.      | deionisiert   |
| DEPC        | Diethylpyrocarbonat   |
| DMEM        | Dulbecco's modified Eagle's Medium                                |
| DMSO        | Dimethylsulfoxid  |
| DOTAP       | N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]N,N,N-trimethylammonium-methylsulfat |

|                  |   |
|------------------|---|
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure  |
| DRBM             | dsRNA-Bindungsmotiv   |
| DRBP76           | Bindungsprotein für doppelsträngige RNA (double-stranded RNA-binding nuclear Protein) |
| dsRBD            | dsRNA-Bindungs-Domäne   |
| dsRNA            | doppelsträngige RNA   |
| DTT              | Dithiothreitol  |
| ECL              | Enhanced Chemiluminescent solution  |
| EDTA             | Ethylendiamintriessigsäure  |
| EGTA             | Ethylenglykol-Bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure                        |
| EIF-2 $\alpha$   | Eukaryontischer Initiationsfaktor-2 $\alpha$  |
| EtOH             | Ethanol   |
| FACS             | fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometer)                             |
| FCS              | Fötales Kälberserum   |
| g                | Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )  |
| GFP              | Green Fluorescent Protein   |
| HBS              | HEPES-buffered Saline   |
| hCG              | humanes Choriogonadotropin  |
| HCl              | Salzsäure   |
| HCV              | Hepatitis C-Virus   |
| HIV              | human immunodeficiency virus  |
| HPV              | Humanpapillomavirus   |
| hr               | Stunde  |
| HRP              | Meerrettichperoxidase (horseradishperoxidase)   |
| HTF              | Human Tissue Factor   |
| IC <sub>50</sub> | inhibitorische Konzentration  |
| Kap.             | Kapitel   |
| kb               | Kilobasen   |
| KCl              | Kaliumchlorid   |
| kDa              | Kilodalton  |
| kg               | Kilogramm   |



---

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| KG                              | Körpergewicht                                |
| Ig                              | Immunglobulin                                |
| l                               | Liter  |
| LD <sub>50</sub>                | letale Dosis, bei der 50% der Tiere tot sind |
| LPS                             | Lipopolysaccharide                           |
| M                               | molar  |
| mA                              | milliampere                                  |
| MCS                             | Multiple Cloning Site                        |
| MeOH                            | Methanol                                     |
| mg                              | milligramm                                   |
| MgCl <sub>2</sub>               | Magnesiumchlorid                             |
| min.                            | Minuten                                      |
| ml                              | milliliter                                   |
| mM                              | millimolar                                   |
| mmol                            | millimol                                     |
| µg                              | mikrogramm                                   |
| µl                              | mikroliter                                   |
| µM                              | mikromolar                                   |
| MOPS                            | 3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure            |
| MPF                             | Mitose Promoting Factor                      |
| NaCl                            | Natriumchlorid                               |
| NaF                             | Natriumfluorid                               |
| NaOH                            | Natriumhydroxid                              |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> | Natriumorthovanadat                          |
| ng                              | nanogramm                                    |
| nM                              | nanomolar                                    |
| o.g.                            | oben genannt                                 |
| PAA                             | Polyacrylamid                                |
| PAZ                             | Piwi-Argonaut-Zwille                         |
| PBS                             | Phosphate Buffered Saline                    |
| PBS-T                           | Phosphate Buffered Saline Tween              |
| PCR                             | Polymerasekettenreaktion                     |

|                |  |
|----------------|--|
| P <sub>i</sub> | anorganisches Phosphat                                     |
| PKR            | RNA-abhängige Proteinkinase (RNA dependent protein kinase) |
| PLK1           | Polo-Like Kinase 1   |
| PMSF           | Phenylmethansulfonylsäure                                  |
| PSKH1          | Protein-Serin-Kinase H1                                    |
| PTGS           | post-transkriptionelles Gen-Silencing                      |
| PVDF           | Polyvinyliden-Difluorid                                    |
| RB             | Runningbuffer  |
| RISC           | RNA-induced silencing complex                              |
| RNA            | Ribonukleinsäure   |
| RNAi           | RNA-Interferenz  |
| RT             | Raumtemperatur   |
| S              | Serin  |
| SDS            | Sodiumdodecylsulfate                                       |
| sec.           | Sekunden   |
| siRNA          | small interfering RNA                                      |
| s.o.           | siehe oben   |
| stRNA          | small temporal RNA   |
| ssRNA          | einzelsträngige RNA  |
| s.u.           | siehe unten  |
| T              | Threonin   |
| Tab.           | Tabelle  |
| TGS            | transkriptionelles Gen-Silencing                           |
| Thr            | Threonin   |
| TNF- $\alpha$  | Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$                              |
| Tyr            | Tyrosin  |
| U./min.        | Umdrehungen pro Minute                                     |
| V              | Volt   |
| vgl.           | vergleiche   |
| z.B.           | zum Beispiel   |

## 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In den Industrienationen sind nach wie vor die Krebserkrankungen die am weitesten verbreitete Zivilisationskrankheit und Todesursache. Etwa 20% der Todesfälle in Deutschland sind auf Krebs zurückzuführen, die Tendenz ist steigend. Weltweit sterben jährlich ca. 5 Millionen Menschen an Krebs.

In Deutschland ist die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Krebsformen folgendermaßen:

Männer: 1. Bronchialkarzinom

2. Malignes Melanom

3. Prostatakarzinom

Frauen: 1. Mammakarzinom – jede 10. Frau erkrankt

2. Malignes Melanom

3. Kolonkarzinom

(Schade J.P. 2001)

Weltweit ist das Bronchialkarzinom die am weitesten verbreitete Krebsform (Tyczynski J.E. et. al. 2003). Die höchsten Inzidenzraten existieren hierfür in Europa und Nordamerika.

So stellt sich die Ausgangssituation in der heutigen Krebsforschung dar. Ziel der Forschung muss es sein, die bestehenden Therapiekonzepte gegen Krebserkrankungen zu erweitern bzw. durch neue Methoden zu ersetzen, die die molekularbiologischen Grundlagen der Tumorentstehung bzw. die molekularbiologischen Möglichkeiten der Bekämpfung gezielter und genauer berücksichtigen. Auch die Notwendigkeit neuer Therapieansätze, die ihren Ursprung auf Ebene der molekularbiologischen Grundlagen haben müssen, ist damit offensichtlich.

Dabei stellt Krebs kein einheitliches Krankheitsbild dar, sondern umfasst mehr als hundert verschiedene Formen bösartiger (maligner) Erkrankungen, die nahezu jedes Gewebe im menschlichen Körper befallen können und die auch noch innerhalb eines Organs verschiedene Ausprägungen haben können

(Hanahan D. et. al. 2000; Weinberg R.A. 1995). Daher wird auch von Krebserkrankungen und nicht nur von Krebs gesprochen, um zu verdeutlichen, dass es sich um verschiedene Ausprägungen handelt.

Auch die Entstehung von Krebs ist nicht einheitlich, sondern ein multifaktorieller, vielstufiger und komplexer Prozess, der sich über Jahre vollzieht und dessen einzelne Schritte bzw. Ursachen bis heute noch immer nicht vollständig aufgeklärt sind. Doch auch die Anhäufung von Zellen zu einem Tumor reicht noch nicht aus, um von Krebs zu sprechen, hier wird erst von einem benignen (gutartigen) Tumor oder auch Neoplasma gesprochen. Als Krebs wird der Tumor erst dann bezeichnet, wenn er die Fähigkeit besitzt, in benachbartes Gewebe einzudringen (Alberts B. et. al. 1995).

Krebs entsteht durch die schrittweise Akkumulation von genetischen Veränderungen, die dazu führen, dass neoplastische Zellen aus dem homöostatischen Mechanismus freigesetzt werden, der im gesunden Gewebe für normale Zellproliferation sorgt. Beim Menschen sind mindestens fünf bis sechs Mutationen nötig, um dieses Stadium zu erreichen, bei Mäusen sind es wahrscheinlich weniger (Hahn W.C. et. al. 1999; Hahn W.C. et. al. 2002). Damit eine normale Zelle in malignes Wachstum übergeht, müssen die sechs folgenden Anforderungen erfüllt sein:

1. Die Zelle wird autonom bezüglich der Wachstumssignale.
2. Sie wird insensitiv gegenüber wachstumshemmenden Signalen.
3. Es findet keine Apoptose mehr statt.
4. Sie hat unbegrenztes Teilungspotenzial.
5. Die Angiogenese ist unbegrenzt möglich.
6. Sie kann invasiv in umliegende Gewebe einwachsen bzw. Metastasen bilden.

(Hanahan D. et. al. 2000)

Ursachen für die Mutationen und damit für die Krebsentstehung sind beispielsweise chemische Stoffe, Hormone, radioaktive Strahlung, Immunstörungen, Viren, freie Radikale oder allgemein oxidative Stoffe sowie genetische

Prädisposition, d.h. beispielsweise Mutationen in bestimmten tumorassoziierten Genen (Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen) (Ames B.N. 1983; Hahn W.C. et. al. 1999; Hahn W.C. et. al. 2002).

Das Problem bei der Therapie der verschiedenen Krebserkrankungen ist die Spezifität der jeweiligen Therapie. Anhand der Tatsache, wie viele verschiedene Möglichkeiten der Erkrankung unter dem Oberbegriff „Krebs“ zusammengefasst sind, wird schnell klar, dass auch viele verschiedene Ansätze zur Bekämpfung nötig sind und es wahrscheinlich kein „Allheilmittel“ für „den Krebs“ geben wird. Je unspezifischer der Ansatz einer Krebstherapie ist, desto größer ist die Gefahr von Nebenwirkungen, da auch normale Gewebe geschädigt werden.

Daher muss neben der Erforschung der genetischen Prädisposition und damit der Möglichkeiten einer präventiven Therapie die Erforschung einer möglichst spezifischen Tumor- bzw. Krebstherapie im Vordergrund stehen. Über Gen-Expressions-Profile ist es bereits gelungen, bei Mammakarzinompatientinnen mit über 90%iger Sicherheit vorherzusagen, ob ein Tumor Metastasen entwickeln oder ob er lokal abgegrenzt bleiben wird (Ahr A. et. al. 2002; Bernards R. et. al. 2002). Ein weiterer Ansatzpunkt für die Erforschung des Krebsgeschehens ist, dass das Genom von Tumorzellen an verschiedenen Stellen irreversibel geschädigt ist, und zwar durch Punktmutationen genauso wie durch Läsionen oder Veränderungen der Chromosomen (Hanahan D. et. al. 2000).

Diese Fakten bieten Ansatzpunkte, die die Forscher weltweit auf verschiedenen Gebieten daran arbeiten lassen, sowohl auf präventiver als auch auf therapeutischer Seite nach neuen Möglichkeiten zu suchen, um vielleicht in den nächsten Jahren oder Jahrzehnten den Krebs erfolgreich bekämpfen zu können. Dies ist jedoch auf „konventionellen“ Wegen unwahrscheinlich, da hier die Grenzen aufgrund der Unspezifität weitestgehend erreicht sind. Neuere Ansätze müssen sich der molekularbiologischen bzw. genetischen Grundlagen bedienen, die zum einen Aussagen über genetische Veränderungen bei bestimmten Krebserkrankungen machen können, zum anderen die Ausprä-

gung bestimmter Merkmale, die für einen Tumor oder eine Tumorgruppe spezifisch sind, erfassen können und dadurch neue Angriffspunkte für moderne Therapiekonzepte liefern können.

Neue Techniken wie die RNA-Interferenz haben die Molekularbiologie revolutioniert, da mit geringen Wirkstoffmengen, in diesem Falle doppelsträngige RNA, die Funktion von Zielgenen komplett ausgeschaltet werden kann. In vielen Studien wurde dies als „proof of principle“ eingesetzt, um zelluläre Funktionsmechanismen zu studieren. Doch nur wenige Arbeitsgruppen haben bisher das Ziel, damit Krankheiten wie Krebs oder virale Infektionen zu bekämpfen. Es sollte jedoch möglich sein, wenn gezielt Gene, z.B. Onkogene, ausgeschaltet werden, spezifisch gegen Krebszellen vorzugehen und dadurch das gesunde Gewebe nur minimal zu schädigen. Genau an dieser Stelle liegt der Ausgangspunkt für die Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden.

## 2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Molekulare Mechanismen der Kanzerogenese

Man kann die Kanzerogenese in die vier Teilschritte Initiation, Promotion, Progression und Metastasierung einteilen.

Die Initiation ist das erste Stadium der Krebsentstehung: Durch eine kanzerogene Substanz, Strahlung oder aber durch genetische Faktoren werden DNA-Schäden induziert, die zu Mutationen führen. Diese DNA-Schäden werden häufig nicht repariert und führen so, wenn die Zelle keiner Apoptose unterliegt, zu transformierten Zellen. Die Initiation ist in der Regel ein irreversibler Vorgang, denn sie lässt sich mit Hilfe einer verstärkenden Substanz auch nach längerer Zeit noch nachweisen.

Die Promotion folgt auf die Initiation, denn initiierte Zellen reagieren auf einen Tumorpromotor (bestimmte chemische Faktoren) wesentlich stärker mit Proliferation als normale Zellen des gleichen Gewebes. Promotion bedeutet also die Beschleunigung der Tumorentstehung.

In der Progressionsphase geht der Tumor durch weitere Mutationen vom benignen in den malignen Zustand über.

In dieser Phase besitzen die Tumorzellen dann auch die Fähigkeit, sich durch massive Zellteilung direkt im benachbarten Gewebe sowie über die Blut- und Lymphbahnen in entfernten Geweben auszubreiten (Metastasierung).

(Migliore L. et. al. 2002)

In der folgenden Abbildung sind die möglichen Mechanismen dargestellt, über die die verschiedenen Phasen der Kanzerogenese verhindert werden können. Als „blocking agents“ (blockende Substanzen) werden solche Substanzen angesehen, die die Initiation verhindern. „Suppressing agents“ (unterdrückende Substanzen) hingegen verhindern die Progression der initiierten Zellen zu vollständig transformierten Tumorzellen.

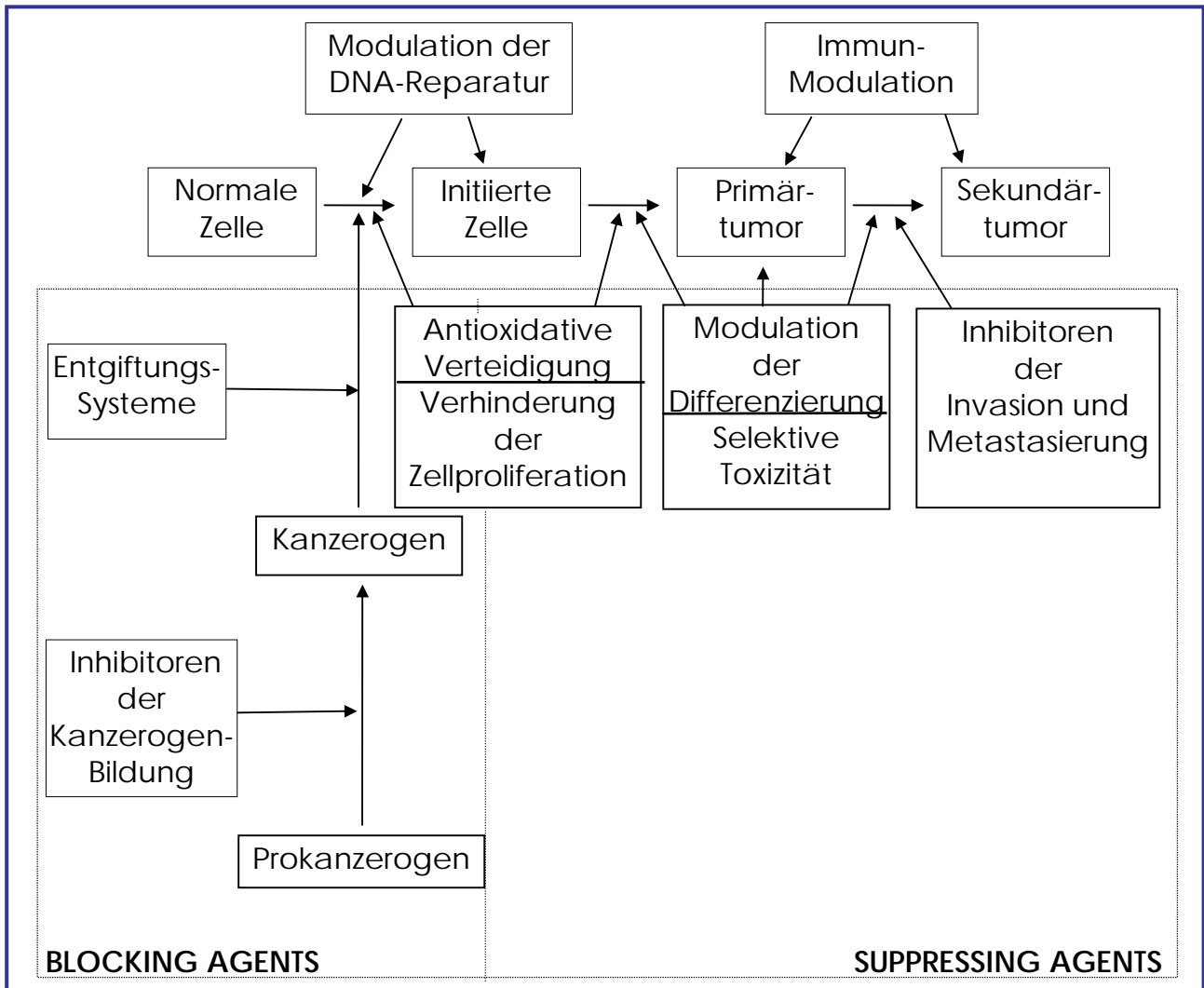


Abbildung 1: **Mögliche Mechanismen für die Verhinderung von Initiation, Promotion, Progression und Metastasierung**

aus: (Johnson I. et. al. 1994)

Darüber hinaus ist es möglich, auf der Ebene der mRNA in der bereits entarteten Zelle in das Krebsgeschehen einzugreifen, indem über die Blockade bestimmter Gene die weitere unkontrollierte Zellteilung und damit die weitere Entartung und Ausbreitung des Tumors bzw. die Metastasierung verhindert werden. Dabei ist die oben beschriebene Kanzerogenese bereits in vollem Gange, und das Ziel ist es, das Wachstum des Tumors zu hemmen bzw. ihn sogar zum Zurückgang zu zwingen.

Zielgene für solche Ansätze sind Gene, die im Krebsgewebe gegenüber normalem gesunden Gewebe überexprimiert werden und dadurch einen geziel-



ten, spezifischen Angriff auf die malignen Tumorzellen ermöglichen, wobei Nebenwirkungen aufgrund der Spezifität möglichst gering gehalten werden können.

## 2.2 Der Zellzyklus und seine Kontrollpunkte

### 2.2.1 Zellzyklusphasen

Der Zellzyklus dient dazu, dass die Zellen ihren biochemischen Apparat verdoppeln und sich anschließend zweiteilen. Da im Rahmen dieser Zellteilungsschritte immer wieder Fehler z.B. in der DNA-Synthese auftreten, unterliegt der Zellzyklus einer komplexen Kontrollmaschinerie, die aus verschiedenen Kontrollpunkten besteht. Die Dauer des Zellzyklus ist in den verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich und kann von Minuten (bei Embryonen von Fliegen) bis über ein Jahr (bei Leberzellen aus einem Säuger) dauern.

Eukaryontische Zellen besitzen einen Zellzyklus, der aus vier Phasen besteht: Die G<sub>1</sub>-Phase, in der die Zelle durch die Synthese von Proteinen, RNA und anderen Zellbestandteilen wächst, sodann ihre Umgebung und ihre eigene Größe prüft, um zu einem geeigneten Zeitpunkt mit der nächsten Phase, der S-Phase fortzufahren. Zellen, die sich nicht weiter teilen, da sie bereits ausdifferenziert sind, gehen nicht in die S-Phase über, sondern verlassen die G<sub>1</sub>-Phase und gehen in die G<sub>0</sub>-Phase über, in der sie auf Dauer verbleiben. In der S-Phase findet die Replikation der DNA statt, sie wird deshalb auch Synthesephase genannt. Im Anschluss an die S-Phase erfolgt wieder ein gewisser Ruheabschnitt, die G<sub>2</sub>-Phase. Dieser Zeitabschnitt verbindet die DNA-Synthesephase mit der eigentlichen Zellteilung, der Mitose, oder auch M-Phase. Aus diesem Grund stellt sie eine Sicherheits-Pause dar, in der sich die Zelle vergewissert, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen wurde, bevor sie in die Mitose eintritt. In der M-Phase teilt sich der Zellkern und anschließend die ganze Zelle. Diese Phase umfasst demzufolge Mitose (= Kernteilung) und Zytokinese (= Zellteilung). Die Mitose kann ihrerseits wieder in fünf Teilabschnitte untergliedert werden: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Während der Prophase zerfällt die Kernmembran (nuclear enve-

lop breakdown), der Inhalt des Zellkerns kondensiert zu sichtbaren Chromosomen, und zelluläre Mikrotubuli bilden die Mitosespindel aus, die schließlich die Chromosomen trennt. Im Laufe der Mitose verharrt die Zelle scheinbar kurz in einem als Metaphase bezeichneten Stadium, in dem die bereits verdoppelten Chromosomen an der Mitosespindel aufgereiht werden und auf ihre Trennung warten. Die Trennung der verdoppelten Chromosomen markiert den Beginn der Anaphase, in der sich die Chromosomen zu den jeweiligen Polen der Spindel hinbewegen, wo sie decondensieren und neue, intakte Zellkerne bilden. Anschließend in der Zytokinese teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen, was das Ende der Mitose bzw. M-Phase darstellt.

Der gesamte Abschnitt zwischen einer M-Phase und der nächsten M-Phase, bestehend aus G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase, wird als Interphase bezeichnet.

(Alberts B. et. al. 1995)

### 2.2.2 Kontrollpunkte im Zellzyklusgeschehen

Die Mitose wird aufgrund ihrer Bedeutung für die Zelle auf molekularer Ebene von einer Reihe von Proteinkinasen überwacht, deren Aktivität letztlich in der Phosphorylierung des Mitose-Promoting-Factors (MPF) resultiert und dadurch die Mitose startet. Umgekehrt wird die Mitose durch Dephosphorylierungen zentraler mitotischer Proteine wieder beendet.

Die Überwachung auf molekularer Ebene findet an drei wichtigen Kontrollpunkten statt:

Restriktionspunkt (G<sub>1</sub>/S-Transition)

DNA-Replikationskontrollpunkt (G<sub>2</sub>/M-Transition)

Spindelkontrollpunkt (Meta-Anaphase-Transition) (Molinari M. 2000).

Die Funktion dieser Kontrollpunkte ist die Überwachung der Vollständigkeit der einzelnen Zellzyklusphasen, damit beispielsweise keine Fehler in der DNA-Synthese auf Tochterzellen weitergegeben werden oder auch damit die Chromosomen vollständig geteilt sind, wenn die Zellen sich teilen.

Die folgende Abbildung 2 zeigt das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen an der Zellzykluskontrolle beteiligten Kinasen und Phosphatasen:

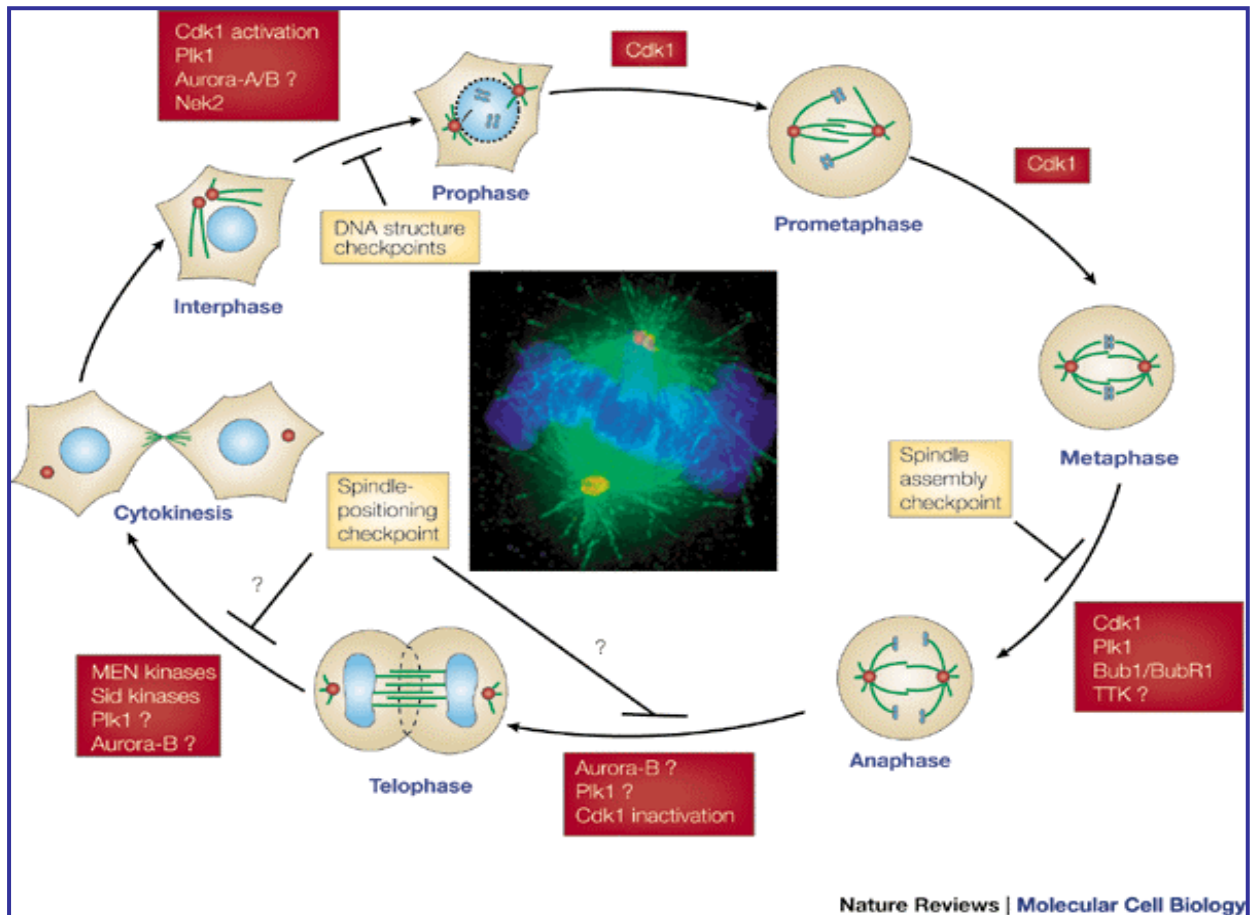


Abbildung 2: Kontrollpunkte in der Mitose

Dargestellt sind die Enzyme [in den roten Kästchen], die die verschiedenen Kontrollpunkte ( $G_1/S$ -Transition,  $G_2/M$ -Transition, Meta-/Anaphase-Transition) während der Mitose darstellen und auf dieser Ebene regulatorisch eingreifen.

aus: (Nigg E.A. 2001)

Es soll hier nur einer der genannten Kontrollpunkte der Mitose genauer besprochen werden, und zwar der DNA-Replikations-Kontrollpunkt an der  $G_2/M$ -Transition.

### 2.2.3 DNA-Replikations-Kontrollpunkt ( $G_2/M$ -Transition)

Dieser Kontrollpunkt liegt am Beginn der Mitose und registriert, ob das Genom in der S-Phase vollständig und intakt repliziert wurde.

Der Einstieg in die Mitose wird durch die Zunahme der Zahl der Cdk/Cyclin-Komplexe induziert, die den MPF bilden (Pines J. 1999). Der MPF besteht als heterodimeres Enzym aus zwei Untereinheiten, Cyclin B1 und seiner zugehörigen cyclinabhängigen Kinase (Cdk) Cdk1 bzw. Cdc2, wobei Cdc2 die katalytische und Cyclin B1 die regulatorische Untereinheit des MPF darstellt. Für die Aktivierung ist die Heterodimerbildung aus Cyclin B1 und Cdc2 grundlegende Voraussetzung.

Die Cycline weisen zellzyklusabhängige Konzentrationsschwankungen auf. Der Cdc2/Cyclin B1-Komplex ist beispielsweise von der Verfügbarkeit von Cyclin B1 abhängig, das in der S-Phase synthetisiert wird und sich vor bzw. in der M-Phase anreichert, um sogleich degradiert zu werden, wenn die Zelle in die nächste G<sub>1</sub>-Phase eintritt.

In Cyclin B1 ist eine Aminosäuresequenz enthalten, die sogenannte CRS (= cytoplasmic retention signal), die dafür verantwortlich ist, dass Cyclin B1 in der Interphase nur im Zytoplasma vorliegt (Pines J. et. al. 1994). Die CRS dient als Kernausstiegssignal, denn Cyclin B1 wird bis zu Beginn der Prophase aktiv aus dem Kern exportiert (Toyoshima F. et. al. 1998).

Die Steuerung des G<sub>2</sub>/M-Übergangs ist demzufolge recht komplex: Am Ende steht der MPF, der entsteht, wenn Cyclin B1, nachdem es sich in der G<sub>2</sub>-Phase angereichert hat, mit seinem Partner Cdc2 assoziiert. Für dessen Aktivierung ist die Dephosphorylierung von Cdc2 erforderlich, die durch Cdc25C erfolgt. Als Antagonist zu Cdc25C wirken die Proteinkinasen Wee1 und Myt1, die Cdc2 an Thr14 bzw. Tyr15 phosphorylieren und damit inaktivieren. Dadurch schützt Wee1 den Zellkern vor vorzeitiger MPF-Aktivierung (Heald R. et. al. 1993). Myt1 hingegen ist im Golgi-Apparat lokalisiert und hält unter anderem die Cdc2-Phosphorylierung in der Interphase aufrecht (Liu F. et. al. 1997). Die Cdc25C-Proteinkonzentration ist während des kompletten Zellzyklus konstant, und Cdc25C ist während der Interphase im Zytosol und während der G<sub>2</sub>/M-Transition im Zellkern lokalisiert. In der späteren Interphase transloziert Cdc25C zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her. Es ist dabei aber hauptsächlich im Zytoplasma zu finden, da es durch Kernausstiegssignale aktiv aus dem Kern

transportiert wird (Kumagai A. et. al. 1996; Yang J. et. al. 1999). In der G<sub>2</sub>-Phase findet die Akkumulation von Cdc25C im Zellkern statt, da es dort die Aktivierung des MPF steuert. Vom aktivierten MPF kann Cdc25C seinerseits auch wieder phosphoryliert und aktiviert werden, und damit kann im Rahmen einer autokatalytischen Schleife der irreversible Einstieg in die Mitose stattfinden (Izumi T. et. al. 1992).

Auch die Regulation von Cdc25C ist komplex: Es wird negativ durch die Isomerase Pin1 reguliert (Winkler K.E. et. al. 2000), durch Kinasen der PLK-Familie (vgl. Kapitel 2.3) aktiviert (Kumagai A. et. al. 1996) und durch die Proteinkinasen Chk1 und Chk2/Cds1 aktiviert oder inaktiviert (Furnari B. et. al. 1997).

### 2.3 Die Polo-Like Kinasen (PLK) und ihre Funktion im Zellzyklus

Die Polo-Like Kinasen (PLK) sind Kinasen aus der Familie der Serin/Threonin-Kinasen, die phylogenetisch – von der Hefe bis zum Menschen – hochkonserviert sind (Abb. 3).

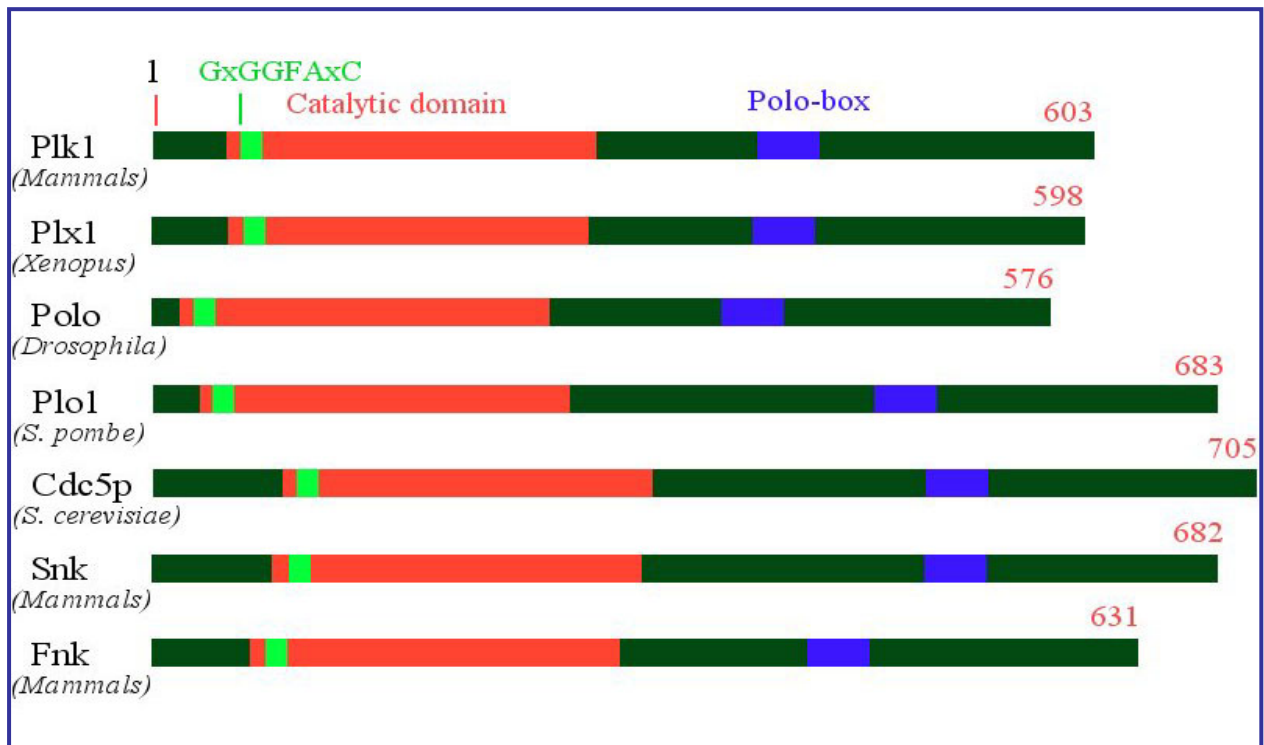


Abbildung 3: Die Familie der Polo-Like Kinasen

Rot dargestellt ist die katalytische Domäne, die Kinasedomäne, blau ist die sogenannte „polo-box“, dunkelgrün sind Domänen mit geringerer funktionaler Bedeutung.

Abgeleitet wird ihr Name von der zuerst in *Drosophila* entdeckten Kinase, die Polo genannt wurde. Alle weiteren entdeckten ähnlichen Kinasen wurden in Anlehnung an die Namensgeberin polo-like, also „polo-ähnlich“ genannt. In Mammaliazellen gibt es im Gegensatz zu den niederen Organismen drei Formen der PLKs: PLK1, SNK/PLK2 und FNK/PLK3. PLK1 ist ein 68 kDa-großes Protein mit multiplen Funktionen an Kontrollpunkten des Zellzyklus.

Allen PLKs sind zwei hochkonservierte Aminosäuresequenzen gemeinsam: Eine C-terminale Domäne, die als polo-box bezeichnet wird (Aminosäuren 410 – 439), und eine zweite konservierte Sequenz in der aminoterminalen Hälfte, die Kinase-Domäne (Aminosäuren 46 – 306) (Clay F.J. et. al. 1993; Hamanaka R. et. al. 1994).

Die PLK1-Expression und damit -Konzentration ist abhängig von der Zellzyklusphase, sie ist am Anfang der G<sub>1</sub>-Phase niedrig, steigt während des Zellzyklus an und erreicht während der G<sub>2</sub>/M-Phase ihr Maximum, parallel zur Expression von Cyclin B1 (Golsteyn R.M. et. al. 1995) (Abb. 4).

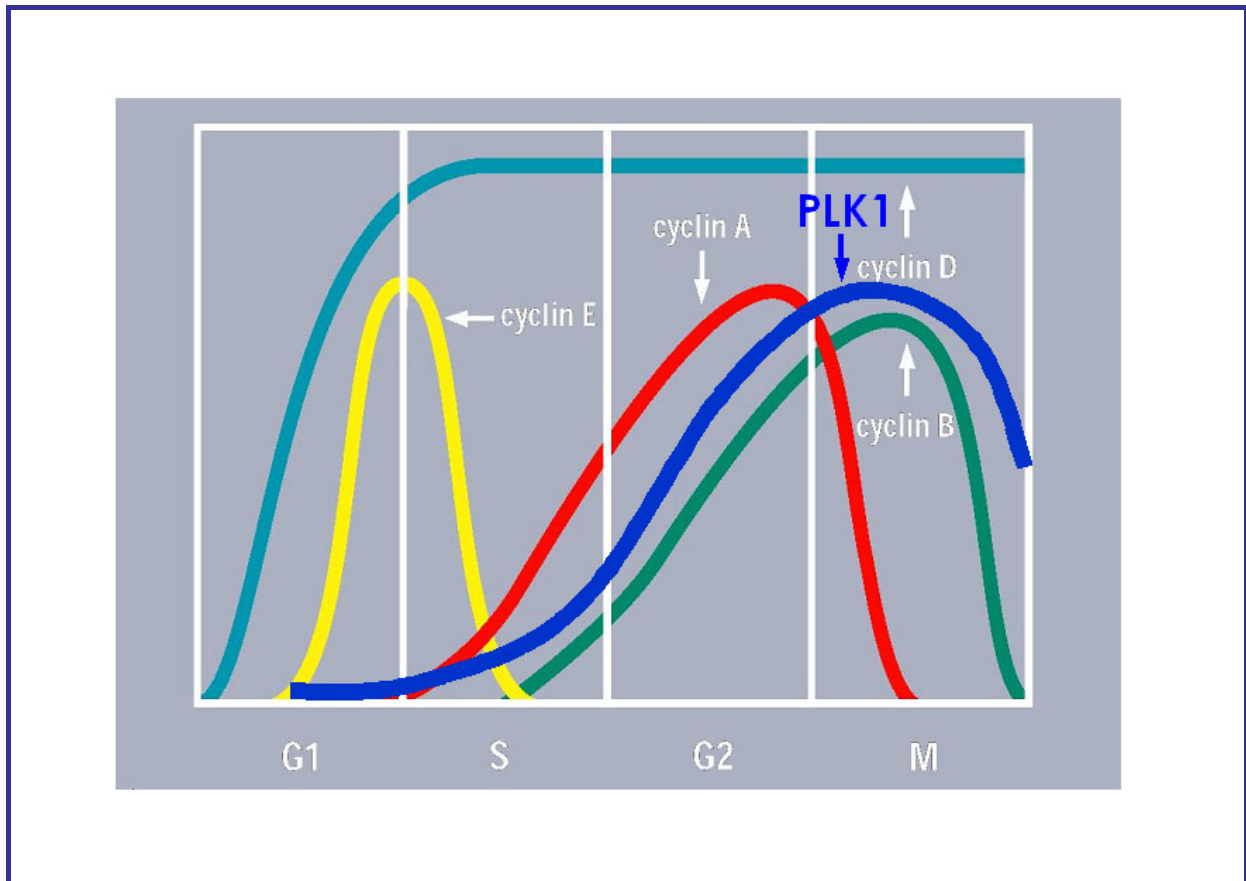


Abbildung 4: **Expressionsmuster von PLK1 im Vergleich zu den Cyclinen**

Es ist der Verlauf der Expression von PLK1 in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen im Vergleich zu den Cyclinen zu sehen. Besondere Bedeutung hat hierbei die parallele Expression von PLK1 und Cyclin B1.

Die enzymatische Aktivität von PLK1 nimmt während der Mitose wieder ab, hält aber länger an als die Cyclin B1-assoziierte Cdc2-Aktivität (Lee K.S. et. al. 1995). Nicht nur die Expression und Aktivität von PLK1 sind abhängig von den jeweiligen Zellzyklusphasen, sondern auch die Lokalisation in der Zelle. In der Pro-Metaphase ist PLK1 an den Zentrosomen bzw. Kinetochoren lokalisiert, in der frühen und späten Anaphase findet sich PLK1 in der Region, die sich zwischen den sich neu bildenden Tochterzellen befindet („Mid-Body“), um dann in der Telophase bzw. während der Zytokinese an der letzten Verbindungsstelle zwischen den neu gebildeten Tochterzellen („Mid-Zone“) zu lokalisieren (Abb. 5).

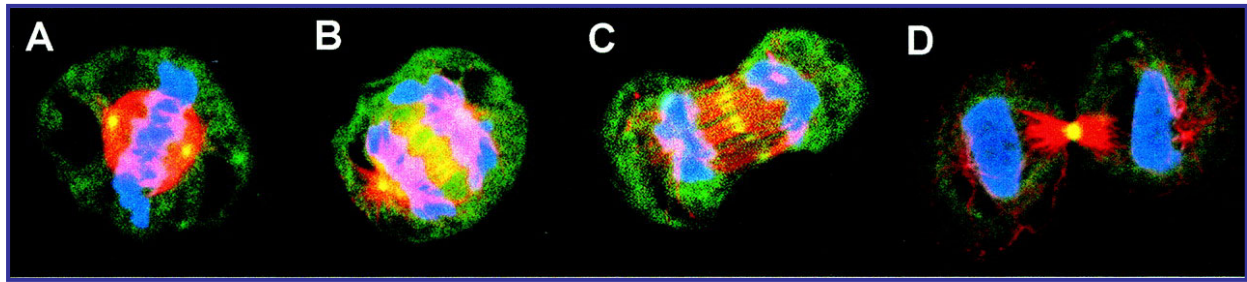


Abbildung 5: **Lokalisation von PLK1 in sich teilenden HeLa-Zellen**

A: Metaphase; B: frühe Anaphase; C: Anaphase; D: Telophase und Zytokinese; (blau: DNA-Färbung; rot: Mikrotubuli; grün: PLK1)

aus: (Glover D.M. et. al. 1998)

Daraus kann gefolgert werden, dass PLK1 sowohl zeitlich, als auch räumlich unterschiedliche Funktionen besitzt (Golsteyn R.M. et. al. 1994).

PLK1 ist beispielsweise an den verschiedenen Phasen des Zellzyklus in ganz unterschiedlichen Funktionen beteiligt:

- Mitoseeinstieg: Phosphorylierung von Cyclin B1 und damit Aktivierung des MPF
- Metaphase-Anaphase-Transition und Ausstieg aus der Mitose: Aktivierung des Anaphase-Promoting-Komplex (APC) und damit Degradation von Cyclin B1
- Septumbildung und Zytokinese: Regulation eines Signalwegs, der nötig für die Septumbildung ist
- Zentrosomenseparation und -reifung: Ermöglichung der Rekrutierung von  $\gamma$ -Tubulin, Aktivierung von Asp (= abnormal spindle protein; 220 kDa) als Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das am Minusende der Mikrotubuli akkumuliert und so deren Ausbildung ermöglicht (do Carmo A.M. et. al. 2001)

(Donaldson M.M. et. al. 2001).

Diese multiplen Rollen, die PLK1 in den verschiedenen Phasen der Mitose spielt, sind in der folgenden Abbildung 6 zusammengefasst.



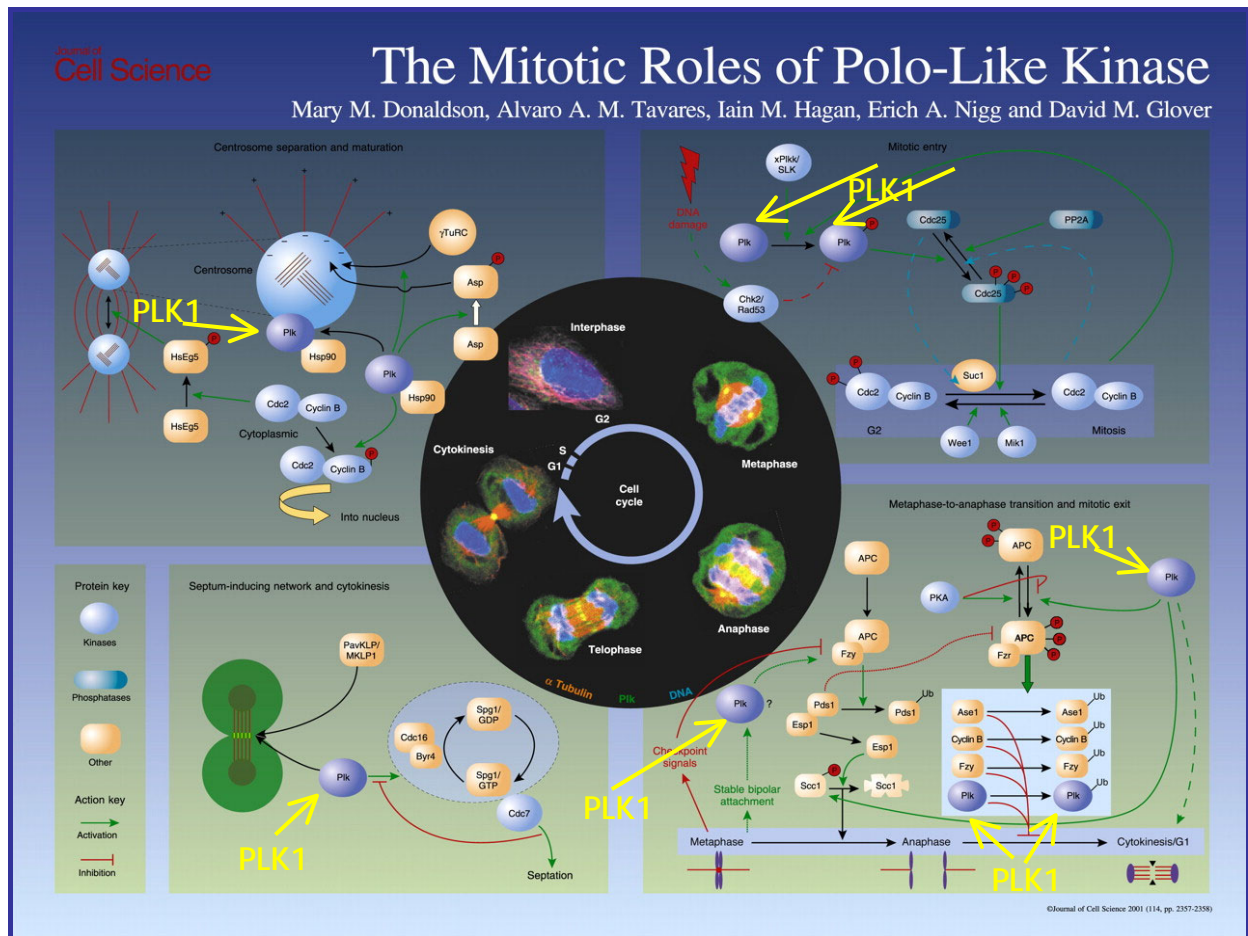


Abbildung 6: **Multiple Rollen der Polo-Like Kinasen in der Mitose**

Die jeweiligen Reaktionen an den verschiedenen Kontrollpunkten in der Mitose werden genauer beleuchtet und mit der Lokalisation von PLK1 (hier im schwarzen Kreis in der Mitte der Abbildung, vgl. Abb. 5) in Beziehung gesetzt. aus: (Donaldson M.M. et. al. 2001)

Die Aktivität von PLK1 ist also an verschiedenen mitotischen Kontrollpunkten beteiligt. Eine der beschriebenen Funktionen ist die Phosphorylierung von Cyclin B1 (Qian Y.W. et. al. 2001; Toyoshima-Morimoto F. et. al. 2001; Yuan J. et. al. 2002). Außerdem wird Cdc25C phosphoryliert, wodurch dann Cdc2 dephosphoryliert und aktiviert wird. Somit ist aktives PLK1 für die Aktivierung des MPF und damit für das Fortschreiten der Zellen in der Mitose erforderlich. Dies zeigt in kurzer Zusammenfassung die folgende Abbildung 7:

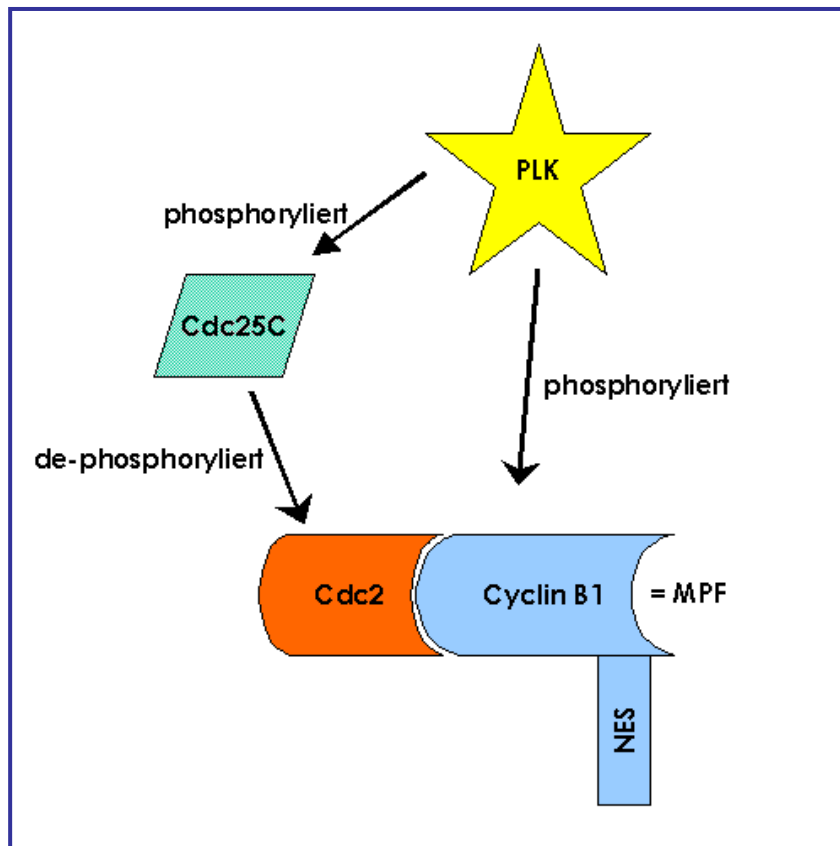


Abbildung 7: Die Rolle von PLK1 an der G<sub>2</sub>/M-Transition

Gezeigt ist die Funktion von PLK1 bei der Phosphorylierung und damit Aktivierung von Cyclin B1 und von Cdc25C. Cdc25C de-phosphoryliert und aktiviert anschließend Cdc2, so dass beide Wege zur Aktivierung des MPF führen.

Neben diesen beschriebenen Funktionen von PLK1 in normalen Zellen wird die Bedeutung von PLK1 im Speziellen auch für die Krebszellen und damit für die Krebsentstehung bzw. die unkontrollierte Teilung entarteter Zellen weiterhin dadurch unterstrichen, dass PLK1 in Geweben mit hohem mitotischen Index, also auch in Tumorzellen bzw. -geweben überexprimiert wird (Clay F.J. et. al. 1993; Golsteyn R.M. et. al. 1994; Holtrich U. et. al. 1994; Holtrich U. et. al. 2000; Yuan J. et. al. 1997) und dass diese Überexpression von PLK1 in den betroffenen Geweben (z.B. nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Oropharynxkarzinome, Ovarial- bzw. Endometriumkarzinome sowie Melanome) zu einer schlechten Prognose der jeweiligen Patienten führt (Knecht R. et. al. 1999; Strebhardt K. et. al. 2000; Tokumitsu Y. et. al. 1999; Wolf G. et. al. 1997). In Studien von Smith *et al.* (Smith M.R. et. al. 1997) konnte gezeigt werden, dass die CMV-Promoter-vermittelte Überexpression von PLK1 in NIH-3T3-Zellen dazu

führt, dass die Zellen von der G<sub>0</sub>-Phase in die Mitose getrieben werden, sich schneller teilen als untransformierte Zellen und nach Injektion in athymische Nacktmäuse Tumoren entstehen. In einer Studie von Smits *et al.* (Smits V.A. *et al.* 2000) konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass ein Zellzyklus-Stopp der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase, der durch Adriamycin induziert wurde, durch mutiertes PLK1 (T210D oder S137D/T210D) wieder aufgehoben werden kann, da ohne funktionierendes PLK1 der G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunkt überschritten werden kann. Damit ist PLK1 ein Maß für die Aggressivität eines Tumors, so dass sich die Frage stellt, ob die Hemmung von PLK1 in Eukaryonten ebenso drastische Folgen hat, wie in niederen Organismen (Byers B. *et al.* 1974; Kitada K. *et al.* 1993; Llamazares S. *et al.* 1991; Ohkura H. *et al.* 1995; Sunkel C.E. *et al.* 1988). Zwei Beispiele für die schwerwiegenden Störungen in niederen Organismen sind die Studien von Llamazares *et al.* (Llamazares S. *et al.* 1991) an *Drosophila*, in denen Mutationen von polo zu starken Anomalien und zum Zelltod führten, sowie die Studien von Ohkura *et al.* (Ohkura H. *et al.* 1995), in denen die Inaktivierung von Cdc5, dem Homologen von polo in *Schizosaccharomyces pombe*, zu kondensierten Chromosomen und monopolaren Spindeln führte, was wiederum das Ende der Mitose bedeutete.

Auf diesen Funktionen bzw. der weitreichenden Bedeutung von PLK1 beruhen Strategien, wie die im Folgenden beschriebene Antisense-Oligonukleotid-Strategie bzw. die RNA-Interferenz, womit die Bildung von PLK1-Protein auf der Ebene der mRNA verhindert werden soll. Ziel dabei ist, dass das in geringerem Umfang vorhandene Protein zu verminderter oder gar keiner weiteren Zellteilung führt und dass diese Wirkung gezielt in Krebszellen, die PLK1 überexprimieren, auftritt.

## 2.4 Antisense-Strategien in der Anwendung

Die Antisense-Technologie ist eine Strategie, mit der die Expression krankheitsrelevanter Gene sehr selektiv und spezifisch gehemmt werden kann. Das Genom wird hierbei im Gegensatz zur Gentherapie aber nicht verändert, son-

dem der Eingriff erfolgt auf der Ebene der Translation von der mRNA zum Protein. Das zugrundeliegende Prinzip ist das folgende:

Es werden kurze, meist ca. 20 Basen lange Antisense-Oligonukleotide (ASOs), bei denen es sich um DNA-Einzelstränge handelt, die komplementär zur mRNA des zu hemmenden Gens sind, in die Zellen eingebracht. Wenn das ASO durch Hybridisierung an die komplementäre mRNA bindet, entsteht eine illegitime Heteroduplex, ein mRNA/DNA-Hybrid. Dieses wird von der Zelle als unphysiologisch erkannt, so dass die zelleigene RNase H induziert wird, die ihrerseits die mRNA an der Stelle der Heteroduplex schneidet und sie damit abbaut (Dirksen M.L. et. al. 1981; Kita K. et. al. 1999; McKay R.A. et. al. 1999). Dadurch wird die Translation zum Protein verhindert und damit auch die sich normalerweise anschließende Signalkaskade (Abb. 8).

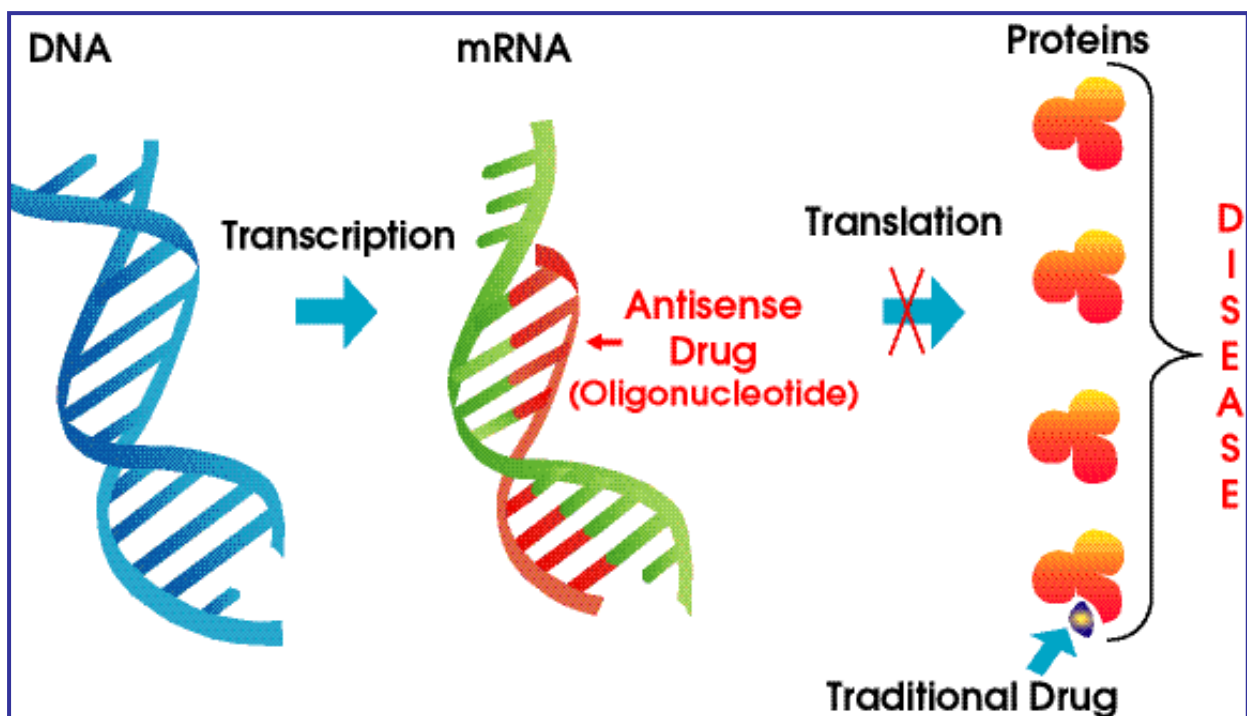


Abbildung 8: Das Wirkprinzip der Antisense-Oligonukleotide

Dargestellt ist die Reaktion der Antisense-Oligonukleotide (rot) nach der Transkription mit der komplementären mRNA (grün) und die Bildung der so entstehenden DNA/mRNA-Hybride. Diese werden von dem Enzym RNase H abgebaut, und so wird die Translation verhindert.

Bei den meisten momentan eingesetzten ASOs handelt es sich um Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotide (ASOs der sogenannten „ersten Generation“). Bei diesen ist der Sauerstoff in der Phosphorsäuregruppe durch ein Schwefelatom ersetzt. Dadurch haben sie eine größere Stabilität gegenüber dem Angriff von Nukleasen (Abb. 9).

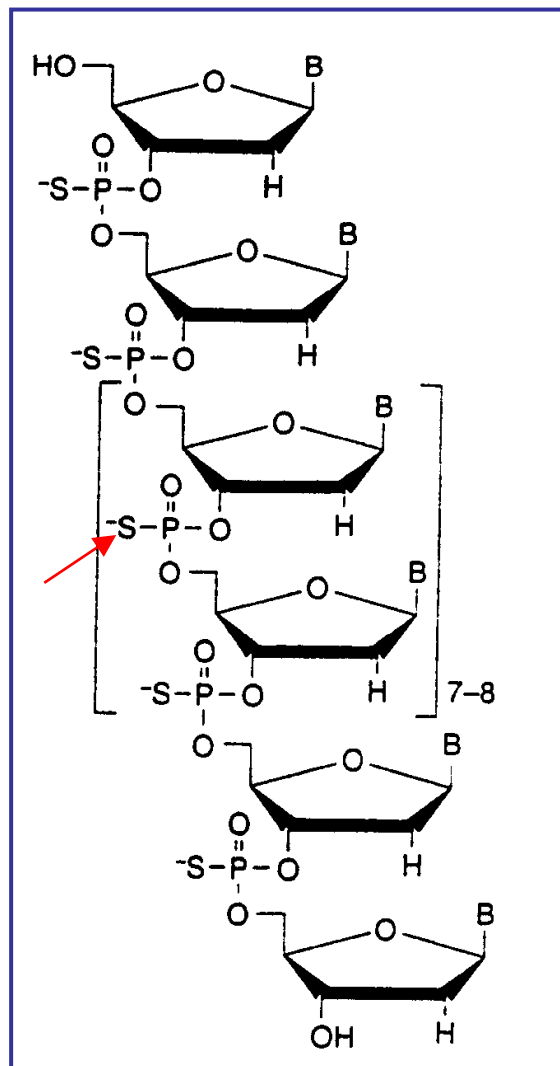


Abbildung 9: **Phosphorothioat-Antisense-Oligonucleotid**

Hier ist gezeigt, dass im Phosphorothioat-Antisense-Oligonucleotid jeweils ein Sauerstoffatom in der Phosphorsäuregruppe durch ein Schwefelatom [roter Pfeil] ersetzt ist, um die Stabilität zu erhöhen.

aus: (Agrawal S. et. al. 2000)

Die folgende Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über die Antisense-Ansätze mit verschiedenen Targets, die sich damit bereits in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung befinden.

| Molekulares Zielgen | Erkrankung   | Applikation      | Status      |
|---------------------|--|------------------|-------------|
| bcl-2               | Prostata, Lymphome   | systemisch, s.c. | Phase I/IIa |
| Bcr-abl             | Leukämie   | systemisch, i.v. | Pilot       |
| c-myb               | Leukämie   | systemisch, i.v. | Phase I     |
| c-raf               | Prostata, Mamma, Ovar, Pankreas, Colon, Lunge                    | systemisch, i.v. | Phase II    |
| Ha-ras              | solide Tumoren   | systemisch, i.v. | Phase I     |
| ICAM-I              | Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatoide Arthritis, Psoriasis | systemisch, i.v. | Phase II    |
| p53                 | Leukämie und Vorläufer   | systemisch, i.v. | Phase I     |
| PKA-R1 $\alpha$     | solide Tumoren   | systemisch, i.v. | Phase II    |
| PKC- $\alpha$       | Ovar, Prostata, Brust, Gehirn, Lunge, Colon, Melanom             | systemisch, i.v. | Phase II    |
| CMV                 | CMV-induzierte Retinitis   | systemisch, i.v. | Phase II    |

Tabelle 1: **Verschiedene klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden**

Es sind die verschiedenen molekularen und krankheitsbezogenen Targets dargestellt, außerdem der Applikationsweg und der Status der klinischen Prüfung der verschiedenen Studien.  
nach: (Agrawal S. et. al. 2000)

Wie bei Antisense-basierten Untersuchungen der Abbau der mRNA nach DNA/mRNA-Hybrid-Bildung das Ziel ist, ist auch bei der RNA-Interferenz, die im folgenden Kapitel 2.5 genau beleuchtet wird und ebenfalls im Rahmen der

vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, das Ziel, die jeweilige Ziel-mRNA abzubauen.

## 2.5 RNA-Interferenz (RNAi)

### 2.5.1 Allgemeine Grundlagen

Die als RNA-Interferenz (RNAi) oder post-transkriptionelles Gen-Silencing (PTGS) bezeichnete biologische Antwort auf doppelsträngige RNA (dsRNA) ist weit verbreitet von Einzellern wie *Neurospora*, Pflanzen, *Drosophila melanogaster* über *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) bis hin zum Säugetier. RNAi vermittelt die Resistenz gegenüber sowohl Transposons als auch exogenen pathogenen Nukleinsäuren (Replikationsintermediate bei viraler Vermehrung) und bewirkt so die Regulation der Expression von Protein-kodierenden Genen.

Die erstmalige Beschreibung des Phänomens RNA-Interferenz erfolgte im Jahre 1998 in Studien an *C. elegans* (Fire A. et. al. 1998). Hier konnte nachgewiesen werden, dass dsRNA auf sequenzspezifische Weise zum Gen-Silencing führt. In dieser Studie konnten Fire *et al.* darüber hinaus zeigen, dass eine dsRNA-Mischung mehr als zehnmal wirkungsvoller war als Sense- oder Antisense-RNAs. Außerdem wurde die anfängliche Wirksamkeit von Sense- oder Antisense-RNA (Guo S. et. al. 1995) im Nachhinein dann ebenfalls auf das Vorhandensein geringer Mengen von dsRNA in den jeweiligen RNA-Präparationen zurückgeführt (Fire A. et. al. 1998; Zamore P.D. 2002).

Gen-Silencing durch RNAi hat einige bemerkenswerte Vorteile: RNAi konnte durch Injektion von dsRNA in *C. elegans* oder durch Füttern mit dsRNA direkt oder mit Bakterien, die dsRNA exprimieren, erzielt werden (Timmons L. et. al. 1998; Timmons L. et. al. 2001). Außerdem ist es in *C. elegans* möglich, RNAi auszulösen, indem die Tiere in einer Lösung gebadet werden, die dsRNA enthält (Plasterk R.H. et. al. 2000; Tabara H. et. al. 1998; Tabara H. et. al. 1999). Bei allen diesen Verfahren reichen einige wenige Moleküle dsRNA aus, um in *C. elegans* selbst (systemisches Silencing) sowie in der F<sub>1</sub>-Generation RNAi auszulösen.

Was allerdings immer noch ungeklärt ist, ist die Frage, welche molekularen Mechanismen dem RNA-Silencing zugrunde liegen. Es wird vermutet, dass endogene auf RNA gerichtete RNA-Polymerasen (RdRP = RNA-directed RNA polymerases) illegitime Transkripte, also doppelsträngige RNA, erkennen und diese in dsRNA umwandeln (Dalmay T. et. al. 2000). Und tatsächlich sind Homologe dieser Enzyme in *C. elegans*, Pilzen und Pflanzen essentiell für das RNA-Silencing. Trotzdem konnte bislang lediglich in Tomaten die Polymerase-Aktivität in RdRPs nachgewiesen werden (Schiebel W. et. al. 1998), so dass weitere Studien erforderlich sind, um die wirkliche Rolle von RdRP bei der RNAi zu untersuchen.

Genetische und biochemische Untersuchungen haben ergeben, dass RNAi, Ko-Suppression und Virus-induziertes Gen-Silencing gemeinsame biochemische Grundlagen besitzen und dass die erforderlichen biologischen Signalwege, über die das dsRNA-induzierte Gen-Silencing erfolgt bzw. erfolgen kann, in vielen, vielleicht sogar in allen eukaryontischen Organismen existieren.

### **2.5.2 Der RNA-induced silencing complex (RISC) – Mechanismen des Post-Transkriptionellen Gen-Silencings (PTGS)**

Die aktuellen Modelle der dsRNA-induzierten Gen-Silencing-Mechanismen beruhen auf genetischen Studien an *C. elegans* und Pflanzen sowie auf biochemischen Studien an *Drosophila*-Extrakten. In den *Drosophila*-Studien konnten Kennerdell und Carthew (Kennerdell J.R. et. al. 1998) zeigen, dass die Injektion von dsRNA in *Drosophila*-Embryonen sequenzspezifisches Gen-Silencing auf post-transkriptioneller Ebene induziert. In weiteren Untersuchungen konnte die Korrelation zwischen dsRNA-Injektion in zellfreie *Drosophila*-Extrakte und Destabilisierung der mRNA gezeigt werden, was zu der Annahme führte, dass dsRNA einen Komplex aktiviert, der die homologe RNA angreift und degradiert (Tuschl T. et. al. 1999). Diese Effektor nuklease, mittlerweile bekannt als RISC (RNA-induced silencing complex, vgl. Kapitel 2.5.4), konnte aus



*Drosophila* S2-Zellen isoliert werden, in denen RNAi durch dsRNA-Behandlung *in vivo* ausgelöst wurde (Hammond S.M. et. al. 2000). Anfänglich wurden weitere Hinweise auf einen vergleichbaren Mechanismus in anderen Spezies gesucht. So konnte in Pflanzen, die ein unterdrücktes Transgen enthielten, eine ~25-Nukleotid-lange RNA gefunden werden (Hamilton A.J. et. al. 1999), die in gleicher Art auch durch Virus-induziertes Gen-Silencing induziert wurde. Außerdem wurde diese ~25-Nukleotid-lange RNA in *Drosophila*-Embryonen entdeckt (Zamore P.D. et. al. 2000). Die anschließende teilweise Aufreinigung des RISC zeigte, dass diese kleinen RNAs mit der Nukleaseaktivität ko-fraktionierten (Hammond S.M. et. al. 2000). Dadurch war die Verbindung zwischen transgener Ko-Suppression in Pflanzen und RNAi in Tieren hergestellt. Gleichzeitig entstand das momentan gültige Modell für die RNAi und die verwandten Silencing-Phänomene. Dieses Modell besagt, dass die Initiation des Silencings dadurch gestartet wird, dass eine Maschinerie die dsRNA erkennt und sodann in ~21–25-Nukleotid-lange RNAs schneidet. Diese Maschinerie ist der sogenannte Dicer (vgl. Kapitel 2.5.4). Die hierbei entstehenden RNAs sind die siRNAs (small interfering RNAs), die charakteristisch für diesen Silencing-Pathway sind und den Komplex im Anschluss zu den homologen mRNA-Substraten führen.

### 2.5.3 Die Struktur der „small interfering“ RNAs (siRNAs)

Verschiedene Studien haben sich damit befasst, die unterschiedliche Silencing-Effizienz verschiedener siRNA-Strukturen zu untersuchen.

Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. et. al. 2001c) stellten an *Drosophila melanogaster* fest, dass das 5´-Ende der siRNA dafür entscheidend ist, dass die siRNA bzw. der RISC (vgl. Kapitel 2.5.4) die Ziel-mRNA erkennt. Nykanen *et al.* (Nykanen A. et. al. 2001) konnten im Zusammenhang mit dieser Feststellung ebenfalls an *Drosophila* beobachten, dass die Phosphorylierung am 5´-Ende für die RNAi erforderlich ist. Der Antisense-RNA-Strang ist hierbei der Entscheidende, und weniger der Sense-Strang (Grishok A. et. al. 2000; Parrish S. et. al. 2000). Diese Beobachtungen an *Drosophila* und *C. elegans* konnten von Schwarz *et al.* (Schwarz D.S. et. al. 2002) auf humane Zellen (HeLa-Zellen) übertragen wer-

den, d.h. auch für humane HeLa-Zellen war die Phosphorylierung des 5´-Endes der siRNA durch eine zelleigene Kinase erforderlich, bevor diese zur Vermittlung der RNAi in der Zelle fähig war.

Weiterhin konnten Chiu *et al.* (Chiu Y.L. et. al. 2002) demonstrieren, dass 5´-Modifikationen am Sense-Strang keinen Einfluss auf die RNAi-Effekte hatten, wenn aber der Antisense-Strang am 5´-Ende modifiziert wurde, ging der RNAi-Effekt vollständig verloren. Der Antisense-Strang alleine hatte aber keinerlei Silencing-Effekt in den untersuchten HeLa-Zellen. In der gleichen Studie wurde noch der Einfluss von Modifikationen am 3´-Ende untersucht, aber hierbei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen unmodifizierter und modifizierter siRNA sowie zwischen Sense- und Antisense-Strang. In Studien von Martinez *et al.* (Martinez J. et. al. 2002) konnte hingegen zum gleichen Zeitpunkt gezeigt werden, dass auch der Antisense-RNA-Strang alleine von RISC (vgl. Kapitel 2.5.4) inkorporiert wurde und einen Silencing-Effekt ausübte. Dieser Effekt war allerdings erst in wesentlich höheren Konzentrationen zu beobachten als der durch doppelsträngige siRNA hervorgerufene (100 nM einzelsträngige siRNA versus 1 nM doppelsträngige siRNA). In den Studien von Amarzguioui *et al.* (Amarzguioui M. et. al. 2003) zeigte der Antisense-Strang alleine auch nur in höherer Konzentration (200 nM versus 100 nM) die gleiche Wirksamkeit wie die doppelsträngige siRNA. In einer früheren Studie konnten Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. et. al. 2001b) allerdings keinen Effekt durch den Antisense-Strang alleine in Konzentrationen von 10 – 100 nM feststellen.

Darüber hinaus stellten Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. et. al. 2001c) fest, dass 21-Nukleotid-lange siRNAs mit einem 3´-Überhang von 2 Nukleotiden die effektivste Wirkung auf die mRNA-Degradation hatten.

#### **2.5.4 Der zweistufige RNA-Interferenz-Mechanismus – DICER und RISC**

Aus den in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 beschriebenen Beobachtungen konnte gefolgert werden, dass den Homologie-abhängigen Gen-Silencing-Antworten ein konservierter biochemischer Mechanismus zugrunde liegt. Dieser allerdings ist dennoch in der Lage, seine Ausprägung an die verschiedenen Erfordernis-

se der einzelnen Spezies anzupassen, beispielsweise ist das Silencing in *C. elegans* vererbbar und systemisch, in *Drosophila* und Mammalia hingegen ist es anscheinend zell-autonom und nicht vererbbar.

Wie schon in Kapitel 2.5.2 angesprochen, wird die dsRNA im ersten Schritt (Initiationsschritt) geschnitten, um siRNAs zu erzeugen. Auch hier konnten die ersten Hinweise in *Drosophila* erbracht werden, und zwar wurde in *Drosophila*-Embryo-Extrakten die enzymatische Aktivität nachgewiesen, lange dsRNAs in ~22-Nukleotid-lange RNAs zu schneiden (Zamore P.D. et. al. 2000). Die auf diesem Weg entstandenen siRNAs waren doppelsträngig und enthielten 5'-phosphorylierte Enden (Elbashir S.M. et. al. 2001c; Zamore P.D. et. al. 2000). Außerdem konnten die verantwortlichen Enzyme gefunden werden, die für das spezifische Schneiden der dsRNA sorgen, und zwar handelt es sich um RNase III-Enzyme, die zur Familie der RNase III Ribonuklease-Familie gehören. Alle diese RNase III-Enzyme besitzen eine RNA-Bindungs-Domäne und können entsprechend ihrer weiteren Struktur in drei Gruppen unterteilt werden: Bakterielle RNase III-Enzyme enthalten eine einzelne katalytische Domäne, Drosha-Familie-Nukleasen (Filippov V. et. al. 2000) enthalten zwei katalytische Domänen, und eine dritte Klasse enthält ebenfalls zwei katalytische Domänen, darüber hinaus aber noch Helikase- und PAZ (=Piwi-Argonaut-Zwille)-Motive (Bernstein E. et. al. 2001). Von Bernstein *et al.* (Bernstein E. et. al. 2001) konnte dann auch diese dritte Klasse identifiziert werden als die für die RNAi verantwortliche Klasse, und ab diesem Zeitpunkt wird diese von *Drosophila* über Insekten, Pilze, *Neurospora* und *C. elegans* bis hin zum Säugetier hochkonservierte Familie Dicer-Enzyme genannt (Bernstein E. et. al. 2001; Grishok A. et. al. 2001; Ketting R.F. et. al. 2001; Knight S.W. et. al. 2001). Erst vor kurzem wurde anhand der Struktur der katalytischen Domäne von RNase III klar, dass die ~22-Nukleotid-langen RNAs durch Dicer gebildet werden (Blaszczyk J. et. al. 2001). Außerdem gelang es Provost *et al.* (Provost P. et. al. 2002), das 218 kDa große Dicer-Enzym zu klonieren, exprimieren, sowie seine Ribonuklease-Aktivität und dsRNA-Bindungseigenschaften zu charakterisieren. Das rekombinante Enzym zerlegte dsRNAs in ~21 – 23-Nukleotid-lange siRNAs.

Die strukturellen Untersuchungen bzw. Entdeckungen sind zusammenfassend in der folgenden Abbildung 10 dargestellt:

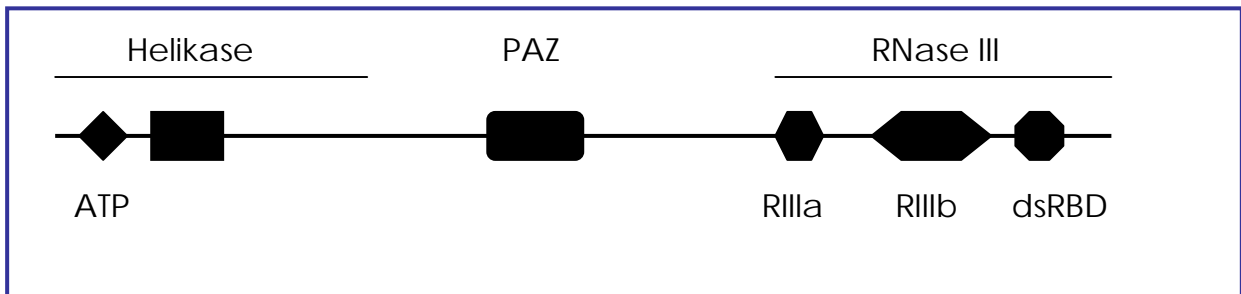


Abbildung 10: **Struktur der Domänen von Dicer**

PAZ = Piwi-Argonaut-Zwille-Domäne, dsRBD = doppelsträngige RNA-Bindungsdomäne, RIIIa und RIIIb = katalytische Domänen der RNase III, ATP = Adenosintriphosphat  
nach: (Provost P. et. al. 2002)

Ebenfalls im *Drosophila*-System konnte gezeigt werden, dass die RNAi im zweiten Schritt (Effektorschritt) durch RISC, einen Protein-RNA-Effektornuklease-Komplex, wirksam wird, indem dieser die Ziel-mRNAs erkennt und zerstört. Die erste identifizierte Untereinheit dieses Komplexes war die siRNA, die wohl über Watson-Crick-Basenpaarung die Substrate identifiziert (Hammond S.M. et. al. 2000). Über die Struktur von RISC sind sich die verschiedenen Arbeitsgruppen allerdings noch nicht einig, klar ist nur, dass RISC die siRNAs inkorporiert, eventuell noch in einem ATP-abhängigen Prozess entwindet und dann für die Zerstörung der zur siRNA homologen mRNA sorgt. RISC wird in *Drosophila*-Embryonen als Vorläufer von ~250K gebildet, der dann durch Zugabe von ATP aktiviert und in einen ~100K Komplex überführt wird, der seinerseits die Ziel-mRNA an der Stelle, die homolog zur siRNA ist, schneidet (Nykanen A. et. al. 2001). Die Struktur der siRNA (3'-Überhang und 5'-Phosphorylierung) (Elbashir S.M. et. al. 2001c; Zamore P.D. et. al. 2000) ist erforderlich für ihre Inkorporation in den RISC-Komplex (Elbashir S.M. et. al. 2001c; Nykanen A. et. al. 2001). In anderen Arbeitsgruppen konnte der RISC-Vorläufer aus *Drosophila*-S2-Zellen als ~500K Ribonukleoprotein mit leicht unterschiedlichen Eigenschaften identifiziert werden (Hammond S.M. et. al. 2000; Hammond S.M. et. al. 2001a). In

den *Drosophila*-Embryonen wird der RISC-Vorläufer durch eine Endonukleaseaktivität prozessiert, in *Drosophila*-S2-Zellen scheint es eine Exonukleaseaktivität zu sein, denn hierbei sind keine Intermediärprodukte nachweisbar. Dennoch wird wohl auch der Komplex aus *Drosophila*-S2-Zellen durch ATP aktiviert. In neueren Studien wurde sogar konstatiert, dass von RISC nur einzelsträngige siRNAs inkorporiert werden (Martinez J. et. al. 2002), da auch diese alleine einen Gen-Silencing-Effekt ausübten.

RISC aus *Drosophila*-S2-Zellen wurde mit AGO2, einem Mitglied der *Argonaut*-Genfamilie aufgereinigt (Hammond S.M. et. al. 2001a). Die korrespondierenden Proteine wurden erstmals in *Arabidopsis*-Mutanten nachgewiesen, die eine veränderte Blattmorphologie aufwiesen (Bohmert K. et. al. 1998). Es handelt sich auch hier um eine große, hochkonservierte Genfamilie, deren Vertreter in fast allen eukaryontischen Genomen mit Ausnahme von *Saccharomyces cerevisiae* (Hammond S.M. et. al. 2001b) vorkommen. Charakteristisch für diese Genfamilie sind zwei Domänen, die PAZ-Domäne und die Piwi-Domäne. Die Piwi-Domäne ist einzigartig in dieser Proteinklasse, die PAZ-Domäne kommt außerdem in Dicer-Proteinen vor und scheint daher wichtig für die Rekrutierung von Silencing-Komplexen zu sein (Bernstein E. et. al. 2001). Weitere Mitglieder der Argonaut-Familie, RDE-1 und RDE-4, konnten von Grishok *et al.* (Grishok A. et. al. 2000) entdeckt werden, die für die Initiierung von RNAi in *C. elegans* nötig sind, allerdings nicht in der F<sub>1</sub>-Generation. Mut-7 (Ketting R.F. et. al. 1999) und RDE-2 hingegen sind in der F<sub>1</sub>-Generation nötig, nicht aber in der Elterngeneration von *C. elegans*. Für RDE-1 und RDE-4 konnte die Interaktion mit Dicer in *C. elegans* nachgewiesen werden, und RDE-4 interagiert mit dsRNA (Tabara H. et. al. 2002), was unter Umständen dafür spricht, dass RDE-4 die dsRNA erkennt und zu Dicer transportiert. Hinweise dafür stammen aus Untersuchungen, in denen RDE-4-defiziente Würmer verminderte siRNA-Spiegel aufwiesen, fehlte ihnen RDE-1, waren die siRNA-Spiegel hingegen unverändert (Parrish S. et. al. 2001). Möglicherweise sind demzufolge Argonaut-Proteine, wie z.B. RDE-1, daran beteiligt, die siRNAs zu den passenden Effektor-Komplexen (RISC) zu transportieren. In Übereinstimmung damit konnten in *Drosophila*

S2-Zell-Extrakten Interaktionen zwischen Dicer und Argonaut-Proteinen nachgewiesen werden (Hammond S.M. et. al. 2001a).

Dieses Modell liefert Hinweise für die Existenz von Signal-Amplifikation und systemischem Silencing (vgl. Kapitel 2.5.5).

Zur stark vereinfachten und gekürzten Zusammenfassung des in den Kapiteln 2.5.1 – 2.5.4 beschriebenen RNAi-Mechanismus soll die folgende Abbildung 11 dienen:

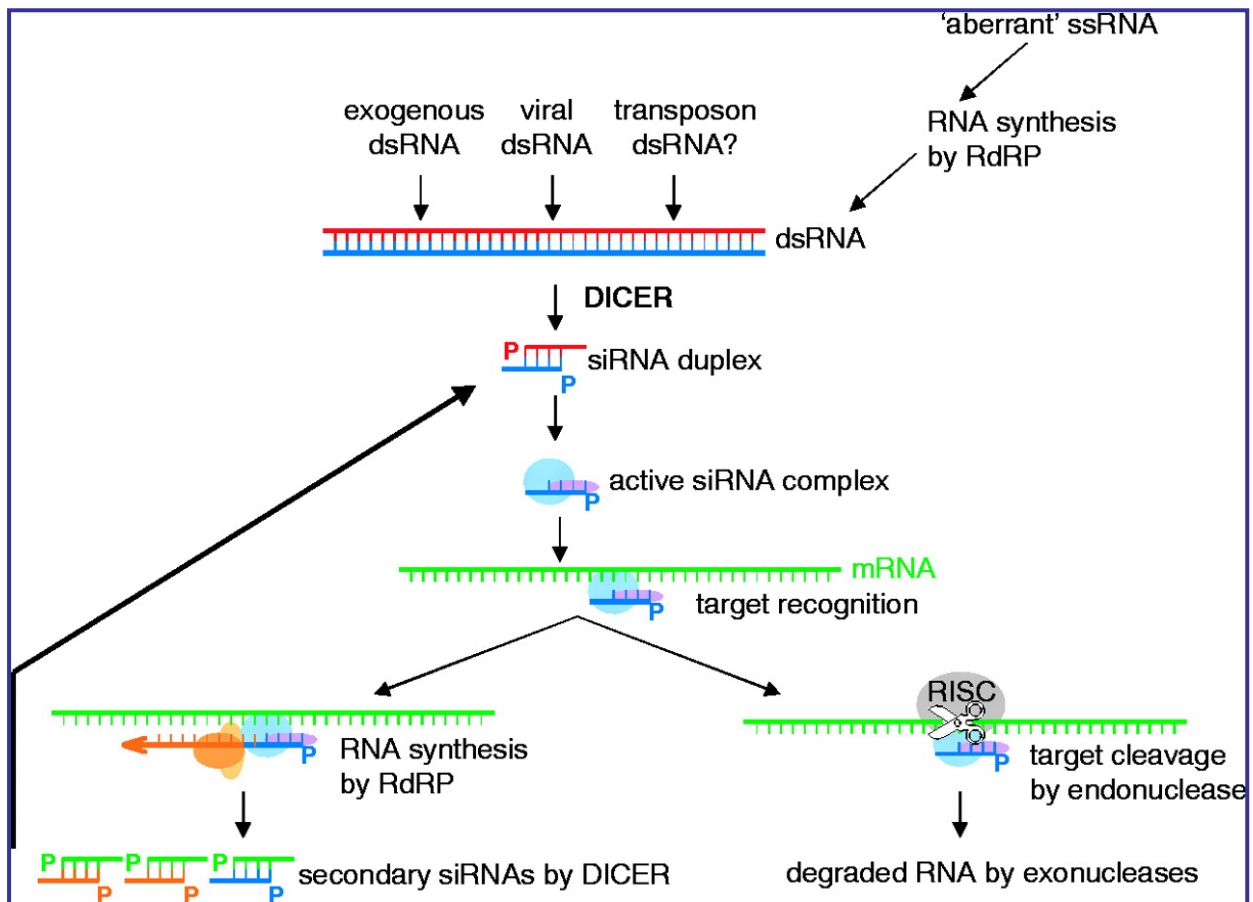


Abbildung 11: Dicer und RISC – der RNAi-Mechanismus

Dargestellt sind die verschiedenen Stufen der RNAi, in denen DICER und RISC tätig sind und die siRNA zu ihrer homologen mRNA transportieren. Diese wird letztlich durch Exonucleasen degradiert, oder es werden sekundäre siRNAs durch DICER gebildet, die ihrerseits aktive siRNA-Komplexe bilden können.  
aus: (Plasterk R.H. 2002)

### 2.5.5 Verstärkung des Gen-Silencing-Signals und Verbreitung der RNA-Interferenz

Ein sehr interessanter Aspekt der RNAi ist die Fähigkeit, sich in *C. elegans* über den gesamten Organismus auszubreiten (Fire A. et. al. 1998). Ähnliche systemische Phänomene konnten in Pflanzen beobachtet werden (Palauqui J.C. et. al. 1997). Dieser Mechanismus erfordert die Möglichkeit, einerseits Signale von Zelle zu Zelle weiterzugeben und andererseits die Signale zu amplifizieren, da in o.g. Studien ein einmaliger Reiz mit dsRNA ausgereicht hatte, um die systemische Antwort zu induzieren.

Ein weiterer Aspekt der Verbreitung der RNAi ist die sogenannte „transitive RNAi“. Hierbei bewegt sich ein Silencing-Signal über ein bestimmtes Gen und wird auf diese Art verbreitet. In *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass sich die transitive RNAi von 3' nach 5' fortsetzt, nicht aber von 5' in 3'-Richtung (Sijen T. et. al. 2001). Dabei wurden siRNAs zu Sequenzen gefunden, die in 5'-Richtung der eingesetzten siRNA auf der Ziel-mRNA lokalisiert waren, in 3'-Richtung dagegen konnten keine homologen siRNAs gefunden werden. In Pflanzen hingegen ist die Bewegung sowohl in 3'-5'-Richtung, als auch in 5'-3'-Richtung möglich (Vaistij F.E. et. al. 2002).

Diese Studien legen den Grundstein für die Annahme, dass bei transistiver RNAi siRNAs die Synthese von zusätzlichen dsRNAs durch RdRPs initiieren. Und obwohl noch keine transitive RNAi in *Drosophila* nachgewiesen werden konnte und auch angenommen wird, dass in *Drosophila* RdRP nicht für die RNAi erforderlich ist, konnte RdRP-Aktivität nachgewiesen werden (Lipardi C. et. al. 2001). In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass der Antisense-Strang der siRNAs als Primer für RdRP dienen kann und damit an der mRNA die Synthese weiterer dsRNAs initiieren kann.

Noch komplexer wird die Situation dadurch, dass in *C. elegans* RDE-1 und RDE-4 nur für die Initiation der RNAi in adulten Tieren erforderlich sind. Unter Umständen werden exogen zugeführte dsRNAs in einer anderen Weise erkannt als die in der Zelle von RdRPs produzierten dsRNAs. Die Aufgabe von RDE-4, die dsRNA zu Dicer zu transportieren, könnte beispielsweise von einem

anderen Protein übernommen werden, oder Dicer liegt gleich in einem stabilen Komplex mit RdRP vor, so dass ein interner dsRNA-Transport überflüssig würde. In Pflanzen müssen zwei Wege der Verbreitung vermutet werden, und zwar einerseits kurze Wege über Zell-Zell-Kontakte und andererseits längere Wege über das Pflanzen-Gefäßsystem (Voinnet O. et. al. 1998).

Winston *et al.* (Winston W.M. et. al. 2002) konnten kürzlich in *C. elegans* ein weiteres Protein identifizieren, das für das systemische Gen-Silencing nötig ist. *Sid-1* kodiert für ein Transmembranprotein, das möglicherweise einen Kanal darstellt, durch den das Silencing-Signal importiert werden kann. Neuronale Zellen exprimieren kein SID-1, was eine Erklärung für die Resistenz von Neuronen in *C. elegans* gegenüber RNAi sein könnte. SID-1-Homologe existieren nicht in *Drosophila*, wo auch kein systemisches Gen-Silencing stattfindet, sie wurden aber schon in Mammalia nachgewiesen, was die Möglichkeit offen lässt, dass zumindest Teile der RNAi auch in Mammalia von Zelle zu Zelle weitergegeben werden können bzw. eine Amplifikation des Silencing-Signals stattfinden kann.

Auch wenn diese Modelle verschiedene Mechanismen vorschlagen, wie die Amplifikation des Silencing-Signals stattfinden könnte, so ist doch der genaue Charakter des Signals, das das systemische Silencing in Pflanzen und Tieren vermittelt, bislang unbekannt.

### 2.5.6 Weitere Funktionen des RNAi-Mechanismus

Obwohl die Kombination von Genetik und Biochemie viel zum Verständnis der RNAi beigetragen hat, bleiben zum momentanen Zeitpunkt noch viele Fragen unbeantwortet. So wird z.B. in *Drosophila*-Embryoextrakten der RISC-Vorläufer durch das Entwinden der siRNA in einem ATP-abhängigen Prozess aktiviert, wobei auf der Suche nach dem RISC-Aktivator verschiedene Helikasen identifiziert wurden, die ihn darstellen könnten (z.B. QDE-3, MUT-6, MUT-14) (Cogoni C. et. al. 1999; Tijsterman M. et. al. 2002; Wu-Scharf D. et. al. 2000). Außerdem



ist die Identität der RISC-assoziierten Nuklease, die die Ziel-mRNA schneidet, noch ungeklärt. In den eben angesprochenen Studien an *Drosophila*-Embryoextrakten (vgl. Kapitel 2.5.4) konnte eine Endonuklease identifiziert werden, die das siRNA-mRNA-Hybrid nahe der Mitte der Duplex schneidet, während *in vivo*-gebildeter RISC zusätzlich Exonukleaseaktivität zu besitzen scheint. Darüber hinaus besitzt MUT-1, das essentiell für RNAi in *C. elegans* ist, Homologie zu dieser Nuklease, wurde aber noch nicht im RISC von *Drosophila* gefunden (Ketting R.F. et. al. 1999). Die Effizienz von RNAi lässt einen aktiven Mechanismus vermuten, über den das Transkriptom nach homologen Substraten abgesucht wird, und tatsächlich konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass RISC mit Ribosomen assoziiert ist (Hammond S.M. et. al. 2000).

Diese Zusammenhänge zwischen der RNAi-Maschinerie und dem zelleigenen RNA-Metabolismus müssen noch weiter analysiert werden, um diese Fragen zu beantworten. Beispielsweise lassen genetische Untersuchungen eine Verbindung zwischen RNAi und der Zerstörung von falsch prozessierter mRNA oder aber generell zur Regulation der mRNA-Stabilität vermuten (Domeier M.E. et. al. 2000).

### 2.5.7 RNA-Interferenz auf genomischer Ebene

Der erste Zusammenhang zwischen RNAi und dem Genom konnte in Pflanzen hergestellt werden, denn dsRNA induziert hier die Methylierung an sequenz-homologen Abschnitten (Wassenegger M. et. al. 1994). Sofern die Methylierung in kodierenden Sequenzen auftritt, hat sie keinen Effekt auf die Transkription, obwohl das Gen-Silencing auf post-transkriptioneller Ebene stattfindet. Methylierung der Promoter-Sequenz hingegen führt zu TGS (= transkriptionelles Gen-Silencing), was im Gegensatz zu PTGS stabil und vererbbar ist (Jones L. et. al. 2001). Daraus kann gefolgert werden, dass dsRNAs durchaus Veränderungen auf genomischer Ebene induzieren können, inwieweit diese Veränderungen aber relevant für das PTGS sind, bleibt noch ungeklärt.

Neuere Studien versuchen die Vorstellung einer engen Verknüpfung von RNAi-Maschinerie und dem Genom zu generalisieren und mechanistische Parallelen zwischen TGS und PTGS zu ziehen. Beispielsweise kann in *C. elegans* auf Transkriptionsebene hervorgerufenen Gen-Silencing durch Mutationen in *mut-7* bzw. *rde-2* wieder aufgehoben werden (Tabara H. et al. 1999). Dies geschieht durch einen Polycomb-Mechanismus, wobei Polycomb-Group-Proteine Chromatin in „offenen“ oder „geschlossenen“ Konformationen organisieren und dadurch stabile und vererbte Muster der Genexpression hervorrufen. Auch Dudley *et al.* (Dudley N.R. et al. 2002) zeigten unter bestimmten experimentellen Bedingungen die Notwendigkeit der Polycomb-Group-Proteine MES-3, MES-4 und MES-6 für die RNAi. Auch in *Drosophila* und in Pflanzen sind Zusammenhänge zwischen Chromatinstruktur und dsRNA-induziertem Gen-Silencing nachweisbar. Zum Beispiel führen Mutationen in *piwi*, dem Pendant zum RISC-Bestandteil *Argonaut-2*, zu Beeinträchtigungen der Ko-Suppression verstreuter Gene in *Drosophila* sowohl auf posttranskriptioneller wie auch auf transkriptioneller Ebene (Pal-Bhadra M. et al. 2002).

Demzufolge ist bislang auf der Ebene der Interaktion mit dem Genom sehr wenig bezüglich der Antwort auf dsRNA geklärt, wobei möglicherweise die Erkennung der genomischen DNA ebenfalls durch Derivate der Silencing-Maschinerie, z.B. durch siRNAs, erfolgt.

### 2.5.8 Bedeutung der RNA-Interferenz für biologische Systeme

Gen-Silencing durch RNAi ist höchst spezifisch, da die Identifikation der Ziel-mRNA über Watson-Crick-Basenpaarung erfolgt. Dieser regulatorische Mechanismus kann für verschiedene zelluläre Funktionen angenommen und angepasst werden. Pflanzen setzen RNAi beispielsweise als Resistenz gegen Pathogene ein. Daher bilden viele Pflanzenviren Suppressoren gegen PTGS aus, die essentiell für die Pathogenese sind. In *C. elegans* fungiert RNAi als Abwehr endogener parasitärer Nukleinsäuren, wie z.B. Transposons. RNAi-defiziente Stämme von *C. elegans* besitzen daher eine erhöhte Mobilität solcher endo-

gener Transposons (Ketting R.F. et. al. 1999; Tabara H. et. al. 1999). Es handelt sich bei Transposons um bestimmte Sequenzen im Genom, die beweglich sind – sie können sich selbst an andere Orte innerhalb des Genoms transportieren. Ihr Kennzeichen ist, dass sie nicht als unabhängige Form existieren (wie z.B. Phagen- oder Plasmid-DNA), sondern direkt von einer Stelle im Genom zu einer anderen wandern. Manchmal verursachen Transposons auch die Umordnung anderer genomischer Sequenzen (Lewin B. 2002). Transposons kommen in einer Zelle meist in vielen Kopien vor (zehn bis zehntausende) und Transposon-dsRNA kann produziert werden, wenn ein Transposon in der Nähe eines endogenen Promoters in Antisense-Richtung eingebaut wird. Aufgrund dieser Variabilität könnten sie die Hauptursache für Mutationen des Genoms darstellen. In vielen Systemen werden Transposons durch die Verpackung in Heterochromatin ausgeschaltet (Martienssen R.A. et. al. 2001).

Dies spricht dafür, dass durch RNAi das Genom stabilisiert wird, indem repetitive Sequenzen wie Transposons abgefangen werden und damit die Transposition verhindert wird. Auf diese Art würden repetitive Elemente für die Rekombination, die zur Translokation von Chromosomen führen würde, unzugänglich. Da es aber jedem Transgen möglich ist, die Suppression seiner homologen Gene zu induzieren, könnte auch nur das durch das Transposon gebildete Transgen für das Gen-Silencing sorgen.

Daher muss untersucht werden, ob RNAi die Transposons auf genomischer Ebene reguliert bzw. ob das Transposon wirklich durch RNAi supprimiert wird – auch in Abwesenheit der exprimierten Transgene – oder durch posttranskriptionelles Ausschalten der für die Transposition nötigen mRNAs.

Es existieren verschiedene Hinweise auf eine Beteiligung von RNAi an der Regulation endogener Gene, was ursprünglich in Pflanzen und Tieren vermutet wurde, die mutierte RNAi-Komponenten besaßen. In *Arabidopsis* zum Beispiel führten Mutationen im *Argonaut-1*-Gen zu verschiedenen Abnormalitäten in der Entwicklung (Bohmert K. et. al. 1998). In *Drosophila* führten Mutationen bei Mitgliedern der *Argonaut*-Familie, speziell bei *Argonaut-1*, zu gestörter neuronaler Entwicklung (Kataoka Y. et. al. 2001). *Piwi*

naler Entwicklung (Kataoka Y. et. al. 2001). *Piwi*-Mutanten besaßen hingegen Defekte in der Keimbahn-Stammzell-Proliferation bzw. -Erhaltung (Cox D.N. et. al. 1998).

Daraus sollte jedoch nicht gefolgert werden, dass über PTGS die endogene Genexpression an sich reguliert wird. Vielmehr agieren die Komponenten der RNAi-Maschinerie und ihre verwandten Genprodukte durchaus auf verwandte, aber dennoch getrennte Art und Weise.

Aus Studien an *C. elegans*, in denen das Dicer-Gen *DCR-1* mutiert wurde, konnte ein Modell entwickelt werden, nach dem die Regulation der endogenen Gene durch RNAi erfolgen könnte. Im Gegensatz zu anderen RNAi-defizienten Tieren induzierte die Mutation im *DCR-1*-Gen zusätzlich zur Beeinträchtigung der RNAi-Maschinerie eine Vielzahl von Veränderungen des Phänotyps (Grishok A. et. al. 2001; Hutvagner G. et. al. 2001; Ketting R.F. et. al. 2001; Knight S.W. et. al. 2001).

Dicer-Mutationen führten darüber hinaus zu den gleichen Veränderungen in der Entwicklung wie Mutationen in den *lin-4*- und *let-7*-Genen in *C. elegans*. *Lin-4* und *let-7* kodieren kleine RNAs, die als ~70-Nukleotid-lange Vorläufer synthetisiert werden und dann post-transkriptionell in ~22-Nukleotid-lange siRNAs prozessiert werden. In genetischen Studien konnte gezeigt werden, dass diese RNAs von Dicer prozessiert werden (Grishok A. et. al. 2001; Hutvagner G. et. al. 2001; Ketting R.F. et. al. 2001).

Diese von *lin-4* und *let-7* kodierten kleinen temporären RNAs (stRNAs, small temporal RNAs) stellen negative Regulatoren von Protein-kodierenden Genen dar. Dies ist zu erwarten, wenn stRNAs an RNAi beteiligt sein sollen. Die beiden stRNAs *lin-4* und *let-7* regulieren die zeitliche Entwicklung von *C. elegans*. stRNAs kodieren, wie schon beschrieben, dabei keine Proteine (Hutvagner G. et. al. 2001) und sind auch nicht an der Degradation der mRNA beteiligt, sondern agieren auf der Ebene der Regulation der Translation (Olsen P.H. et. al. 1999; Slack F.J. et. al. 2000). Danach ließe sich vermuten, dass stRNA und RNAi lediglich über das Enzym Dicer verbunden sind. Dennoch haben Grishok *et al.*

(Grishok A. et. al. 2001) beobachten können, dass Proteine aus der Argonaut-Familie (Alg-1 und Alg-2) sowohl für die stRNA-Bildung als auch für die stRNA-vermittelte Suppression nötig sind. Demnach wäre es naheliegend, dass die Effektor Komplexe, die siRNA bzw. stRNA enthalten, eng verwandt sind, aber über verschiedene Mechanismen die Expression regulieren (vgl. Abb. 12).

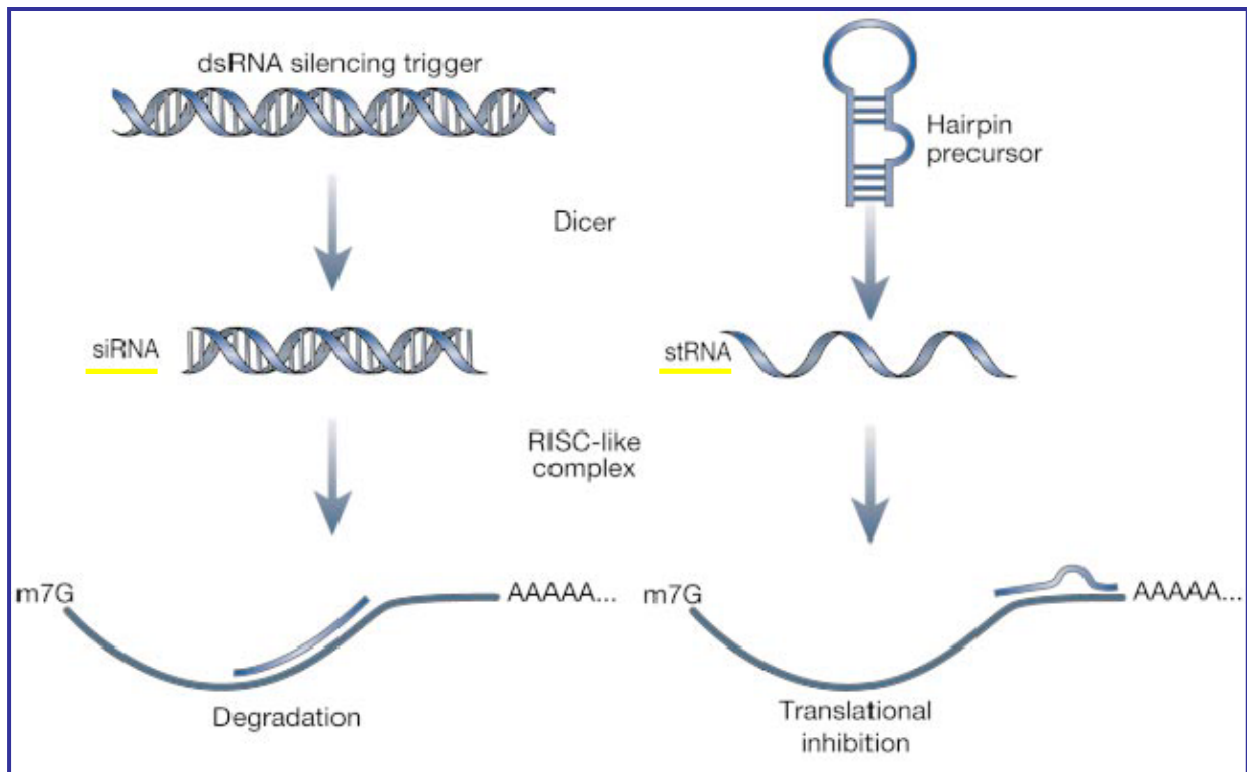


Abbildung 12: **Vergleich stRNA – siRNA**

Von Dicer werden entweder die siRNAs inkorporiert und führen so zur mRNA-Degradation, oder aber es werden stRNAs inkorporiert, wodurch die Translation inhibiert wird.  
aus: (Hannon G.J. 2002)

Im Gegensatz zu siRNAs bilden weder lin-4 noch let-7 perfekte Duplizet mit ihrer Ziel-mRNA (Ha I. et. al. 1996). Daher wird in einem erweiterten RNAi-Modell ein analoger RISC-Komplex gebildet, der entweder siRNA oder stRNA enthält. Bei der Bildung eines RISC, der siRNA enthält, ist die perfekte komplementäre Bindung für das Schneiden der Ziel-mRNA-Sequenz erforderlich. Wird stRNA vom RISC inkorporiert, ist keine perfekte komplementäre Bindung nötig, es

wird allerdings auch keine mRNA geschnitten, sondern der Komplex blockiert die Elongation an den Ribosomen. Wahrscheinlich benutzen demnach siRNA und stRNA verwandte, aber verschiedene Komplexe, die ihrerseits zwischen stRNA und siRNA unterscheiden können und dann, je nachdem, ob sie stRNA oder siRNA inkorporiert haben, entweder zur Degradation der mRNA oder zur Regulation der Translation führen.

Zu dieser Theorie passt die Beobachtung, dass synthetische siRNAs oder exogen zugeführte shRNAs, die ein einzelnes „Mismatch“ enthalten, nicht mehr zum Gen-Silencing führen, aber dadurch ihre Eigenschaften dahingehend ändern, dass sie auf translationaler Ebene inhibierend wirken (Carmichael G.G. 2002; Elbashir S.M. et. al. 2001a; Elbashir S.M. et. al. 2001c; Paddison P.J. et. al. 2002a).

Somit kann RISC als „flexible Plattform“ betrachtet werden, an der verschiedene Regulatoren ansetzen. RISC wäre demnach verantwortlich, die siRNA- oder stRNA-Moleküle von Dicer zu erhalten und diese dann als Wegweiser zu den jeweiligen homologen Substraten zu benutzen. Abhängig vom Signal (seiner Struktur oder Lokalisation) stehen verschiedene Effektorfunktionen zur Verfügung: Bei RNAi werden Nukleasen in den RISC inkorporiert, bei stRNA-vermittelter Regulation werden Repressoren der Translation inkorporiert. Weitere Möglichkeiten der Anpassung an die jeweiligen Erfordernisse sind denkbar.

Die verschiedenen möglichen Wirkweisen von RISC sollen zusammenfassend in der folgenden Abbildung 13 verdeutlicht werden:

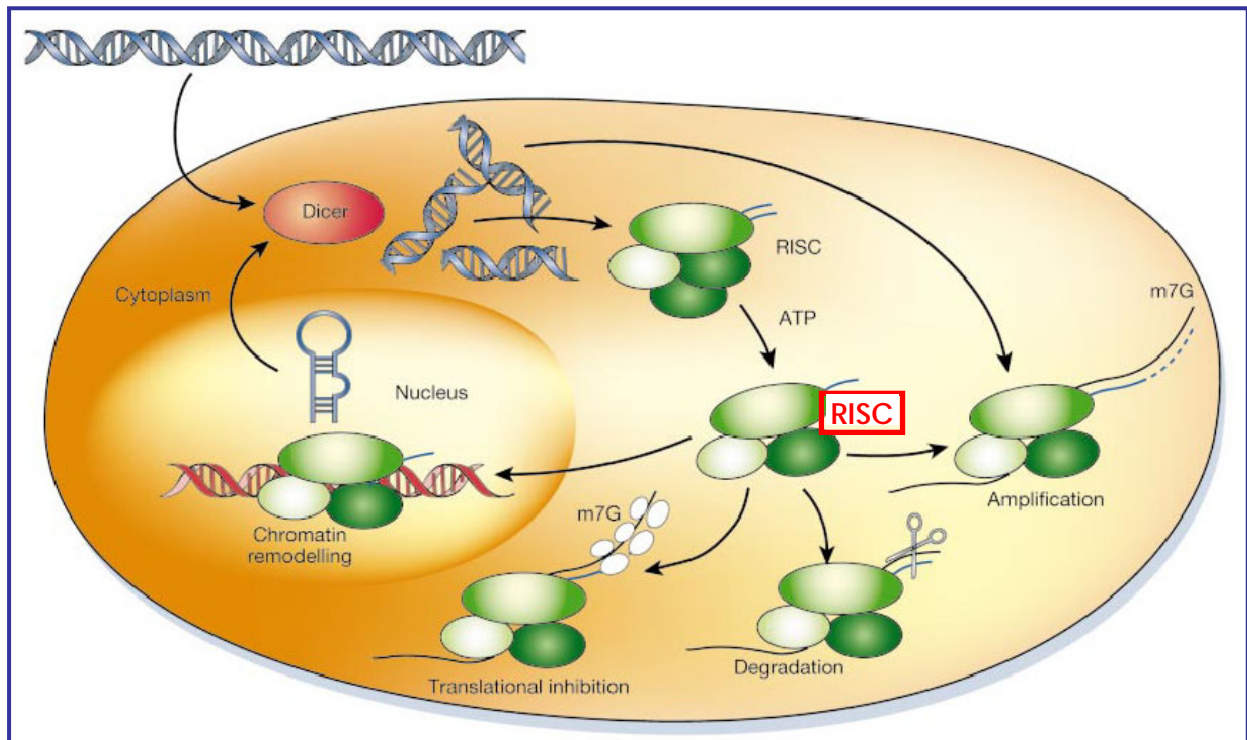


Abbildung 13: **Erweitertes Modell des RNAi-Mechanismus**

Hier ist die Einbindung von RISC in die verschiedenen Funktionen bei RNAi dargestellt, bei der Amplifikation des Signals, der Degradation der mRNA und der Inhibierung der Translation.  
aus: (Hannon G.J. 2002)

Durch neue Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass *lin-4* und *let-7* zu einer großen Klasse von endogen kodierten kleinen RNAs gehören, wurde die Frage nach der Funktion von RISC als flexiblem Regulator wichtig. In *Drosophila*, *C. elegans* und Mammalia sind mittlerweile über 100 dieser Mikro-RNAs (miRNAs) identifiziert worden (Lagos-Quintana M. et. al. 2001; Lau N.C. et. al. 2001; Lee R.C. et. al. 2001; Mourelatos Z. et. al. 2002), was zu der Annahme führt, dass aufgrund ihrer Verbreitung und obwohl ihre eigentliche Funktion noch unbekannt ist, ein Zusammenhang zwischen RNAi und der Kontrolle der Genexpression besteht.

### 2.5.9 Bedeutung der RNAi für die Genforschung

Die RNA-Interferenz ist eine praktikable und sehr gute Methode, wenn es darum geht, die Genfunktion zu untersuchen. Dabei ist die Funktion der ~19.000

Gene in *C. elegans* mittlerweile fast vollständig analysiert worden (Kamath R.S. et. al. 2003), aber auch für Pflanzen und andere Organismen wird sie momentan mit Hilfe der RNA-Interferenz untersucht.

Obwohl es eine Zeit lang so aussah, als ob RNAi in Mammalia-Systemen nicht funktionieren würde, kamen die ersten Hinweise von Mäuseembryonen (Svoboda P. et. al. 2000; Wianny F. et. al. 2000). Allerdings kommt es wohl in somatischen, nicht aber in embryonischen Zellen zur unspezifischen Antwort der Zellen auf dsRNA, die über PKR (RNA-abhängige Proteinkinase) vermittelt zu sein scheint und die spezifische Reaktion – das eigentliche Gen-Silencing – überdeckt (vgl. hierzu Kapitel 2.5.11).

#### **2.5.10 Funktionsweise von RNAi in Säugetierzellen**

Die ersten Versuche, mittels RNAi auch Gene in Mammalia-Zellen auszuschalten, wurden von Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. et. al. 2001a) durchgeführt. In diesen Untersuchungen gelang die Hemmung endogener Gene, wie z.B. die Lamine A/C, oder von ko-transfizierter Luziferase in HeLa S3-, COS-7-, 293- oder NIH-3T3-Zellen, was einen Durchbruch für die Genanalyse in Mammalia-Zellen darstellt.

Für RNA-Interferenz-Studien an Mammalia-Zellen *in vitro* gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten der Behandlung. Zum einen kann synthetische siRNA, die homolog zur Ziel-mRNA ist, mit Hilfe von Transfektionsvermittlern, wie z.B. Oligofectamin, in die Zellen transfiziert werden, was bislang häufiger eingesetzt wurde, aber auch der teurere Weg ist, oder es werden Expressionsplasmide transfiziert, die die Sequenz für eine hairpin-RNA enthalten, die homolog zur Ziel-mRNA ist (Abb. 14). Eine weitere Möglichkeit, die lipophile Zellmembran zu überwinden, ist die Elektroporation (s.u. und Tab. 2).



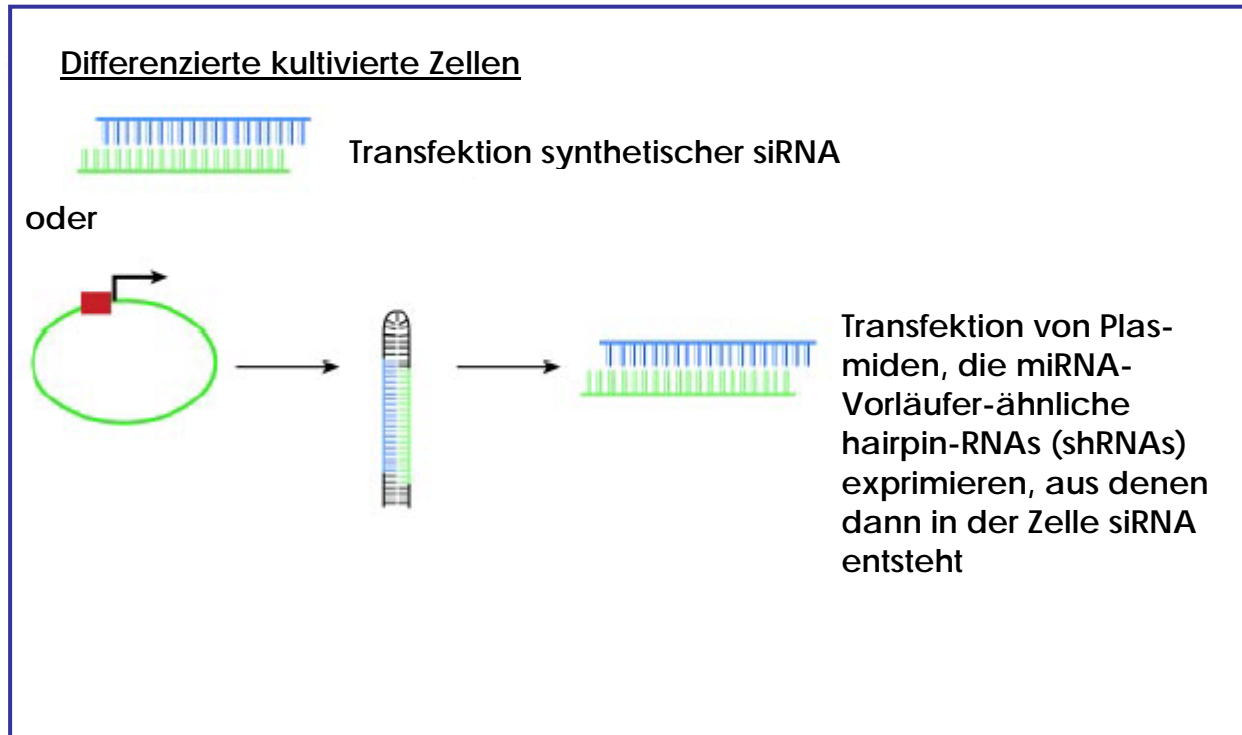


Abbildung 14: **Gen-Silencing „tools“ in differenzierten kultivierten Zellen**

Es sind die zwei möglichen Wege veranschaulicht, wie siRNAs bzw. shRNAs in differenzierte kultivierte Zellen eingebracht werden können, um in diesen RNAi auszulösen.  
aus: (Zamore P.D. 2002)

Ein weiteres wichtiges Kriterium bei allen *in vitro*-Untersuchungen ist der Zeitpunkt nach der Transfektion, zu dem versucht wird, die Auswirkungen des Gen-Silencings durch siRNA oder durch Plasmid-DNA zu detektieren. Dabei haben z.B. Chiu *et al.* (Chiu Y.L. et. al. 2002) anhand der Expression von GFP in HeLa-Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen GFP festgestellt, dass die RNAi-Antwort sechs Stunden nach der Transfektion anfängt, bei 42 Stunden einen Peak erreicht und nach 66 Stunden bereits beendet ist. Je nach Analysetechnik und je nachdem, ob synthetische siRNAs oder Expressionsplasmide transfiziert wurden, kann der Zeitpunkt, zu dem noch ein Gen-Silencing nachweisbar ist, auch später sein.

Einen kurzen Überblick über die verschiedenen Studien, in denen synthetische siRNAs mit unterschiedlichen Transfektionsmethoden (Elektroporation oder [li-

posomale] Transfektionsvermittler) an Mammalia-Zellen eingesetzt wurden, um unterschiedliche Gene auszuschalten, gibt die folgende Tabelle 2:

| Ziel-Gen  | Zelltyp                          | Effektive/<br>getestete<br>siRNA | Zeit<br>(Stunden) | % Silencing                        | Transfektions-<br>Methode         | Referenz                                |
|---|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|
| 21 ver-<br>schie-<br>ne<br><i>RaiA</i> ,<br><i>RASSF1</i> | HeLa,<br>NIH3T3,<br>rat FB       | 21/22                            | 40-48             | unterschied-<br>liches Aus-<br>maß | Oligofectamin                     | (Harborth<br>J. et. al.<br>2001)        |
|   | HeLa,<br>CaCo2                   | 2/2                              | 72                | 97-99                              | Oligofectamin                     | (Moska-<br>lenko S.<br>et. al.<br>2002) |
| <i>ShcA</i>   | HeLa                             | 2/2                              | 48                | 97-99                              | Oligofectamin                     | (Kisielow<br>M. et. al.<br>2002)        |
| <i>HMps1</i><br>kinase                                    | HeLa                             | 1/1                              | 24-28             | nicht be-<br>schrieben             | Oligofectamin                     | (Stucke<br>V.M. et.<br>al. 2002)        |
| PRSC  | HL-5,<br>293                     | 1/1                              | 24-28             | nicht be-<br>schrieben             | Oligofectamin                     | (Wu F. et.<br>al. 2002)                 |
| CD4, CD8  | T-<br>Zellen,<br>HeLa            | 1/5                              | 36                | 85-90                              | Oligofectamin,<br>Elektroporation | (McMa-<br>nus M.T.<br>et. al.<br>2002)  |
| <i>HTF</i> ,<br><i>PSKH1</i>                              | HeLa,<br>Cos-1,<br>293,<br>HaCaT | 6/16                             | 96-120            | 90                                 | Lipofectamin                      | (Holen T.<br>et. al.<br>2002)           |
| <i>Cdc14A</i>   | HeLa                             | 1/1                              | 48                | nicht be-<br>schrieben             | Oligofectamin                     | (Mailand<br>N. et. al.<br>2002a)        |

|                  |           |       |                   |                             |                               |
|------------------|-----------|-------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>EGFP</b>      | HeLa, 1/1 | 24    | >85               | Lipofectamin                | (Caplen N.J. et. al. 2001)    |
| <b>Luc, LMNA</b> | HeLa, 6/7 | 40-48 | >85               | Oligofectamin, Lipofectamin | (Elbashir S.M. et. al. 2001a) |
| <b>PLK1</b>      | HeLa, 1/1 | 48    | 90                | Oligofectamin               | (Liu X. et. al. 2002)         |
| <b>Cdc25A</b>    | HeLa 1/1  | 12-72 | nicht beschrieben | Oligofectamin               | (Mailand N. et. al. 2002b)    |

Tabelle 2: **Einsatz von synthetischen siRNAs in Mammalia-Zellen**  
 modifiziert nach : (McManus M.T. et. al. 2002)

### 2.5.11 Die unspezifischen Antworten auf lange dsRNAs – PKR und das 2-5A-System

Wie schon in Kapitel 2.5.9 angesprochen, sind lange dsRNAs in der Lage, eine unspezifische Reaktion in der Zelle auszulösen, die das eigentliche spezifische Gen-Silencing überdeckt. Dabei induzieren dsRNAs die Produktion von IFN $\alpha/\beta$  und führen damit zur Apoptose (Der S.D. et. al. 1997).

Diese Reaktion wird über zwei mögliche Wege vermittelt (vgl. Abbildung 15). Zum einen ist dies der Weg über PKR, die Interferon (IFN) induzierte RNA-abhängige Proteinkinase, von der wiederum der eukaryontische Initiationsfaktor-2 $\alpha$  (EIF-2 $\alpha$ ) phosphoryliert wird, der unspezifisch die Translation hemmt (Der S.D. et. al. 1997; Gil J. et. al. 2000).

PKR ist eine Serin/Threonin-Kinase mit 551 Aminosäuren, die N-terminal zwei dsRNA-Bindungs-Domänen enthält (DRBM) und C-terminal eine konservierte

Kinasedomäne besitzt (Meurs E. et. al. 1990). Nach dsRNA-Bindung an eine der DRBM oder nach Protein-Protein-Interaktion mit Aktivator-Proteinen dime-riert PKR, wird autophosphoryliert und so aktiviert (Clemens M.J. et. al. 1997; Stark G.R. et. al. 1998). Es ist keine RNA-Sequenz-Spezifität für die Bindung der dsRNA an PKR erforderlich. Nachdem PKR aktiviert ist, erfolgt eine Konformati-onsänderung, wodurch wahrscheinlich die C-terminale katalytische Kinase-domäne freigelegt wird (Carpick B.W. et. al. 1997), so dass PKR nun exogene Substrate phosphorylieren kann. Das am besten charakterisierte Substrat hier-bei ist die kleine  $\alpha$ -Untereinheit des EIF-2 (EIF-2 $\alpha$ ), die an Serin 51 phosphoryliert wird, wodurch die Initiation der Translation durch PKR verhindert wird (Levin D. et. al. 1978). Außerdem reguliert PKR noch weitere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF- $\kappa$ B (Kumar A. et. al. 1997), IRF-1 (Kumar A. et. al. 1997), p53 (Cuddihy A.R. et. al. 1999a; Cuddihy A.R. et. al. 1999b), STAT1 (Wong A.H. et. al. 1997) oder NF-90 (Langland J.O. et. al. 1999) und phosphoryliert wahr-scheinlich DRBP76, ein Bindungsprotein für doppelsträngige RNA (Patel R.C. et. al. 1999). Durch die Modulation all dieser Targets kann PKR diverse zelluläre Prozesse wie Zellwachstum oder Differenzierung kontrollieren und kann seine Antitumorwirkung und antivirale Wirkung ausüben (Gil J. et. al. 2000). PKR wird darüber hinaus zellzyklusabhängig reguliert (Zamanian-Daryoush M. et. al. 1999) und kann nach bestimmten Reizen, wie Lipopolysacchariden (LPS) oder Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Apoptose über eine Aktivität induzieren, die sich von ihrer katalytischen Kinaseaktivität unterscheidet (Lee S.B. et. al. 1994).

Der zweite Weg der unspezifischen Reaktion in Mammalia-Zellen auf lange dsRNAs ist das 2-5A-System, bei dem durch dsRNA die IFN-induzierbaren 2',5'-Oligoadenylat-Synthetasen aktiviert werden, die ihrerseits eine Reihe von 2',5'-Oligoadenylat (2-5A) synthetisieren, was wiederum die 2',5'-Oligoadenylat-abhängige RNase L aktiviert (Stark G.R. et. al. 1998). Die Akti-vierung dieses Signalwegs führt zum Abbau von einzelsträngiger RNA (ssRNA) (Carroll S.S. et. al. 1996; Floyd-Smith G. et. al. 1981; Wreschner D.H. et. al. 1981).

Die 2-5A-Synthetasen sind 67 – 100 kDa groß, werden von verschiedenen Genen kodiert und sind in verschiedenen Kompartimenten der Zelle zu finden. Das von den 2-5A-Synthetasen synthetisierte 2-5A bindet an inaktive, als Monomer vorliegende RNase L, wodurch die Formation eines homodimeren aktiven Enzyms induziert wird. Diese Aktivierung ist reversibel. Die N-terminale Hälfte stellt einen Repressor dar, der die 2-5A-Bindungsstelle enthält. In der C-terminalen Hälfte liegt eine Domäne, die homolog zu Proteinkinasen ist, eine Cystein-reiche Domäne und die Ribonuklease-Domäne (Hassel B.A. et. al. 1993; Zhou A. et. al. 1993). Wird die C-terminale Hälfte von RNase L isoliert untersucht, so können in Abwesenheit von 2-5A RNA-Moleküle geschnitten werden (Dong B. et. al. 1997).

Diese beiden unspezifischen Reaktionsmechanismen sind in der folgenden Abbildung 15 zusammenfassend dargestellt:

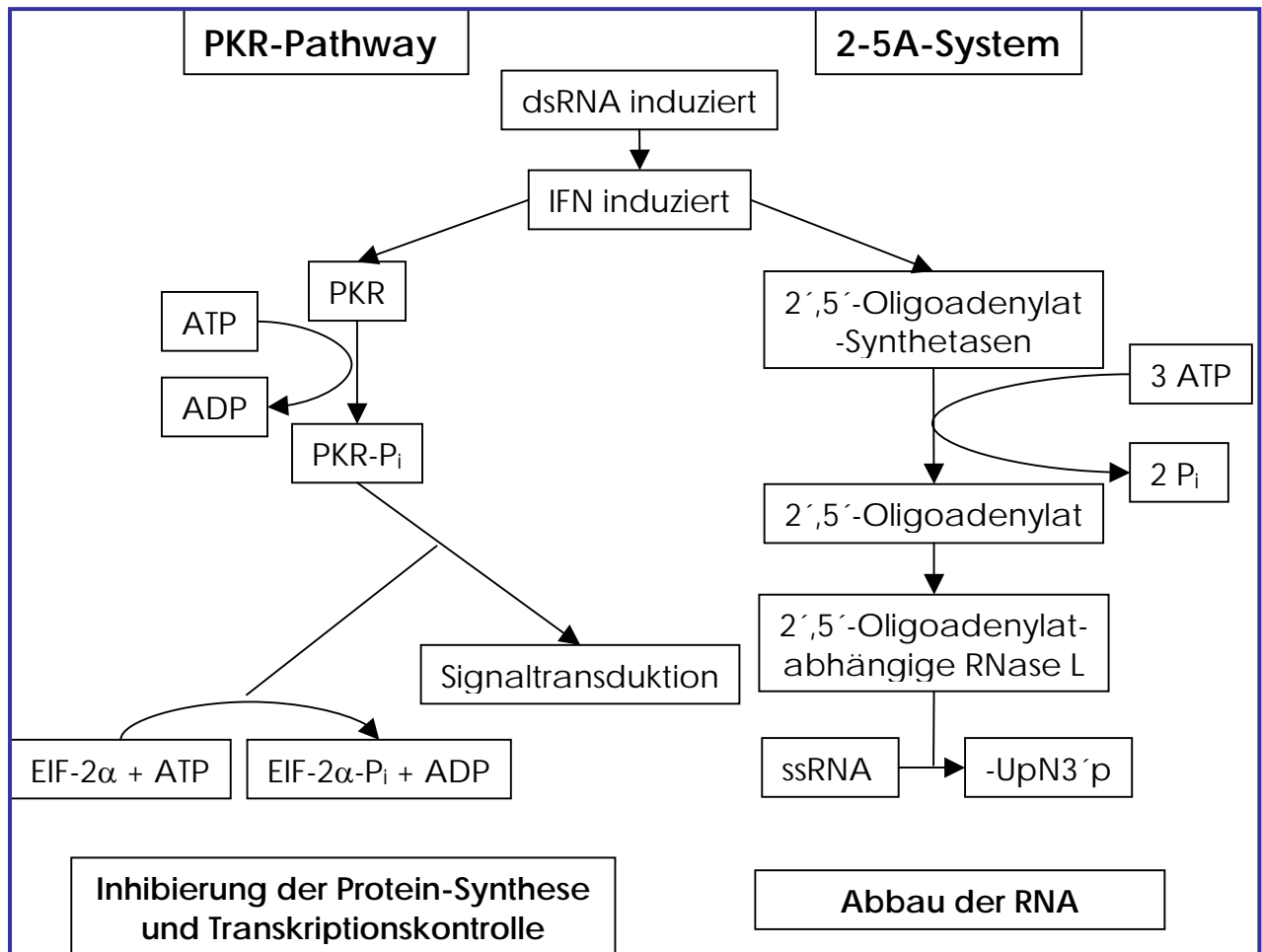


Abbildung 15: Der PKR-Pathway und das 2-5A-System

Die beiden unspezifischen Reaktionsmöglichkeiten der Zellen auf lange dsRNAs sind dargestellt. 2-5A = 2'-5'-Oligoadenylat, PKR = Proteinkinase R, EIF-2 $\alpha$  = eukaryontischer Initiationsfaktor-2 $\alpha$ , IFN = Interferon.

aus: (Stark G.R. et. al. 1998)

Es ist aber möglich, anstelle der langen dsRNAs kleine siRNAs, die eine Länge von ~22 Nukleotiden besitzen, zu verwenden, um den Gen-Silencing-Effekt zu erzeugen (Bass B.L. 2001; Elbashir S.M. et. al. 2001a). Diese synthetisch hergestellten siRNAs imitieren die Produkte von Dicer, werden in den RISC inkorporiert und führen so zur Degradation ihrer Substrat-mRNA. Da siRNAs durch ihre geringe Größe keine unspezifische Reaktion auslösen, kommt es nicht zur PKR-Aktivierung oder zur Aktivierung des 2-5A-Systems, sondern nur zur beabsichtigten spezifischen Gen-Silencing-Reaktion (Caplen N.J. et. al. 2001; Clarke P.A. et. al. 1995)

### 2.5.12 Nachteile der siRNAs bzw. Erfolge mit shRNAs

Ein Nachteil der siRNAs ist, dass ihre Effekte vorübergehend sind, da in Mammalia – zumindest bislang – noch kein Mechanismus gefunden wurde, der eine Amplifikation des Silencing-Signals und damit ein systemisches und länger anhaltendes Silencing ermöglicht. In verschiedenen anderen Systemen, wie z.B. *Drosophila*, *C. elegans* und auch Trypanosomen, ist stabile und vererbba-re RNAi möglich, wenn die siRNA ständig exprimiert wird, üblicherweise als invertierte wiederholte Sequenz, die sodann *in vivo* eine hairpin-Struktur ausbildet (Kennerdell J.R. et. al. 2000; LaCount D.J. et. al. 2000; Shi H. et. al. 2000; Smith N.A. et. al. 2000; Tavernarakis N. et. al. 2000).

Zellen, die keine unspezifische Immunantwort auf dsRNAs, wie z.B. über den in Kapitel 2.5.11 beschriebenen PKR-Weg, besitzen, können auch durch die Expression von 500-Basenpaar langen dsRNAs reguliert werden (Paddison P.J. et. al. 2002b).

Ein anderer Weg, um RNAi zu induzieren, sind die eben angesprochenen short hairpin RNAs (shRNAs). Diese können exogen zugeführt und wie die siRNAs transfiziert werden. Sie können aber auch *in vivo* durch RNA-Polymerase III (Pol III)-Promotoren exprimiert werden, um stabiles Gen-Silencing in Mammalia-Zellen zu erzielen (Brummelkamp T.R. et. al. 2002b; Paddison P.J. et. al. 2002a; Sui G. et. al. 2002). Die hierfür eingesetzte RNA-Polymerase III steuert in der Zelle die Expression von tRNAs und von kurzen RNAs, weshalb sie sich auch für die Synthese der siRNAs oder shRNAs anbietet. Auf diese Weise können von Pol III-Promotoren bis zu  $5 \times 10^6$  shRNA-Moleküle in der Zelle exprimiert werden, so dass dauerhaft ein starkes Signal ausgeübt wird. Dadurch wird eine Amplifikation des Silencing-Signals überflüssig.

Dabei konnten Paddison *et al.* (Paddison P.J. et. al. 2002a) sowohl mit über die T7-Polymerase als auch über die Pol III-vermittelte Expression gebildeten shRNAs zeigen, dass shRNAs in *Drosophila* S2-Zellen und in Mammalia-Zellen zum Gen-Silencing führen. Sie konnten eine 80 – 90%ige Reduktion der Gen-Expression erzielen, was in der Größenordnung dessen lag, was sie mit synthetischer siRNA gegen Luziferase erreichen konnten (Reduktion von 90 – 95%).

Die anfangs mit T7-RNA-Polymerasen hergestellten shRNAs werden in den Zellen durch Dicer in aktive siRNAs prozessiert (Paddison P.J. et. al. 2002a). Es konnten in der o.g. Studie aber auch siRNAs mit der T7-RNA-Polymerase hergestellt werden, die nicht weiter prozessiert werden müssen, sondern direkt wirksam sind. Eine weitere Studie, in der der T7-Promoter verwendet wurde, war die von Jacque *et al.* (Jacque J.M. et. al. 2002), in der das HIV-1 *tif*-Gen in primären, peripheren Lymphozyten ausgeschaltet wurde. Dabei wurden shRNAs exprimiert, die auf einer Länge von 19 Nukleotiden komplementär waren, zwischen drei und sieben Nukleotiden in der Schleife hatten und in der Lage waren, die Expression von *tif* um 70 – 80% zu reduzieren.

Da die T7-RNA-Polymerase als Initiationsstelle zwei Guanosine benötigt, wird die Auswahl der Sequenz erheblich eingeschränkt. Außerdem waren in der Studie von Paddison *et al.* (Paddison P.J. et. al. 2002a) die siRNAs, die zwei ungepaarte Guanosine am 5'-Ende aufwiesen, weit weniger wirksam als die anderen siRNAs. Aus diesem Grund ist eine mögliche Alternative die Expression der siRNAs oder shRNAs mittels Pol III-Promotern, und zwar sind hier die beiden am besten untersuchten der U6 snRNA-Promoter und der H1-RNA-Promoter (zum U6- bzw. p*Silencer*<sup>TM</sup>-Vektor vgl. Kap. 2.6; Paddison P.J. et. al. 2002a). Brummelkamp *et al.* (Brummelkamp T.R. et. al. 2002b) konnten mit dem pSUPER-Vektor in MCF-7-Zellen eine stabile Reduktion der Expression verschiedenster Gene, z.B. CHD1, p53, PLK1 und Cdc20, erzielen. Sie konnten außerdem feststellen, dass der 49-Nukleotid-lange Vorläufer sofort prozessiert wurde und damit kaum nachweisbar war, sondern direkt die gebildete siRNA zu detektieren war. Dies legt den Schluss nahe, dass es effizienter ist, anstelle synthetischer siRNA Plasmide zu applizieren, aus denen dann auf enzymatischem Wege innerhalb kürzester Zeit und mit nur einem DNA-Template die jeweilige siRNA gebildet werden kann (Paddison P.J. et. al. 2002a). Dass für die intrazelluläre Prozessierung der shRNAs ebenfalls Dicer RNase III erforderlich ist, konnte in derselben Studie gezeigt werden, denn in Zellen, in denen Dicer supprimiert war, war keine siRNA nachweisbar. In beiden Studien (Brummelkamp T.R. et. al. 2002b; Paddison P.J. et. al. 2002a) konnte p53 durch die Expression von shRNA über Plasmide stabil ausgeschaltet werden, so dass



es über zwei Monate in Antibiotika-selektierten, stabil transfizierten Zellen nicht mehr nachweisbar war.

Yu *et al.* (Yu J.Y. et. al. 2002) konnten mit dem Maus-U6-Promoter shRNAs erzeugen, die in einer Mäusezelllinie die Expression der Ziel-mRNA spezifisch und vergleichbar mit synthetischer siRNA reduzierten. Lee *et al.* (Lee N.S. et. al. 2002) verwendeten hingegen den humanen U6 snRNA-Promoter, der ebenfalls ein einfaches Terminationssignal hat (eine Folge von Thyminen), um damit in humanen 293-Zellen die Expression von HIV-1 *rev* zu reduzieren. Auch Miyagishi *et al.* (Miyagishi M. et. al. 2002) und Paul *et al.* (Paul C.P. et. al. 2002) setzten den humanen U6-Promoter ein, weil er keine internen Promoter-Sequenzen wie A- oder B-Box enthält, sondern die siRNA direkt transkribiert und zur Duplex geformt werden kann. Diese siRNAs haben jeweils am 3'-Ende einen Überhang von ~4 – 5 Uridinen. Miyagishi *et al.* konnten in der erwähnten Studie in HeLa S3-Zellen die Expression von stabil transfiziertem GFP sowie die Expression von Luziferase ausschalten. Außerdem gelang ihnen die Reduktion der Expression von  $\beta$ -Catenin als endogenem Target. Paul *et al.* schalteten in der angesprochenen Studie ebenfalls in HeLa S3-Zellen die Lamine A/C entweder mittels synthetischer siRNA oder mit siRNA, die von Klonen exprimiert wurde, aus. Sui *et al.* (Sui G. et. al. 2002) konnten mit dem Maus-U6-Promoter ebenfalls erfolgreich durch Ko-Transfektion die Expression von GFP bzw. der Lamine A/C in humanen HeLa-Zellen reduzieren.

In einer Studie, in der die siRNA mit Hilfe eines retroviralen Systems mit dem humanen H1-Promoter in die Zellen eingebracht wurde, konnten Barton *et al.* (Barton G.M. et. al. 2002) zeigen, dass die Expression von p53 in HEK293T-Zellen sowie in primären humanen Fibroblasten durch die so hergestellten siRNAs deutlich reduziert werden konnte.

Eine Zusammenfassung der eben beschriebenen Studien gibt die folgende Tabelle 3:

| Gen                                | Zelltyp                                    | Loop-Größe<br>(nt) | % Silencing<br>(max.)  | Referenz                               |
|------------------------------------|--|--------------------|------------------------|--|
| <i>Luc, p53</i>                    | HeLa, 293, 4-23<br>Cos-1, NIH3T3,<br>IMR90 |                    | 85-90                  | (Paddison P.J.<br>et. al. 2002a)       |
| <i>HIV rev</i>                     | 293  | -                  | 90                     | (Lee N.S. et. al.<br>2002)             |
| <i>Neuronales<br/>Tubulin, GFP</i> | P19  | 3                  | nicht be-<br>schrieben | (Yu J.Y. et. al.<br>2002)              |
| <i>Luc, CD4, CD8</i>               | T-Zellen, HeLa                             | 4-9                | 80-85                  | (McManus M.T.<br>et. al. 2002)         |
| <i>GFP, Dnmt1,<br/>LMNA, cdk-2</i> | HeLa, U20S, 6<br>H1299, C-33A              |                    | >90                    | (Sui G. et. al.<br>2002)               |
| <i>GFP, LMNA</i>                   | HeLa                                       | 4                  | >90                    | (Paul C.P. et.<br>al. 2002)            |
| <i>p53, CDH1,<br/>CDC20</i>        | HeLa, MCF-7                                | 2-9                | >90                    | (Brummelkamp<br>T.R. et. al.<br>2002b) |
| <i>Hygl GFP, Luc,<br/>CTNNB1</i>   | HeLa                                       | -                  | 95                     | (Miyagishi M.<br>et. al. 2002)         |
| <i>Tat, CAT</i>                    | 293T                                       | 15                 | 70-80                  | (Zeng Y. et. al.<br>2002)              |
| <i>HIV-1 vif</i>                   | Lymphozyten                                | 3-7                | 70-80                  | (Jacque J.M.<br>et. al. 2002)          |

Tabelle 3: **Silencing-Konstrukte**

modifiziert nach: (McManus M.T. et. al. 2002)

### 2.5.13 RNAi in Mäusen – die ersten Studien

Die erste Studie mit RNAi an Embryonen von Mäusen wurde schon im Jahre 2000 von Wianny *et al.* (Wianny F. et. al. 2000) durchgeführt. Allerdings waren dies noch keine *in vivo*-Untersuchungen, sondern sie konnten *in vitro* c-mos in der Oozyte der Maus sowie von der Zygote exprimiertes E-Cadherin bzw. transgen exprimiertes GFP in Embryonen vor der Preimplantation ausschalten. Für ihre Versuche haben sie die befruchteten Oozyten aus 4 – 6 Wochen alten Mäusen (F<sub>1</sub>-Generation) entnommen und in Kultur genommen. Um diese befruchteten Ein-Zell-Embryonen zu erhalten, wurde den mütterlichen Tieren hCG (humanes Choriogonadotropin) injiziert und 20 – 24 Stunden später die befruchteten Ein-Zell-Embryonen entnommen. In diese Zellen wurde die dsRNA per Mikroinjektion eingebracht. Die Embryonen wurden im Anschluss an die Injektion von dsRNA gegen GFP noch 3 – 4 Tage in Kultur gehalten, wobei in den mikroinjizierten Embryonen keine GFP-Fluoreszenz mehr nachweisbar war, es war aber noch möglich, sie erfolgreich in Mäuse zu reimplantieren, d.h. es konnte keine toxische Wirkung der dsRNA beobachtet werden. Ähnliche Effekte konnten nach der Injektion von dsRNA gegen E-Cadherin beobachtet werden, denn auch hier konnte die Expression deutlich reduziert werden. Nach der Injektion von dsRNA gegen c-mos in die Oozyte konnte ebenfalls die c-mos-Expression deutlich reduziert werden. In einer ähnlich angelegten Studie an Maus-Oozyten bzw. –Embryonen konnten Svoboda *et al.* (Svoboda P. et. al. 2001) die Wirkung von shRNA, die von Plasmiden exprimiert wurde, auf die Expression von GFP und c-mos zeigen. Hierbei war die Reduktion der Expression durch die shRNAs vergleichbar mit der Reduktion, die durch konventionelle siRNA erzielt werden konnte.

Lewis *et al.* (Lewis D.L. et. al. 2002) injizierten mit der „High-Pressure-Technik“, bei der große Volumina an Puffer (~ 2 ml), der die jeweilige siRNA oder das Expressionsplasmid enthält, eingesetzt werden, siRNA gegen die Transgene GFP bzw. Luziferase in die Schwanzvene von neugeborenen Mäusen. Sie wollten deren Wirkung analysieren und mit der Wirkung, die sie *in vitro* mit siRNA gegen GFP erzielen konnten, vergleichen. Dies stellte damit den ersten wirkli-

chen *in vivo*-Hinweis für die Wirksamkeit von siRNA dar. Allerdings wurde in dieser Studie nur die Expression eines Transgens, und nicht eines endogenen Gens reduziert. Auch wurde die Aufnahme der mit dieser Technik injizierten siRNA nur in Hepatozyten untersucht. Dort konnten allerdings hohe Aufnahme-raten erzielt werden. Einen weiteren Fortschritt stellen die Untersuchungen von McCaffrey *et al.* (McCaffrey A.P. *et. al.* 2002) dar, in denen die Expression von ko-injizierten Genen (Luziferase, HCV [Hepatitis C-Virus]) ausgeschaltet wurde, aber nicht die von endogenen Genen. Es wurden nicht nur chemisch synthetisierte siRNAs untersucht, sondern auch shRNAs, die *in vivo* von Expressionsplasmiden transkribiert wurden. Diese waren bei der Induktion des Gen-Silencings genauso effektiv wie die synthetischen siRNAs. Somit konnten die Autoren zeigen, dass mit Plasmid-kodierter shRNA eine starke, spezifische RNAi-Antwort in Mäusen induziert werden kann.

Ein Ansatz, bei dem in Mäusen die Expression eines endogenen Gens ( $\beta$ -Glucuronidase) reduziert werden konnte, ist die Studie von Xia *et al.* (Xia H. *et. al.* 2002), in der rekombinante Adenoviren mit CMV-Promoter eingesetzt wurden, die die siRNA exprimierten. Die Autoren injizierten die Adenoviren, die siRNA gegen die murine  $\beta$ -Glucuronidase exprimieren, in die Schwanzvene und konnten drei Tage später in dem entnommenen Lebergewebe eine deutlich reduzierte  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität feststellen.

Brummelkamp *et al.* (Brummelkamp T. *et. al.* 2002a) entwickelten wiederum einen anderen Ansatz, der auf ihrer kurz vorher veröffentlichten Studie (Brummelkamp T.R. *et. al.* 2002b) beruht, indem sie eine humane Pankreaskarzinom-Zelllinie *in vitro* mit Retroviren infizierten, die siRNA gegen *K-Ras* exprimieren. Nach drei Tagen wurden diese Zellen in athymische Mäuse injiziert und die Angehrate der Tumoren ermittelt. Innerhalb von fünf Wochen entwickelten alle Kontrollmäuse, denen nur die nicht-vorbehandelten Pankreaskarzinomzellen injiziert worden waren, ohne Ausnahme Tumoren. Die Mäuse hingegen, die mit infizierten Zellen behandelt worden waren, entwickelten keine Tumoren.

## 2.6 U6-Promoter und pSilencer™ 1.0-U6 siRNA-Expressions-Vektor

U6-Promoter haben die praktische Eigenschaft, wenn es um die Expression von siRNA geht, dass sie geringere Anforderungen an die zu exprimierende Sequenz stellen als beispielsweise der T7-Promoter. So ist beim U6-Promoter lediglich erforderlich, dass die ligierte Sequenz mit einem Guanosin an der Position +1 beginnt und mit mehreren (meist fünf) Uridinen bzw. Thymidinen endet, die als Terminationssignal für die RNA-Polymerase III dienen. Außerdem werden die Pol III-Promoter selber nicht transkribiert, so dass nur die gewünschte siRNA- bzw. shRNA-Sequenz entsteht, und nicht noch Teilsequenzen der Promoter-Sequenz mit abgeschrieben werden, die ihrerseits das Ausmaß des Gen-Silencings verringern würden.

Ein speziell für die Expression von siRNA in humanen Zellen oder Geweben entwickeltes Plasmid mit U6-Promoter ist der pSilencer™ 1.0-U6 siRNA-Expressions-Vektor, der die für Klonierung und bakterielle Replikation erforderlichen Sequenzen enthält, z.B. Ampizillinresistenz und MCS (multiple cloning site). In diesen ist von Herstellerseite aus bereits der U6-RNA-Polymerase III-Promoter kloniert, mit dem später die siRNA-Transkripte hergestellt werden können.



### 3. ZIELSETZUNG

Die momentan angewandte Chemotherapie im Einsatz gegen verschiedene Krebsformen ist aufgrund ihrer begrenzten Spezifität immer auch gegen andere stark proliferierende Gewebe, und somit nicht nur gegen Tumorgewebe gerichtet. Auch die Bestrahlungstherapie kann nicht gezielt das Tumorgewebe zerstören, sondern schädigt auch das umliegende Gewebe, beides mit nicht unerheblichen Beeinträchtigungen für das alltägliche Leben der Betroffenen. Aus diesem Grunde ist es überaus wichtig, neue Technologien und sich daraus ergebende Therapieprinzipien zu entwickeln, die eine spezifische Hemmung der Proliferation von Krebszellen bzw. -gewebe ermöglichen. Damit könnten die Nebenwirkungen, die von der Krebstherapie ausgehen, drastisch reduziert werden.

PLK1 ist eine Kinase aus der Familie der Serin/Threonin-Kinasen, die in malignen Geweben und in Geweben mit hohem mitotischen Index überexprimiert wird, was mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergeht (Golsteyn R.M. et. al. 1994; Holtrich U. et. al. 1994; Knecht R. et. al. 1999; Kneisel L. et. al. 2002; Yuan J. et. al. 1997). Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Hemmung der PLK1-Funktion durch verschiedene neue Techniken. Dass es schwerwiegende Auswirkungen auf Zellen – in der genannten Studie auf HeLa-Zellen – hat, wenn die PLK1-Aktivität vermindert wird, konnte in einer Studie von Lane und Nigg (Lane H.A. et. al. 1996) gezeigt werden, in der sie PLK1-Antikörper in die Zellen mikroinjizierten. Die Zellen waren in der G<sub>2</sub>-Phase blockiert. Dies ist der Ansatzpunkt auch für die vorliegende Arbeit, denn wenn die Hemmung eines Enzyms zum Verharren der Zellen an einem der unterschiedlichen Zellzykluskontrollpunkte führt, könnte so das Tumorstadium gestoppt werden.

Um PLK1 spezifisch und selektiv auszuschalten, bieten sich Hemmprinzipien an, die auf der Ebene der mRNA angreifen, denn so ist ein besonderes Maß an Spezifität alleine dadurch gewährleistet, dass nur das Gen von Interesse ausgeschaltet wird. Auch muss das Prinzip in Tiermodellen anwendbar sein, um

eine mögliche Anwendung für die Therapie vorzubereiten. Dies ist beispielsweise mittels Mikroinjektion von Antikörpern in einzelne Zellen nicht möglich.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit zum einen Antisense-Oligonukleotide (ASOs) eingesetzt werden, die illegitime mRNA/DNA-Hybride mit der Ziel-mRNA bilden und damit zur selektiven Zerstörung der PLK1-mRNA führen, so dass PLK1 nicht mehr exprimiert werden kann.

Zum anderen sollten „small interfering“ RNAs (siRNAs) bzw. Plasmide, die hairpin-RNAs (shRNAs) exprimieren, eingesetzt werden, wobei die siRNAs bzw. shRNAs aufgrund ihres doppelsträngigen Charakters ebenfalls zur Zerstörung der Ziel-mRNA führen. Trotz verschiedener Ansätze ist es bislang noch keiner Arbeitsgruppe gelungen, tumortragende Tiere mit siRNA – in keiner der bislang beschriebenen Präparationen – *in vivo* zu behandeln und dadurch das Tumorstwachstum zu inhibieren. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es daher, im Xenograft-Modell siRNAs gegen PLK1 bzw. Expressionsplasmide auf ihre Fähigkeit zu testen, das Tumorstwachstum zu hemmen.

Damit sollten zwei Techniken entwickelt werden, unter deren Einsatz die Auswirkungen auf verschiedene Krebszelllinien, humane Xenograft-Modelle sowie ein primäres Zellsystem untersucht werden können.

Zunächst galt es, ASOs zu identifizieren, die in der Lage sind, die PLK1-mRNA-Expression effizient zu hemmen. Die mit diesen ASOs behandelten Zellen sollten dann auf ihre biologischen Eigenschaften getestet werden: PLK1-Proteinexpression, Wachstumsverhalten, Apoptose, Zellzyklusveränderungen, Morphologie. Das besondere Interesse galt dem Vergleich der Hemmung der PLK1-Expression durch ASOs und siRNAs im Rahmen der neuen Technik der RNA-Interferenz, wobei auch mit den siRNAs die Zellen auf ihre biologischen Eigenschaften (s.o.) getestet werden sollten. ASOs werden bereits in klinischen Studien eingesetzt, das Phänomen der RNA-Interferenz wird hingegen zur Zeit erst in seinen biochemischen Grundlagen erforscht und ist somit als „neue Strategie“ zu bezeichnen.



Im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen mit beiden Techniken sollten folgende Parameter bestimmt werden:

- Veränderung der PLK1-mRNA-Expression mittels Northern-Blots
- Veränderung der PLK1-Proteinmenge mittels Western-Blots
- Veränderung der Lamin A/C-Proteinmenge mittels Western-Blots als Kontrolle für das Prinzip der RNA-Interferenz
- Veränderung der Proliferation mittels Bestimmung der Zellzahl über einen Zeitraum von bis zu 96 Stunden nach der Transfektion
- Veränderung der Kinaseaktivität von endogenem PLK1 im Kinaseassay mit dem Substrat Kasein bzw. der CRS
- Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie
- Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie nach Anfärbung der Zellen mit Propidiumiodid
- Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin sowie PLK1 zur Ermittlung des Phänotyps und der PLK1-Protein-Reduktion

Außerdem sollten in humanen Xenograft-Tierexperimenten folgende Parameter bestimmt werden:

- Wachstum der Tumoren mittels Kalipermessung
- Immunhistochemische Färbung von PLK1 und MIB-1 bzw. Ki-67 in behandelten und unbehandelten Tumoren

Für das Xenograft-Experiment mit Expressionsplasmiden sollte *ex vivo* das optimale Verhältnis zwischen Plasmid-DNA und dem Nukleaseinhibitor ATA ermittelt werden. Im Xenograft-Experiment sollten dann neben den oben beschriebenen Parametern bestimmt werden:

- Wachstum der Tumoren während weiteren vier Wochen nach Beendigung der Therapie
- Bestimmung des Gewichts der Mäuse im Verlaufe des Experiments
- Veränderung der PLK1-mRNA-Expression in den Tumoren mittels Northern-Blots
- Nachweis der Plasmide im Tumor mittels Southern-Blot und PCR



## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 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)

CELLQuest (BD Biosciences Heidelberg)

Digitalkamera DC290 (Kodak, Stuttgart)

Elektrophoreseapparatur Mini-Protean III (Bio-Rad, München)

Elektrophoreseapparatur Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, München)

Entwicklermaschine Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Wiesloch)

FACScan (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)

Gefrierschrank -80°C (Revcu Scientific, Veenendal/Niederlande)

GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego/USA)

Heizplatte 60°C DHP 37 (Fisher Scientific, Nidderau)

Hybridisierungs-ofen Model 310 (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach)

Konfokales Laserscan-Mikroskop (Leica, Wetzlar)

Kühlplatte Jung Histoblock (Leica, Bensheim)

Kühlschrank +4°C (Liebherr, Ochsenhausen)

Magnetrührer Ikamak RTC (IKA Labortechnik, Staufen)

Mikro-Dismembrator II (B.Braun, Melsungen)

Mikroskop IDO3 (Zeiss, Jena)

Mikrowellengerät (Bosch, Stuttgart)

ModFit LT for Mac (BD Biosciences, Heidelberg)

Netzgerät Power PAC 300 (Bio-Rad, München)

pH-Meter Mikroprozessor pH-Meter HI 9321 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)

Photodokumentationssystem Kodak 1D 3.5 (EDAS 290) (Kodak, Stuttgart)

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)

Rotator (Fisher-Scientific, Nidderau)

Schüttler (Fisher-Scientific, Nidderau)

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, Wiesbaden)

Thermoblock DRI-Block BB-3A (TECHNE, Burkhardtsdorf)

Thermo-Cycler (Perkin Elmer Cetus, Köln)

Thermo-Cycler (Eppendorf, Hamburg)

Transluminator (Vilber Lourmat, Frankreich)

Trockenschrank 6200 (Heraeus, Hanau)

VacConnector (Qiagen, Hilden)

Vakuumpumpe Refrigerated Condensation Trap RT100 (Fischer-Laborbedarf, Frankfurt/M.)

Vakuumpumpe Membranpumpe (Vacuumbrand GmbH + Co., Wertheim)

Vortex Janke &Kunkel (Ika Labortechnik, Staufen)

Waage Mettler PM 2000 (Mettler Instruments GmbH, Gießen)

Wasserbad klein (Mettmert, Schwalbach)

Wasserbad groß (Mettmert, Schwalbach)

Zellzählkammer Neubauer (Renner, Darmstadt)

Zentrifuge Rotanta/RPC (Hettich, Tuttlingen)

Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)

Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Atemmaske Carpex® carat (Beiersdorf AG, Hamburg)

Cryoröhrchen (Nalgene® Brand Products, Hamburg)

Deckgläser (Marienfeld, Lauda-Königshofen)

Eppendorfgefäße 500 µl; 1,5 ml; 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg)

Färbekammer nach Hellendahl (Glas) (Fisher-Scientific, Nidderau)

Färbeküvette nach Hellendahl (Merck-Eurolab, Frankfurt/M.)

Falcon® Röhrchen 15 ml, 50 ml (BD Biosciences, Heidelberg)

Falcon® Zellkulturflaschen 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup> (BD Biosciences, Heidelberg)

Falcon® FACSRöhrchen 2052 (BD Biosciences, Heidelberg)

Falcon® Cell Scraper (BD Biosciences, Heidelberg)

Feuchtkammer (Fisher-Scientific, Nidderau)

Filter Millex®-GP (Millipore GmbH, Eschborn)

Filterpapier (Whatman, Maidstone/England)

Filterpapier (Merck, Frankfurt/M.)

HiSpeed™ Plasmid Purification Kit – Midi und Maxi (Qiagen, Hilden)

Hyperfilm™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Hyperfilm™ MP™ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Immobilon™-P Transfermembran, PVDF (Millipore, Bedford/USA)

Kanülen BD Microlance™ 3 (BD Biosciences, Heidelberg)

Membran Hybond™-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Nick™ Columns Sephadex™ G-50 DNA-Grade (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Nitrilhandschuhe Gr. S & Gr. M (Kimberley-Clark®, Roswell/USA)

Objektträger Super Frost Plus (Menzel, Braunschweig)

Photometrische Küvetten (Brand GmbH, Wertheim)

Photometrische Küvetten Uvette Starter Set (Eppendorf, Hamburg)

Pipetten 5ml, 10 ml (Greiner GmbH, Solingen)

Pipetten 10 ml, 25 ml (Corning Incorporated, MA/USA)

Pipettenspitzen ART-Aerosol Resistant Tips (ART, Californien/USA)

Pipettenspitzen (Star Lab, Ahrensburg)

QIAprecipitator (Qiagen, Hilden)

Schikanen-Erlenmeyerkolben 500 ml (Fisher Scientific, Nidderau)

Slide-Flasks – Objektträger-Zellkulturgefäße 10 cm<sup>2</sup> (Nunc, Wiesbaden)

Spritzen Injekt 5 ml, 20 ml, 30 ml (B. Braun, Melsungen)

Spritzen 1 ml OmniFix®-F 1 ml (B. Braun, Melsungen)

6-well-Platten Nunclon™ (Nunc, Wiesbaden)

Zellkulturschalen 10 cm Ø (Greiner GmbH, Solingen)

### **4.1.3 Antikörper, Chemikalien, Primer und Bakterien**

#### **4.1.3.1 Antikörper**

Anti-β-Aktin, monoklonal (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Anti-Lamin A/C, monoklonal (Santa Cruz, Heidelberg)

Anti-Ki-67, polyklonal (Dako, Hamburg)

Anti-PLK1, monoklonal (cocktail) (Zymed Laboratories, San Francisco/USA)

Anti-PLK1 mAb, monoklonal (BD Biosciences Transduction Laboratories, Heidelberg)

Anti-PLK1, Kaninchen (Yuan J. et. al. 1997)

Anti-α-Tubulin, monoklonal (Dianova, Hamburg)

Anti-α-Tubulin, Ratte (Serotec/Biozol, Eching)

Anti-γ-Tubulin, monoklonal (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

goat-anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz, Heidelberg)

polyvalenter, biotinylierter Sekundärantikörper (Coulter-Immunotech, Hamburg)

Cy™3-konjugierter goat-anti-mouse IgG (H+L) (Dianova, Hamburg)

Cy™3-konjugierter donkey-anti-rabbit IgG (H+L) (Dianova, Hamburg)

Cy<sup>TM</sup>3-konjugierter goat-anti-rat IgG (H+L) (Dianova, Hamburg)

DTAF-konjugierter goat-anti-mouse IgG (H+L) (Dianova, Hamburg)

#### 4.1.3.2 Chemikalien

Adenin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

AEC Chromogen (Coulter-Immunotech, Hamburg)

Agarose (ICN Biomedical GmbH, Eschwege)

Agarose mod. (Millipore GmbH, Eschborn)

2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride, DAPI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Ampizillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Apal (NewEngland Biolabs GmbH, Frankfurt/M.)

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Aurintricarboxylic acid, ATA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

BIO-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München)

Bromphenolblau (Fluka, Buchs/CH)

BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg)

Cruz Marker<sup>TM</sup> MW Standards (Santa Cruz, Heidelberg)

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 6000 Ci/mmol (Perkin Elmer, Köln)

Cycle TEST<sup>TM</sup> PLUS DNA reagent kit (BD Biosciences, Heidelberg)

DEPC – Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Dinatriumhydrogenphosphat (AppliChem, Darmstadt)

Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

DMSO Dimethylsulfoxid (ICN Biomedical GmbH, Eschwege)

DNA Ladder 1 kb, 100 bp (Invitrogen, Karlsruhe)

DNA Polymerase I, Large Fragment (Klenow) (NewEngland Biolabs GmbH, Frankfurt/M.)

DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)

Dulbecco's modified eagle's medium (Invitrogen, Karlsruhe)

Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 HAM (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

ECL – enhanced chemiluminescent solution (Pierce, Bonn)

*Eco*RI (NewEngland Biolabs GmbH, Frankfurt/M.)

EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure (AppliChem, Darmstadt)

EGTA – Ethylenglykol-Bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Enfluran® (Abbott, Wiesbaden)

EnVision+System (Dako, Hamburg)

Essigsäure (Merck, Darmstadt)

Ethanol (Merck, Darmstadt)

Ethidiumbromid (AppliChem, Darmstadt)

FACSFlow (BD Biosciences, Heidelberg)

FACSRinse (BD Biosciences, Heidelberg)

Fötales Kälberserum FCS (PAA Laboratories GmbH, Linz/Österreich)

Formaldehyd (AppliChem, Darmstadt)

Formamid (AppliChem, Darmstadt)

Formalin (Riedel-de Haën, Seelze)

FuGENE™6 (Roche, Mannheim)

Gelatine (Merck, Darmstadt)

Glutathion Sepharose™ 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Glycerol (AppliChem, Darmstadt)

Glyceringelatine (Chroma-Gesellschaft Schmidt, Köngen)

Glycin (AppliChem, Darmstadt)

Guanin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

HAM'S NUTRIENT Medium F12 (PAA Laboratories GmbH, Linz/Österreich)

HEPES buffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

HEPES-KOH (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

*Hind*III (NewEngland Biolabs GmbH, Frankfurt/M.)

Histoclear (= Xylolersatz) (Shandon, Frankfurt/M.)

Isopropanol (Riedel-de Haën, Seelze)

Kaliumazetat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)



Kaliumchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)  
Kalziumchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Kasein (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
*Kpn I* (NewEngland Biolabs GmbH, Frankfurt/M.)  
LB-Agar (International Diagnostics Group plc, Lancashire/UK)  
LB-Broth (LENNOX) (International Diagnostics Group plc, Lancashire/UK)  
L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe)  
Magnesiumazetat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Magnesiumchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Manganchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
 $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)  
Methanol (Riedel-de Haën, Seelze)  
MEBM Minimum essential basal medium (Clonetics, Verviers/Belgien)  
Mineralöl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure (MOPS) (AppliChem, Darmstadt)  
Natriumazetat (Fluka, Buchs/CH)  
Natriumazetat-Pufferkonzentrat (Coulter-Immunotech, Hamburg)  
Natriumazid (Riedel-de Haën, Seelze)  
Natriumchlorid (NaCl) (Merck, Darmstadt)  
Na-Deoxycholat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Natriumfluorid (NaF) (Fluka, Buchs/CH)  
Natriumhydroxid (NaOH) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
NP-40 (ICN Biomedical GmbH, Eschwege)  
Oligofectamin (Invitrogen, Karlsruhe)  
Opti-MEM I (Invitrogen, Karlsruhe)  
Penicillin–Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe)  
Phenylmethansulfonylsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Phosphate buffered saline, PBS (Invitrogen, Karlsruhe)  
Platinum® Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe)

Prestained SDS-Page Standards broad range (Bio-Rad, München)  
Propidiumiodid – PI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Proteaseinhibitor Complete Mini (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)  
Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz, Heidelberg)  
p*Silencer*<sup>TM</sup> 1.0-U6 siRNA-Expressions-Vektor (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire/UK)  
QiaAmp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)  
QiaShredder (250) (Qiagen, Hilden)  
QuickHyb<sup>®</sup> Hybridization Solution (Stratagene, Amsterdam/Niederlande)  
Quick Ligation<sup>TM</sup> Kit (NewEngland Biolabs GmbH, Frankfurt/M.)  
Ready-Gel 12% PAA (Bio-Rad, München)  
Ribonuclease A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
RNA-Ladder 1 kb, 100 bp (NewEngland Biolabs, Frankfurt/M.)  
RNAlater (Qiagen, Hilden)  
RNase-free water (Qiagen, Hilden bzw. Dharmacon, Colorado/USA)  
RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor (Promega, Mannheim)  
RNeasy Mini Kit (250) (Qiagen, Hilden)  
RPMI-1640 Medium (ohne L-Glutamin) (Invitrogen, Karlsruhe)  
Salzsäure (HCl) (Riedel-de Haën, Seelze)  
Select Yeast Extract (Invitrogen, Karlsruhe)  
Select Peptone 140 (=Bacto-Trypton) (Invitrogen, Karlsruhe)  
SingleQuots (Clonetics, Verviers/Belgien)  
Sonicated Salmon Sperm DNA kit (Stratagene, Amsterdam/Niederlande)  
Taq<sup>2000</sup> Polymerase (Stratagene, Amsterdam/Niederlande)  
Thymidin (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Tri-Natriumzitat-Dihydrat (Roth, Karlsruhe)  
TrisBase (USB, Ohio/USA)  
Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
Trypsin EDTA (Invitrogen, Karlsruhe)  
Trypanblau 0,4% (Invitrogen, Karlsruhe)  
Tween-20 (AppliChem, Darmstadt)

Ultrafree-DA-Säulen (Millipore GmbH, Eschborn)

Vectashield (Linaris, Wertheim)

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30% (Roth, Karlsruhe)

Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% (Coulter-Immunotech, Hamburg)

Zitronensäure-Monohydrat (Fluka, Buchs/CH)

#### 4.1.3.3 Primer

Für Northern-Blots – mit den jeweiligen Positionen im offenen Leseraster von PLK1 (NCBI Accession-Nummer X75932), β-Aktin (NCBI Accession-Nummer X00351 und GAPDH-2 (NCBI Accession-Nummer M17851):

PLK1-17-low: 5´-TGATGTTGGCACCTGCCTTCAGC-3´ (Position 1533 – 1554)

β-Aktin-low: 5´-CATGAGGTAGTCAGTCAGGTC-3´ (Position 591 – 611)

GAPDH-2: 5´-TCCCTGCCTCTACTGGCGCT-3´ (Position 653 – 672)

PLK1-150as: 5´-GCAGCAGAGACTTAGGCACAA-3´ (Position 310 – 330)

Für die Klonierung – mit den Positionen im offenen Leseraster von PLK1 (NCBI Accession-Nummer X75932):

shRNA/PLK1: 5´-GGCGGCTTGCCAAGTGCTTA-3´ (247–266)

5´-AGCTTAAGCACTTGGCAAAGCCGCC-3´ (266–247)

5´-AGCTTAAGCACTTGGCAAAGCCGCCCTTTTGG -3´ (266–244)

5´-AATCAAAAAGGGCGGCTTGCCAAGTGCTTA -3´ (244–266)

shRNA/PLK1S: 5´-GGGCCCTGTACTAGGTTGCTG-3´

5´-AGCTCAGCAACCTAGTACAGGGCCC-3´

5´-AATCAAAAAGGGCCCTGTACTAGGTTGCTG -3´

5´-AATCCAGCAACCTAGTACAGGGCCCCTTTT-3´

Für die PCR zum Nachweis der Expressionsplasmide (pBS/U6) in den Tumoren:

pBS-500s: 5´-GAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT-3´

pBS-500as: 5´-CGTCGTTTACAACGTCGTGACTG-3´

#### 4.1.3.4 Bakterien

Die Bakterien, die für die Klonierung der Plasmide zur Expression der shRNAs eingesetzt wurden, waren *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Karlsruhe). DH5 $\alpha$  ist ein Bakterienstamm, der häufig zur DNA- bzw. Plasmid-Herstellung eingesetzt wird, da er geringere Endonuklease-Aktivitäten (*endA*) aufweist als andere *E. coli*-Stämme und dadurch die gebildeten Plasmide nicht gleich wieder abgebaut werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass DH5 $\alpha$  *phoA*-defizient ist. Das *phoA*-Gen kodiert in *E. coli* für die periplasmatische alkalische Phosphatase. *phoA*-defiziente Stämme sind aus diesem Grund geeignet, wenn das Auftreten von unerwünschten Ereignissen, z.B. konstitutive Phosphatase-Mutationen oder Schwankungen in der alkalischen Phosphatase-Aktivität, vermieden werden soll. Insgesamt hat sich also gezeigt, dass mit DH5 $\alpha$  hohe Ausbeuten an Plasmid-DNA erreicht werden können, weshalb der Stamm zumeist für diese Anwendungen eingesetzt wird.

#### 4.1.4 Testsubstanzen

##### 4.1.4.1 Antisense-Oligonukleotide (ASOs)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antisense-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert, HPSF<sup>®</sup> („high purified salt free“) aufgereinigt und direkt mittels MALDI-TOF-Analyse (Massenspektrometrie) die Reinheit verifiziert. Die Lage in der PLK1-Sequenz und die jeweiligen PLK1-ASO-Sequenzen sowie die Sequenz und die Lage des HSV-ASO sind im folgenden angegeben (Abb. 16 und Tab. 4).

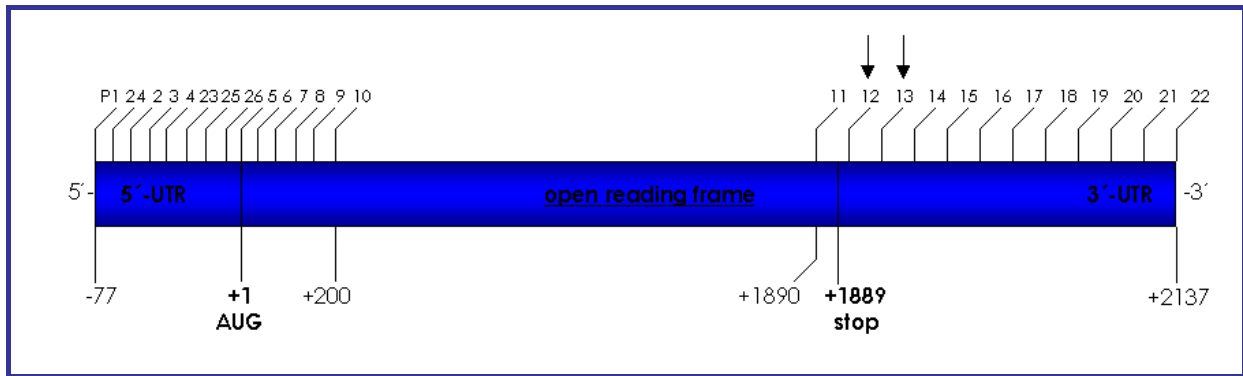


Abbildung 16: Lageplan der verschiedenen gegen PLK1 gerichteten ASOs

Es ist symbolisch in blau die PLK1-mRNA dargestellt mit 5'- und 3'-untranslatiertem Bereich sowie offenem Leseraster und anhand dieser die Lage der 26 verschiedenen PLK1-ASOs gezeigt.

| Oligo-Nummer | Sequenz              | Lage in der PLK1- bzw. HSV-mRNA |
|--------------|----------------------|---------------------------------|
| P1           | cctccccggcaactctcgag | 5'-UTR                          |
| P2           | cgaccgctccgctcctccc  | 5'-UTR                          |
| P3           | gcagagcctccgcaccgctc | 5'-UTR                          |
| P4           | gcagacctgatccgagcag  | 5'-UTR                          |
| P5           | catgctcccgaagctgcgct | 5'-UTR                          |
| P6           | gtcactgcagcactcatgct | offener Leseraster              |
| P7           | gtgccagcttccctgcagtc | offener Leseraster              |
| P8           | cccagggtcggccggtgcc  | offener Leseraster              |
| P9           | ggagctgcaactccggggac | offener Leseraster              |
| P10          | cgggatctcttcgccggtg  | offener Leseraster              |
| P11          | gagggcagctattaggaggc | offener Leseraster              |
| P12          | accagtccggaggggagggc | 3'-UTR                          |
| P13          | gggccccagatgcaggtggg | 3'-UTR                          |
| P14          | gcgggagccaaccagtatgg | 3'-UTR                          |
| P15          | ctgcagacatggcaccgagg | 3'-UTR                          |
| P16          | caccggggctggggggcaca | 3'-UTR                          |
| P17          | tgcagctctgcccagccacc | 3'-UTR                          |

|     |                        |                    |
|-----|------------------------|--------------------|
| P18 | cccacctgcaaggatgatgc   | 3'-UTR             |
| P19 | tgtacaaaaataacttatac   | 3'-UTR             |
| P20 | ggacaaggctgtagaaccca   | 3'-UTR             |
| P21 | ggtggggtgaggggggagg    | 3'-UTR             |
| P22 | gaaatattctgtacaattca   | 3'-UTR             |
| P23 | aagctgcgctgcagacctcg   | 5'-UTR             |
| P24 | aagctgactgcagacctcg    | 5'-UTR             |
| P25 | aagctgactgtgagacctcg   | 5'-UTR             |
| P26 | aagctgactgtgagacctta   | 5'-UTR             |
| HSV | gcggagggtccatgctgtacgc | offener Leseraster |

Tabelle 4: Sequenzen der eingesetzten ASOs gegen PLK1 und HSV

#### 4.1.4.2 Small-interfering RNA (siRNA)

Die in den *in vitro*- und einem Teil der *in vivo*-Experimente eingesetzten siRNAs wurden von Dharmacon (Colorado, USA) erworben. Die siRNAs wurden von Herstellerseite aus annealed, entsalzt und die Schutzgruppen wurden entfernt. Danach wurden sie über Gele aufgereinigt und lyophilisiert, so dass sie direkt in RNase freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen werden konnten.

Die Konstruktion der siRNAs erfolgte nach dem Schema von Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. et. al. 2001a), d.h. es wurden Sequenzbereiche gewählt, in denen von 5' nach 3' zwei Adenosine, 19 beliebige Nukleotide und zwei Thyminidine folgen, um so 21-Nukleotid-lange siRNAs zu erhalten, die einen 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen besitzen, um die Stabilität der siRNAs gegenüber dem Angriff durch Nukleasen zu erhöhen.

Die gegen PLK1 (NCBI Accession-Nummer: X75932) gerichteten Sequenzen korrespondieren zu folgenden Positionen des offenen Leserasters von PLK1:

siRNA2: 178-200  
siRNA3: 362-384  
siRNA4: 1416-1438  
siRNA5: 1572-1594.

siRNA1, gerichtet gegen die Lamine A/C (NCBI Accession-Nummer: X03444), korrespondiert zu den Positionen 608-630 bezogen auf das Startcodon (Elbashir S.M. et. al. 2001a). siRNA4S („scrambled“) repräsentiert siRNA4 als randomisierte Sequenz und wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Weitere synthetische siRNAs, siRNA4 und siRNA4S, die für einen Teil der *in vivo*-Experimente eingesetzt wurden, wurden freundlicherweise von der Firma Ribopharma AG in Kulmbach zur Verfügung gestellt. Auch diese waren annealed, aufgereinigt, entsalzt und bereits auf die einzusetzende Konzentration in Annealingpuffer eingestellt.

#### 4.1.5 Plasmide

Neben den selber hergestellten parentalen und rekombinanten Plasmiden (vgl. Kapitel 4.2.3) wurden noch weitere Plasmide (pBS/U6, pBS/U6/shRNA/PLK1 und pBS/U6/shRNA/PLK1S) bei der Firma PlasmidFactory in Bielefeld in Auftrag gegeben, um standardisierte Qualität der Plasmide zu gewährleisten. Diese wiesen „*Research Grade*“ und damit eine besonders hohe Reinheit auf, insbesondere Endotoxinfreiheit, hohe Homogenität, keine Verunreinigungen mit genomischer DNA oder mit RNA. Dies wurde durch chromatographische Aufreinigung der Plasmide von löslichen Biomolekülen, wie z.B. chromosomaler DNA, RNA, Nukleotiden, Fetten, Proteinen, Aminosäuren, Sacchariden und Endotoxinen sowie von Salzen und anderen Pufferkomponenten, erzielt. Über 90% der Plasmide weisen durch diese Behandlung die kovalent geschlossene zirkuläre Form auf (ccc = covalent closed circular).

#### 4.1.6 Zelllinien und primäre Zellen

A549 Bronchial-Karzinom (DSMZ, Braunschweig)

HeLa S3 Zervix-Karzinom (DSMZ, Braunschweig)

HMEC human mammary epithelial cell system (Clonetics, Verviers/Belgien)

MCF-7 Mamma-Karzinom (DSMZ, Braunschweig)

MDA-MB-435 Mamma-Karzinom (CLS, Heidelberg)

SW-480 Kolon-Karzinom (DSMZ, Braunschweig)

#### 4.1.7 Zellkulturmedien

##### A549:

DMEM

10% FCS

2% L-Glutamin

1% Penicillin–Streptomycin

##### HeLa S3:

HAM'S NUTRIENT Medium F12

10% FCS

2% L-Glutamin

1% Penicillin–Streptomycin

##### HMEC:

MEBM Minimum essential basal medium

SingleQuots: 0,5 ml Insulin (5 mg/ml)

0,5 ml Hydrocortison (0,5 g/ml)

0,5 ml hEGF – Epidermal Growth Factor, human, recombinant  
(10 µg/ml)

2,0 ml BPE – Bovine Pituitary Extract

0,5 ml GA – Gentamycinsulfat Amphotericin-3

Diese Mengen wurden vom Hersteller mitgeliefert und wurden jeweils zu 500 ml des MEBM-Basalmediums zugegeben.



**MCF-7:**

RPMI-1640

10% FCS

2% L-Glutamin

1% Penicillin–Streptomycin

**MDA-MB-435:**

DMEM F12

10% FCS

1,25% L-Glutamin

1% Penicillin–Streptomycin

**SW-480:**

RPMI-1640

10% FCS

2% L-Glutamin

1% Penicillin–Streptomycin

Das Medium zum Einfrieren der jeweiligen Zelllinien wurde folgendermaßen zusammengesetzt:

50% normales Kulturmedium

40% FCS

10% DMSO

**4.1.8 Nacktmäuse**

Bei den in den humanen Xenograft-Experimenten eingesetzten Mäusen handelt es sich um immunsupprimierte Nacktmäuse (nu/nu) NMRI.

Für die ASO-Versuche mit der Zelllinie A549 wurden Männchen verwendet, mit der Zelllinie MDA-MB-435 wurden Weibchen verwendet, die jeweils im Alter von 4 – 6 Wochen von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen) bezogen und nach einer kurzen Ruhezeit von fünf bis sieben Tagen transplantiert wurden.

Die Mäuse für die siRNA-Versuche mit den Zelllinien MCF-7, SW-480 und MDA-MB-435 entstammten aus der Zucht der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität und wurden ebenfalls im Alter von 4 – 6 Wochen transplantiert. Für die Versuche mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden bzw. dem parentalen Plasmid wurden ebenfalls Weibchen aus der eigenen Zucht eingesetzt, denen auch hier im Alter von 4 – 6 Wochen die Tumoren der Zelllinien HeLa S3 transplantiert wurden.

Das entspricht einem durchschnittlichen Alter von 8 – 10 Wochen beim jeweiligen Versuchsbeginn.

#### 4.1.9 Lösungen

##### 4.1.9.1 Lösungen für die Klonierung

###### MgSO<sub>4</sub>/MgCl<sub>2</sub>-Lösung:

1 M MgSO<sub>4</sub>

1 M MgCl<sub>2</sub>

in H<sub>2</sub>O deion. lösen und sterilfiltrieren

###### SOB-Medium:

1% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Bacto-Trypton (= Select Peptone 140)

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

in H<sub>2</sub>O deion. ansetzen.

Die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Autoklavieren auf 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> mit 1M MgSO<sub>4</sub>/MgCl<sub>2</sub>-Lösung eingestellt, danach wurde der pH-Wert mit 0,1 M HCl auf 6,4 eingestellt und sterilfiltriert. Die Lagerung ist bei +4°C möglich.

**TFB I-Puffer:**

30 mM Kaliumazetat, pH 7,0

100 mM RbCl<sub>2</sub>

50 mM MnCl<sub>2</sub>

10 mM CaCl<sub>2</sub>

15% (v/v) Glycerol

mit H<sub>2</sub>O deion. auf 475 ml auffüllen und mit 0,2 N NaOH auf pH 5,8 einstellen, ad 500 ml, sterilfiltrieren. Die Lösung kann bei +4°C gelagert werden.

**TFB II-Puffer:**

10 mM MOPS, pH 7,5

75 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM RbCl<sub>2</sub>

15% (v/v) Glycerol

sterilfiltrieren, bei +4°C lagern

**Annealing-Puffer:**

100 mM Kaliumazetat

30 mM HEPES-KOH, pH 7,4

2 mM Magnesiumazetat

**LB-Medium:**

LB-Broth enthält:   10 g/l Trypton  
                          5 g/l Yeast Extrakt  
                          5 g/l NaCl

20 g LB-Broth (LENNOX) wurden in 1 l H<sub>2</sub>O deion. gelöst und bei 121°C 15 min. autoklaviert.

**LB-Ampizillin-Medium:**

287 µM Ampizillin in LB-Medium

**LB-Agarplatten mit oder ohne Ampizillin:**

LB Agar enthält:     10 g/l Trypton  
                          5 g/l Yeast Extrakt  
                          5 g/l NaCl  
                          15 g/l Agar

35 g LB Agar wurden in LB-Ampizillin-Medium oder in LB-Medium gelöst und unter sterilen Bedingungen Platten gegossen, die dann bei +4°C gelagert werden konnten.

**4.1.9.2 Lösung für die Transfektion mit DOTAP****HBS (HEPES-buffered saline):**

150 mM NaCl  
  20 mM HEPES  
pH 7,4

Diese Lösung wurde steril filtriert.

**4.1.9.3 Lösungen für die Transfektion mit Plasmid-DNA****TE-Puffer:**

10 mM Tris, pH 8,5  
  1 mM EDTA

**ATA-Stammlösung:**

2,4 mM ATA in H<sub>2</sub>O deion. lösen und steril filtrieren  
Die Lösung kann bei +4°C gelagert werden.

#### 4.1.9.4 Lösungen für Western-Blots

##### Lysepuffer für die Krebszelllinien:

50 mM Hepes

250 mM NaCl

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

10% (v/v) Glycerol

pH 7,0

Von diesem Lysepuffer wurden 10 ml eingesetzt und jeweils frisch versetzt mit:

10 µl 1 M DTT

20 µl 0,2 M PMSF

10 µl 100 nM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

1 Proteininhibitor-Tablette

##### Lysepuffer für HMECs (SDS-Puffer):

4% (w/v) SDS

20% (v/v) Glycerol

0,12 M TRIS, pH 6.8

Von diesem Lysepuffer wurden ebenfalls 10 ml eingesetzt und versetzt mit:

10 µl 1 M DTT

20 µl 0,2 M PMSF

10 µl 100 nM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

1 Proteininhibitor-Tablette

Für die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes in den gewonnenen Lysaten wurde folgendes angesetzt:

800 µl H<sub>2</sub>O deion.

200 µl Bradford-Reagenz

1 µl Proteinlysat bzw. 1 µl Lysepuffer als Referenz

**10% (w/v) SDS-Lösung:**

100 g SDS wurden in 900 ml H<sub>2</sub>O deion. gelöst (auf 68°C erwärmen). Nach dem Abkühlen wurde der pH-Wert mit HCl konz. auf 7,2 eingestellt und dann auf 1 l mit H<sub>2</sub>O deion. aufgefüllt.

**5x SB:**

30 nM Bromphenolblau  
270 µM Glycerol  
0,5% (w/v) SDS  
63 µM Tris-HCl, pH 6,8  
250 µM DTT

**10x RB:**

1,9 M Glycin  
250 mM Tris-Base

**Laufpuffer:**

100 ml 10x RB  
20 ml 10% SDS  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O deion.

**Blotpuffer:**

100 ml 10x RB  
200 ml MeOH  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O deion.

**5% (w/v) Milchpuffer (Blocking-Puffer) :**

5 g Magermilchpulver wurden in 100 ml PBS mittels Magnetrührer dispergiert (ca. 20-30 min.).

**PBS-T:**

200 ml 10x PBS

ad 2 l mit H<sub>2</sub>O deion.

Zugabe von 4 ml Tween-20

**4.1.9.5 Lösungen für Northern-Blots****10x MOPS:**

400 mM MOPS

100 mM Na-Azetat

25 mM EDTA

in DEPC-H<sub>2</sub>O lösen

pH 7,0; mit NaOH einstellen (wenn pH>7,0 verwerfen, nicht mit HCl titrieren)

**Gesättigte Bromphenolblau-Lösung:**

1 Spatelspitze in 1 ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen

**Agarose-Gel 1%:**

195 ml H<sub>2</sub>O deion.

35 ml 10x MOPS (Morpholino-propan-sulfonsäure)

2,3 g Agarose

**Ladepuffer:**

720 µl Formamid

420 µl Formalin

150 µl 10x MOPS

100 µl Glycerol

60 µl Ethidiumbromid

50 µl Bromphenolblau

100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

**Laufpuffer:**

250 ml 10x MOPS

2 l DEPC-H<sub>2</sub>O

500 ml Formalin

**20x SSC:**

3 M NaCl

300 mM Tri-Natriumzitat-dihydrat

**10x PCR-Puffer:**

100 mM Tris-HCl, pH 8,8

500 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

0,1% (w/v) Gelatine

**Waschpuffer (hohe Salzkonzentration: 5x SSC, 0,1% SDS):**

250 ml 20x SSC

10 ml 10% SDS

ad 1 l H<sub>2</sub>O deion.

**Waschpuffer (hohe Salzkonzentration: 2x SSC, kein SDS):**

100 ml 20x SSC

ad 1 l H<sub>2</sub>O deion.

**Waschpuffer (niedrige Salzkonzentration: 0,1x SSC, 0,1% SDS):**

5 ml 20x SSC

10 ml 10% SDS

ad 1 l H<sub>2</sub>O deion.



**„Strip“-Solution:**

Hierfür wurde der Waschpuffer mit hoher Salzkonzentration (5x SSC, 0,1% SDS) 1 : 1 mit H<sub>2</sub>O deion. verdünnt, so dass ein Puffer mit 2,5x SSC und 0,05% SDS entstand.

**4.1.9.6 Lösungen für Southern-Blots****Depurinierungspuffer:**

0,25 M HCl

**Denaturierungspuffer:**

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

**Neutralisierungspuffer:**

1,5 M NaCl

0,5 M Tris-HCl, pH 7,2

1 mM EDTA, pH 8,0

**4.1.9.7 Lösungen für Kinaseassays****Lysepuffer (RIPA):**

20 mM Tris-HCl, pH 7,4

1% (v/v) NP-40

0,25% (v/v) Na-Deoxycholat

150 mM NaCl

1 mM EDTA

0,1% (w/v) SDS

50 mM NaF

**Kinasepuffer:**

20 mM HEPES pH 7,4

150 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM EGTA

0,5 mM DTT

5 mM NaF

0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

**Kinasereaktion (Kinasepremix; ATP-Mix):**

für fünf Proben:

88 µl Kinasepuffer

10 µl 1 mM ATP

10 – 30 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP

3 µl Kinase

**Laufpuffer:**

wie bei Western-Blots (Kapitel 4.1.9.4) beschrieben

**Fixierlösung:**

70% (v/v) H<sub>2</sub>O deion.

20% (v/v) MeOH

10% (v/v) Essigsäure

**Coomassie-Lösung:**

6 mM Coomassie Brilliant Blue G-250

908 ml MeOH

908 ml H<sub>2</sub>O deion.

184 ml Essigsäure

dispergieren und filtrieren

**Schnellentfärber:**

40% (v/v) H<sub>2</sub>O deion.

40% (v/v) EtOH

20% (v/v) Essigsäure

**4.1.9.8 Lösung für die Immunfluoreszenz****1% (w/v) BSA-Lösung:**

1 g BSA im Becherglas auf 100 ml PBS geben und bei RT sedimentieren lassen.

**4.1.9.9 Lösungen für die Immunhistochemie****AEC-Gebrauchslösung:**

2 Tropfen Natriumazetat-Pufferkonzentrat

2 Tropfen Chromogen AEC

2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung 3%

zu 5 ml H<sub>2</sub>O deion. geben und mischen. Die so erhaltene Lösung ist für ca. 2 Stunden stabil.

**Antikörper-Ansatzlösung:**

150 µM Natriumazid

500 mg BSA in 100 ml PBS lösen

pH 7,2 – 7,4

**Citratpuffer (10 mM, pH 6,0):**

1,8 mM Zitronensäure-Monohydrat

8,2 mM Tri-Natriumzitat-Dihydrat

**0,1% (v/v) Triton X-100:**

1 ml Triton X-100 in 1 l PBS lösen

pH 7,2 – 7,4

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

Als Zellkultur wird die Züchtung und Vermehrung höherer Zellen *in vitro* bezeichnet. Hierfür werden Brutschränke eingesetzt, in denen eine kontrollierte Atmosphäre herrscht, für die meisten eukaryontischen Zelltypen sind dies 5% CO<sub>2</sub> und eine Temperatur von 37°C. Die meisten kultivierten Zellen wachsen hierbei als Monoschicht (Monolayer). Die nicht-adhärenenten Zellkulturen werden Suspensionskultur genannt.

Um die adhärenenten Zellen zu subkultivieren, wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und danach mit Trypsin von der Kulturgefäßoberfläche gelöst. Dieser Prozess wurde unter dem Mikroskop überwacht. Nachdem sich alle Zellen von der Kulturgefäßoberfläche gelöst hatten, wurde das Trypsin durch Zugabe des doppelten Volumens FCS-haltigen Kulturmediums inaktiviert. Diese Zellsuspension wurde im Anschluss bei 248 x g und Raumtemperatur 10 min. zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in neue Kulturgefäße ausgesät. Um bei der Kultivierung eukaryontischer Zelllinien (neben der Temperatur und dem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre im Brutschrank) möglichst physiologische Bedingungen zu erreichen, werden die Zellen in halbsynthetischen Wachstumsmedien (vgl. Kapitel 4.1.7) gezüchtet.

Für alle Transfektionsexperimente mit ASOs, siRNAs oder Plasmiden (vgl. Kapitel 4.2.5, 4.2.6 und 4.2.7) wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion subkultiviert und in einer definierten Zellzahl von  $5 \times 10^5/25 \text{ cm}^2$  Wachstumsfläche ausgesät.

### 4.2.2 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Die Zellzahlbestimmung wurde nach der Methode von Sandström (Sandstrom C. 1965) mit dem sogenannten Trypanblau-Ausschluss-Test durchgeführt. Es

handelt sich hierbei um eine einfache Methode, in einem Schritt Zell-Vitalität und Zellzahl zu bestimmen. Geschädigte oder tote Zellen können den Farbstoff aufnehmen und erscheinen daher blau-violett, ungeschädigte Zellen nehmen aufgrund ihrer intakten Zellmembran den Farbstoff nicht auf und werden so auch nicht gefärbt.

Hierfür wurden jeweils nach der Zentrifugation beim Subkultivieren der Zellen 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen gemischt und ca. 10 µl in die Neubauer-Zählkammer (Hämacytometer) gegeben. Unter dem Mikroskop wurden bei 100-facher Vergrößerung vier Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt und Mittelwerte gebildet.

Vitalität und Zellzahl lassen sich folgendermaßen bestimmen:

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\sum \text{ aller Zellen}} \times 100$$

$$\text{Zellzahl/ml: } \sum \text{ aller Zellen eines Großquadrates} \times 10^4 \times 2$$

Die „2“ in der unteren Formel für die Bestimmung der Zellzahl ist der Verdünnungsfaktor, da 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt wurden.

#### 4.2.3 Herstellung der Plasmide zur Expression von hairpin-RNAs gegen PLK1

##### 4.2.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zuerst wurde eine Vorkultur hergestellt. Dafür wurde eine *E. coli*-Bakterienkolonie in 5 ml SOB-Medium überimpft und unter Schütteln bei 150 U./min. bei 37°C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^8$ /ml (entsprechend etwa einer OD von 0,4 – 0,5 bei 600 nm) kultiviert. Diese Bakterien wurden dann mit dem gleichen Volumen an 40% Glycerol/60% SOB-Medium verdünnt und für 5 min. auf Eis gestellt. Diese Suspension kann bei –80°C gelagert werden.

Aus dieser Vorkultur wurden 100 µl entnommen und damit 50 ml auf 37°C vorgewärmtes SOB-Medium in einem 500 ml-Schikanen-Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Zellen wurden für 2 – 3 Stunden bei 37°C unter Schütteln (ca. 150 U./min.) kultiviert, bis eine Dichte entsprechend einer OD von 0,4 – 0,5 bei 600 nm erreicht wurde. Daraufhin wurden die Zellen auf Eis abgekühlt, bei 210 x g und +4°C 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in TFB I-Puffer aufgenommen und vorsichtig, aber gründlich resuspendiert. Diese Suspension wurde mindestens 30 min. auf Eis inkubiert, und erneut bei 210 x g für 15 min. bei +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in TFB II-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Inkubation von 5 min. auf Eis wurde DMSO zugegeben, gemischt und für weitere 5 min. auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Dann konnte die Suspension aliquotiert und bei –80°C gelagert werden.

#### 4.2.3.2 Annealing, Restriktionsverdau und Ligation

Die Plasmide für die Expression von hairpin-RNAs wurden mit Hilfe des *pSilence™* 1.0-U6 siRNA-Expressions-Vektors konstruiert, der eine Ampizillin-Resistenz trägt, um später die Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden, selektieren zu können. Zu diesem Zweck wurde eine Zwei-Stufen-Klonierung durchgeführt, die aus den folgenden Schritten bestand:

Das erste Insert wurde hergestellt, indem ein 21-Nukleotid-langes Oligonukleotid (5'-GGCGGCTTTGCCAAGTGCTTA-3') mit einem 25-Nukleotid-langen Oligonukleotid (5'-AGCTTAAGCACTTGGCAAAGCCGCC-3') annealed wurde. Die Annealing-Reaktion fand unter folgenden Bedingungen statt: Es wurde 5 min. bei 95°C und anschließend 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das so erhaltene siRNA-Insert kann entweder sofort für die Ligation eingesetzt werden oder bei –20°C aufbewahrt werden.

Um die erste Ligation vorzubereiten, erfolgte der Restriktionsverdau des *pSilence™* 1.0-U6-Vektors mit jeweils 30 Units der Restriktionsenzyme *Apa* I

(GGGCC<sup>↓</sup>C) und *Hind*III (A<sup>↓</sup>AGCTT). Dazu wurde für 1½ Stunden bei 37°C inkubiert. Die überstehenden Enden an der *Apa* I-Schnittstelle (<sup>G</sup><sub>CCCGG</sub>) wurden sodann mit DNA-Polymerase I (Klenow) abverdaut, um so stumpfe Enden (<sup>G</sup><sub>C</sub>) zu erzielen. Zu diesem Zweck wurde mit 1 Unit Klenow/µg DNA für 15 min. bei 25°C inkubiert, EDTA zugegeben (Endkonzentration 10 mM) und für 20 min. auf 75°C erhitzt. Anschließend wurden die Plasmide für ca. 30 min. bei 100 V auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, um die geschnittenen von den ungeschnittenen Plasmiden zu trennen, und die geschnittenen Plasmide im Anschluss mit Hilfe der Ultrafree-DA-Säulen aus dem Gel aufgereinigt.

Das erste Insert (<sup>GGCGGCCTTGCCAAGTGCTTA</sup><sub>CCGCCGAAAGCCATTCACGAATTCGA</sub>) mit der siRNA-Sequenz, die siRNA2 aus Kapitel 4.1.4.2 entspricht, wurde in der anschließenden Ligation bei 25°C für 15 – 20 min. mit Quick-Ligase aus dem Quick Ligation™-Kit in den geschnittenen p*Silencer*™ 1.0-U6-Vektor eingefügt. Das entstehende Intermediär-Plasmid enthielt damit die Sequenz von siRNA2 (vgl. Kapitel 4.1.4.2) und wurde für die weiteren Klonierungsschritte für die hairpin-RNAs, gerichtet gegen die PLK1-Sequenz, eingesetzt.

In 3'-Richtung vom ersten Insert sollte anschließend das zweite Insert, das die 6-Nukleotid-lange Verbindungsschleife, das invertierte Motiv und die fünf terminierenden Thymidine enthält, ligiert werden. Dazu wurde wiederum erst das zweite Insert mittels Annealing hergestellt, indem das invertierte Motiv, das die 6-Nukleotid-lange Schleife und darüber hinaus die terminierenden fünf Thymidine enthält (5'-AGCTTAAGCACTTGGCAAAGCCGCCCTTTTGG-3') für 5 min. bei 95°C und anschließend 1 Stunde bei 37°C mit dem entsprechenden Oligonukleotid (5'-AATCAAAAAGGGCGGCTTGCCAAGTGCTTA-3') inkubiert wurde. Auch dieses Insert kann entweder bei -20°C gelagert werden oder direkt für die Ligation verwendet werden.

Das auf oben beschriebene Weise hergestellte Intermediär-Plasmid, das die siRNA2-Sequenz enthält, wurde sodann jeweils mit 30 Units *Hind*III (A<sup>↓</sup>AGCTT) und *Eco*R I (G<sup>↓</sup>AATTC) wie ebenfalls oben beschrieben (1½ Stunden bei 37°C)

verdaut, wodurch das Plasmid direkt 3' vom bereits eingefügten ersten Insert geschnitten wurde (*Hind*III-Schnittstelle). Dabei entstanden folgende Überhänge:  $\begin{matrix} A \\ \text{TTCGA} \end{matrix}$  und  $\begin{matrix} \text{AATT} \\ A \end{matrix}$ . Nach der Aufreinigung der geschnittenen Plasmide aus dem 1%igen Agarosegel wurde in der anschließenden Ligation (15 – 20 min., 25°C) das eben hergestellte zweite Insert ( $\begin{matrix} \text{AGCTTAAGCACTTGGCAAAGCCGCCCTTTTG} \\ \text{ATTCGTGAACCGTTTCGGCG GGAAAAACTTAA} \end{matrix}$ ) in diese Schnittstellen eingefügt, um so pBS/U6/shRNA/PLK1 zu erhalten.

Mit den in Kapitel 4.1.3.3 für shRNA/PLK1S angegebenen Primern wurde nach dem gleichen Protokoll das Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1S für die Expression von shRNA/PLK1S, der korrespondierenden „scrambled“-Sequenz konstruiert.

Der prinzipielle Aufbau des Plasmids mit den beiden 21-Nukleotid-langen Sequenzen und die 6-Nukleotid-lange Verbindungsschleife für die Konstruktion der rekombinanten Plasmide sowie die Sequenzen der gegen die PLK1-Sequenz gerichteten hairpin-RNA shRNA/PLK1, entsprechend siRNA2 (vgl. Kapitel 4.1.4.2), und ihrer „scrambled“ Kontrolle shRNA/PLK1S sind in der folgenden Abbildung 17 dargestellt.





mit Ampizillin-Resistenz ausgestrichen, um die Bakterien zu selektieren, die das Plasmid und damit auch die Ampizillin-Resistenz aufgenommen haben. Diese Klone wurden gepickt und für die unterschiedlichen Präparationen in verschiedenen Volumina LB-Ampizillin-Medium angesetzt.

Für eine anschließende Plasmid-Präparation (mit dem HiSpeed™ Plasmid Purification Kit Midi/Maxi von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben) wurden die Klone in 5 ml LB-Ampizillin aufgenommen, und für ca. 8 Stunden im Bakterien-schüttler bei 37°C und 150 U./min. inkubiert. Anschließend wurde bei 16,1 x g für 10 sec. zentrifugiert. Für die Maxi-Präparation wurden die Klone in 50 ml LB-Ampizillin aufgenommen, ebenfalls für ca. 8 Stunden im Bakterien-schüttler bei 37°C und 150 U./min. inkubiert und zentrifugiert (1200 x g, 10 min.). Danach wurden die Bakterienpellets erneut in LB-Medium aufgenommen und für 12 – 16 Stunden im Bakterien-schüttler bei 37°C und 150 U./min. inkubiert. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation bei 1200 x g für 15 min. bei +4°C geerntet und in 6 ml/10 ml Puffer des im Kit enthaltenen Puffers P1 (Midi/Maxi-Präp.) resuspendiert. Puffer P1 enthält RNase A in einer Endkonzentration von 100 µg/ml. Weitere 6 ml/10 ml Puffer P2 wurden zugegeben, gründlich gemischt und 5 min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die im Kit enthaltenen QIAfilter Cartridges vorbereitet und in ein entsprechendes QIArack gesetzt. Zu den Bakterienlysaten wurden 6 ml/10 ml auf +4°C-vorgekühlter Puffer P3 gegeben, sofort gemischt, die Lysate sofort auf die QIAfilter Cartridge gegeben und für 10 min. bei RT inkubiert. Die HiSpeed Midi oder Maxi Tips wurden durch Zugabe von 4 ml/10 ml Puffer QBT äquilibriert. Im Anschluss wurden die Lysate aus den QIAfilter Cartridges auf die äquilibrierten HiSpeed Tips gegeben und sedimentieren gelassen. Die HiSpeed Tips wurden mit 20 ml/60 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 5 ml/15 ml Puffer QF eluiert, durch Zugabe von 3,5 ml/10,5 ml Isopropanol bei RT präzipitiert, indem gemischt und dann 5 min. bei RT inkubiert wurde. Während dieser Inkubation wurden die QIAprecipitator Midi oder Maxi Module auf 20 ml/30 ml-Spritzen und diese wiederum auf Abfallflaschen gesetzt. Das Elu-

at/Isopropanol-Gemisch wurde in eine Spritze überführt und durch den QIAprecipitator gepresst, wobei die DNA an die Membran im QIAprecipitator gebunden wurde. Der QIAprecipitator wurde von der Spritze entfernt und in diese 2 ml frischer 70%iger Ethanol gegeben, womit die DNA gewaschen wurde. Danach wurden die QIAprecipitatoren wieder von den Spritzen entfernt, erneut auf die Spritzen gesetzt und anstelle des Puffers Luft durchgedrückt, um die Membran des QIAprecipitators und damit die daran gebundene DNA zu trocknen. Danach wurde der QIAprecipitator auf ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt, und mit 1 ml TE-Puffer wurde die DNA von der Membran in das Eppendorfgefäß eluiert. Dieses Eluat wurde in eine 5 ml-Spritze überführt und erneut durch den QIAprecipitator gepresst, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen. Die so eluierten Plasmide wurden in TE-Puffer bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 4.2.4 Der Nukleaseinhibitor ATA (Aurintricarboxyl-Säure)

Da freie DNA sehr anfällig gegenüber dem Angriff von Exo- oder Endonukleasen ist, wurde zwecks Stabilisierung von Plasmid-DNA der Nukleaseinhibitor Aurintricarboxyl-Säure (ATA) getestet. ATA wurde erstmals im Jahre 1892 synthetisiert, damals als Triphenylmethan-Derivat. Als pures Agens wurde es erstmals im Jahre 1949 synthetisiert. Als Monomer hat ATA ein Molekulargewicht von 473 Da, es polymerisiert aber zu größeren Komplexen von bis zu 6 kDa (Guo Z. et. al. 1993).

ATA inhibiert Nukleasen, wie z.B. DNase I, RNase A, SI-Nuklease oder Exonuklease III, zudem verschiedene Restriktions-Endonukleasen (Blumenthal T. et. al. 1973; Hallick R.B. et. al. 1977). Dabei fungiert es in seiner polymeren Form als kompetitiver Inhibitor, der mit der Nukleinsäure um die Bindungsstelle der Nuklease konkurriert und dadurch die Nukleaseaktivität direkt ausschaltet (Gonzalez R.G. et. al. 1980).

ATA war in einer Studie von Glasspool-Malone *et al.* bei der Transfektion von DNA in den Respirationstrakt von Mäusen und Menschen in der Lage, die Le-

bensdauer von reiner DNA im Organismus zu verlängern (Glasspool-Malone J. et. al. 2002). Schon in einer früheren Studie konnten dieselben Autoren zeigen, dass ATA die DNase-Aktivität hemmt und so die Transfektionseffizienz in Lungengewebe von Mäusen und Makaken erhöht (Glasspool-Malone J. et. al. 1999). In dieser Studie konnte auch mit 6 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag in der Maus die LD<sub>50</sub> ermittelt werden. Dennoch sind Daten über die systemische Applikation von ATA noch rar. Der Effekt von ATA auf die Plättchenaggregation wurde in Pavianen ermittelt, indem diesen ATA intravenös injiziert wurde (Alwayn I.P. et. al. 2000). Eine Dosis von 24 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag verminderte die Plättchenaggregation, eine Dosis von 12 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag jedoch führte bereits wieder zu normalen Blutparametern.

Eine Nebenwirkung, die durch große Mengen an ATA auftreten kann, wird demzufolge dadurch verursacht, dass ATA auch ein Inhibitor des Plättchen-Glykoproteins Ib ist (Ito T. et. al. 1999). Es ist möglich, dass es bei Überdosierung von ATA zu einer verminderten Plättchenaggregation kommt, die zu inneren Blutungen führen kann. Da die bei Mäusen ermittelte LD<sub>50</sub> in recht hohen Konzentrationsbereichen liegt, ist diese Gefahr aber minimal (s.o.).

#### **4.2.5 Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden (ASOs)**

Für die Untersuchungen mit ASOs wurden die folgenden Krebszelllinien eingesetzt: MDA-MB-435 – Mammakarzinom, HeLa S3 – Zervixkarzinom und A549 – Bronchialkarzinom.

Die lyophilisierten ASOs (P1 – P26 und das HSV-ASO) wurden in HBS aufgenommen und auf eine Endkonzentration von 0,1 µg/µl eingestellt. Das Transfektionsreagenz DOTAP wurde jeweils am Versuchstag laut den Herstellerangaben ebenfalls mit HBS auf die Arbeitskonzentration von 30 µl/100 µl eingestellt. In ersten Vorexperimenten mit FITC-markierten ASOs wurde das optimale Verhältnis DOTAP/ASO ermittelt, um maximale Transfektionseffizienzen zu erreichen. Das so bestimmte Verhältnis von 6 µl DOTAP/1 µg ASO wurde dann in allen folgenden Experimenten eingesetzt.

Die so vorbereitete ASO-Lösung (das Volumen war abhängig von dem jeweiligen Molekulargewicht der verschiedenen ASOs) wurde in die vorgelegte DOTAP-Lösung überführt und durch vorsichtiges Pipettieren gemischt. Diese ASO-DOTAP-Mischung inkubierte 15 min. bei RT, damit sich die Komplexe zwischen dem liposomalen Transfektionsvermittler DOTAP und den ASOs bilden konnten. Im Anschluss daran wurde diese Mischung mit der entsprechenden Menge serumfreiem Opti-MEM I-Medium auf die jeweilige Endkonzentration eingestellt. Diese Konzentration betrug in den Konzentrationsabhängigkeitsexperimenten 10 nM – 250 nM. In allen weiteren Experimenten wurde eine Konzentration von 250 nM gewählt. Dieser Transfektionsmix wurde 15 min. auf 37°C vorgewärmt und dann zu den folgendermaßen vorbereiteten Zellen gegeben: Die Zellen wurden in dieser Inkubationszeit zweimal mit je 5 ml warmem Opti-MEM I/25 cm<sup>2</sup>-Kulturgefäß gewaschen, um restliche Stoffwechselprodukte und Serumreste zu entfernen. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit dem Transfektionsmix bzw. die Kontrollzellen nur mit vorgewärmtem Opti-MEM I überschichtet und im Anschluss im Brutschrank bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> für 3½ – 4 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Transfektionsmix entfernt und frisches Kulturmedium zu den Zellen gegeben. Diese wurden dann bis zu den weiteren Untersuchungen für 24 – 96 Stunden bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.2.6 Transfektion mit siRNA

Für die Untersuchung der Wirkung von siRNA gegen PLK1 auf Zellen *in vitro* wurden vier Krebszelllinien und ein primäres Zellsystem eingesetzt. Die Krebszelllinien waren die folgenden: HeLa S3 – Zervixkarzinom, MCF-7 – Mammakarzinom, A549 – Bronchialkarzinom und SW-480 – Kolonkarzinom. Das untersuchte primäre Zellsystem waren HMECs (human mammary epithelial cells).

Die doppelsträngig gelieferte siRNA (siRNA1 – 5 und siRNA4S) wurde in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf eine Konzentration von 20 µM eingestellt. Für 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturgefäße wurden in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen jeweils 156 µl Opti-MEM I vorgelegt und 39 µl Oligofectamin zugegeben. In einem anderen

1,5 ml-Eppendorfgefäß wurden jeweils 650 µl Opti-MEM I vorgelegt und 3,9 µl siRNA zugegeben. Diese angegebenen Mengen ergeben eine Endkonzentration von 56 nM. Für die Konzentrationsabhängigkeitsexperimente (0,56 nM – 2 µM) wurde entsprechend die siRNA-Menge verändert, die anderen Parameter blieben gleich. Für andere Zellkulturgefäß-Größen wurden alle Parameter entsprechend angepasst. Nach einer Inkubationszeit von 7 – 10 min. bei RT wurde der Opti-MEM I/Oligofectamin-Mix zu dem Opti-MEM I/siRNA-Mix gegeben und weitere 20 – 25 min. bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 494 µl Opti-MEM I zugegeben und diese Mischung dann zu den zuvor mit Opti-MEM I gewaschenen Zellen gegeben und für 4 Stunden bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Kontrollzellen wurden nur mit Opti-MEM I inkubiert. Nach Ablauf der 4 Stunden wurden in jedes 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturgefäß 459 µl normales Kulturmedium mit dreifacher FCS-Konzentration zugegeben, um im Endvolumen wieder 10% FCS zu erhalten, womit dann die weitere Inkubation erfolgen konnte.

Die sich anschließenden Analysen erfolgten nach weiteren 6 – 96 Stunden Inkubation bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

#### **4.2.7 Transfektion mit Expressionsplasmiden**

Im Rahmen der Analyse der Wirkung von shRNA, die von Expressionsplasmiden in den Zellen exprimiert wurde, wurden nur HeLa S3-Zellen (Zervixkarzinom) untersucht.

Die Plasmide wurden in TE-Puffer bei –20°C gelagert und für die Transfektionen auf Eis aufgetaut. Für die Transfektion in 6-well-Platten (10 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) wurden pro well in 1,5 ml-Eppendorfgefäßen 100 µl Opti-MEM I vorgelegt, dazu dann 2,8 µl FuGENE™6 und die verschiedenen Mengen Plasmid-DNA (1,5 µg/3,0 µg/4,5 µg/6,0 µg) gegeben. Während der Inkubation dieser Mischung von ca. 30 min. bei RT wurden die Zellen gewaschen und pro well 500 µl normales Kulturmedium vorgelegt, zu dem nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation der Transfektionsmix gegeben wurde. Auch hier erhielten die Kontrollzellen nur Opti-MEM I bzw. den parentalen Vektor pBS/U6 in

den gleichen Konzentrationen wie die rekombinanten Plasmide pBS/U6/shRNA/PLK1 bzw. pBS/U6/shRNA/PLK1S.

Es wurden nicht nur Zellen mit den Plasmiden alleine behandelt, sondern es wurde noch die Auswirkung des Nukleaseinhibitors ATA auf die Plasmidstabilität in Zellkultur untersucht. Dafür wurden die gleichen Mengen des rekombinanten Plasmids pBS/U6/shRNA/PLK1 wie oben beschrieben mit ATA im Verhältnis ATA : Plasmid-DNA 1 : 5 gemischt und dann erst zu der vorgelegten Mischung aus Opti-MEM I und FuGENE™6 gegeben. Das weitere Verfahren war wie beschrieben.

Am nächsten Tag wurde zu allen Ansätzen jeweils 1 ml normales Zellkulturmedium zugegeben, um das Gesamtvolumen an Medium auf den Zellen aufzufüllen. Die folgenden Analysen erfolgten auch hier nach weiteren 24 – 96 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.8 Ex vivo-Inkubation von Blut aus Nacktmäusen mit der Plasmid-DNA und verschiedenen ATA-Konzentrationen**

Unbehandelte nu/nu (NMRI)-Nacktmäuse wurden unter Enfluran®-Narkose ausgeblutet und ihr Blut dann *ex vivo* für verschiedene Zeiträume mit Plasmid und ansteigenden ATA-Konzentrationen bei 37°C inkubiert. Die Stabilisierung der Plasmide ist entscheidend für die Effizienz der shRNA/PLK1- bzw. shRNA/PLK1S-Expression in *in vivo*-Untersuchungen.

Es wurden jeweils 200 µl Blut mit 0,7 µg des rekombinanten Plasmids pBS/U6/shRNA/PLK1 inkubiert. Diese Mengenverhältnisse (Blutvolumen – Plasmidmenge) entsprechen der Plasmid-Dosierung im späteren Xenograft-Experiment (vgl. Kapitel 4.2.18). Die Negativkontrolle erhielt nur Plasmid ohne vorherige Zugabe von ATA. Bei allen anderen Proben wurde das Plasmid mit ATA gemischt und dann erst zum Blut zugegeben. Dabei wurden drei ATA-DNA-Konzentrationsverhältnisse eingesetzt, und zwar ATA : Plasmid-DNA 1 : 50, 1 : 5 und 1 : 0,5. Die Zeitpunkte, zu denen nach der jeweiligen Inkubation die Plasmid-DNA aus dem Blut isoliert wurde (vgl. Kapitel 4.2.19), waren nach 5 min., 30 min., 2 Stunden und 4 Stunden.

Diese Untersuchung diente der Beurteilung der Wirkung, die ATA auf die Plasmidstabilität im Blut ausübt, um für das sich anschließende Xenograft-Experiment (vgl. Kapitel 4.2.18) das entsprechende ATA/Plasmid-DNA-Verhältnis zu wählen.

#### 4.2.9 Proteinisolierung und Proteinbestimmung nach Bradford

Um Proteinlysate aus den verschiedenen Krebszelllinien herzustellen, wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion geerntet. Zu diesem Zweck wurde das Medium entfernt, PBS zugegeben und die Zellen auf Eis geschabt, da beim Trypsinieren durch das Trypsin die Proteine direkt verdaut würden. Die geschabten Zellen wurden in 15 ml-Falcons® überführt und dann 10 min. bei 248 x g und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet jeweils zweimal wiederum in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut verworfen, zu den Zellpellets das dreifache Volumen Lysepuffer bzw. RIPA gegeben, durch Pipettieren gemischt, in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und 1 Stunde auf Eis inkubiert, wobei in dieser Zeit immer wieder gemischt wurde. Danach wurde 20 min. bei 16,1 x g und +4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer, Zellkerne und Nukleinsäuren zu entfernen. Die Überstände (= Proteinlysate) wurden in neue 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und die abzentrifugierten Zelltrümmer verworfen. Danach wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt (s.u.).

Bei den HMECs wurden die Lysate nach einem etwas anderen Protokoll hergestellt (Garbe J. et. al. 1999): 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS wurde verworfen und die Zellen in PBS mit Zellschabern auf Eis geschabt und in 15 ml-Falcons® überführt. Dann wurden sie 10 min. bei 248 x g und +4°C zentrifugiert. Die Zellpellets wurden im dreifachen Volumen SDS-Puffer resuspendiert, in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und sofort für 10 min. im Wasserbad aufgekocht (95°C). Danach wurde auch für diese Lysate die Proteinmenge nach Bradford bestimmt.



Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich ursprünglich um eine Methode, bei der der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 von dem im Proteinlysate vorhandenen Protein gebunden wird, woraus eine Veränderung des Absorptionsmaximums resultiert (Bradford M.M. 1976). Für die Durchführung der Messung wurden in 1 ml-Photometerküvetten 800 µl H<sub>2</sub>O deion. mit 200 µl BIO-Rad Protein Assay-Lösung gemischt. Dann wurde in eine Küvette 1 µl Lysepuffer bzw. RIPA als Leerwert zugegeben, in die anderen Küvetten wurde je 1 µl Proteinlysate gegeben und die Absorption bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen. Entsprechend der Eichgeraden entspricht eine Absorption von 1,0 einer Proteinkonzentration von 17,9 µg/µl.

In den sich anschließenden Versuchen wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt, die von 50 µg bis 800 µg reichten.

#### **4.2.10 Western-Blots**

Bevor die Proteine geblottet werden können, muss eine Gelelektrophorese durchgeführt werden. Es handelt sich hierbei um ein biochemisches Trennverfahren, bei dem geladene Moleküle durch die Wanderung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Wanderungsverhalten von Makromolekülen im elektrischen Feld hängt u.a. von der Stärke des angelegten Feldes (je größer die angelegte Spannung ist, desto größer ist die Wanderungsgeschwindigkeit), Nettoladung, Form und Größe der Makromoleküle, sowie der Ionenstärke, der Porengröße und der Temperatur der verwendeten inerten Matrix ab, in der die Moleküle aufgetrennt werden sollen. Agarose- bzw. Polyacrylamid (PAA)-Gele wirken aufgrund ihrer Porenstruktur wie Molekularsiebe, die die Wanderung von Makromolekülen verlangsamen oder sogar vollständig blockieren, während niedermolekulare Substanzen frei durch die von ihnen erzeugte Matrix wandern können. Die Porengröße wird durch die Agarose- bzw. PAA-Konzentration bestimmt, wobei die Porengröße mit steigender Agarose- bzw. PAA-Konzentration sinkt.

Für einen Western-Blot werden die zu analysierenden Proteine auf SDS-PAA-Gelen aufgetrennt, sogenannte SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE. Das SDS bewirkt eine negative Überschussladung, denn da es negativ geladen ist, kann es sich in konstanten Gewichtsverhältnissen durch hydrophobe Wechselwirkung an die Proteine anlagern. So werden die positiven Ladungen der Proteine kompensiert, und alle Proteine können zur Anode wandern. Daher erfolgt in einer SDS-PAGE die Auftrennung nach dem Molekulargewicht und nicht nach der Ladung der Proteine. Gleichzeitig werden die Proteine vollständig denaturiert und wandern daher in einem Gel geeigneter Porosität entsprechend ihrer Molmasse.

Das zugrundeliegende Prinzip ist das Laemmli-System. Hierbei werden die aufgetragenen Proben zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert, von der aus sie in das Trenngel einwandern.

Nach ihrer Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (PVDF-Membran) übertragen (= geblottet). Um die Proteine sichtbar zu machen, werden im Anschluss daran Antikörper verwendet, die für die aufgetrennten Proteine spezifisch sind. Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster bleibt bei der Übertragung erhalten, so dass eine exakte Replik des Gels entsteht.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proteinlysate so aliquotiert, dass pro Slot 50 µg Protein bei den Krebszelllinien bzw. 100 µg bei den primären HMECs aufgetragen werden konnten. Die restlichen Lysate konnten bei -80°C aufbewahrt werden. Die aliquotierten Lysate wurden mit einem Fünftel ihres Volumens an 5x SB gemischt und 5 min. bei 95°C im Wasserbad denaturiert und direkt wieder auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit wurden die 12%igen PAA-Ready-Gele in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut, Laufpuffer in die Kammer eingefüllt und die Slots mit einer Pipette durchgespült. Dann wurde das Gel mit den Proteinlysaten bzw. den entsprechenden Markern beladen. Die Elektrophorese wurde zunächst

für 1 – 2 Minuten bei 110 V (Sammelgel), dann für ca. 1 – 1½ Stunden bei 120 – 170 V (Trenngel) durchgeführt.

Für den anschließenden Blot wurden während der SDS-PAGE für jedes Gel eine PVDF-Membran, zwei Filterpapiere und zwei Schwämme vorbereitet. Die Membran wurde sodann 1 min. in Methanol, 5 min. in H<sub>2</sub>O deion. und 5 min. in Blotpuffer eingelegt, um sie entsprechend den sich anschließenden Blotbedingungen zu äquilibrieren.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut:

- weißer Teil der „Sandwich-Box“ (oben)
- Schwamm
- Filterpapier
- Membran
- Gel
- Filterpapier
- Schwamm
- schwarzer Teil der „Sandwich-Box“ (unten)

Dann erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran mit Blotpuffer für 1½ Stunden bei 85 V in einer Eisbox. Die Membran wurde danach in PBS gewaschen und konnte bei +4°C in PBS aufbewahrt werden.

#### 4.2.11 Antikörper-Behandlung der Membran

Die Antikörper-Behandlung der PVDF-Membran erfolgte bei RT auf einem Schüttler, um eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers zu gewährleisten. Nachdem die Membran in PBS gewaschen wurde, wurde sie für eine Stunde in Milchpuffer prä-inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen im Anschluss zu vermeiden.

Danach wurden die Erstantikörper in frischem Milchpuffer zugegeben. Die eingesetzten Konzentrationen der Antikörper waren folgendermaßen:

Krebszelllinien:

PLK1-AK            1 : 250  
β-Aktin-AK        1 : 200.000  
Lamin A/C-AK    1 : 100

HMECs:

PLK1-AK            1 : 50  
β-Aktin-AK        1 : 200.000  
Lamin A/C-AK    1 : 100

Es wurden jeweils die PLK1- und β-Aktin- bzw. die Lamin A/C- und β-Aktin-Antikörper gleichzeitig auf die Membranen gegeben. Im Anschluss daran wurde die Membran für eine Stunde in PBS-T gewaschen, das in dieser Zeit mehrfach erneuert wurde. Die Behandlung mit dem Zweitantikörper (goat anti mouse) erfolgte wiederum in frischem Milchpuffer, und zwar für alle Western-Blots in einer Verdünnung von 1 : 2000. Die Membran wurde hiernach 15 min. in PBS-T und dann 15 min. in PBS gewaschen. Auch hier wurden PBS bzw. PBS-T mehrfach erneuert.

Um die Signale sichtbar zu machen, wurden die Membranen für ca. 2 min. bei RT mit ECL inkubiert, auf einem Papiertuch abgetropft und in eine Filmkassette gelegt. Die Exposition gegenüber Hyperfilm™ ECL™ erfolgte für 15 sec. bis 30 min. im Dunkeln.

#### 4.2.12 Northern-Blots

Beim Northern-Blot wird die Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben zuerst im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss daran auf Cellulose- oder Nylonmembranen übertragen (= geblottet). Auf diesem Trägermaterial wird die RNA durch große Hitze immobilisiert. Auch bei dieser Technik bleibt das ursprünglich im Gel erhaltene Muster der Moleküle nach der Übertragung erhalten, so dass eine exakte Replik des Gels entsteht.

Mit Hilfe von Northern-Blots kann demzufolge nachgewiesen werden, ob ein bestimmtes Gen transkribiert wird, wie viel von der jeweiligen mRNA gebildet wird und ob die Menge durch bestimmte regulatorische Einflüsse beeinflussbar ist. Dieser Nachweis der Höhe der Expression einer bestimmten mRNA erfolgt durch Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde (vgl. Kapitel 4.2.13) und kann nach der Hybridisierung durch Autoradiographie auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden.

Für die Bestimmung der PLK1-mRNA in Zellen und Tumoren wurde 6, 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion bzw. am Ende der Tierversuche aus den Tumoren die mRNA isoliert. Die Zellpellets (ohne Überstand) konnten von der Ernte bis zur RNA-Isolierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die Tumoren wurden direkt nach der Entnahme bei RT in RNAlater aufgenommen und sofort mit einem Mikro-Dismembrator zerkleinert und weiterverarbeitet. Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und entsprechend den Herstellerangaben zum RNeasy Mini Kit und zum QiaShredder weiterverarbeitet.

Das weitere Vorgehen war für beide Probenarten gleich: Der im RNeasy Mini Kit enthaltene RLT-Puffer wurde jeweils frisch mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, und davon dann  $650\ \mu\text{l}$  zu den Zellpellets bzw. zu dem zerkleinerten Tumormaterial gegeben und gründlich resuspendiert. Die auf diese Art lysierten Zellen bzw. Tumoren wurden auf den QiaShredder pipettiert und bei  $9,3 \times g$  und  $+4^{\circ}\text{C}$  für 2 min. zentrifugiert. Zu den so entstandenen Lysaten wurde das gleiche Volumen ( $650\ \mu\text{l}$ ) 70%iger Ethanol gegeben, gut gemischt und auf die Spin-Columns aus dem RNeasy Mini Kit gegeben. Diese wurden dann 15 sec. bei  $9,3 \times g$  zentrifugiert. Der Flow-through wurde verworfen, denn die RNA ist mit diesem Zentrifugationsschritt an die Membran gebunden. Um sie von der Membran zu eluieren, wurde diese mit  $700\ \mu\text{l}$  RW1-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit 15 sec. bei  $9,3 \times g$  und im Anschluss daran nochmals mit  $500\ \mu\text{l}$  RPE-Puffer 15 sec. bei  $9,3 \times g$ , dann erneut 2 min. bei  $16,1 \times g$  zentrifugiert. Die Filter mit der Membran wurden danach in frische 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt,

damit die RNA im Anschluss mit 150 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei 9,3 x g in 2 min. eluiert werden konnte.

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde im Photometer bei 260 nm (RNA) bzw. 280 nm (DNA) gemessen. Es wurden jeweils 4 µg Gesamt-RNA pro Gel eingesetzt. Das erforderliche Volumen der RNA-Lösung wurde in Eppendorfgefäße aliquotiert, kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und 1 – 2 Stunden in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert, um das H<sub>2</sub>O zu entfernen. Die so entstandenen Lyophilisate wurden in RNA-Ladepuffer aufgenommen, aufgeköcht und in einem 1%igen denaturierenden Agarose-Gel bei 90 V aufgetrennt.

Für den anschließenden Northern-Blot wurde die Nylonmembran kurz in H<sub>2</sub>O deion. und dann in 20x SSC äquilibriert. 20x SSC wurde in eine Schale gefüllt und mit einer Glasplatte abgedeckt, über die Filterpapier gelegt wurde, dessen Enden im Puffer lagen, damit die RNA durch Kapillarkräfte aus dem Gel auf die Membran übertragen werden kann. Zu diesem Zweck wurde das Gel auf dieses Filterpapier gelegt und von einer auf die entsprechende Größe zurechtgeschnittenen Membran bedeckt. Auf die Membran wurden zwei weitere Filterpapiere, die vorher ebenfalls in 20x SSC äquilibriert wurden, und ein Stapel Papiertücher gelegt. Um den Kapillartransfer zu erleichtern bzw. effizienter zu machen, wurde der Blot beschwert. Geblottet wurde über Nacht bei RT, wonach die Membran ca. 1 Std. auf einem Papier luftgetrocknet oder bei 70°C im Trockenschrank ca. 30 min. getrocknet wurde. Danach wurde die mRNA auf der Membran fixiert, indem ca. 2 Stunden bei 80°C im Trockenschrank inkubiert wurde. Dies erfolgte zumeist erst am Tage der Hybridisierung (Kapitel 4.2.13) gleichzeitig mit der PCR zur Sondenherstellung.

#### **4.2.13 Hybridisierung**

Die Sonden für die unterschiedlichen Hybridisierungen wurden mittels PCR jeweils am Tag der Hybridisierung hergestellt:

PCR-Ansatz:

2,5 µl AGT-Mix

2,5 µl 10x PCR-Puffer

1 µl Taq<sup>2000</sup> Polymerase (5U/µl)

1 µl PLK1-DNA bzw. β-Aktin-DNA (Template)

1 µl Primer (PLK1-17-low bzw. PLK1-150as) oder 2 µl Primer (β-Aktin-low bzw. GAPDH-2)

3,5 – 10 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (6000 Ci/mmol; entspricht 70 – 200 µCi pro Ansatz; die Menge wurde je nach Kalibrierungsdatum der Radioaktivität und Anzahl der Röhren gewählt)

H<sub>2</sub>O deion. (autoklaviert) ad 25 µl

Dieser Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet, denn diese PCR wurde in einem Thermocycler mit nicht beheizbarem Deckel durchgeführt.

PCR-Programm

Denaturierung: 1 min., 95°C

Hybridisierung: 1 min., 52°C

Elongation: 1 min., 72°C

25 Zyklen

Der Hybridisierungsofen wurde auf 68°C vorgeheizt. Außerdem wurden die Nick<sup>TM</sup>-Säulen vorbereitet, indem sie mit H<sub>2</sub>O äquibriert wurden. Der Hybridisierungsmix wurde direkt aus dem Kühlschrank verwendet, gut gemischt und entsprechend der Anzahl an Röhren abgemessen (für jede Röhre ca. 20 µl) damit er dann in den Röhren auf 68°C vorgewärmt werden konnte. Die Membranen wurden nach der Fixierung der mRNA kurz in H<sub>2</sub>O deion. gelegt und dann in die mit Hybridisierungsmix vorbereiteten Röhren gelegt, um 15 – 20 min. bei 68°C im Hybridisierungsofen zu prä-hybridisieren, damit die unspezifische Bindung der Sonde an die Membran verhindert wird. Die Sonden wurden während der Prä-Hybridisierung der Membranen über die in der Zwischenzeit äquibrierten Säulen aufgereinigt. Zum Äquibrieren wurden 400 µl H<sub>2</sub>O deion. auf die Säulen gegeben und das Eluat verworfen. Für die Aufrei-

nigung der Sonde wurden die Eppendorfgefäße nach Beendigung der 25 Zyklen PCR auf Eis gestellt, 75 µl H<sub>2</sub>O deion. unter das Öl pipettiert und dann 95 µl Sonde auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde aufgefangen und verworfen. Danach wurden 400 µl H<sub>2</sub>O deion. auf die Säule gegeben und in einem zweiten Eppendorfgefäß aufgefangen. Dies wurde wiederholt und das Eluat in einem dritten Eppendorfgefäß aufgefangen. Danach wurde die Aktivität der Eluate in den beiden Eppendorfgefäßen gemessen, um anhand der Radioaktivität zu bestätigen, dass sich die Sonde im dritten Eluat befand (vgl. hierzu Abb. 18).

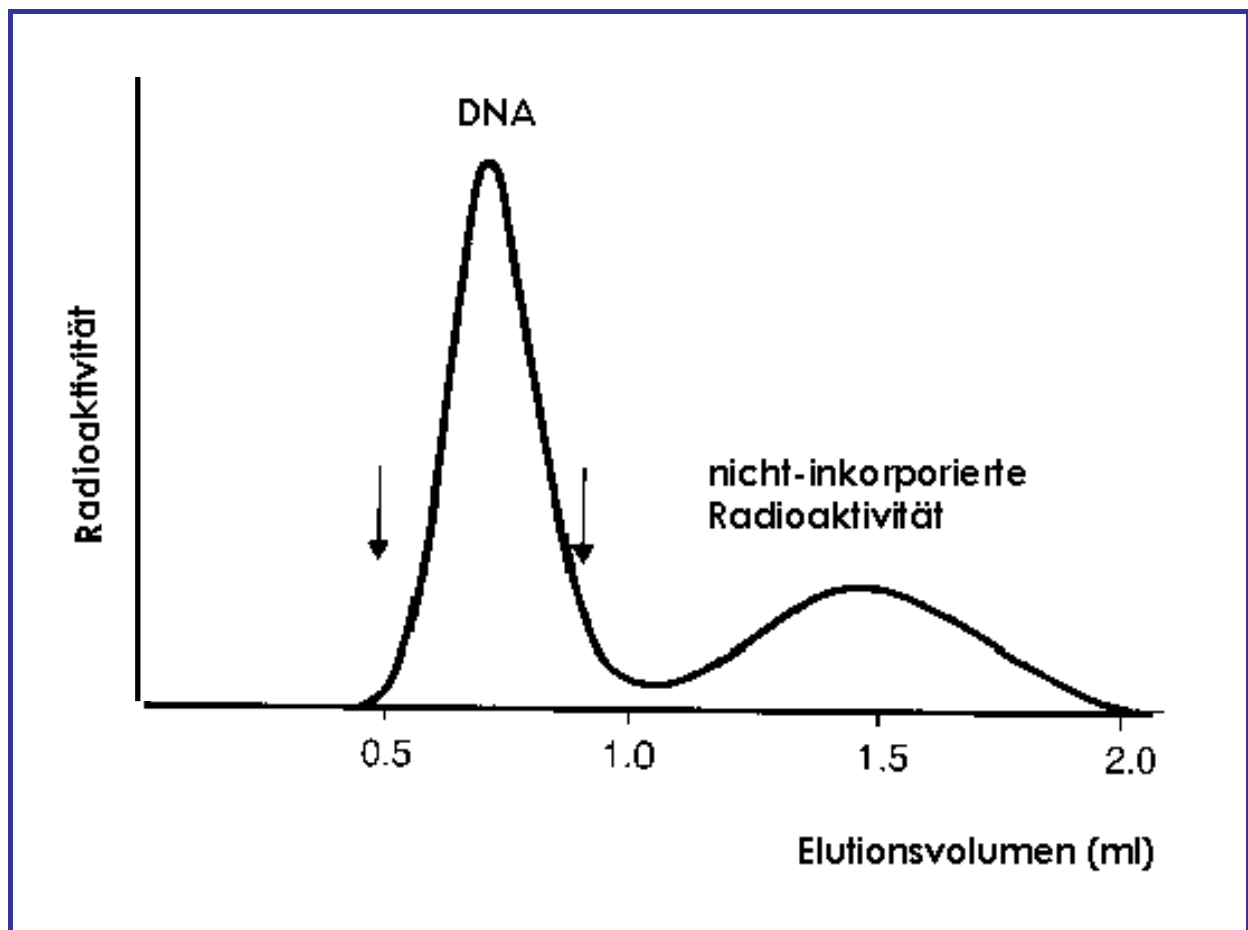


Abbildung 18: Elutionsprofil der Sonde über die Nick™-Säulen

Es ist der Peak der Radioaktivität bei der Aufreinigung der Sonde über die Säulen zu sehen, der in der 0,6 – 1 ml Elutionsvolumen-Fraktion auftritt.

Zur Sonde wurden 400 µl Hybridisierungsmix und 100 µl ultraschallbehandelte Lachsspermien-DNA gegeben und bei 95°C für 2 min. im Thermoblock aufge-



kocht, 10 sec. bei 16,1 x g zentrifugiert und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  cpm/ml auf die Röhren verteilt. Die Röhren rotierten im Hybridisierungssofen eine Stunde bei 68°C. Die Temperatur im Ofen wurde auf 60°C reduziert und die Membranen viermal 15 min. mit je 20 – 50 ml 5x SSC/0,1% SDS gewaschen. Danach wurde viermal 15 min. mit je 20 – 50 ml 0,1x SSC/0,1% SDS gewaschen (vgl. hierzu auch die Waschprozedur beim Southern-Blot, Kapitel 4.2.19). Die Membranen wurden zum Trocknen auf Papiertücher gelegt, in die Filmkassette eingelegt und mit Folie abgedeckt. Die Exposition erfolgte bei –80°C über einen Zeitraum von 1 – 48 Stunden.

#### **4.2.14 Entfernung radioaktiver Sonden von Northern-Blot-Membranen**

Um die wie in Kapitel 4.2.13 beschriebenen hybridisierten Membranen erneut mit einer zweiten Sonde zu hybridisieren, muss die erste Sonde entfernt werden.

In den durchgeführten Versuchen musste die PLK1-Sonde aus der ersten Hybridisierung entfernt werden, um die zweite Hybridisierung mit einer Sonde gegen  $\beta$ -Aktin bzw. GAPDH zu ermöglichen. Dies geschah unter stringenten Bedingungen, denn die Watson-Crick-Basenpaarungen zwischen der Sonde und der nachzuweisenden mRNA aus der ersten Hybridisierung sind relativ stabile Bindungen, die getrennt werden mussten.

Dazu wurde der Hybridisierungssofen auf 80°C vorgeheizt. Die Membranen wurden in die Röhren verteilt, und in jede Röhre wurden 20 – 25 ml „Strip“-Solution gegeben. Die Membranen wurden nun im Hybridisierungssofen ca. 30 min. bei 80°C inkubiert und standen für eine erneute Hybridisierung zur Verfügung.

#### **4.2.15 Kinase-Assays inklusive Immunpräzipitation**

Im Kinase-Assay kann untersucht werden, in wieweit die Kinaseaktivität der zu untersuchenden Kinase durch eine bestimmte Behandlung verändert wird. Zu diesem Zweck wird die Kinase mit ihrem Substrat inkubiert, und anhand der

daraus resultierenden Phosphorylierung können Rückschlüsse auf die Kinaseaktivität gezogen werden.

Um zu bestimmen, wie die PLK1-Kinaseaktivität durch ASO- oder siRNA-Behandlung beeinflussbar ist, wurden die Kontrollzellen und die behandelten Zellen 48 Stunden nach der Transfektion, wie in Kapitel 4.2.9 beschrieben, lysiert, um die Proteine zu isolieren. Im Anschluss an die Proteinbestimmung erfolgte die Immunpräzipitation von PLK1. Dafür wurden jeweils 800 µg Gesamtprotein mit 1,5 µg PLK1-Antikörper für 1 Stunde auf dem Rotator bei +4°C inkubiert, um das PLK1-Protein und damit die Kinase aus den Lysaten zu präzipitieren. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden pro Ansatz 15 µl mit RIPA-Puffer äquilibriertes Protein A/G PLUS-Agarose zugegeben und erneut für 1 Stunde auf dem Rotator bei +4°C inkubiert. Dieses koppelt dabei an die PLK1-Antikörper, um so Komplexe (= Immunpräzipitate) zu bilden, die anschließend durch Zentrifugation pelletiert werden können. Dann wurde bei 0,6 x g für 5 min. bei +4°C das Immunpräzipitat gewonnen. Das Pellet wurde 4x mit RIPA-Puffer gewaschen und jeweils bei 0,6 x g für 1 min. bei +4°C zentrifugiert.

Parallel dazu wurde das Substrat für PLK1, das Cytoplasmic Retention Signal (= CRS) vorbereitet. Dafür mussten zuerst Glutathion Sepharose™-Beads mit Lysepuffer äquilibriert werden. Dann wurden 50 µl CRS vorgelegt, 10 µl der äquilibrierten Beads sowie Proteaseinhibitor zugegeben und mit Lysepuffer auf 200 µl aufgefüllt. Auch hier erfolgte nun eine Inkubation von 1 Stunde auf dem Rotator bei +4°C, in der sich durch Kopplung der Beads an das Substrat ebenfalls Komplexe bilden, die anschließend durch Zentrifugation pelletiert werden können. Danach wurde das Substrat aus der Pufferlösung gefällt, indem es 5 min. bei 0,6 x g bei +4°C zentrifugiert wurde und danach 4x mit Lysepuffer gewaschen und jeweils bei 0,6 x g bei +4°C für 1 min. zentrifugiert wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 10 µl Kinasepuffer aufgenommen und je Reaktionsansatz 1 µl vorgelegt.

Bei Verwendung von Kasein als Substrat entfielen diese Vorbereitungsschritte, und es konnte direkt 1 µl Kasein vorgelegt werden.

Die Immunpräzipitationspellets, in denen PLK1 nach den verschiedenen Transfektionsbehandlungen enthalten war, wurden ebenfalls in ca. 20 µl Kinasepuffer resuspendiert und für jeden Ansatz ca. 3 µl eingesetzt. Der Kinasepremix (ATP-Mix; vgl. Kapitel 4.1.9.7) wurde für jede der unterschiedlichen Behandlungen angesetzt und zu jedem Substrat 20 µl zugegeben. Nach Zugabe des radioaktiv markierten [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP wurde im Thermoblock für 30 min. bei 37°C inkubiert, damit die Kinase PLK1 unter physiologischen Bedingungen ihr Substrat Kasein bzw. die CRS phosphorylieren kann. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde zu jedem Ansatz ein Fünftel des Volumens an 5x SB gegeben und die Mischung bei 95°C ca. 3 min. aufgekocht und 30 sec. bei 16,1 x g zentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde ein 12%iges PAA-Gel vorbereitet, auf das dann die Proben aufgetragen wurden. Die anschließende Elektrophorese erfolgte für ca. 1 – 1½ Stunden bei 120 – 170 V. Das PAA-Gel wurde fixiert und danach getrocknet, in eine Filmkassette eingelegt und mit Folie abgedeckt. Die Exposition erfolgte bei –80°C über 1 – 2 Tage. Danach wurde das Gel rehydriert und mit Coomassie Brilliant Blue G-250 die Proteine angefärbt, um sicherzustellen, dass gleiche Mengen vom Substrat Kasein bzw. CRS geladen worden waren.

Parallel zum Ansatz der Kinasereaktion wurden gleiche Mengen der Immunpräzipitationspellets mit einem Fünftel des Volumens an 5x SB versetzt, aufgekocht und auf ein vorbereitetes 12%iges PAA-Gel aufgetragen. Die Kammer wurde mit dem Laufpuffer für Western-Blots gefüllt. Im Anschluss an die Elektrophorese bei 120 – 170 V für 1 - 1½ Stunden wurde das Gel wie in Kapitel 4.2.10 beschrieben auf eine PVDF-Membran geblottet und diese danach mit einem monoklonalen anti-PLK1-Antikörper behandelt (vgl. Kapitel 4.2.11), um sicherzustellen, dass gleiche Mengen der Kinase PLK1 in den Immunpräzipitaten der verschiedenen Transfektionsbehandlungen enthalten sind und damit für den Kinase-Assay eingesetzt wurden.

#### 4.2.16 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Färbungen dienen dazu, morphologische Veränderungen der Zellen zu detektieren, die durch die Behandlung mit ASOs oder mit siRNAs, die gegen PLK1 gerichtet sind, hervorgerufen werden. Außerdem kann analysiert werden – neben den Western-Blot-Analysen – ob das PLK1-Protein durch die Behandlungen reduziert werden konnte. Zu diesem Zweck werden Zellen nach der Behandlung auf Objektträgern fixiert und die zu analysierenden Proteine nach folgendem Prinzip mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt, so dass sie der anschließenden Analyse im Fluoreszenzmikroskop zugänglich sind: Hierfür werden zuerst nach der Fixierung der Zellen Erstantikörper eingesetzt, die hochspezifisch an die zellulären Moleküle binden. Im zweiten Schritt werden Zweitantikörper eingesetzt, die ihrerseits nicht an zelluläre Moleküle binden, sondern spezifisch an die Moleküle des Erstantikörpers. Diese Zweitantikörper sind spezifisch für die Spezies, aus der die Erstantikörper stammen. An die Zweitantikörper sind fluoreszierende Farbstoffe gebunden, die bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Licht abgeben, also farbig werden. Ein Beispiel für Fluoreszenzfarbstoffe, die grünes Licht emittieren, ist das Fluorochrom FITC, ein Beispiel für einen roten Fluoreszenzfarbstoff ist Texas-Rot bzw. Rhodamin. Eine schematische Darstellung des eben beschriebenen Prinzips zeigt Abbildung 19:

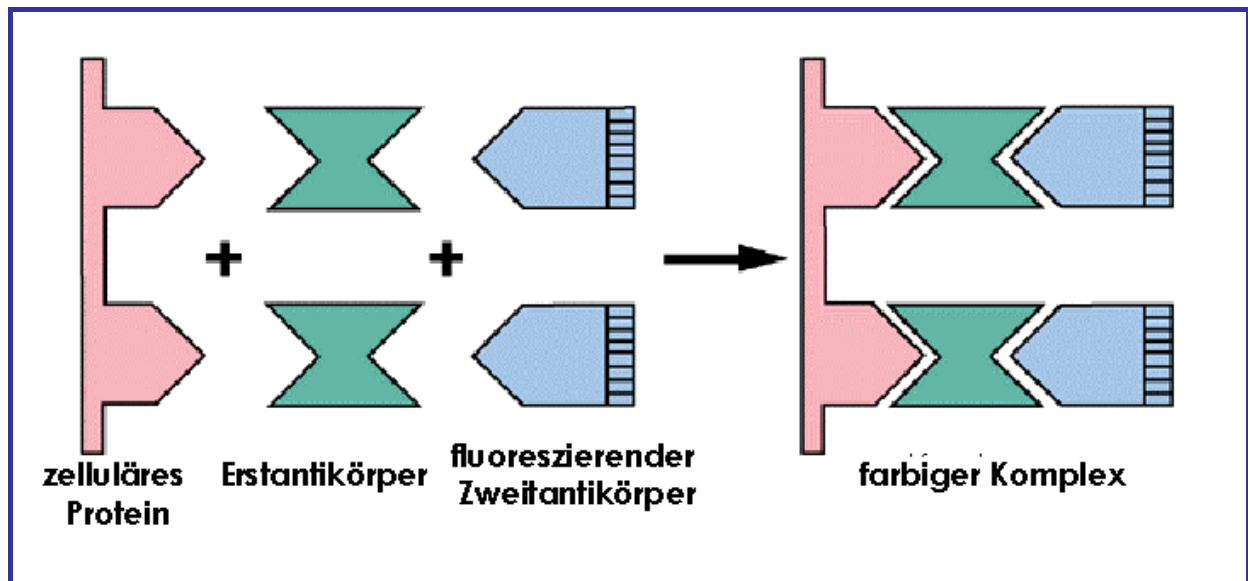


Abbildung 19: Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Das prinzipielle Reaktionsschema von zellulärem Protein mit dem Erstantikörper und dem fluoreszierendem Zweitantikörper ist gezeigt, wobei der farbige Komplex entsteht, der anschließend im Mikroskop detektiert werden kann.

Die Zellen wurden zu diesem Zweck in Objektträger-Zellkulturgefäßen („slide-flasks“) kultiviert, damit sie sich direkt auf den Objektträgern befanden, auf denen die weitere Untersuchung stattfand. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium entfernt, die „slide-flasks“ geöffnet und die Zellen 3x in PBS gewaschen. Dann wurden sie in einer abgedeckten Glasküvette 15 min. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem MeOH fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Objektträger dreimal je 5 min. in einer Küvette auf dem Schüttler bei RT in PBS gewaschen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Lagerung in PBS bei  $+4^{\circ}\text{C}$  möglich. Danach wurde in 1% BSA in PBS für 20 min. auf dem Schüttler prä-inkubiert, um spätere unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Die Objektträger wurden danach in eine Feuchtkammer gelegt, in der die Antikörperbehandlung erfolgte. Auf jeden Objektträger wurden 500  $\mu\text{l}$  der Erstantikörper gegen PLK1,  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin gegeben, die in einer Verdünnung von 1 : 100 in 1% BSA vorlagen (das entspricht einer Endkonzentration von 0,1 – 2,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die Inkubation erfolgte bei RT für 1 Stunde. Die Objektträger wurden sodann 3x 5 min. in PBS auf dem Schüttler gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper behandelt. Dieser wurde ebenfalls in 1% BSA verdünnt, aber 1 : 500, und die

Inkubation erfolgte mit 500 µl je Objektträger für 1 Stunde bei RT im Dunkeln. Es folgten wieder 3x 5 min. Waschen bei RT auf dem Schüttler in PBS. Danach wurde die DNA mit Bisbenzimid H33342 gefärbt. Die bei +4°C gelagerte Stammlösung Bisbenzimid H33342 (Konzentration 10 mg/ml) wurde für diesen Zweck 1 : 2000 mit PBS verdünnt, und auch von dieser Lösung wurden auf jeden Objektträger 500 µl gegeben und für 20 min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurde nochmals 3x 5 min. bei RT in PBS auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit Vectashield und Deckgläschen eingedeckt. Die Ränder wurden mit Nagellack abgedichtet, damit keine Feuchtigkeit eintreten kann. Die weitere Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscan-Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung.

#### **4.2.17 FACScan-Analyse (Fluorescence activated cell sorting; Durchflusszytometrie)**

Im FACScan können verschiedene Zellarten aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften, wie zum Beispiel der unterschiedliche DNA-Gehalt in den verschiedenen Zellzyklusphasen bzw. unterschiedliche Mengen an aufgenommenen Fluoreszenzfarbstoffen, unterschieden (sortiert) werden. Die Zellen passieren dabei einen Laserstrahl und können durch die unterschiedliche Lichtstreuung bzw. durch die von den Zellen emittierte Fluoreszenz unterschieden werden. Weiterhin wird die Durchflusszytometrie eingesetzt, um den DNA-Gehalt von Zellen zu messen. Der DNA-Gehalt einer Zelle wird aufgrund der Fluoreszenzintensität eines an die DNA gebundenen Farbstoffes (hier: Propidiumiodid) bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit dem Durchflusszytometer folgende Untersuchungen durchgeführt: Zum einen wurde der Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bestimmt, zum anderen wurde der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt, und weiterhin wurde die Aufnahme von FITC-markierten siRNAs in verschiedene Zelltypen gemessen.

Für die Zellzyklusverteilungs-Bestimmungen wurden die Zellen 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion (mit ASOs bzw. siRNAs) trypsinisiert, 1x mit PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min.; 248 x g bei RT) und dann gemäß dem Protokoll zum Cycle TEST™ PLUS DNA reagent kit mit leichten Änderungen vorbereitet. Zu den Zellpellets wurden 175 µl Lösung A gegeben, gut gemischt, in FACS-Röhrchen überführt und 10 min. bei RT inkubiert. Danach wurden 175 µl Lösung B zugegeben und erneut 10 min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 175 µl Lösung C (enthält Propidiumiodid) erfolgten mindestens 10 min. und max. 2 Stunden Inkubation bei +4°C im Dunkeln. Direkt vor der Analyse im FACScan-Gerät wurden die einzelnen Proben kurz gemischt und anschließend mit Hilfe des Programms CellQuest gemessen. Die quantitative Analyse der Zellzyklusverteilung erfolgte mittels ModFit LT für Mac.

Für die Apoptoseuntersuchungen wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion trypsinisiert, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min.; 248 x g bei RT) und im Anschluss daran mit -20°C kaltem 70%igen EtOH fixiert. Nach der Fixierung wurden sie für 20 min. bei 37°C mit RNase A (5 µg/ml) und Propidiumiodid (50 µg/ml) inkubiert und sodann im FACScan-Gerät mit dem Programm CellQuest analysiert.

Die Aufnahme von FITC-markierter siRNA wurde 24 Stunden nach der Transfektion (vgl. Kapitel 4.3.6) der MCF-7-Zellen und HMECs gemessen. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen markierter siRNA transfiziert, 24 Stunden nach der Transfektion trypsinisiert, mit PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min.; 248 x g bei RT). Nach dem Resuspendieren in PBS wurde ebenfalls mit Hilfe des Programms CellQuest im FACScan-Gerät die Fluoreszenz der transfizierten Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen gemessen, um die Eigenfluoreszenz der Zellen und von Mediumresten zu berücksichtigen. Durch diese Messung können Daten erhoben werden, wie viel Prozent der Zellen den Fluoreszenzfarbstoff enthalten, also durch die Transfektion aufge-

nommen haben. In diesem Fall konnte demzufolge festgestellt werden, wie viel Prozent der Zellen die siRNA aufgenommen haben.

#### 4.2.18 Xenograft-Experimente

Die humanen Krebs-Xenograft-Modelle wurden mit immunsupprimierten Nacktmäusen (nu/nu) NMRI durchgeführt, die zu Versuchsbeginn ca. 8 – 10 Wochen alt waren. Alle Eingriffe wie die Injektion der Tumorzellen in die Flanken der Mäuse, die Tumortransplantationen, die Injektion der Testsubstanzen in die Schwanzvene, das Entbluten oder die Entnahme der Tumoren am Ende der Versuche wurden unter Enfluran<sup>®</sup>-Narkose durchgeführt. Die Tierversuche und die damit verbundenen Eingriffe wurden vom Regierungspräsidium in Darmstadt genehmigt und von dazu berechtigten Personen in der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität durchgeführt.

Die Zellen (A549 – Bronchialkarzinom; HeLa S3 – Zervixkarzinom; MCF-7 – Mammakarzinom; MDA-MB-435 – Mammakarzinom; SW-480 – Kolonkarzinom) wurden aus der Zellkultur trypsiniert, mit PBS gewaschen und in normalem Zellkulturmedium resuspendiert. Dann wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen subkutan in beide Flanken der Mäuse injiziert. Für die Zelllinie A549 wurden männliche, für die MCF-7-, MDA-MB-435-, SW-480- und HeLa S3-Zellen weibliche Mäuse verwendet. Die Tumoren wurden mindestens dreimal auf den Mäusen passagiert, bevor sie auf die endgültige Anzahl an Mäusen transplantiert wurden. Dabei wurden die Tumorstücke subkutan wiederum in beide Flanken der Mäuse transplantiert und zweimal wöchentlich die Größe bestimmt. Dies geschah, indem mit einem Kaliper die beiden Durchmesser der Tumoren gemessen wurden. Aus diesen beiden Messwerten wurde nach folgender Formel das Tumolvolumen berechnet:

$$\text{Volumen} = \frac{\pi}{6} \times \text{größerer Durchmesser} \times \text{kleinerer Durchmesser}^2$$



Bei einem Volumen von durchschnittlich 100 mm<sup>3</sup> wurde mit den jeweiligen Behandlungen begonnen. Das Tumorwachstum wurde für jeden einzelnen Tumor auf das Anfangsvolumen bezogen, um Unterschiede in der Anfangstumorgröße zu eliminieren und standardisierte Werte zu erhalten. Die Therapiezeiten erstreckten sich über einen Zeitraum von 24 – 28 Tagen, in denen weiterhin zweimal wöchentlich das Tumolvolumen gemessen wurde. Die Messung der Tumorumfänge erfolgte bei Behandlung mit den Expressionsplasmiden weitere 28 Tage über das Behandlungsende hinaus.

Für die Tierexperimente mit ASOs wurden die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 und die Bronchiolalkarzinom-Zelllinie A549 gewählt und für jede der ASO-Behandlungen auf drei Gruppen zu je fünf Tieren transplantiert. Die Behandlung begann bei der Zelllinie A549 jeweils an Tag 25 nach der Transplantation und wurde über einen Zeitraum von 24 Tagen fortgesetzt. Bei der Zelllinie MDA-MB-435 wurde 15 Tage nach der Transplantation mit der Therapie begonnen und diese über 26 Tage fortgesetzt. Die ASOs P12, P13 und das HSV-ASO wurden in PBS gelöst (in einer Konzentration von 540 µM) und täglich intravenös in einer Dosierung von 6 mg ASO/kg Körpergewicht/Tag bzw. 12 mg ASO/kg Körpergewicht/Tag mit einem Totalvolumen von 100 µl injiziert. Die Negativkontrollgruppe erhielt jeden Tag 100 µl PBS.

Mit den synthetischen siRNAs der Firma Dharmacon wurden verschiedene *in vivo* Ansätze untersucht:

Zum einen wurden mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und mit der Kolonkarzinomzelllinie SW-480 in zwei aufeinanderfolgenden Experimenten jeweils drei Gruppen zu jeweils sechs Mäusen mit purer siRNA behandelt (siRNA4 und siRNA4S). Die drei eingesetzten Konzentrationen betragen hierbei 44,2 µg/kg Körpergewicht/Tag, 442 µg/kg Körpergewicht/Tag und 4,42 mg/kg Körpergewicht/Tag, und die Behandlung erfolgte täglich über eine Bolusinjektion von 100 µl in die Schwanzvene. Gleich große Kontrollgruppen erhielten jeden Tag eine PBS-Injektion in die Schwanzvene.

Um die Aufnahme der siRNAs in die Zellen zu verbessern, wurden im nächsten Versuch die siRNAs vor der Injektion mit dem Transfektionsvermittler Oligofec-

tamin (vgl. Kapitel 4.2.6) gemischt. Hierfür wurden wiederum je Behandlung (siRNA4 und siRNA4S) drei Gruppen zu je sechs Mäusen, die Tumoren der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 trugen, verwendet. Die Injektion erfolgte wiederum täglich mit einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l in die Schwanzvene. Auch hier erhielt die Kontrollgruppe das gleiche Volumen PBS.

Ein weiterer Ansatz diente der Stabilisierung der synthetischen siRNAs im Blut der Tiere. Hierbei wurden die siRNAs (siRNA4 und siRNA4S) vor der Injektion mit RNasin<sup>®</sup>, einem Ribonukleaseinhibitor (Futami J. et. al. 2001; McCaffrey A.P. et. al. 2002), gemischt und dann wiederum täglich ein Volumen von 100  $\mu$ l MCF-7-tumortragenden Mäusen in die Schwanzvene injiziert.

In diesen beiden weiterführenden Experimenten wurde nur die mittlere siRNA-Konzentration von 442  $\mu$ g/kg Körpergewicht/Tag eingesetzt. Die Oligofectaminkonzentration war entsprechend der *in vitro* eingesetzten Konzentration, und die RNasin<sup>®</sup>-Konzentration lag bei 250 Units auf 442  $\mu$ g siRNA.

Zwei weitere Experimente wurden mit synthetischen siRNAs durchgeführt, die freundlicherweise von der Firma Ribopharma AG zur Verfügung gestellt wurden. Diese siRNAs trugen keinen 3'-Überhang von zwei Thymidinen, und waren in *in vitro*-Vorversuchen genauso wirksam wie die für die in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Transfektionen verwendeten siRNAs der Firma Dharmacon. In den beiden Xenograft-Versuchen wurden zum einen MCF-7-tumortragende weibliche Tiere verwendet, zum anderen A549-tumortragende männliche Mäuse. In beiden Experimenten erhielten die Mäuse jeweils eine tägliche Injektion von 3,33 mg/kg Körpergewicht/Tag in einem Volumen von insgesamt 50  $\mu$ l in die Schwanzvene. Verwendet wurden auch hier siRNA4 und siRNA4S sowie eine Kontrollgruppe, der nur PBS injiziert wurde.

Alle beschriebenen Ansätze mit siRNA wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt, in dem auch die Tumorumfänge ein- bis zweimal pro Woche gemessen wurden.

Die Tierexperimente mit den Expressionsplasmiden, die für shRNA/PLK1 bzw. shRNA/PLK1S kodieren, bzw. mit dem parentalen Vektor pBS/U6 wurden mit der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa S3 durchgeführt, die für jede der vier Behand-

lungen auf 4 Gruppen zu je 6 Tieren transplantiert wurde. Die Behandlung der Tiere begann 16 Tage nach der Transplantation und erstreckte sich über einen Zeitraum von 26 Tagen. Das Behandlungsregime war folgendermaßen: Die Mäuse bekamen dreimal in der Woche (Montag, Mittwoch und Freitag) eine Injektion von 500 µl in die Schwanzvene, in der das jeweilige Plasmid in einer Dosierung von 0,33 – 0,4 mg/kg Körpergewicht enthalten war. Eine Kontrollgruppe wurde mit dem parentalen Vektor pBS/U6 behandelt, eine Gruppe mit pBS/U6/shRNA/PLK1 und eine weitere Kontrollgruppe mit pBS/U6/shRNA/PLK1S, der „scrambled“-Sequenz zu pBS/U6/shRNA/PLK1. Es wurde jeweils der Nukleaseinhibitor ATA zugegeben, um die Stabilität der Plasmide im Blut zu erhöhen, indem die physiologisch im Blut vorhandenen Nukleasen daran gehindert werden, die DNA zu zerschneiden. ATA wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von Glasspool-Malone (Glasspool-Malone J. et. al. 2002) bzw. entsprechend der in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Vorversuche in einem Verhältnis von ATA : Plasmid-DNA von 1 : 5 eingesetzt. Für die Gruppe, die mit pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelt wurde, gab es noch eine weitere Kontrolle, nämlich eine Gruppe, die kein ATA zugesetzt bekam, um die Wirkung von ATA auf die Plasmidstabilität auch direkt im Tier beurteilen zu können und um toxische Effekte durch ATA ausschließen zu können.

Für die weiteren Untersuchungen der Mäuse bzw. die Auswertung der Effekte nach Behandlung mit ASOs bzw. mit pBS/U6/shRNA/PLK1, pBS/U6/shRNA/PLK1S oder pBS/U6 wurden die Mäuse jeweils am Tag nach der letzten Behandlung getötet und ihre Tumoren entnommen. Bei dem Versuch mit Plasmid-DNA wurden aus allen vier Gruppen (s.o.) je 12 Tiere am Leben gelassen, um das Wachstum der Tumoren nach Beendigung der Behandlung über einen Zeitraum von weiteren 28 Tagen zu verfolgen.

Ein Teil der entnommenen Tumoren wurde in RNAlater aufbewahrt, um dann Northern-Blots (Kapitel 4.2.12) zur Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression im Tumor nach shRNA-Behandlung durchführen zu können. Ein weiterer Teil der Tumoren, der ebenfalls in RNAlater vorgelegt wurde, diente dem Nachweis

der Plasmide im Tumor mittels Southern-Blot (Kapitel 4.2.19) bzw. PCR (Kapitel 4.2.20). RNAlater stabilisiert die RNA in den Proben, um deren Degradation zu verhindern. Da RNA noch empfindlicher gegenüber dem Angriff durch Nukleasen ist als DNA, wurden auch die Tumoren für den Plasmid-Nachweis in RNAlater asserviert, damit auch die DNA vor Abbau durch Nukleasen geschützt wurde.

Diese Analysen wurden beide nur bei dem Xenograft-Experiment mit den Expressionsplasmiden durchgeführt.

Bei den Tierexperimenten mit ASOs bzw. mit den Expressionsplasmiden wurden weitere Tumoren für die immunhistochemische Färbung (vgl. Kapitel 4.2.21) bis zum Schneiden in Formalin aufbewahrt.

#### **4.2.19 Southern-Blots**

Southern-Blots wurden im Jahre 1975 als erste der verschiedenen Blottechniken von E.M. Southern entwickelt, um DNA nachzuweisen. Sie stellen damit den Namensgeber für die verschiedenen Blot-Arten dar, die alle ihren Namen dem Erfinder dieser Methode verdanken.

Für Southern-Blots wird die DNA aus den Zellen oder Geweben aufgereinigt und dann zuerst wie die mRNA für den Northern-Blot elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung müssen die Gele denaturiert und depuriniert und im Anschluss neutralisiert werden. Dann erst können sie auf die Nylonmembranen geblottet werden, wobei hier auch durch Kapillarkräfte die DNA auf die Membran übergeht. Auf diesem Trägermaterial wird die RNA durch große Hitze oder UV-Strahlung immobilisiert. Auch bei dieser Technik bleibt das ursprünglich im Gel erhaltene Muster der Moleküle nach der Übertragung erhalten, so dass eine exakte Replik des Gels entsteht.

Der Nachweis der DNA auf der Membran erfolgt wie beim Northern-Blot durch Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde (vgl. Kapitel 4.2.13). Die DNA kann danach durch Autoradiographie auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden.

Um die Plasmid-DNA in Blut und Tumoren nachzuweisen, wurde die Gesamt-DNA mit Hilfe des QiaAmp<sup>®</sup> DNA Mini Kit entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Hierfür wurden 200 µl Blut bzw. 25 mg Tumorgewebe eingesetzt.

Für die Plasmid-Isolation aus Blut wurden 20 µl der im QiaAmp<sup>®</sup> DNA Mini Kit enthaltenen QIAGEN Proteinase K in 1,5 ml-Eppendorfgefäße gegeben und je Ansatz 200 µl Blutprobe zugegeben. Dann wurden 200 µl Puffer AL zugegeben und für 15 sec. gut gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation von 10 min. bei 56°C im Wasserbad. Nach 10 Sekunden Zentrifugieren bei 16,1 x g, um Tropfen vom Deckel zu entfernen, wurden 200 µl Ethanol (96 – 100%) zugegeben und wieder 15 sec. gründlich gemischt. Danach wurde erneut 10 sec. bei 16,1 x g zentrifugiert. Dann wurden die QIAamp-Säulen mit dem VacConnector in die QIAVac gesetzt und die Lösung in die Säulen überführt. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde nun die Lösung durch die Säulen gesaugt. Danach wurden auf die Säulen je 750 µl AW1-Puffer gegeben und erneut mit Hilfe der Vakuumpumpe durchgesaugt. Dies wurde mit je 750 µl AW2-Puffer wiederholt. Die Säulen wurden sodann in frische 2 ml-Eppendorfgefäße überführt und bei 16,1 x g für 1 min. zentrifugiert, um die Membran vollständig zu trocknen. Daraufhin wurden die Säulen in frische 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O deion. zur Elution der an die Membran gebundenen DNA wurde für 1 min. bei RT inkubiert und dann bei 5,9 x g für 1 min. zentrifugiert.

Für die Plasmid-Isolation aus den Tumoren wurden jeweils 25 mg Tumorgewebe in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gegeben und 180 µl ATL-Puffer sowie 20 µl Proteinase K zugegeben. Es wurde gründlich gemischt und bei 56°C inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Anschließend wurde 10 sec. bei 16,1 x g zentrifugiert, um Tropfen vom Deckel zu entfernen. Nach Zugabe von je 4 µl RNase A wurde 15 sec. gründlich gemischt und dann für 2 min. bei RT inkubiert. Es wurde erneut 10 sec. bei 16,1 x g zentrifugiert und dann 200 µl AL-Puffer zugegeben. Nach 15sekündigem Mischen wurde für 10 min. bei 70°C inkubiert und erneut 10 sec. bei 16,1 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden 200 µl Ethanol (96 – 100%) zugegeben, gründlich gemischt und erneut 10 sec. bei 16,1 x g zentrifugiert. Die so erhaltene Lösung wurde auf die QIAamp-Säulen

gegeben und in einem 2 ml-Eppendorfgefäß bei 5,9 x g für 1 min. zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säulen in neue Gefäße gesetzt. Nach Zugabe von 500 µl AW1-Puffer wurde erneut für 1 min. bei 5,9 x g zentrifugiert, das Filtrat verworfen und 500 µl AW2-Puffer auf die Säulen gegeben. Dann wurde bei 16,1 x g für 3 min. zentrifugiert, das Filtrat wiederum verworfen und die Säulen in neue 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Nun wurde die an die Membran gebundene DNA mit 200 µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O deion. eluiert, indem für 1 min. bei RT inkubiert und dann für 1 min. bei 5,9 x g zentrifugiert wurde.

Die so erhaltene Mischung aus genomischer DNA und dem transfizierten bzw. injizierten Plasmid wurde auf 1%ige Agarosegele aufgetragen und bei 100 V in ca. 30 min. aufgetrennt. Zur Kontrolle erfolgte jeweils noch die Auftragung von frisch präpariertem Plasmid bzw. von mit Hilfe von *Kpn* / linearisiertem Plasmid, um für jede der resultierenden Plasmid-Banden (zirkulär, linear und supercoiled) einen Größenstandard zu erhalten.

Nach der Auftrennung im Agarosegel musste die DNA depuriniert und denaturiert werden, damit aus den Doppelsträngen der DNA Einzelstränge werden, da sonst die Sonde in der anschließenden Hybridisierung nicht binden kann. Dafür wurden die Gele 15 min. in 0,25 M HCl auf dem Schüttler inkubiert, um Doppelstrangbrüche zu induzieren, danach wurden sie auf dem Schüttler für 30 min. unter denaturierenden Bedingungen in 1,5 M NaCl und 0,5 M NaOH inkubiert. Um sie wieder zu neutralisieren, wurden die Gele anschließend 2x 15 min. in Neutralisierungspuffer inkubiert. Danach wurden die Gele – wie für die Northern-Blots (Kapitel 4.2.12) beschrieben – geblottet, die Membranen getrocknet und die DNA durch 5 min. UV-Licht oder durch 2 Stunden Inkubation bei 80°C im Trockenschrank auf der Membran fixiert. Dann konnte die denaturierte DNA mittels Hybridisierung wie im Anschluss an die Northern-Blots nachgewiesen werden (vgl. hierzu Kapitel 4.2.13). Im Anschluss an die Hybridisierung von 1 Stunde im Hybridisierungssofen bei 68°C folgten in diesem Fall allerdings andere Waschschrte, und zwar wurde nur zweimal 15 min. bei 36°C mit je 20 – 50 ml 2x SSC gewaschen. Diese weniger stringenten Bedingungen sorgen dafür, dass die Sonde, die beim Nachweis der Plasmide zur

Expression von shRNAs nur über einen kurzen Sequenzabschnitt hybridisiert, nicht sofort wieder entfernt wurde.

#### 4.2.20 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis der Expressionsplasmide in den Tumoren

Neben dem Nachweis der Plasmide in den Tumoren mittels Southern-Blot-Analyse erfolgte der Nachweis zur Bestätigung noch mit Hilfe einer PCR, um so auch kleinste Mengen an Plasmid-DNA in den Tumoren detektieren zu können. Dafür wurden Primer konstruiert, die ein 500 bp-langes Fragment des pBS/U6-Vektors amplifizieren (vgl. Kapitel 4.1.3.3), um in einer PCR die Plasmide in den Tumoren aller Behandlungsgruppen nachweisen zu können.

##### PCR-Ansatz:

5 µl 10x Puffer

1,5 µl dNTPs (je 0,3 mM)

1 µl MgSO<sub>4</sub> (50 mM)

0,5 µl Primer (100 µM)

300 ng DNA-Template

0,5 µl Platinum® Pfx DNA Polymerase (2,5 U/µl)

ad 50 µl mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O deion.

##### PCR-Programm:

Initiale Denaturierung: 4 min., 94°C

Denaturierung: 35 sec., 94°C

Hybridisierung: 1 min. 10 sec., 50°C

Elongation: 25 sec., 68°C

35 Zyklen

Die terminale Elongation betrug 5 Minuten bei 68°C. Danach wurde auf +4°C abgekühlt.

Die PCR-Produkte wurden auf 1%ige Agarose-Gele aufgetragen und bei 100 V in 30 min. aufgetrennt. Zur Kontrolle wurden sowohl das parentale Plasmid sowie der Marker auf die Gele aufgetragen.

#### 4.2.21 Immunhistochemische Färbung

Es wurden Schnitte der entnommenen Tumoren angefertigt (Yuan J. et. al. 1997) und diese dann mit MIB-I-/Ki-67- bzw. PLK1-Antikörpern angefärbt. Der immunhistochemische Nachweis beruht dabei auf der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Enzym-Komplexmethode), die zu den indirekten immunhistochemischen Nachweismethoden gehört.

Die ABC-Methode beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Avidin, einem Glykoprotein aus dem Hühnereiweiß, zum Biotin (Vitamin H). Der ABC-Komplex ist ein Komplex, der aus Avidin und biotinyliertem Enzym besteht. Durch Koppelung an einen multivalenten, biotinylierten Sekundärantikörper wird dieser Komplex an den Primärantikörper gekoppelt, weshalb das Verfahren eine indirekte Nachweismethode darstellt. Die einzelnen Inkubationsschritte zur Ausbildung des Avidin-Biotin-Komplexes können entweder nacheinander erfolgen, oder aber es wird ein schon ausgebildeter Avidin-Biotin-Komplex eingesetzt. Die Sensitivität dieses Systems ist sehr hoch, da mehrere ABC-Komplexe an einen biotinylierten Sekundärantikörper binden können, so dass mehrere Marker-Enzymmoleküle am Ort des gewebsgebundenen Antigens nachgewiesen werden können (Abb. 20).



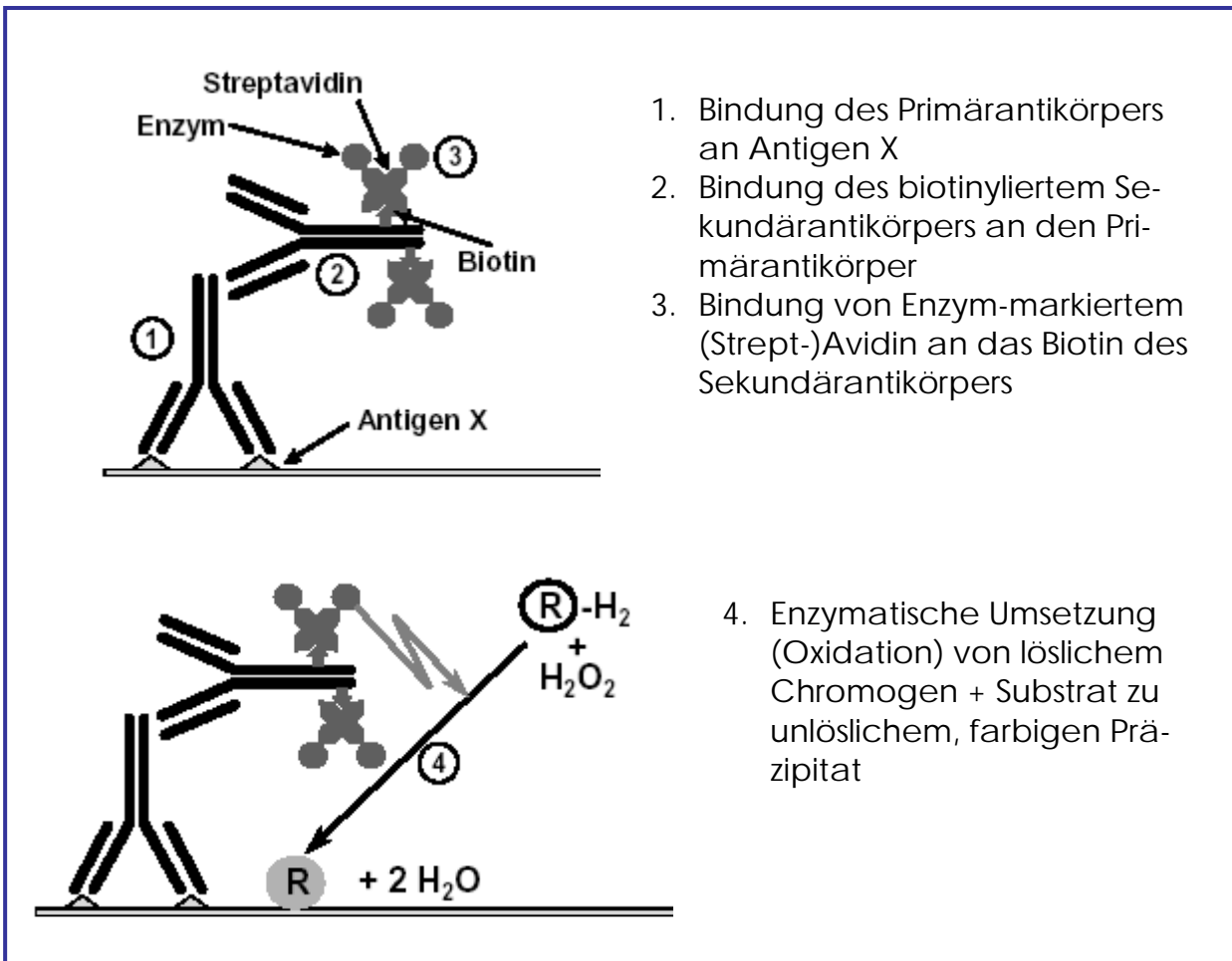
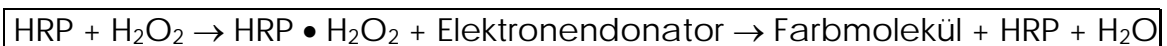


Abbildung 20: Die ABC-Methode zum immunhistochemischen Nachweis von Proteinen

Hierbei ist das Prinzip zu sehen, nach dem der Primärantikörper vom Protein gebunden wird, dieser dann den biotinylierten Sekundärantikörper binden und schließlich an diesem die Farbreaktion stattfinden kann.

Das eingesetzte Enzym ist die Meerrettichperoxidase (HRP), die einen Komplex mit  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid) eingeht. Dieser Komplex reagiert anschließend mit einem Elektronendonator, wobei ein Farbmolekül und  $H_2O$  entstehen. HRP fungiert hierbei als Katalysator, wird also wieder komplett regeneriert und kann erneut mit  $H_2O_2$  reagieren:



Durch die Katalysatorwirkung von HRP ist häufig die Immunhistochemie sensibler als die Immunfluoreszenz, bei der eine solche verstärkende Wirkung entfällt. Im vorliegenden Fall bildet das Chromogen AEC (= 3-Amino-9-Ethylcarbazol), das als Elektronendonator dient, ein rot-braunes, in Alkohol lösliches Endprodukt, das am Ort der Entstehung präzipitiert. Aus diesem Grund muss bei dieser Nachweismethode ein wässriges Eindeckmedium verwendet werden.

Allgemein ist die ABC-Methode eine sehr sensitive Methode, bei der allerdings berücksichtigt werden muss, dass verschiedene Gewebe, wie z.B. Leber, Brust, Gehirn und Niere selber (Strept-)Avidin enthalten, das zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führen kann. In diesen Fällen sollte auf andere Methoden ausgewichen werden. Bei Geweben, die selber endogene Peroxidase enthalten (z.B. rote und weiße Blutkörperchen oder Dünndarm- bzw. Nervenzellen), sollte vor der Behandlung der Paraffinschnitte mit dem Primärantikörper eine Inkubation mit 3%iger-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung erfolgen, um die endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren.

Im folgenden sind die Verfahren zur Färbung von MIB-I (Ki-67) – Kapitel 4.2.21.1 – bzw. PLK1 – Kapitel 4.2.21.2 – im Detail beschrieben.

#### **4.2.21.1 MIB-I-/Ki-67-Färbung**

Die Paraffinschnitte inkubierten 20 min. bei 60°C und wurden danach in Histo-clear 4x 5 min. entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 min. in 95%, 80% und 70% EtOH), wonach die Schnitte in einer mit Citratpuffer gefüllten Plastikkuvette in der Mikrowelle bei 600 Watt für 9x 3 min. aufgekocht wurden. Nach dieser Vorbehandlung kühlten die Schnitte mindestens 20 min. bei RT ab und wurden sodann in einer Glaskuvette für jeweils 5 min. mit H<sub>2</sub>O deion. bzw. PBS gewaschen. Die Schnitte wurden in 0,1%igem Triton-PBS und PBS nacheinander für jeweils 4 min. bei RT gewaschen und in eine Feuchtkammer gelegt, wo sie für 45 min. bei 37°C mit dem polyklonalen Ki-67-Antikörper (1 : 30) oder dem mo-

noklonalen MIB-I-Antikörper (1 : 10) inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem gebrauchsfertigen, polyvalenten, biotinylierten Sekundärantikörper für 30 min. und danach mit dem gebrauchsfertigen Peroxidase-konjugierten Streptavidin für 45 min. bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde 2x mit PBS für je 5 min. gewaschen und dann die Farbreaktion durch 25minütige Inkubation mit einer frisch zubereiteten AEC-Lösung bei RT ausgelöst. Danach erfolgte die Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin nach Mayer. Für die Negativkontrolle wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper ausgelassen. Das Eindecken erfolgte mit Kaisers Glyzeringelatine als wässriges Eindeckmedium.

#### 4.2.21.2 PLK1-Färbung

Die PLK1-Färbung erfolgte ebenfalls nach dem ABC-Prinzip mit einem monoklonalen anti-PLK1-Antikörper.

Hierbei wurden folgende aufeinanderfolgende Schritte durchgeführt:

- Entparaffinieren und Rehydratation: Hierbei wurden die Schnitte für 30 min. bei 60°C inkubiert, anschließend für 4x 5 min. in HistoClear bei RT inkubiert, dann 2x 5 min. in 100%igem EtOH bei RT und zum Schluss für 2x 5 min. in 95%igem EtOH bei RT.
- Mikrowellen-Vorbehandlung: Die Schnitte wurden in eine Glaskammer gelegt und 2x 5 min. bei RT gründlich in Leitungswasser gewaschen. Danach wurden sie in Citratpuffer 9x 3 min. und 1x 2 min. in der Mikrowelle bei 600 Watt inkubiert. Bei diesem Kochen geht Flüssigkeit verloren, die durch Zugabe von H<sub>2</sub>O deion. immer wieder ausgeglichen werden musste, um ein Austrocknen der Schnitte und damit falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Nach dieser Vorbehandlung und anschließendem Abkühlen wurden die Schnitte für jeweils 5 min. in H<sub>2</sub>O deion. bzw. PBS bei RT gewaschen.
- Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität: Die Schnitte wurden für 12 min. bei RT in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert und danach gründlich in Lei-

tungswasser gewaschen. Anschließend wurde für jeweils 4 min. bei RT in 0,1%igem Triton X-100 bzw. PBS gewaschen.

- Inkubation mit dem Primärantikörper: In einer Feuchtkammer erfolgte die Inkubation für 60 min. bei 37°C mit dem anti-PLK1-Antikörper, der in einer Verdünnung von 1 : 600 eingesetzt wurde. Im Anschluss wurde für 2x 2 min. bei RT in PBS gewaschen.
- Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper: Für die Komplexbildung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper wurde die gebrauchsfertige Lösung auf die Schnitte gegeben und für 30 min. bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde wiederum 2x 2 min. bei RT in PBS gewaschen.
- Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Reagenz: Die Komplexbildung mit der Peroxidase erfolgte durch Inkubation mit dem gebrauchsfertigen Reagenz für 45 min. bei RT. Anschließend wurde für 2x 5 min. mit PBS bei RT gewaschen.
- Farbreaktion: Für die enzymatische Reaktion mit dem Substrat wurde AEC-Gebrauchslösung zugegeben und für 60 min. bei RT inkubiert. Danach wurde für 2 min. mit H<sub>2</sub>O deion. gewaschen.
- Gegenfärbung: Die Färbung der Zellkerne erfolgte auch hier mit Hämatoxylin nach Mayer für eine Minute bei RT, wonach wiederum für 2x 10 min. bei RT mit Leitungswasser gewaschen wurde.
- Eindecken der Schnitte: Auch nach der PLK1-Färbung wurden die Schnitte mit Glyzeringelatine eingedeckt.

#### 4.2.22 Quantitative Auswertung der Autoradiogramme und Gele

Die PLK1-Protein- bzw. -mRNA-Level wurden auf die  $\beta$ -Aktin-Protein- bzw. mRNA-Expression standardisiert, indem alle Filme eingescannt wurden und dann mit Hilfe des Kodak-Fotodokumentationssystems (1D 3.5) die Intensität der Banden (entsprechend der Expression) quantifiziert wurde. Im Anschluss an die Integration der Signale wurde jeweils der Quotient aus der PLK1- und der  $\beta$ -Aktin-Expression gebildet. Die daraus resultierenden  $\beta$ -Aktin-

standardisierten PLK1-Protein- bzw. -mRNA-Level wurden auf jeweils unterschiedliche Kontrollen bezogen: In den Antisense-Untersuchungen waren dies Kontrollzellen, die nur mit dem Medium Opti-MEM I behandelt wurden, und im Xenograft-Experiment wurde die Kontrollgruppe mit PBS behandelt.

In den siRNA-Experimenten waren die Kontrollen die nur mit siRNA4S behandelten Zellen, außer beim konzentrationsabhängigen Nachweis der PLK1-Protein-Reduktion, in diesem Fall waren die Kontrollzellen auch hier die nur mit dem Medium Opti-MEM I behandelten Zellen.

Für die Experimente mit den Expressionsplasmiden war die Situation wieder anders, denn hier waren die Kontrollen für den Nachweis der PLK1-mRNA-Reduktion *in vitro* die unbehandelten Zellen, die nur mit Medium inkubiert worden waren. Im Xenograft-Experiment wurden sowohl die Tumorumfänge als auch die PLK1-mRNA-Expressionen auf die Kontrollgruppe bezogen, die mit dem parentalen Vektor pBS/U6 therapiert wurde. Im Fall der Bestimmung der PLK1-mRNA-Spiegel in den Tumoren der Mäuse nach Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1, pBS/U6/shRNA/PLK1S oder pBS/U6 wurde die PLK1-mRNA-Expression nicht auf die  $\beta$ -Aktin-Expression standardisiert, sondern auf die Ethidiumbromidfärbung der Gele. Hierzu wurden auch die Gele nach der Färbung eingescannt und die Bandenintensitäten für die 18S- und 28S-rRNA bestimmt und beide Werte addiert. Auf diesen Wert wurde anschließend die PLK1-mRNA-Expression standardisiert, indem der Quotient aus PLK1-mRNA und der Summe aus der 18S- und 28S-rRNA gebildet wurde. Die so standardisierten PLK1-mRNA-Mengen wurden wiederum wie auch in den übrigen Experimenten nach der  $\beta$ -Aktin-Standardisierung hier nach der Ethidiumbromid-Standardisierung verglichen mit der standardisierten PLK1-mRNA-Expression in pBS/U6-behandelten Mäusen.

Zur Auswertung der Kinase-Assays wurden Autoradiogramme und Coomassie Brilliant Blue G-250-gefärbte Gele ebenfalls mit dem Fotodokumentationssystem eingescannt und die Signalintensitäten bestimmt. Das Verhältnis der Signalintensitäten des phosphorylierten Substrates und des geladenen Substrates

in den behandelten Zellen wurde berechnet und auf das Verhältnis in den jeweiligen unbehandelten Zellen bezogen.

#### 4.2.23 Statistische Methoden

Alle Versuche wurden drei bis fünf Mal durchgeführt, und aus diesen Werten wurden Mittelwerte gebildet (bei Western- und Northern-Blots nach der Standardisierung auf  $\beta$ -Aktin bzw. auf Ethidiumbromid). Diese Werte wurden jeweils als Prozent der jeweiligen Kontrollen angegeben. Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden die p-Werte und die Standardabweichungen bzw. die 95% Konfidenzintervalle berechnet.

Bei der Erstellung der Wachstumskurven wurden die Zellen je dreimal für jeden Zeitpunkt gezählt, daraus Mittelwerte gebildet und das relative Zellwachstum auf die Zellzahl der unbehandelten Kontrollen nach 96 Stunden als Referenzpunkt bezogen und in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen angegeben.

In den Tierexperimenten wurden die Tumoren jeweils gemessen und mit der in Kapitel 4.2.18 angegebenen Formel das Volumen berechnet. Um auch hier einen Bezugspunkt zu haben, wurden die einzelnen Tumorumfänge auf das Anfangsvolumen des jeweiligen Tumors bezogen, so dass Faktoren erhalten wurden, die mit 100 multipliziert die durchschnittliche Anfangsgröße der Tumoren von 100 mm<sup>3</sup> wiedergeben. Auch hier wurden für die verschiedenen Therapiegruppen Mittelwerte gebildet.

Die statistische Auswertung erfolgte für die Untersuchungen der Auswirkung von ASOs mit dem zweiseitigen gepaarten T-Test, für die siRNA-Experimente bzw. die Expressionsplasmid-Experimente mit der zweiseitigen ANOVA (Analysis of Variance; GraphPad Prism), um zufällige Effekte der einzelnen Gele bzw. Autoradiogramme und der verschiedenen Behandlungen zu vermeiden. Der statistische Vergleich erfolgte gegen verschiedene Kontrollgruppen:

Es wurden alle behandelten Gruppen in den Antisense-Untersuchungen mit der Opti-MEM I-Kontrolle verglichen.

Bei den siRNA-Untersuchungen erfolgte der statistische Vergleich der behandelten Zellen in allen Analysen mit den siRNA4S-behandelten Zellen. Die Ausnahme bildeten hierbei die Wachstumskurven der verschiedenen Zelllinien sowie die konzentrationsabhängige PLK1-Protein-Bestimmung, bei denen der statistische Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen (ohne Oligofectamin und ohne siRNA) erfolgte.

Die mit Plasmiden zur Expression von shRNA behandelten Zellen bzw. Tiere wurden jeweils mit den mit dem parentalen Vektor pBS/U6 behandelten Zellen bzw. Tieren verglichen und die statistische Auswertung auf diese bezogen. Auch hier bildeten die Wachstumskurve und die konzentrationsabhängige PLK1-mRNA-Bestimmung *in vitro* eine Ausnahme, denn bei diesen beiden Versuchen wurden wiederum die unbehandelten Kontrollzellen als Bezugspunkt für den statistischen Vergleich herangezogen.

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurden die mit den Antikörpern angefärbten Zellen auf den Objektträgern ausgezählt und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl auf dem Objektträger ermittelt. Aus diesen Werten wurden im Anschluss Mittelwerte für die P12-behandelten bzw. für die pBS/U6/shRNA/PLK1-behandelten Mäuse gebildet und diese dann mit dem entsprechenden Mittelwert für die mit dem HSV-ASO bzw. mit pBS/U6 behandelten Mäuse verglichen.

Es werden demzufolge für alle Versuche mit den ASOs Mittelwerte, p-Werte und Standardabweichungen aus den T-Test-Analysen angegeben. Für die Versuche mit siRNA oder mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden werden die Mittelwerte, p-Werte und 95% Konfidenzintervalle aus der ANOVA-Auswertung für die statistische Signifikanz angegeben.





## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Antisense-Oligonukleotidbehandlung verschiedener Krebszelllinien und von Xenograft-Mäusen

In verschiedenen Krebszelllinien wurde der Einfluss von Antisense-Oligonukleotiden (ASOs) gegen PLK1 getestet. Dabei wurden Parameter, wie z.B. die PLK1-Expression, der Phänotyp der Zellen, die Zellzyklusverteilung oder der Einfluss auf das Wachstum von Xenograft-Tumoren, analysiert.

#### 5.1.1 Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression nach ASO-Behandlung

Zuerst wurde die Fähigkeit der ASOs untersucht, die Spiegel an endogener PLK1-mRNA zu reduzieren. Dafür wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion geerntet und die Menge an PLK1- und  $\beta$ -Aktin-mRNA im Northern-Blot bestimmt. Die Analyse der  $\beta$ -Aktin-mRNA diente zum einen dazu, die Spezifität der PLK1-Wirkung der ASOs zu zeigen, zum anderen diente  $\beta$ -Aktin, da es zellzyklusunabhängig exprimiert wird, dazu, die PLK1-mRNA-Menge zu standardisieren, um unterschiedliche geladene Mengen auszugleichen.

Als Erstes wurde die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 untersucht und 24 Stunden nach der Transfektion für alle 26 ASOs Northern-Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 21). Zum Vergleich und zur Prüfung der Spezifität wurden zum einen auch unbehandelte Kontrollzellen untersucht, zum anderen wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz DOTAP behandelt und ebenfalls analysiert, und zum Dritten wurden Zellen mit dem HSV-ASO behandelt, um unspezifische ASO-Reaktionen auszuschließen. Zwei der eingesetzten gegen PLK1 gerichteten ASOs (P12 und P13) zeichneten sich durch eine besonders starke Reduktion der PLK1-mRNA, standardisiert gegen  $\beta$ -Aktin, aus. P12 reduzierte die PLK1-mRNA um 73%, P13 reduzierte die PLK1-mRNA um 60% verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Zusätzlich zur Standardisierung gegen  $\beta$ -Aktin wurde in diesem Versuch auch gegen GAPDH standardisiert. Da es aber keine we-

sentlichen Unterschiede in den Ergebnissen gab, wenn die Standardisierung gegen  $\beta$ -Aktin oder GAPDH stattfand, wurde in den folgenden Untersuchungen auf die Standardisierung gegen GAPDH verzichtet.

In Abbildung 21 sind die Autoradiogramme der Hybridisierungen gegen PLK1,  $\beta$ -Aktin und GAPDH dargestellt. Der besseren Übersichtlichkeit halber ist in der graphischen Auswertung der Autoradiogramme nur eines der beiden wirksamsten ASOs, P12, durch einen roten Pfeil hervorgehoben.

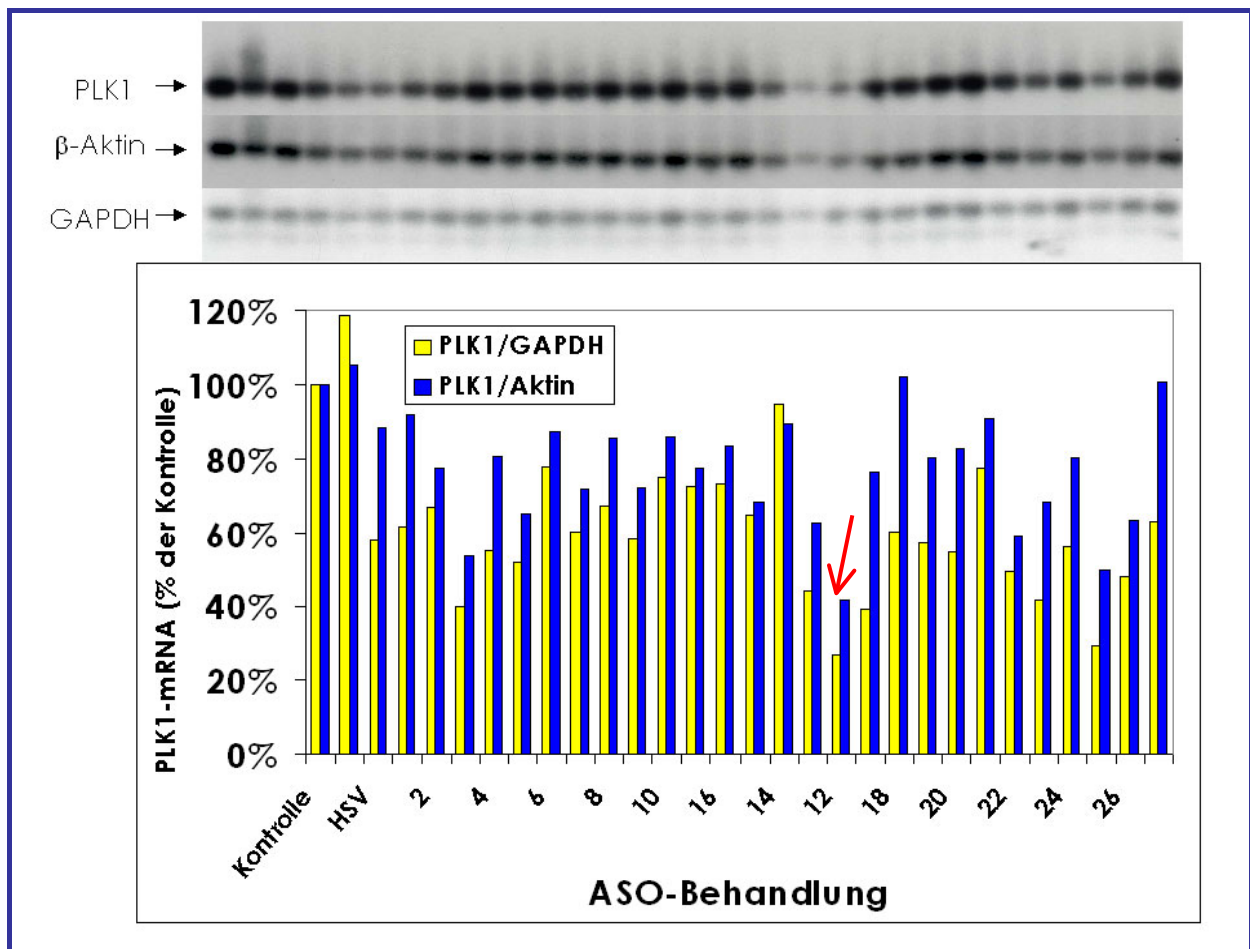


Abbildung 21: Reduktion der PLK1-mRNA in MDA-MB-435-Zellen durch ASOs

Behandelt wurde mit den ASOs (P1 – P26 und dem HSV-ASO) in einer Konzentration von 250 nM. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über jeweils drei unabhängige Experimente.

Die Wirkung der beiden ASOs – P12 und P13 –, die in MDA-MB-435-Zellen die PLK1-Expression am stärksten gehemmt haben, wurde in den weiteren Nor-

thern-Blots an anderen Krebszelllinien getestet und mit der Wirkung der Negativkontrolle, dem ASO gegen HSV, bzw. unbehandelten oder DOTAP-behandelten Zellen verglichen. Auch hierbei erfolgten die Northern-Blots 24 Stunden nach der Transfektion. Dabei konnte für die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa S3 für das ASO P12 ebenfalls eine deutliche Reduktion um 62%, und für das ASO P13 zumindest eine leichte Reduktion der PLK1-mRNA um 30% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen oder den mit dem HSV-ASO behandelten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 22).

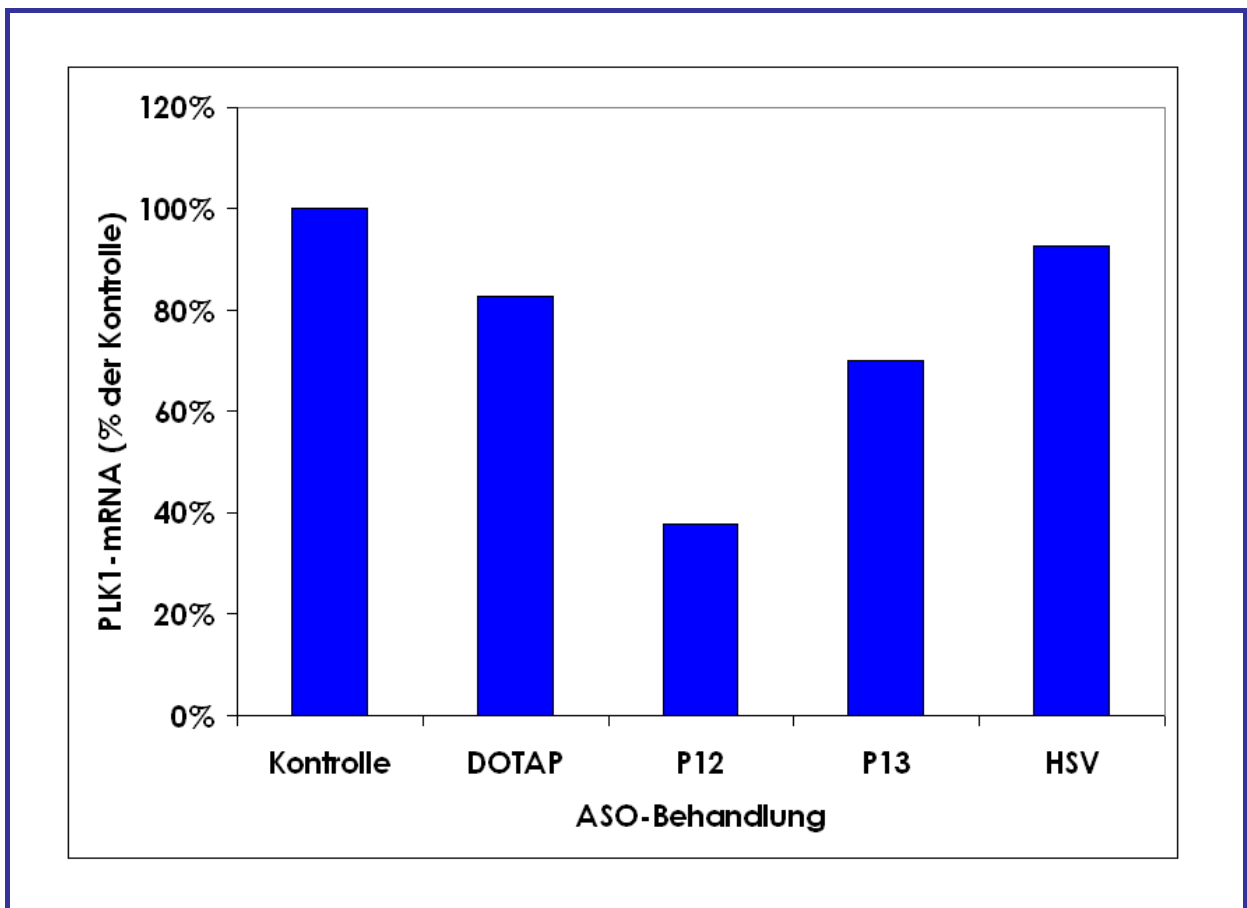


Abbildung 22: **Reduktion der PLK1-mRNA in HeLa S3-Zellen durch ASOs**

Behandelt wurde mit den ASOs (P12, P13 und dem HSV-ASO) in einer Konzentration von 250 nM. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über drei unabhängige Experimente.

Auch bei der Bronchialkarzinom-Zelllinie A549 wurden die beiden ASOs – P12 und P13 – eingesetzt und 24 Stunden nach der Transfektion mit verschiedenen Kontrollzellen verglichen. Hier konnte mit beiden ASOs eine deutliche Reduktion der PLK1-mRNA im Vergleich zu den verschiedenen Kontrollzellen erzielt werden (Abb. 23). P12 reduzierte die PLK1-mRNA um 87%, P13 reduzierte die PLK1-mRNA um 74% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen.

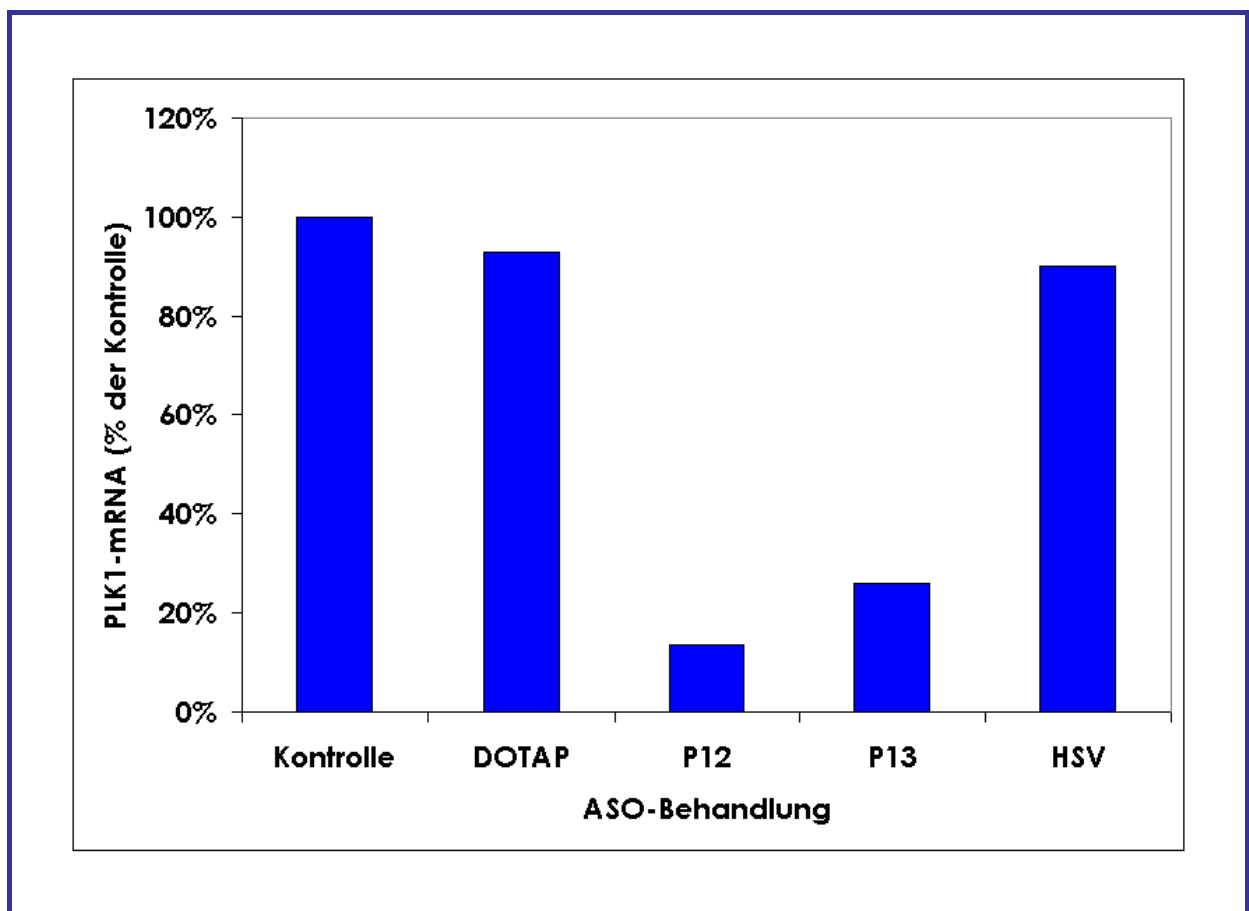


Abbildung 23: Reduktion der PLK1-mRNA in A549-Zellen durch ASOs

Behandelt wurde mit den ASOs (P12, P13 und dem HSV-ASO) in einer Konzentration von 250 nM. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über drei unabhängige Experimente.

### 5.1.2 Bestimmung der PLK1-Proteinmenge nach ASO-Behandlung

Da es bei der Hemmung eines bestimmten Gens nicht alleine darauf ankommt, die mRNA zu reduzieren, sondern auch das Protein, das den Phänotyp der Zellen determiniert, vermindert werden soll, wurde neben dem Nachweis der Reduktion der PLK1-mRNA auch die PLK1-Proteinmenge analysiert. Zu diesem Zweck wurden 48 Stunden nach der Transfektion Western-Blot-Analysen durchgeführt, in denen die PLK1-Proteinmenge auf die jeweilige  $\beta$ -Aktinmenge standardisiert wurde und im Anschluss daran auf die  $\beta$ -Aktin-standardisierte PLK1-Proteinmenge in den unbehandelten Kontrollzellen bezogen wurde. Auch hier wurden zur Kontrolle Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz DOTAP bzw. dem HSV-ASO behandelt wurden, parallel untersucht.

Zuerst wurden wie im Northern-Blot an der Zelllinie MDA-MB-435 alle 26 gegen PLK1 gerichteten ASOs eingesetzt und mit den Kontrollen verglichen. In der folgenden Abbildung 24 sind ein Western-Blot, auf dem allerdings wegen der besseren Übersichtlichkeit nur ein Teil der ASOs dargestellt ist, und die graphische Auswertung für alle ASOs gezeigt. Auch hier wird mit zwei roten Pfeilen auf die beiden wirksamsten ASOs P12 und P13 hingewiesen. Mit diesen konnte eine signifikante Reduktion des PLK1-Proteins erreicht werden: P12 reduzierte das PLK1-Protein um 80% ( $p < 0,001$ ) und P13 um 73% ( $p < 0,001$ ).

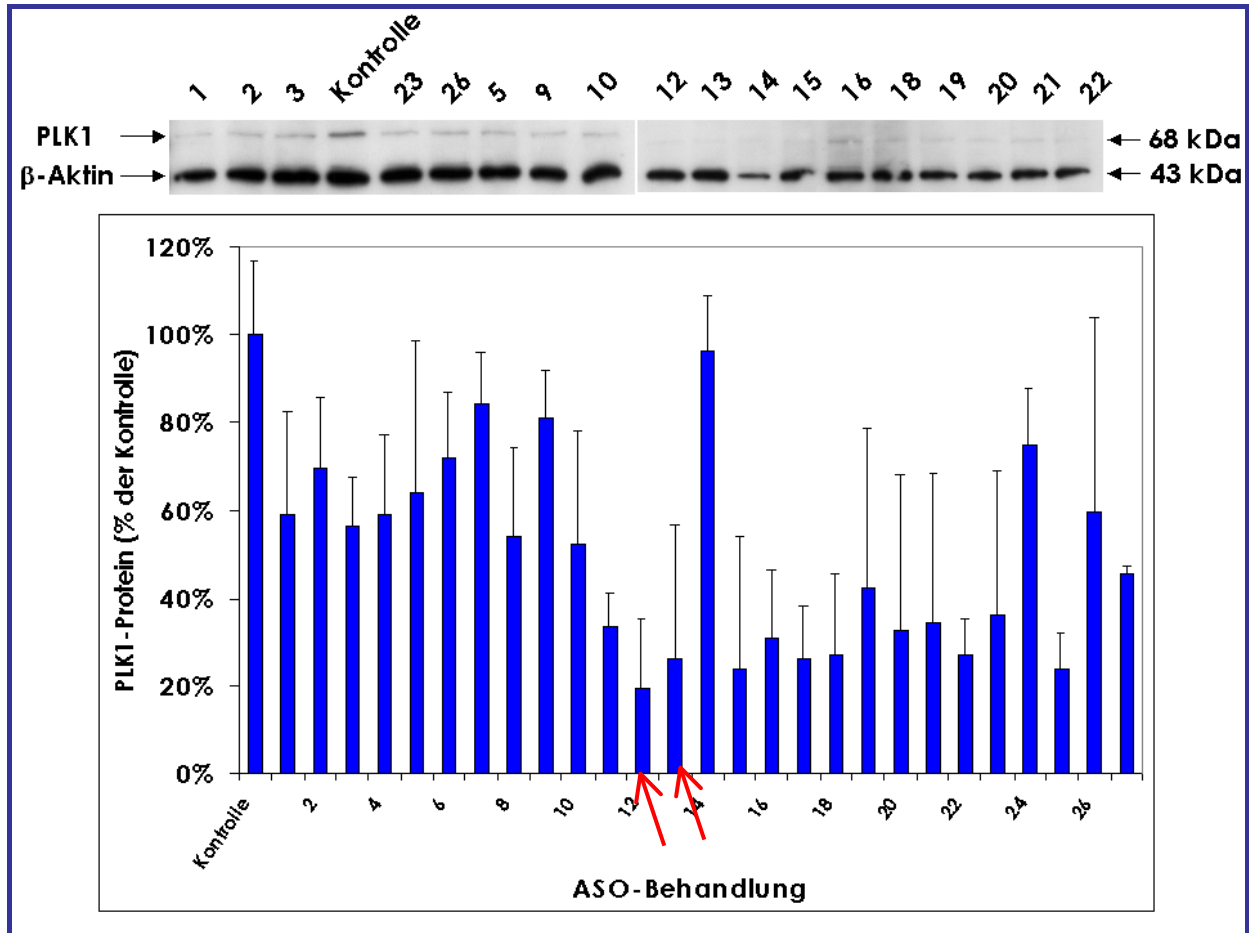


Abbildung 24: Reduktion des PLK1-Proteins in MDA-MB-435-Zellen durch verschiedene ASOs

Behandelt wurde mit den ASOs (P1 – P26 und dem HSV-ASO) in einer Konzentration von 250 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt ist im oberen Teil der Abbildung ein Western-Blot zur Demonstration der Expression von PLK1 und  $\beta$ -Aktin. Im unteren Teil der Abbildung sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die Standardabweichungen dargestellt.

Um einen möglichen Hemmeffekt auch in anderen Zelllinien zu studieren, wurden auch im Western-Blot die beiden anderen Zelllinien untersucht. Hier konnte in HeLa S3-Zellen mit P12 eine signifikante Reduktion um 87% ( $p < 0,05$ ) und mit P13 um 47% ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden. DOTAP und das Kontroll-ASO gegen HSV hatten keinen Einfluss auf die Menge des PLK1-Proteins (Abb. 25).

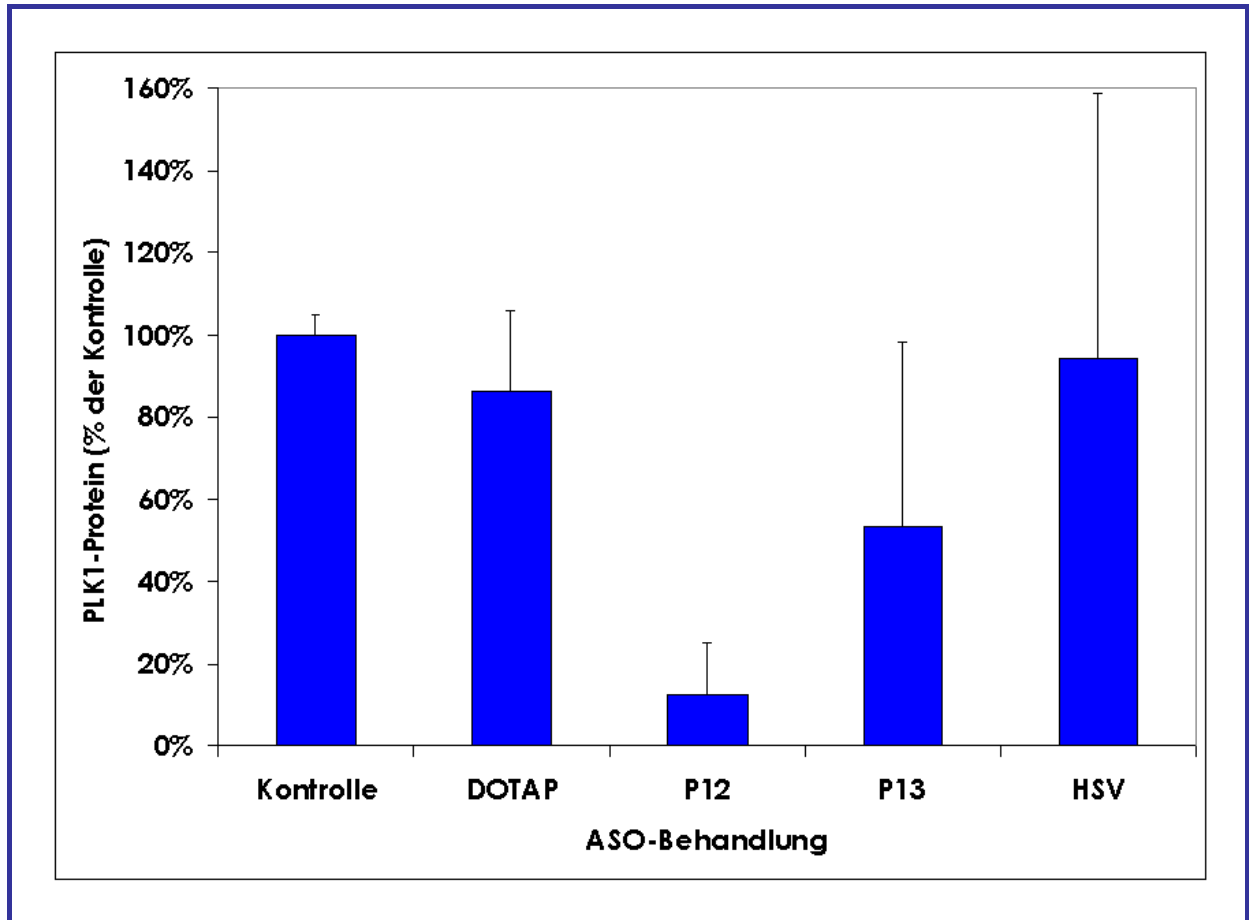


Abbildung 25: **Reduktion des PLK1-Proteins in HeLa S3-Zellen durch ASOs**

Behandelt wurde mit den ASOs (P12, P13 und dem HSV-ASO) in einer Konzentration von 250 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die Standardabweichungen.

In A549-Zellen war die PLK1-Protein-Reduktion durch P12 und P13 ebenfalls signifikant, hier konnte P12 das PLK1-Protein um 74% reduzieren ( $p < 0,05$ ) und P13 konnte es um 61% reduzieren ( $p < 0,05$ ). Auch bei dieser Zelllinie übten DOTAP bzw. das HSV-ASO keinen Effekt auf die Menge des PLK1-Proteins aus. Dies ist in der folgenden Abbildung 26 graphisch dargestellt.

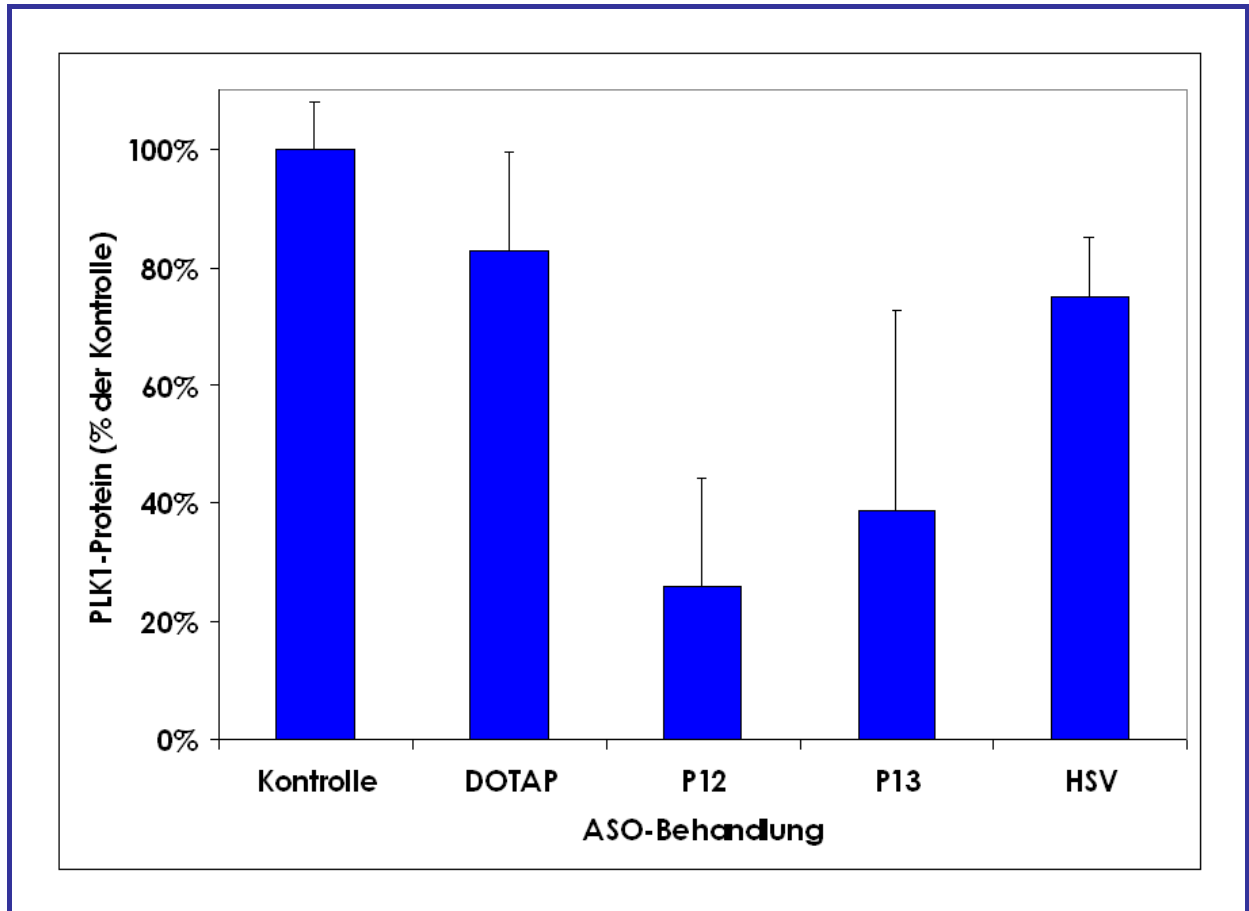


Abbildung 26: Reduktion des PLK1-Proteins in A549-Zellen durch ASOs

Behandelt wurde mit den ASOs (P12, P13 und dem HSV-ASO) in einer Konzentration von 250 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die Standardabweichungen.

Um die Spezifität der ASOs zu untermauern, sollte untersucht werden, ob ihre Wirkung konzentrationsabhängig ist. Außerdem wurde überprüft, ob die Wirkung auf die Proteinmenge proportional zu der Reduktion der PLK1-mRNA-Expression ist. Zu diesem Zweck wurden P12 und das HSV-ASO an zwei der untersuchten Zelllinien in aufsteigenden Konzentrationen eingesetzt. In MDA-MB-435- und HeLa S3-Zellen zeigte P12 eine konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von 50 – 75 nM. Auch in diesen Experimenten hatte das Kontroll-ASO gegen HSV keine signifikante Hemmwirkung auf die Proteinexpression. In der folgenden Abbil-



Abbildung 27 zeigt die konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins durch P12 im Vergleich zu HSV an der Zelllinie MDA-MB-435 dargestellt.

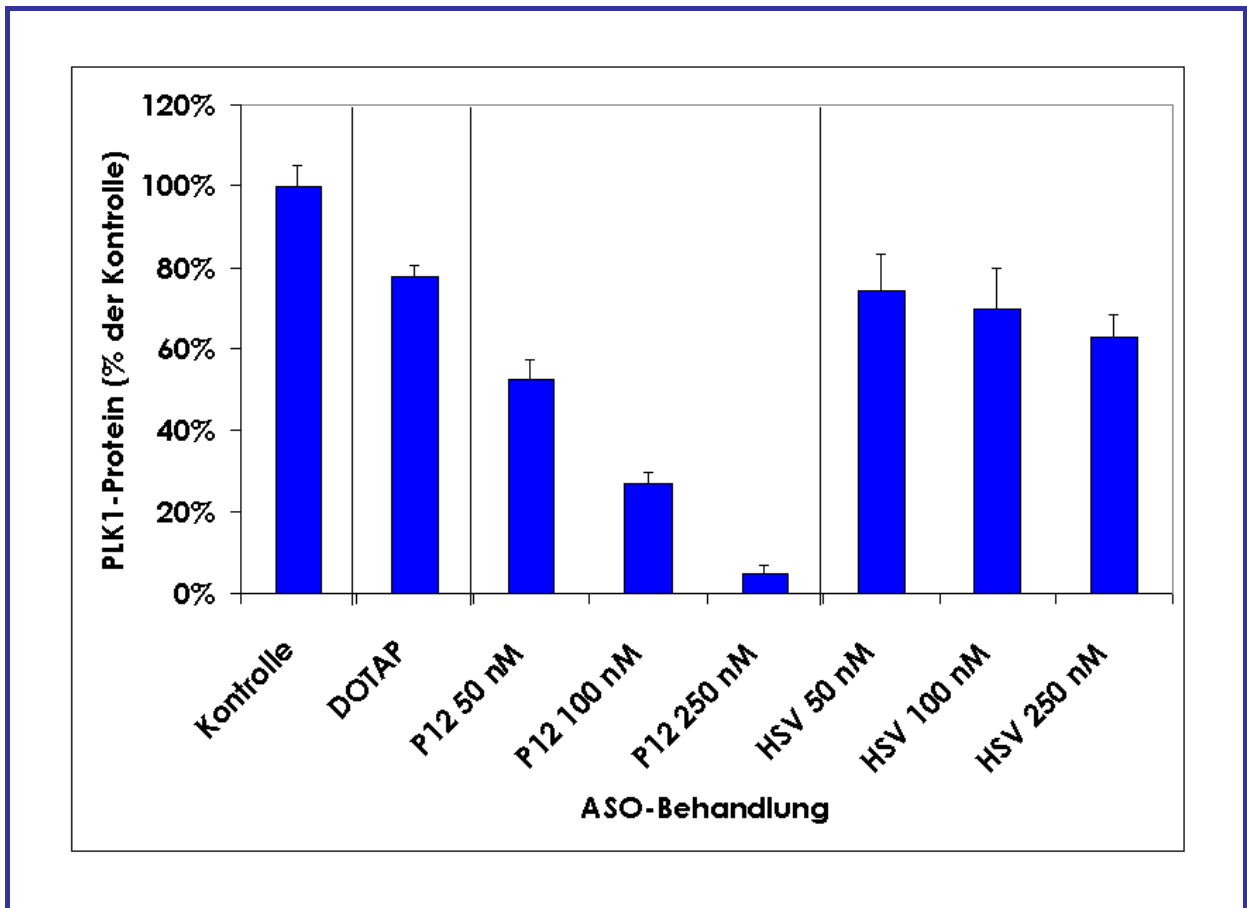


Abbildung 27: Konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins in MDA-MB-435-Zellen durch P12

Behandelt wurde mit den ASOs (P12 und dem HSV-ASO) in Konzentrationen von 50 – 250 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die Standardabweichungen.

Darüber hinaus wurde die Expression von anderen zellulären Protein wie  $\beta$ -Aktin oder MAP-Kinase (p38) an dieser Zelllinie untersucht. Diese blieb durch die Transfektion mit den PLK1-ASOs ebenfalls unbeeinflusst. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Effekte, die durch die Behandlung mit P12 und P13 hervorgerufen werden, auf einer sequenzspezifischen Wirkung der ASOs gegen PLK1 beruhen.

Das konnte auch durch die konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins in HeLa S3-Zellen durch P12 bestätigt werden (Abb. 28).

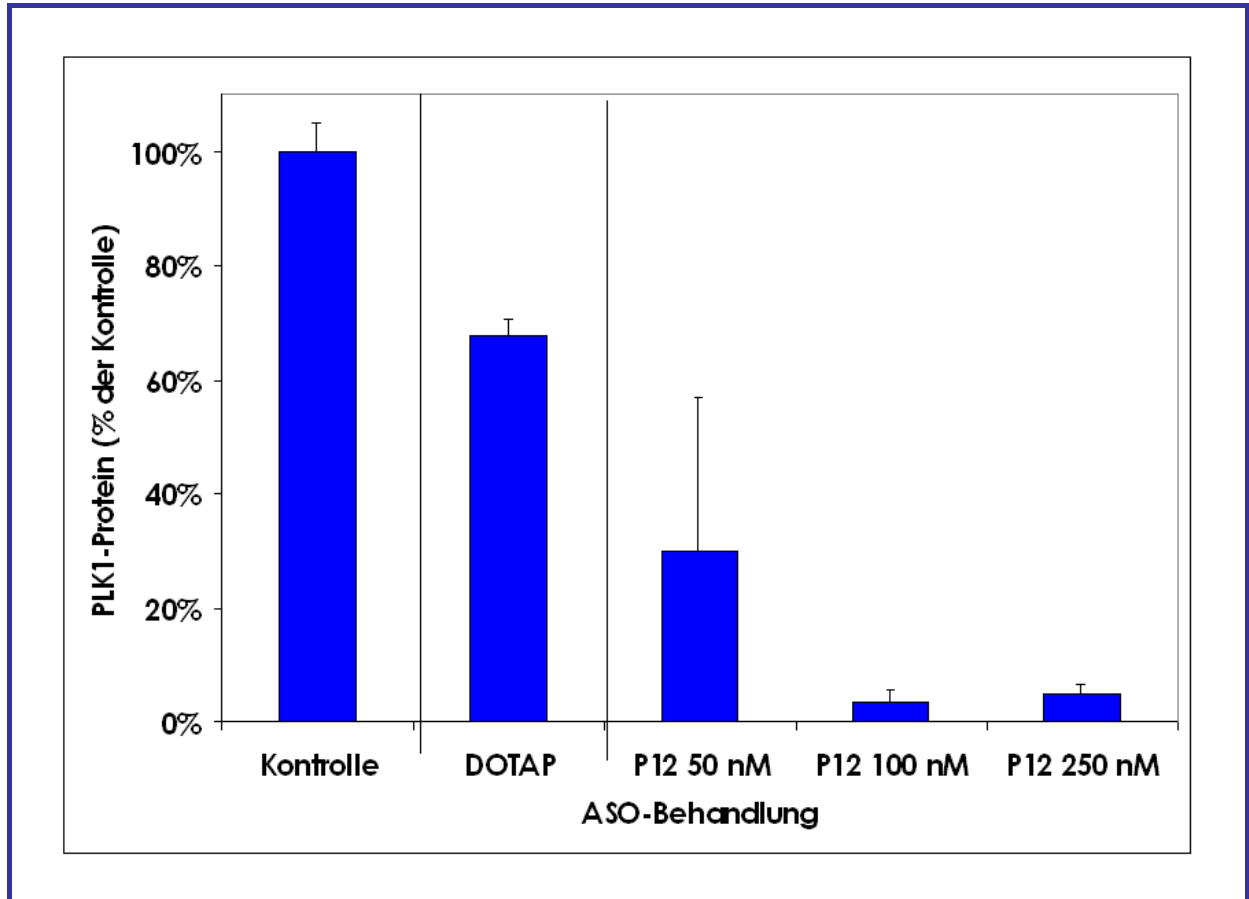


Abbildung 28: **Konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins in HeLa S3-Zellen durch P12**

Behandelt wurde mit dem ASO P12 in Konzentrationen von 50 – 250 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die Standardabweichungen.

Aus all diesen Beobachtungen über die PLK1-mRNA- und –Protein-Reduktion kann gefolgert werden, dass es sich bei der PLK1-Reduktion durch ASOs um eine spezifische Reaktion handelt. Unter dieser Voraussetzung schlossen sich die weiteren Analysen der Auswirkungen der PLK1-Hemmung durch ASOs an.

### 5.1.3 Untersuchung der Kinaseaktivität von endogenem PLK1

Um zu klären, ob die reduzierten PLK1-Protein-Spiegel mit einer reduzierten PLK1-Kinaseaktivität korrelieren, wurde immunpräzipitiertes endogenes PLK1 dem Kinaseassay unterworfen. Hierfür wurden HeLa S3-Zellen mit Opti-MEM I alleine, mit P12 bzw. dem HSV-ASO behandelt und 48 Stunden nach der Transfektion auf Unterschiede in ihrer Kinaseaktivität analysiert.

Durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue G-250 konnte bestätigt werden, dass gleiche Mengen des Substrates Kasein eingesetzt worden waren. Im Western-Blot der Immunpräzipitate, bei dem die PLK1-Proteinmenge in den Immunpräzipitaten nachgewiesen wurde, konnte zudem gezeigt werden, dass auch gleiche Mengen an PLK1 aus der Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Um vergleichbare standardisierte Kinaseaktivitäten zu erhalten, wurde die Phosphorylierung von Kasein (gemessen als Bandenintensität) auf die eingesetzte Kaseinmenge (ebenfalls als Bandenintensität des Coomassie-gefärbten Gels) standardisiert. Im Prä-Immunpräzipitat zur Negativkontrolle, um unspezifische Phosphorylierungen auszuschließen, konnte keine Kinaseaktivität nachgewiesen werden.

Die Kinaseaktivität von PLK1, gemessen als die Phosphorylierung von exogenem Kasein, konnte durch die P12-Behandlung um 50% gegenüber der Kinaseaktivität in Kontrollzellen reduziert werden (Abb. 29). Die Transfektion der HeLa S3-Zellen mit dem HSV-ASO führte nicht zu einer reduzierten PLK1-Kinaseaktivität, was aber auch nicht zu erwarten war, denn auch das PLK1-Protein wurde durch das HSV-ASO nicht gemindert.

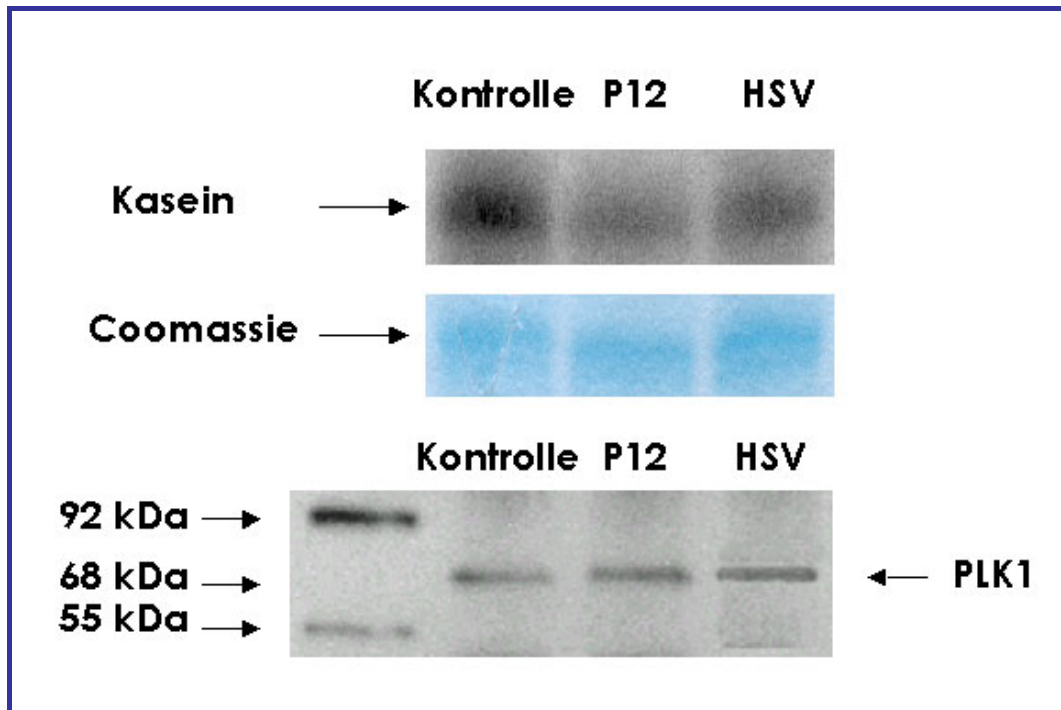


Abbildung 29: Kinaseassay mit PLK1 aus HeLa S3-Zellen nach ASO-Behandlung

Das Autoradiogramm zeigt die Phosphorylierung des Substrats Kasein durch endogenes PLK1 aus HeLa S3-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit P12 bzw. dem HSV-ASO im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Außerdem ist die Coomassie-Brilliant Blue G-250-Färbung desselben Gels dargestellt sowie der Western-Blot der Immunpräzipitate.

#### 5.1.4 Antiproliferativer Effekt der ASO-Behandlung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ASOs die PLK1-mRNA- und -Protein-Expression signifikant reduzieren können und damit eine Reduktion der Kinaseaktivität einhergeht, wurde der Einfluss dieser PLK1-Reduktion auf die Proliferation der untersuchten Krebszelllinien analysiert.

Zu diesem Zweck wurden MDA-MB-435-Zellen mit P12, P13 bzw. dem HSV-ASO in einer Konzentration von 250 nM behandelt. Das Proliferationsverhalten von  $5 \times 10^5$  Zellen wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden untersucht. Mit dem Transfektionsreagenz DOTAP alleine wurde nur eine geringe Reduktion der Proliferation erzielt, auch das HSV-ASO hatte einen dem Effekt von DOTAP ver-

gleichbaren Effekt auf die Proliferation von MDA-MB-435-Zellen. P12 und P13 hingegen zeigten einen signifikanten antiproliferativen Effekt ( $p < 0,05$ ). Die Reduktion betrug für P12 98% und für P13 93% gegenüber DOTAP-behandelten Zellen. 24 weitere PLK1-spezifische ASOs reduzierten die Proliferation von MDA-MB-435-Zellen in dem Ausmaß, das etwa ihrem Potenzial entsprach, die PLK1-mRNA bzw. das PLK1-Protein zu mindern (vgl. Kapitel 5.1.1 und 5.1.2).

In Abbildung 30 ist die Wirkung von P12 und P13 auf die Proliferation von MDA-MB-435-Zellen im Vergleich zu verschiedenen Kontrollzellen dargestellt.

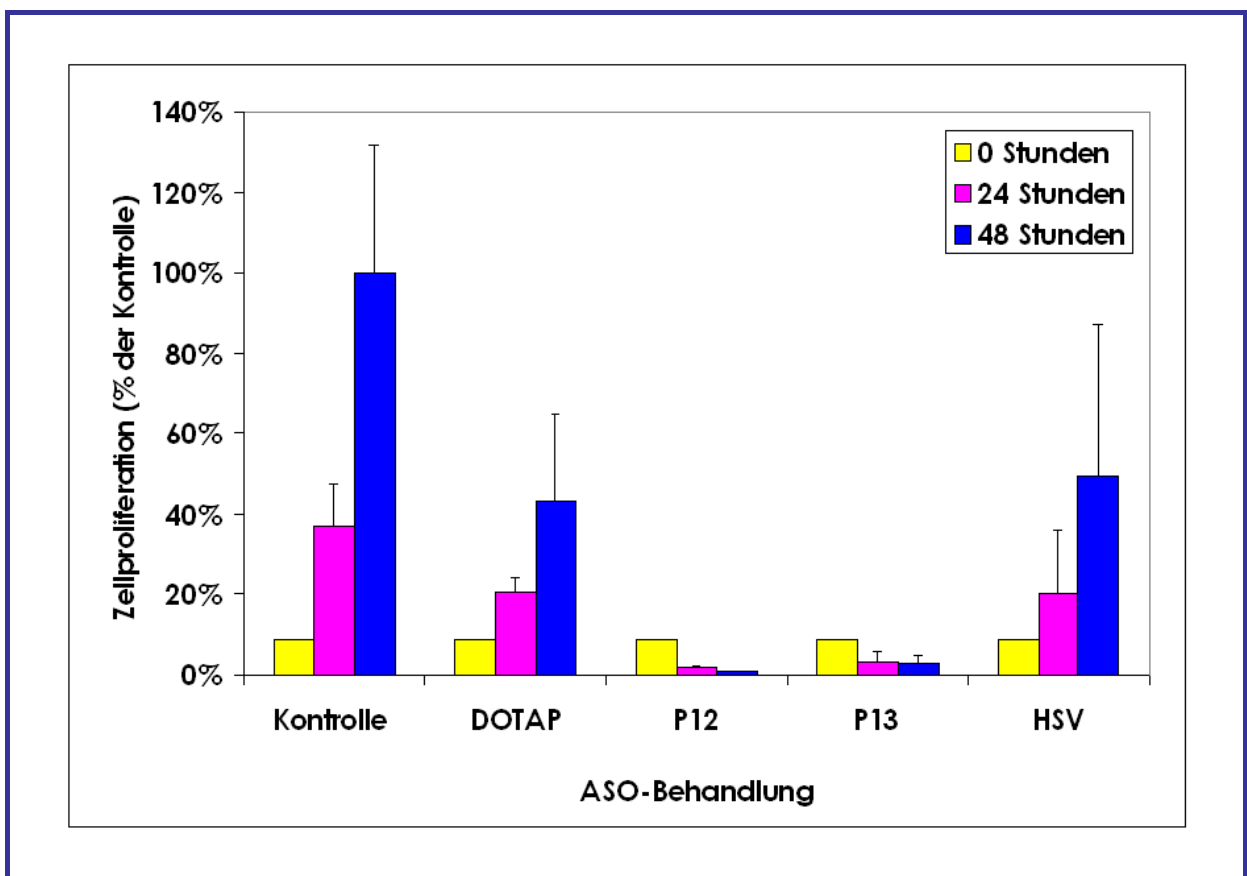


Abbildung 30: **Antiproliferative Wirkung von ASOs auf MDA-MB-435-Zellen**

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit P12, P13 und dem HSV-ASO (250 nM) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der DOTAP-Kontrolle und die jeweiligen Standardabweichungen.

Der nächste Schritt bestand darin, zu prüfen, ob die an MDA-MB-435-Zellen beobachtete antiproliferative Wirkung der ASOs einzigartig für diesen Zelltyp

war oder ob vergleichbare Effekte auch in den anderen untersuchten Zelllinien (HeLa S3- und A549-Zellen) erzielt werden können. Dazu wurde die Proliferation von  $5 \times 10^5$  Zellen über einen Zeitraum von jeweils 72 Stunden bestimmt.

P12 und P13 waren auch in HeLa S3-Zellen und in A549-Zellen in der Lage, die Proliferation signifikant im Vergleich zu DOTAP-behandelten Zellen zu hemmen. Hierbei konnte in HeLa S3-Zellen nach 72 Stunden für P12 eine Reduktion von 92% und für P13 eine Reduktion von 81% beobachtet werden, für beide war  $p < 0,001$ . Bei A549-Zellen führte P12 zu einer Reduktion um 64% und P13 zu einer Reduktion um 54%, hier war  $p < 0,05$  für P12 und P13. Diese Werte sind in Abbildung 31 für HeLa S3-Zellen und in Abbildung 32 für A549-Zellen dargestellt. In diesen beiden Zelllinien zeigte das HSV-ASO einen leichten transienten zytotoxischen Effekt, der bei ASOs durch höhere Konzentrationen hervorgerufen wird. Die Zellen wurden aber nur in ihrer Proliferation gebremst und wuchsen weiter. Es kam nicht zu einer Reduktion der Zellzahlen.

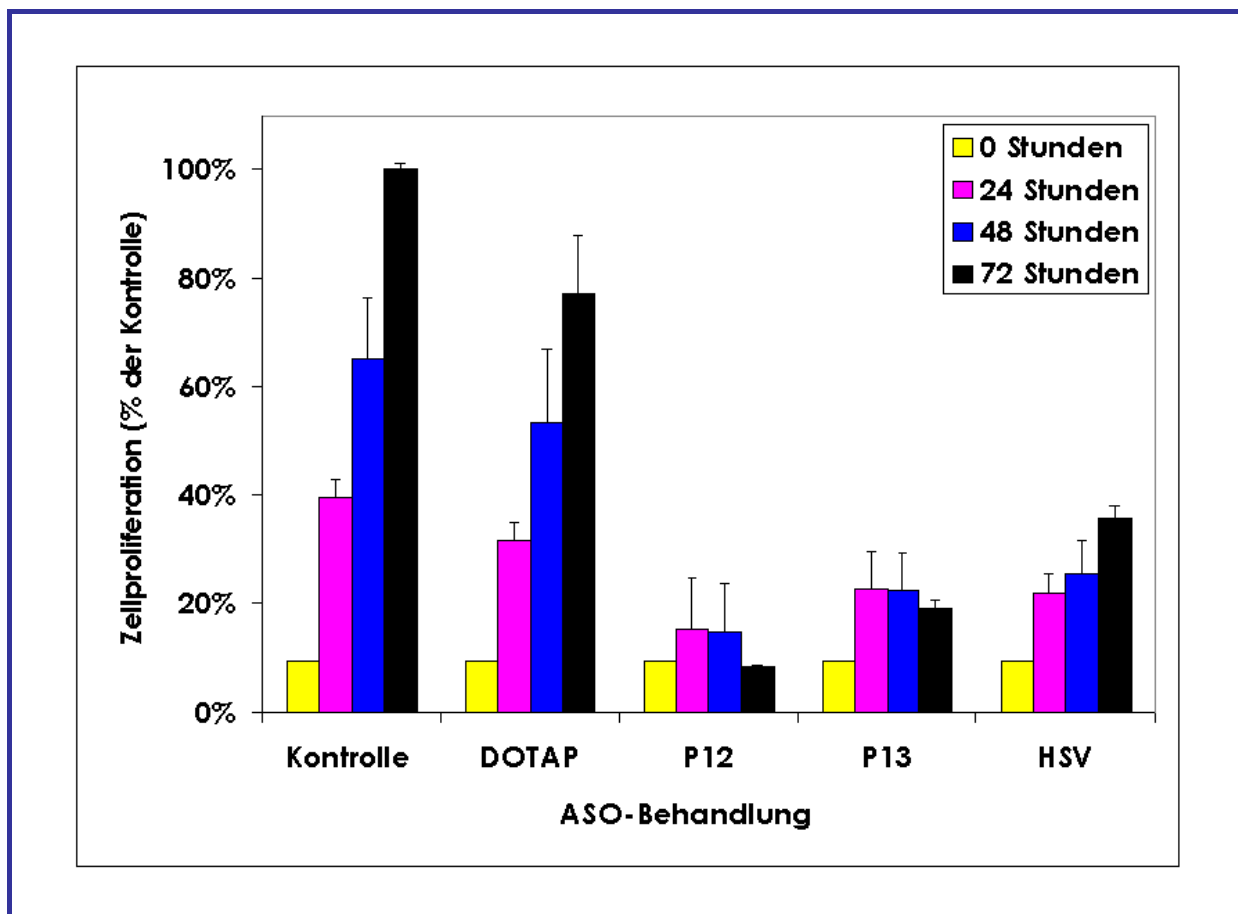


Abbildung 31: Antiproliferative Wirkung von ASOs auf HeLa S3-Zellen

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mit P12, P13 und dem HSV-ASO (250 nM) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der DOTAP-Kontrolle und die jeweiligen Standardabweichungen.

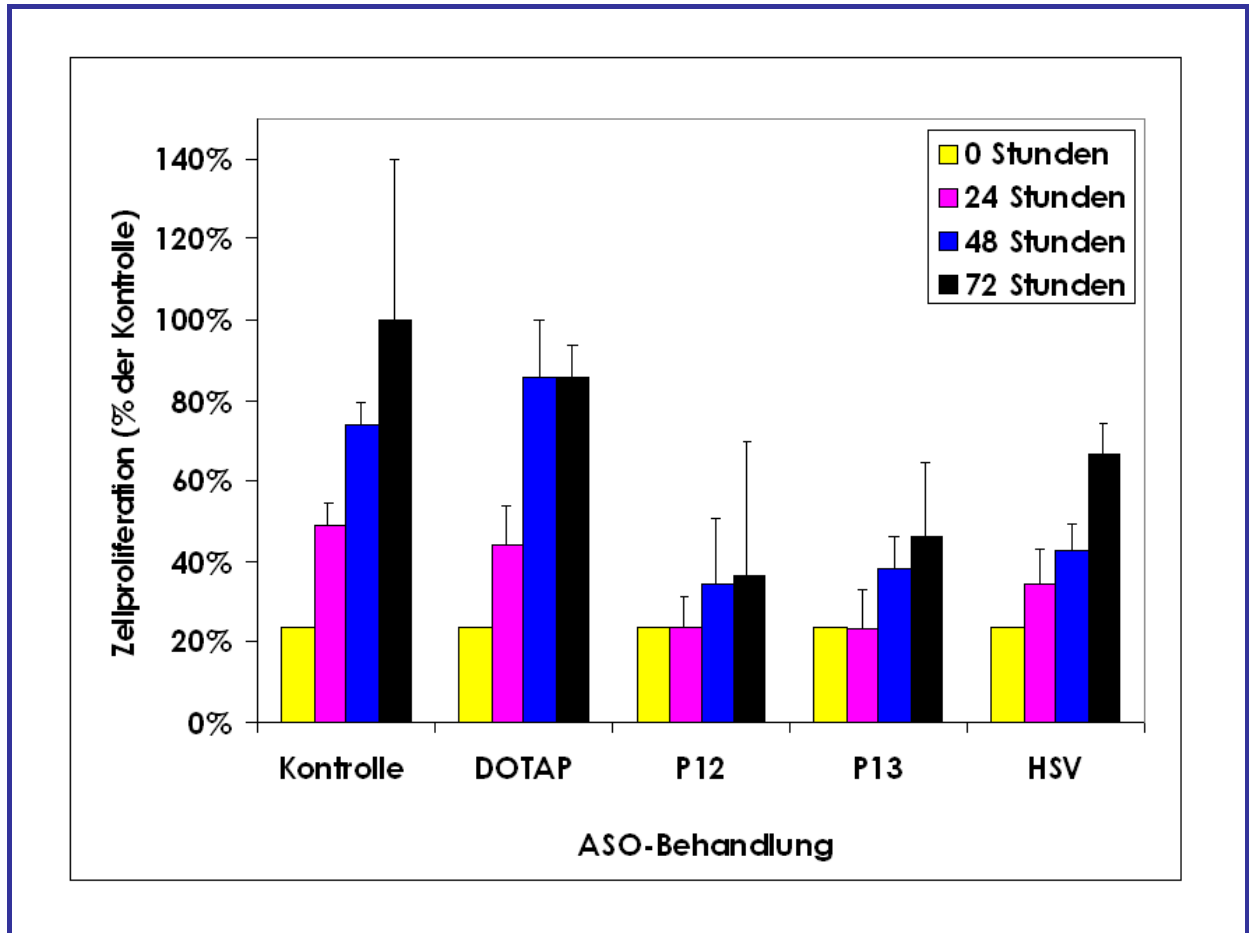


Abbildung 32: Antiproliferative Wirkung von ASOs auf A549-Zellen

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mit P12, P13 und dem HSV-ASO (250 nM) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der DOTAP-Kontrolle und die jeweiligen Standardabweichungen.

Es wurden noch weitere Untersuchungen durchgeführt, die dem Nachweis der Spezifität der PLK1-ASO-Wirkung dienen. Und zwar wurde die konzentrationsabhängige Wirkung der PLK1-ASOs auf die Proliferation gemessen und mit der Wirkung verschiedener Konzentrationen des HSV-ASOs verglichen. Zu diesem Zweck wurden bei MDA-MB-435-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden die Zellzahlen bestimmt, nachdem mit 50 nM, 100 nM und 250 nM P12 bzw. dem HSV-ASO transfiziert wurde. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferation um 80% durch 250 nM P12 in MDA-MB-435-Zellen innerhalb von 24 Stunden ( $p < 0,01$ ). Die maximale Reduktion der Zellzahl konnte mit einer Konzentration von 250 nM erreicht werden (Abb. 33). Das HSV-ASO bewirkte in diesen



Experimenten in keiner der eingesetzten Konzentrationen (50 – 250 nM) eine signifikante Hemmung der Proliferation. Es konnte nur eine leichte Hemmung in einer Konzentration von 250 nM im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden, die wiederum auf die zytotoxischen Effekte zurückzuführen sind, die bei höheren ASO-Konzentrationen auftreten.

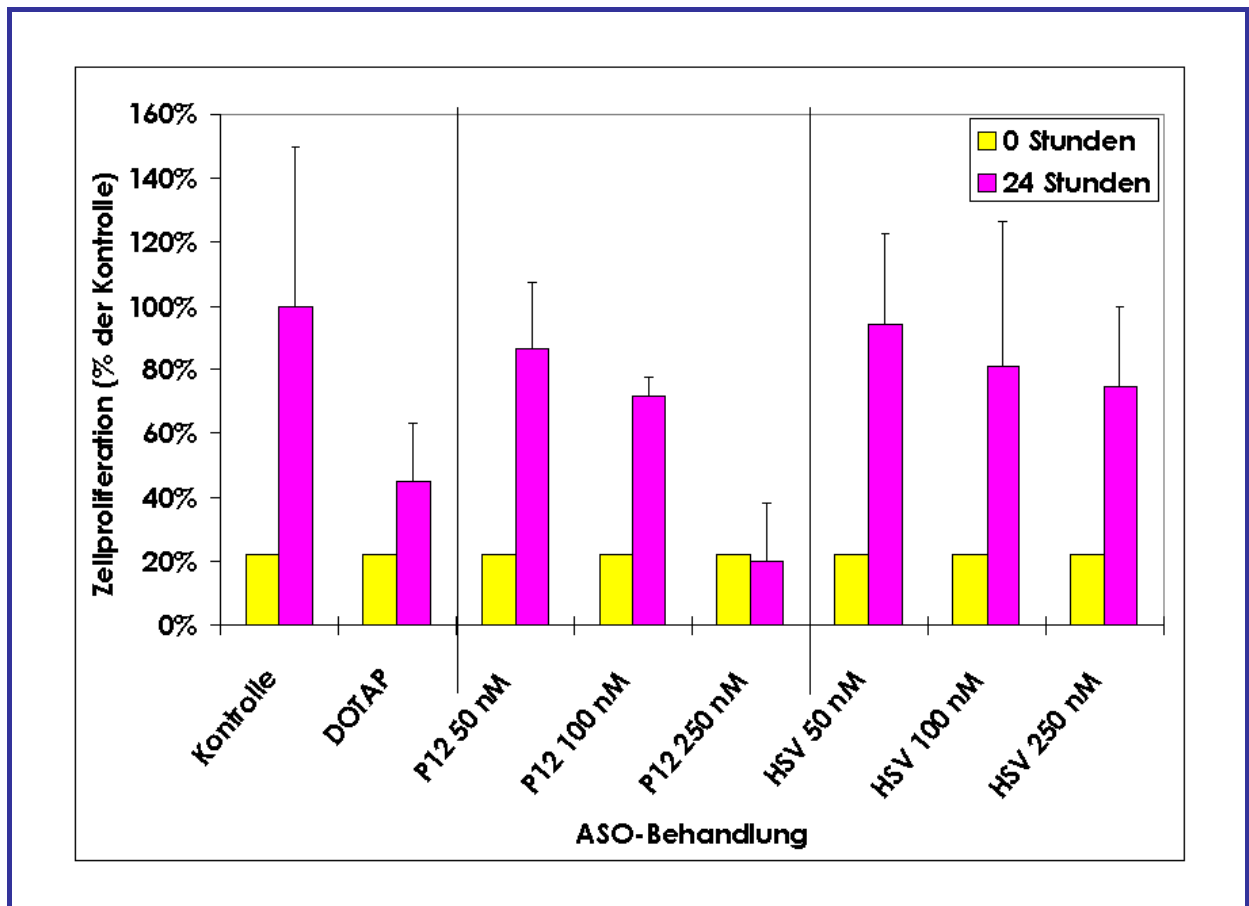


Abbildung 33: Konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung von P12 auf MDA-MB-435-Zellen im Vergleich zum HSV-ASO

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24 Stunden nach der Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (50 – 250 nM) P12 und dem HSV-ASO im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der DOTAP-Kontrolle und die jeweiligen Standardabweichungen.

In HeLa S3-Zellen wurde ebenfalls mit P12 und dem HSV-ASO in aufsteigenden Konzentrationen (50 – 250 nM) über 48 Stunden die Proliferation gemessen. In dieser Zelllinie konnte nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion der Zellzahl

durch 250 nM P12 um 95% festgestellt werden ( $p < 0,001$ ). Die maximale Reduktion konnte auch in dieser Zelllinie erst mit 250 nM erreicht werden (Abb. 34). Auch in diesen Experimenten blieb das HSV-ASO in allen untersuchten Konzentrationen ohne signifikante Hemmwirkung auf die Proliferation.

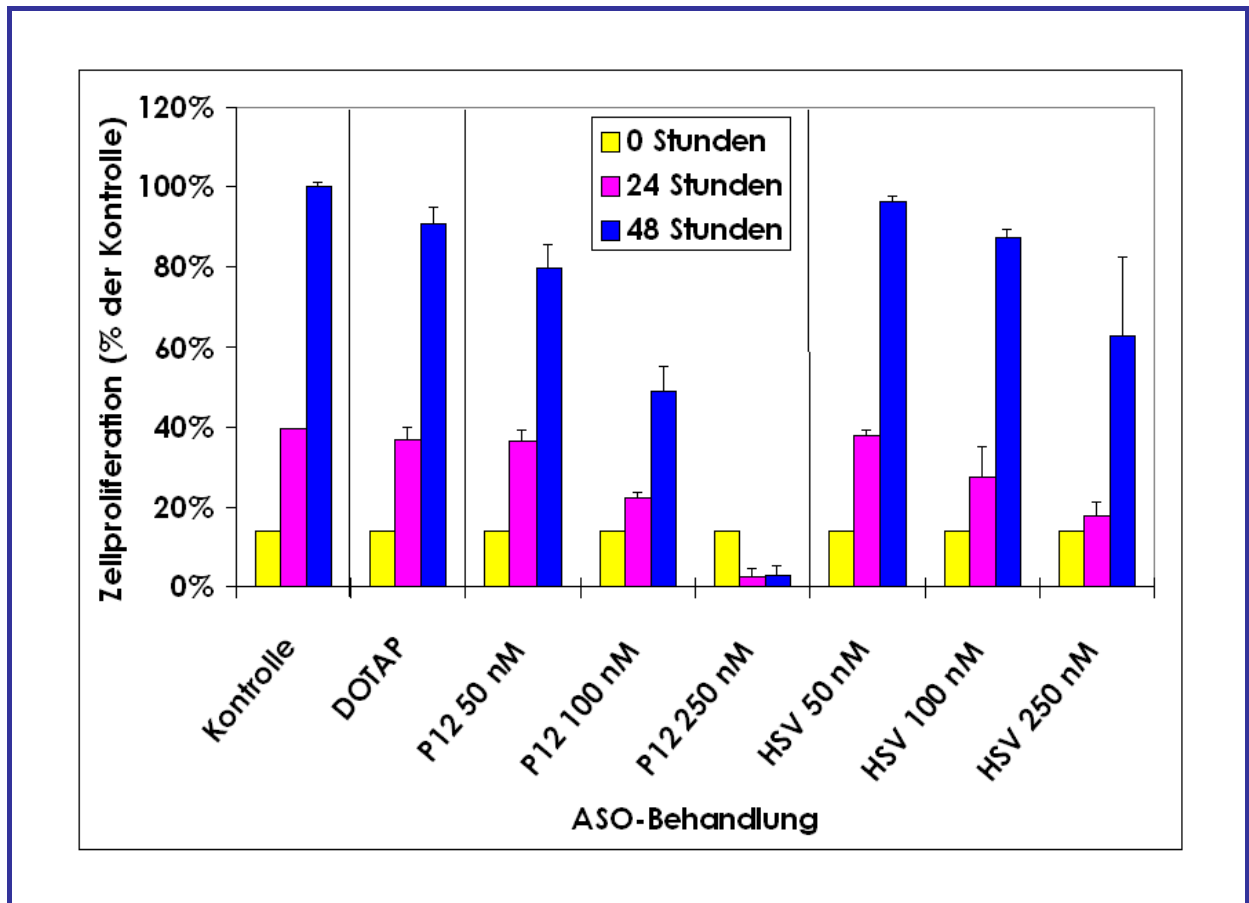


Abbildung 34: Konzentrationsabhängige antiproliferative Wirkung von P12 auf HeLa S3-Zellen im Vergleich zum HSV-ASO

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (50 – 250 nM) P12 und dem HSV-ASO im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der DOTAP-Kontrolle und die jeweiligen Standardabweichungen.

Im Western-Blot lag bei HeLa S3-Zellen die für die maximale Reduktion des PLK1-Proteins nötige Konzentration nur bei 100 nM, für die maximale Hemmung der Proliferation waren 250 nM nötig. Bei den MDA-MB-435-Zellen hingegen decken sich die Beobachtungen aus den Experimenten zur konzentrationsab-

hängigen Reduktion des PLK1-Proteins und der Proliferation, denn es waren sowohl für die maximale Reduktion des PLK1-Proteins als auch für die maximale Hemmung der Proliferation 250 nM nötig. Vergleiche hierzu die Abbildungen 27 und 28 aus Kapitel 5.1.2 mit den Abbildungen 33 und 34 aus dem aktuellen Kapitel. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse bei der konzentrationsabhängigen Hemmung der Proliferation teilweise in der P12-Konzentration, die für die jeweilige maximale Reduktion des PLK1-Proteins bzw. der Proliferation erforderlich war, von den Western-Blot-Ergebnissen zur Analyse der konzentrationsabhängigen Reduktion des PLK1-Proteins in den beiden Zelllinien MDA-MB-435 bzw. HeLa S3.

#### **5.1.5 Durchflusszytometrie (FACScan-Analyse) zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach ASO-Behandlung**

Mittels FACScan-Analyse wurde untersucht, ob der beobachtete Zelltod mit einer Anreicherung der transfizierten Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase bzw. an einem der Kontrollpunkte, z.B. an der G<sub>2</sub>/M-Transition, einhergeht. Der Zusammenhang zwischen einer Anreicherung der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase und anschließender Apoptose konnte z.B. schon von Nishii *et al.* gezeigt werden (Nishii K. *et al.* 1996).

Dazu wurden die 24 Stunden zuvor mit P12, P13 bzw. dem HSV-ASO transfizierten Zellen geerntet und mit Propidiumiodid angefärbt, um eine Fluoreszenz messen zu können, die dem DNA-Gehalt der Zellen proportional ist.

In allen drei Zelllinien konnte nach PLK1-ASO-Behandlung (P12 und P13) ein schwacher Anstieg des Anteils von Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase um 20 – 30% im Vergleich zu den Zellen der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem HSV-ASO oder mit dem Transfektionsreagenz DOTAP hatte in allen drei Zelllinien keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. Die einzelnen Werte sind in der folgenden Tabelle 5 dargestellt. Die Werte für P12 und P13 sind jeweils farbig hervorgehoben.

|                          | G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> -Phase | G <sub>2</sub> /M-Phase | S-Phase |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------|
| <b><u>MDA-MB-435</u></b> |                                       |                         |         |
| Kontrolle                | 47%                                   | 8,5%                    | 44,5%   |
| DOTAP                    | 49%                                   | 7,7%                    | 43,3%   |
| P12                      | 41,9%                                 | <b>10%</b>              | 48,1%   |
| P13                      | 40,8%                                 | <b>12%</b>              | 47,2%   |
| HSV-ASO                  | 50,5%                                 | 8,1%                    | 41,4%   |
| <b><u>HeLa S3</u></b>    |                                       |                         |         |
| Kontrolle                | 46%                                   | 9%                      | 45%     |
| DOTAP                    | 48%                                   | 8,8%                    | 43,2%   |
| P12                      | 41,3%                                 | <b>11,8%</b>            | 46,9%   |
| P13                      | 43,2%                                 | <b>11,3%</b>            | 45,5%   |
| HSV-ASO                  | 47%                                   | 8,5%                    | 44,5%   |
| <b><u>A549</u></b>       |                                       |                         |         |
| Kontrolle                | 52,1%                                 | 5,5%                    | 42,4%   |
| DOTAP                    | 47,6%                                 | 5,6%                    | 46,8%   |
| P12                      | 43,9%                                 | <b>7,1%</b>             | 49%     |
| P13                      | 48,7%                                 | <b>6,8%</b>             | 44,5%   |
| HSV-ASO                  | 49,2%                                 | 5,9%                    | 44,9%   |

Tabelle 5: Zellzyklus-Verteilung in MDA-MB-435-, HeLa S3- und A549-Zellen

Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Zellen (Kontrolle, DOTAP-behandelt, P12-, P13- und HSV-transfiziert) in der jeweiligen Zellzyklusphase in Prozent der Gesamtzellzahl (30.000) 24 Stunden nach der Transfektion. Die jeweilige ASO-Konzentration betrug 250 nM. Farblich hervorgehoben sind die erhöhten Werte für die G<sub>2</sub>/M-Phase bei den P12- und P13-behandelten Zellen.

### 5.1.6 Immunfluoreszenzuntersuchung zur Detektion phänotypischer Veränderungen in ASO-behandelten Zellen

Es wurde dann mit Hilfe einer Immunfluoreszenzanalyse untersucht, ob die PLK1-ASO-Behandlung auch Veränderungen des Phänotyps der Zellen verursacht. Dazu wurden 48 Stunden nach der Transfektion  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tubulin angefärbt, um einerseits durch  $\alpha$ -Tubulin den Spindelfaserapparat/die Mikrotubuli und andererseits durch  $\gamma$ -Tubulin die Zentrosomen sichtbar zu machen. Dass die Mikrotubulibildung und Zentrosomenseparation intaktes PLK1 erfordern, konnte bereits im Jahre 1996 von Lane und Nigg (Lane H.A. et. al. 1996) gezeigt werden. In der genannten Studie zeigten sich nach Mikroinjektion von PLK1-Antikörpern monoastrale Mikrotubuli und nicht-getrennte Chromosomen zu Beginn der Mitose, was auf ein Fehlen von PLK1 zurückgeführt wurde.

In der vorliegenden Arbeit zeigten A549-Zellen, die mit dem HSV-ASO (250 nM) behandelt wurden, einen normalen Phänotyp. Sie konnten normale Zentrosomen ausbilden und die Mitose vollenden. Die mit P12 (250 nM) behandelten Zellen rundeten sich ab und verloren die Adhäsion zu den Zellkulturgefäßen. Sie waren nicht mehr in der Lage, die Mitose zu beenden, sondern zeigten häufig ungetrennte Chromosomen bzw. multiple Zentrosomen. Diese beiden Phänotypen werden in Abbildung 35 anhand der  $\gamma$ -Tubulin-Färbung dargestellt.

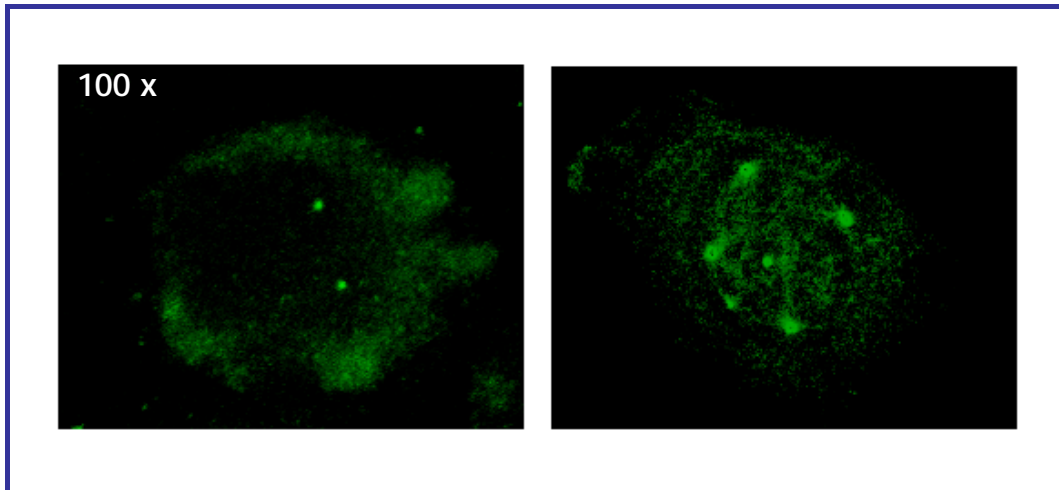


Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung von A549-Zellen [grün:  $\gamma$ -Tubulin]

Es sind zwei Zellen mit typischer Morphologie 24 Stunden nach der Transfektion mit 250 nM P12 zu sehen, deren Zentrosomen durch eine  $\gamma$ -Tubulin-Färbung sichtbar gemacht wurden.

### 5.1.7 Xenograft-Experimente

Nachdem die *in vitro*-Experimente verschiedene Hinweise für die spezifische Wirkung der PLK1-ASOs geliefert haben, wurde das Antisense-Prinzip auch im humanen Tumor-Xenograft-Modell mit Nacktmäusen auf seine Wirksamkeit überprüft.

Dafür wurden wiederum P12, P13 und als Negativkontrolle das HSV-ASO eingesetzt, um die Spezifität zu überprüfen. Wie in Kapitel 4.2.18 beschrieben, wurde bei einem durchschnittlichen Tumolvolumen von 100 mm<sup>3</sup> mit der Therapie begonnen. Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von 24 – 28 Tagen eine Injektion von 6 mg ASO/kg Körpergewicht/Tag bzw. 12 mg ASO/kg Körpergewicht/Tag per Bolusinjektion in die Schwanzvene. Eine Negativkontrollgruppe erhielt nur PBS. Die Tumorumfänge wurden zweimal wöchentlich mit dem Kaliper gemessen.

Anfängliche Versuche in MDA-MB-435- und A549-Xenograft-Modellen mit einer Dosierung von 6 mg/kg Körpergewicht/Tag, blieben ohne Hemmeffekt auf das Tumorstadium. Erst im A549-Xenograft-Modell mit einer Dosierung von 12 mg/kg Körpergewicht/Tag konnten beide PLK1-ASOs das Tumorstadium sig-

nifikant reduzieren ( $p < 0,05$ ), P12 um 70% und P13 um 86% (Abb. 36). Das HSV-ASO hatte in allen Versuchen mit beiden Dosierungen keine inhibierende Wirkung auf das Tumorstadium, der Kurvenverlauf war jeweils parallel zur PBS-Kontrolle.

Die durch P12 und P13 erzielte Wachstumsinhibition wurde in Relation gesetzt zum exponentiellen Wachstum, das sowohl die Kontrollgruppe aufwies, der täglich PBS injiziert wurde, als auch die Kontrollgruppe, die das HSV-ASO in gleicher Dosierung wie P12 und P13 erhielt.

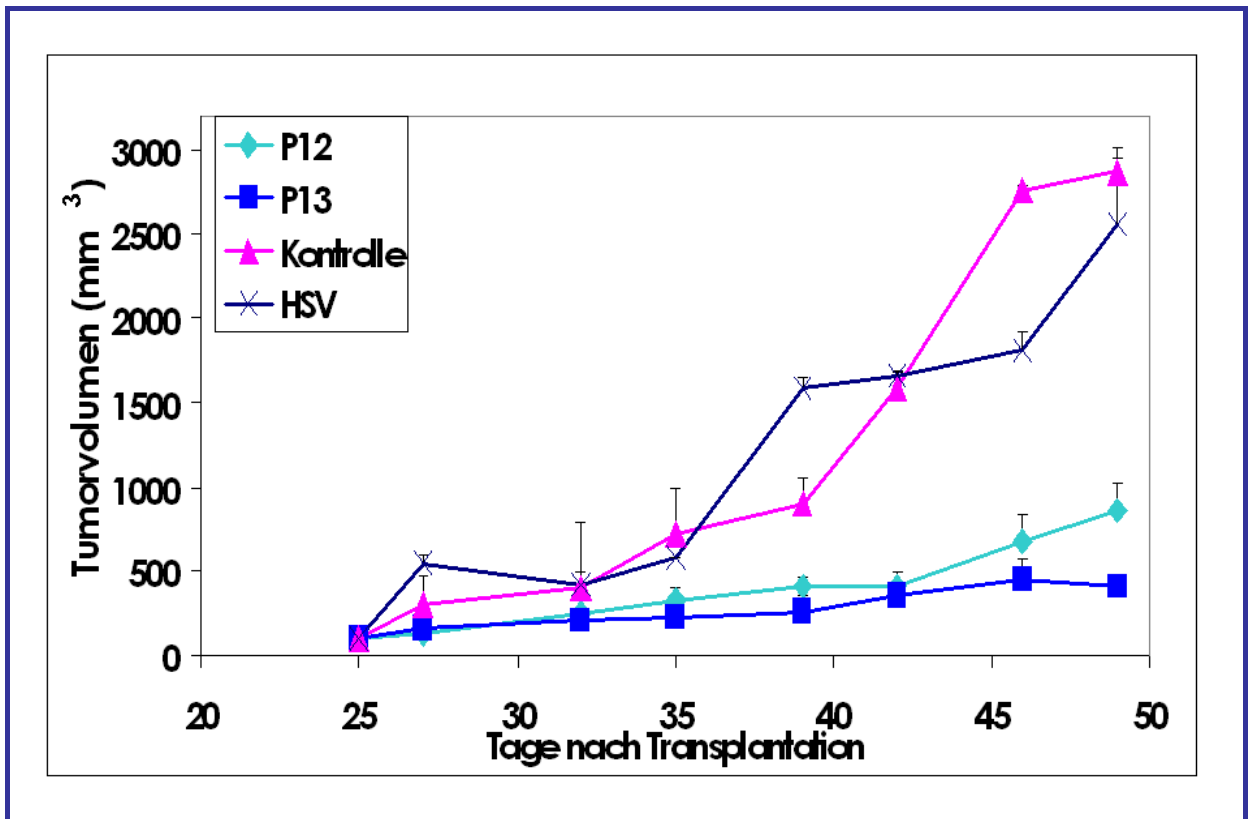


Abbildung 36: Hemmung des Tumorstadiums im humanen Xenograft-Modell (A549)

Es sind die Mittelwerte über die Tumorstadiume [mm<sup>3</sup>] dargestellt und die Standardabweichungen eingezeichnet. Alle Tumorstadiume sind in Beziehung gesetzt zum Anfangsvolumen von jeweils 100 mm<sup>3</sup>.

Die Wachstumsreduktion der Tumoren wurde durch eine anschließende immunhistochemische Analyse im Detail untersucht. Hierzu wurden die Tumoren am Tag nach der letzten Injektion entnommen und mit Antikörpern gegen PLK1 bzw. MIB-1 gefärbt.

Die Gabe des HSV-ASOs über 24 Tage hatte keinen Effekt auf den Prozentsatz der PLK1-positiven Zellen (76%) verglichen mit den Tumoren der unbehandelten Kontrolltiere. Die Injektion von 12 mg P12/kg Körpergewicht/Tag (bzw. 12 mg P13/kg Körpergewicht/Tag) reduzierte die Anzahl der PLK1-positiven Zellen hingegen deutlich (10% PLK1-positive Zellen).

Die immunhistochemische Färbung von PLK1 konnte damit verdeutlichen, dass durch die P12-Behandlung spezifisch die Expression des PLK1-Proteins und damit die Proliferationsaktivität im Tumorgewebe reduziert werden konnte. Die Färbung mit Antikörpern gegen den konventionell eingesetzten Proliferationsmarker MIB-1 zeigte eine Reduktion der proliferierenden Zellen von 61% auf 8% nach PLK1-ASO-Behandlung, was ein weiteres Indiz für die Reduktion der Proliferation und damit für die Hemmung des Tumorwachstums durch P12-Behandlung darstellt (Abb. 37).



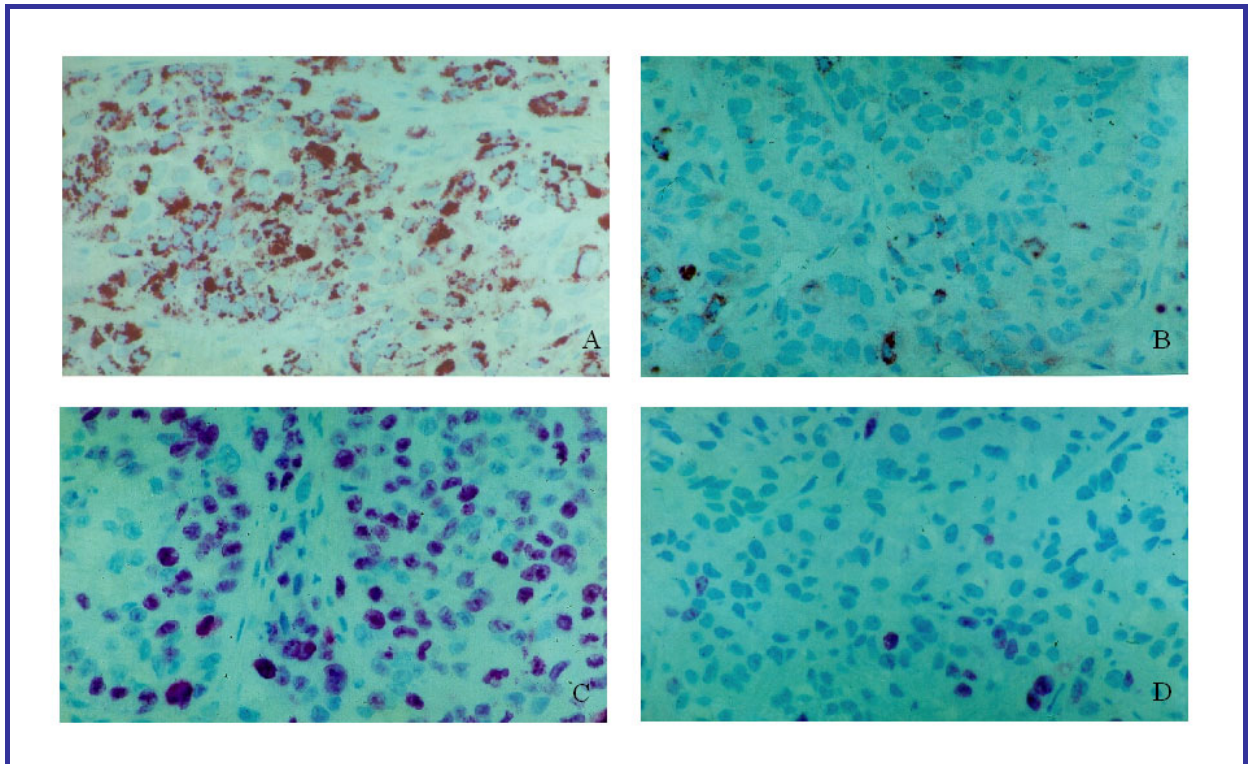


Abbildung 37: Immunhistochemische Färbung von PLK1 und MIB-1

PLK1-Expression nach HSV-ASO-Injektion [A] bzw. nach P12-Injektion [B]; MIB-1-Expression nach HSV-ASO-Injektion [C] bzw. nach P12-Injektion [D].

## 5.2 siRNA-Behandlung verschiedener Krebszelllinien, primärer humaner Mammaepithelzellen und von Xenograft-Mäusen

Die Anwendung von Antisense-Oligonukleotiden in Säugetieren wird durch ihre toxische Wirkung in höheren Konzentrationen und die damit verbundenen Nebenwirkungen sowie die hohen Kosten bei der Herstellung immer noch limitiert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine zweite Technik eingesetzt, mit der die PLK1-Expression spezifisch reduziert werden sollte, die RNA-Interferenz.

Auch durch die siRNA-Behandlung sollte in den verschiedenen Krebszelllinien und in einem primären humanen Zellsystem (HMECs = human mammary epithelial cells) versucht werden, die Expression von PLK1 zu hemmen.

Die zu diesem Zweck eingesetzten siRNAs wurden nach dem Schema von Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. et. al. 2001a) konzipiert, d.h. es wurde nach Sequenzbereichen in der PLK1-mRNA gesucht, in denen auf zwei Adenosine 19 beliebige Nukleotide und zwei Thymidine folgen, so dass siRNAs synthetisiert werden konnten, die einen 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen enthalten, um die Stabilität der siRNAs gegenüber Nukleasen zu erhöhen (Elbashir S.M. et. al. 2001a). Zur Überprüfung der Spezifität der siRNA-Aktion wurde neben den PLK1-siRNAs eine weitere siRNA zur Kontrolle eingesetzt, die gegen die Lamine A/C gerichtet ist. Bei dieser siRNA wurde außerdem in MCF-7-Zellen und in HMECs der Einfluss auf die Expression des Lamin A/C-Proteins untersucht, damit nicht nur der Effekt einer siRNA gegen ein tumorassoziiertes Gen analysiert wurde, sondern auch der Effekt einer siRNA gegen ein normales Zytoskelettprotein.

Im Anschluss an die *in vitro*-Untersuchungen sollte der Effekt der siRNAs auch im Xenograft-Modell an Nacktmäusen untersucht werden.

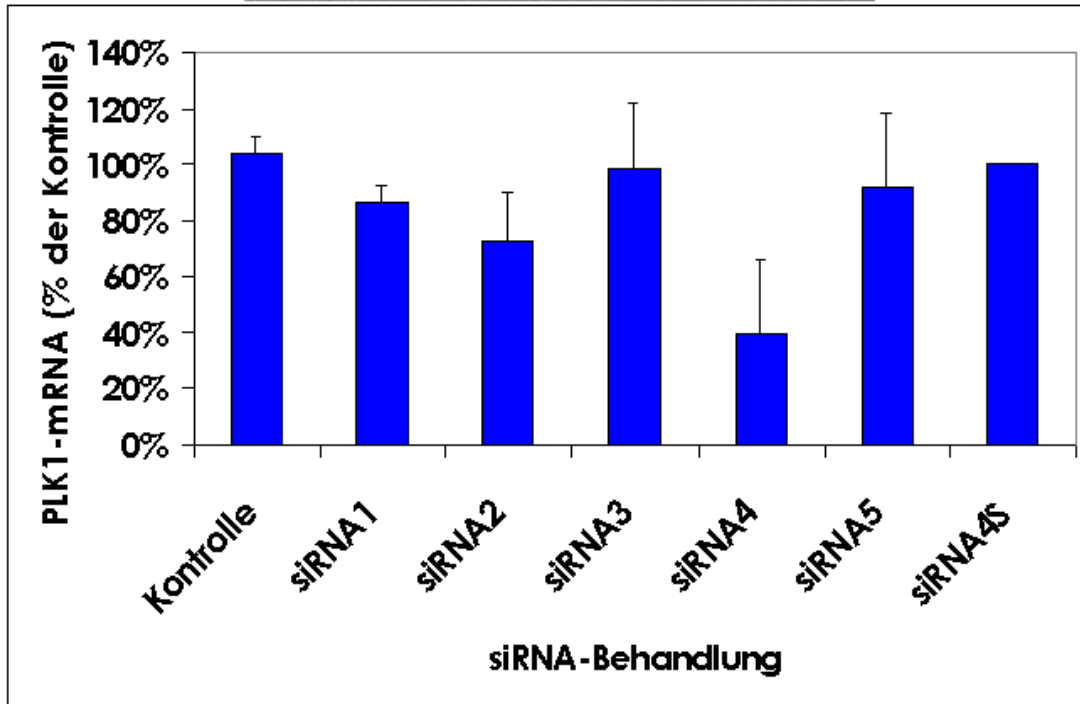
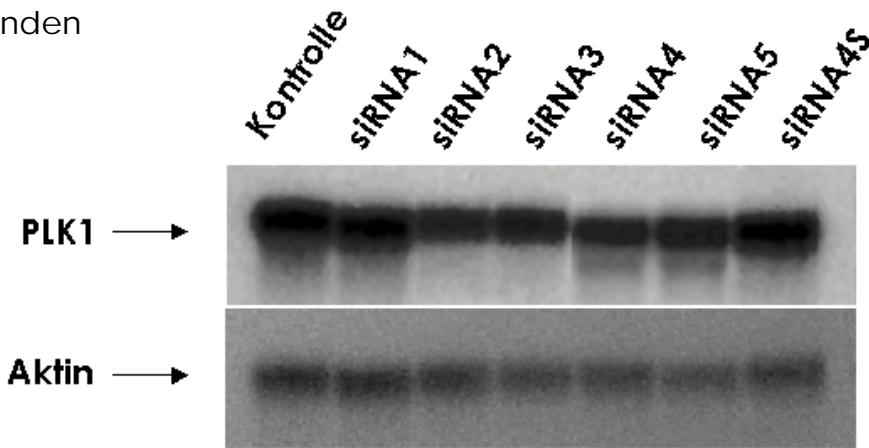
### 5.2.1 Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression nach siRNA-Behandlung

Um die siRNA-Wirkung auf mRNA-Ebene zu studieren, wurden die Zellen der Krebszelllinien MCF-7, HeLa S3, SW-480 und A549 mit den gegen PLK1 gerichteten siRNAs (siRNA2 – 5), der siRNA gegen die Lamine A/C (siRNA1) und der

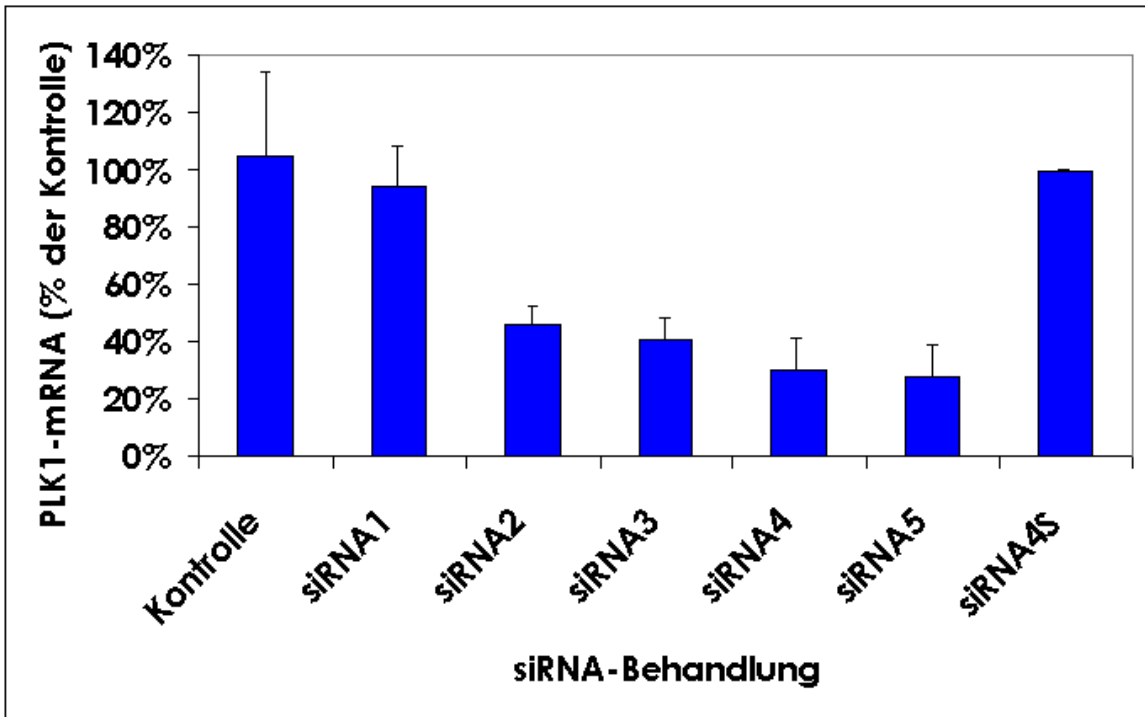
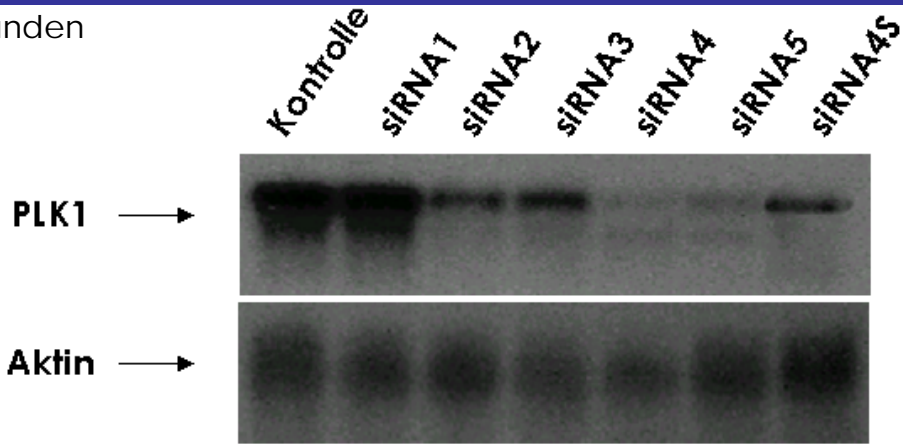
„scrambled“-Kontrolle (siRNA4S), die von der Basenzusammensetzung siRNA4 entspricht (vgl. Kapitel 4.1.4.2), transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und Northern-Blots angefertigt. Die primären Zellen (HMECs) wurden 48 Stunden nach der Transfektion auf die Hemmung der PLK1-mRNA-Expression untersucht. Es wurde auch in diesen Experimenten die PLK1- und die  $\beta$ -Aktin-Expression gemessen. Der Vergleich mit der  $\beta$ -Aktin-Expression diente dazu, da es zellzyklusunabhängig exprimiert wird, die PLK1-mRNA-Menge zu standardisieren, um unterschiedliche auf die Gele geladene Mengen an Gesamt-RNA auszugleichen. Die  $\beta$ -Aktin-standardisierte PLK1-mRNA-Menge in den transfizierten Zellen wurde mit der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Menge der siRNA4S-behandelten Zellen verglichen.

In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnte 6 Stunden nach der Transfektion mit siRNA2, siRNA3, siRNA4 bzw. siRNA5 in einer Konzentration von 56 nM verglichen mit 56 nM siRNA4S noch keine statistisch signifikante Reduktion der PLK1-mRNA nachgewiesen werden, aber nach 24 bzw. 48 Stunden war eine statistisch signifikante Reduktion der PLK1-mRNA um 25 – 75% verglichen mit den siRNA4S-behandelten Zellen nachweisbar (Abb. 38). Nach 24 Stunden war  $p < 0,01$  für siRNA2 – 5 und nach 48 Stunden nur für siRNA4. Mit siRNA1, die gegen die Lamine A/C gerichtet ist, wurde die PLK1-mRNA nicht reduziert.

6 Stunden



24 Stunden



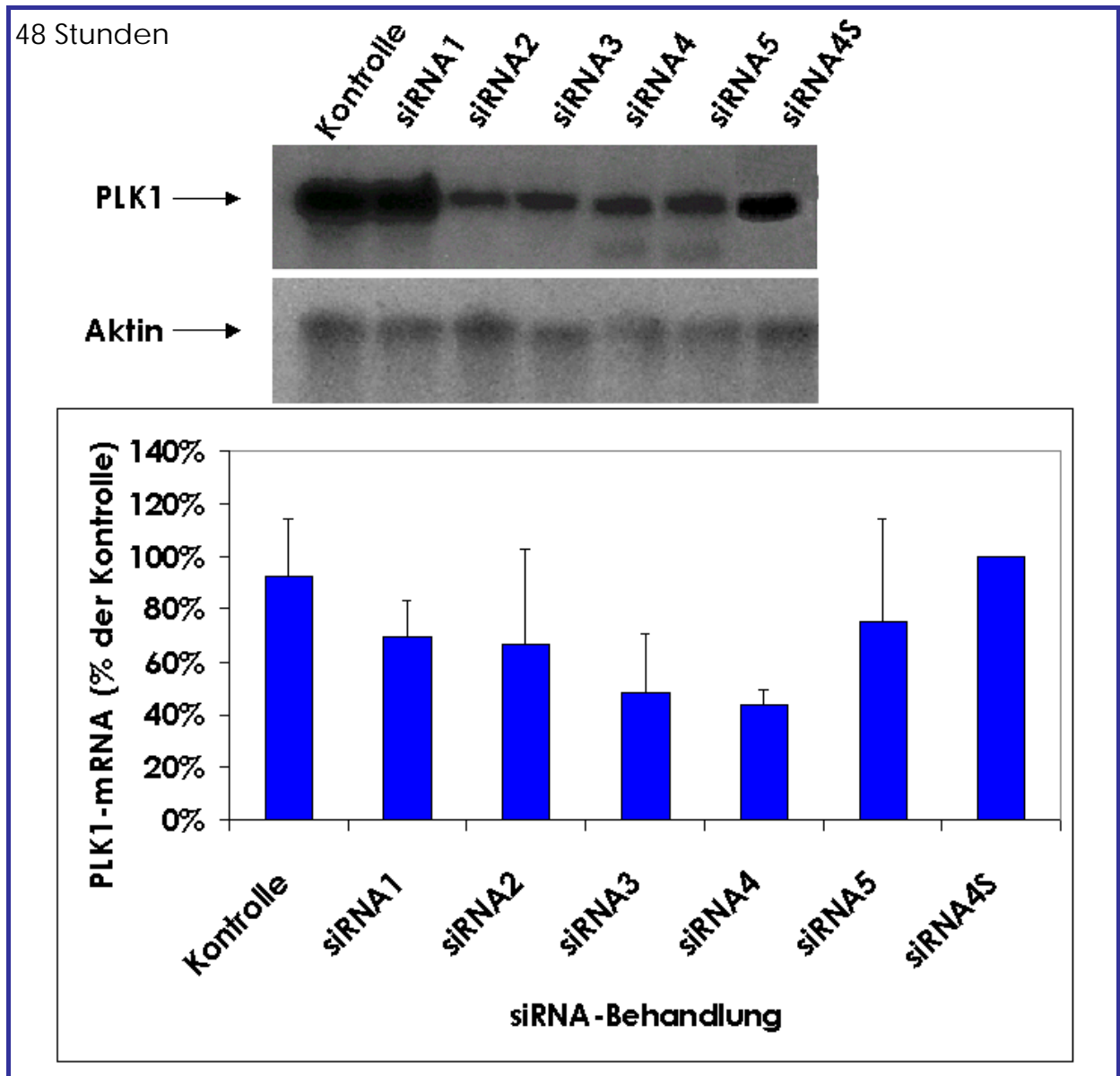


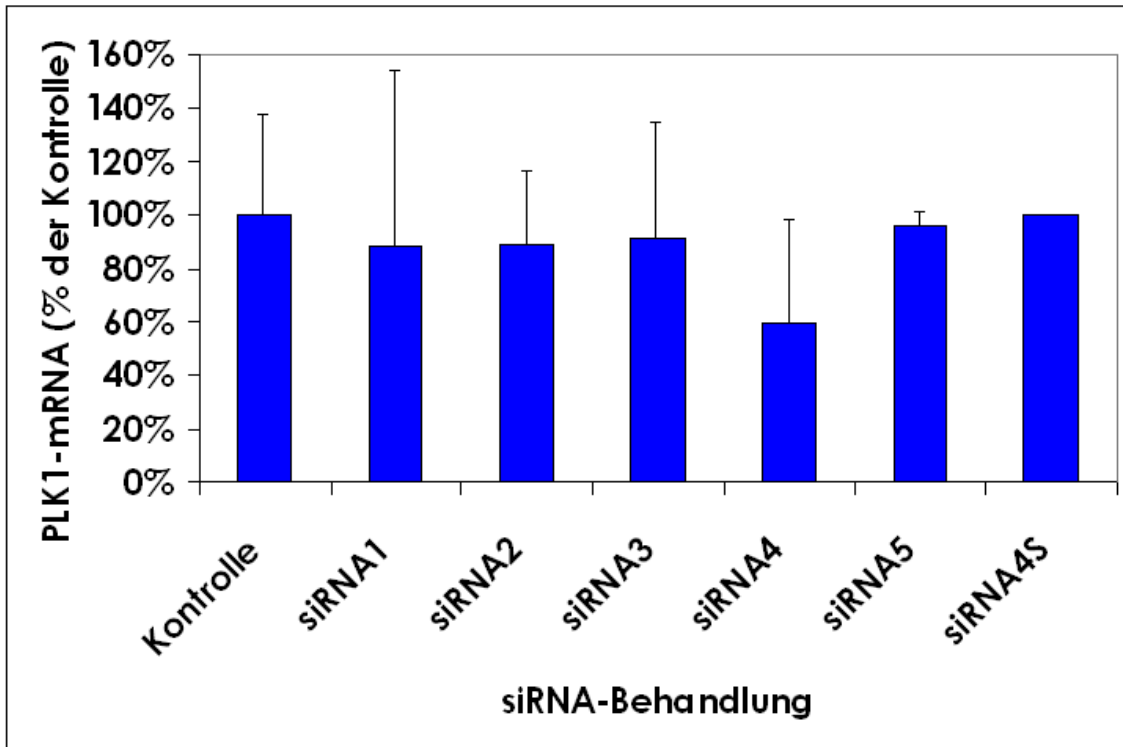
Abbildung 38: Reduktion der PLK1-mRNA in MCF-7-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA

Behandelt wurde mit den siRNAs (siRNA1 – 5 und siRNA4S) in einer Konzentration von 56 nM. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind im oberen Teil der Abbildungen jeweils die Northern-Blots für PLK1 und  $\beta$ -Aktin. Im unteren Teil sind jeweils die graphische Darstellung der Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle zu sehen.

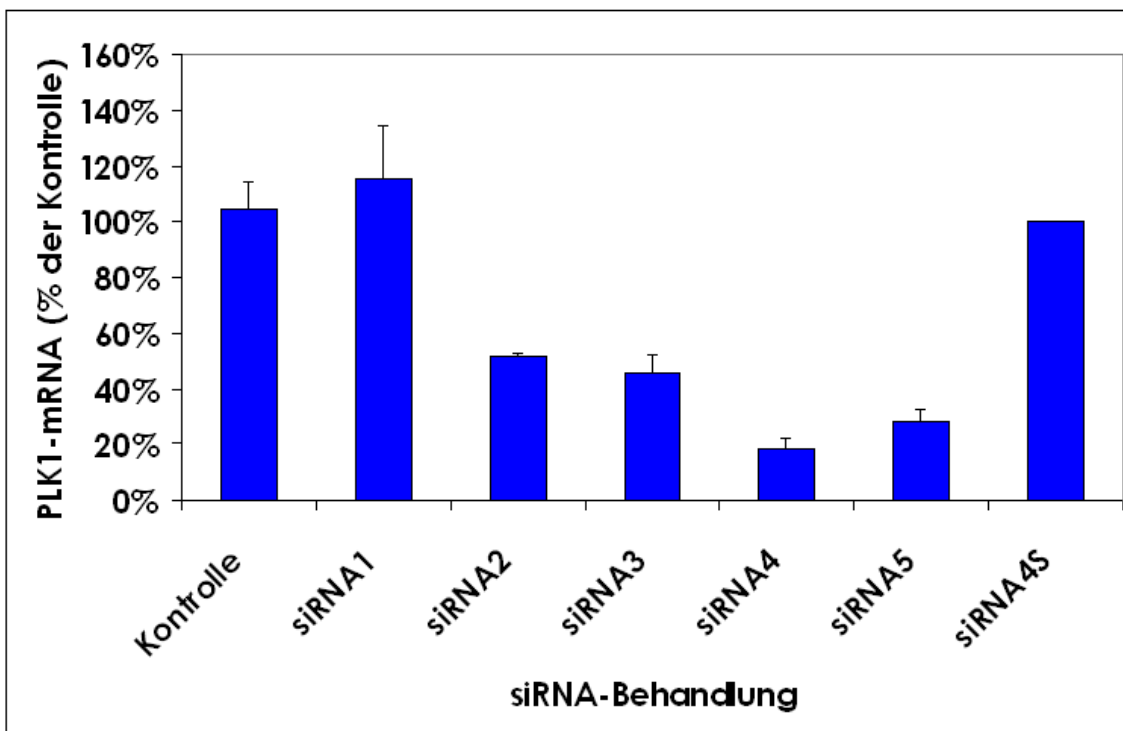
Durch Einsatz von PLK1-spezifischer siRNA konnte die PLK1-mRNA-Menge in MCF-7-Zellen also deutlich reduziert werden. Es wurde im Folgenden untersucht, ob dieser Hemmeffekt durch PLK1-spezifische siRNAs auch auf andere Zelltypen übertragbar ist.

In der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa S3 konnte nach 6 Stunden noch keine signifikante Reduktion der PLK1-mRNA durch siRNA2 – 5 verglichen mit siRNA4S nachgewiesen werden, aber auch hier konnten für siRNA2 – 5 nach 24 und 48 Stunden vergleichbare signifikante Reduktionen wie in den MCF-7-Zellen nachgewiesen werden, die im Bereich von 70 – 80% lagen (Abb. 39). Nach 24 Stunden war für siRNA3 und siRNA5  $p < 0,01$ , für siRNA2 und siRNA4 war sogar  $p < 0,001$ . Nach 48 Stunden war hier  $p < 0,01$  nur noch für siRNA3 – 5.

6 Stunden



24 Stunden





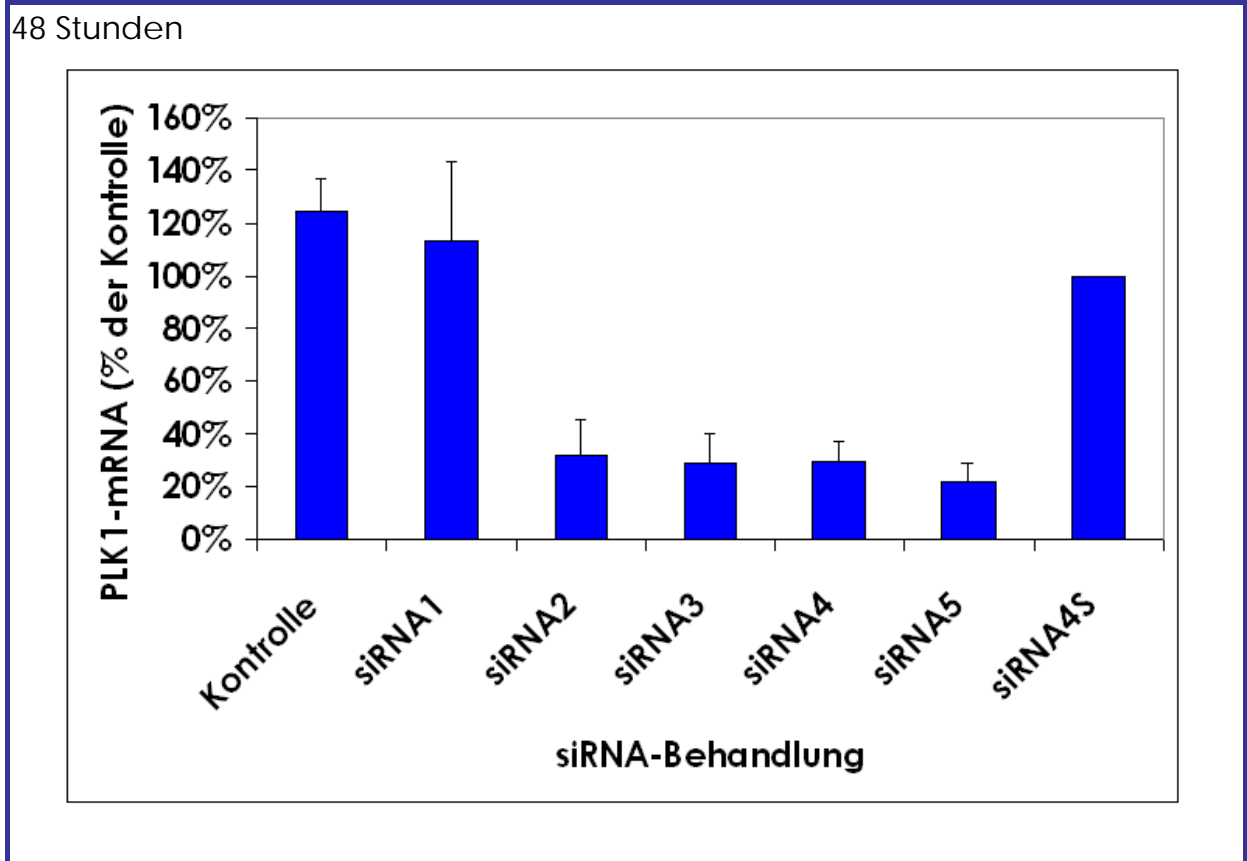
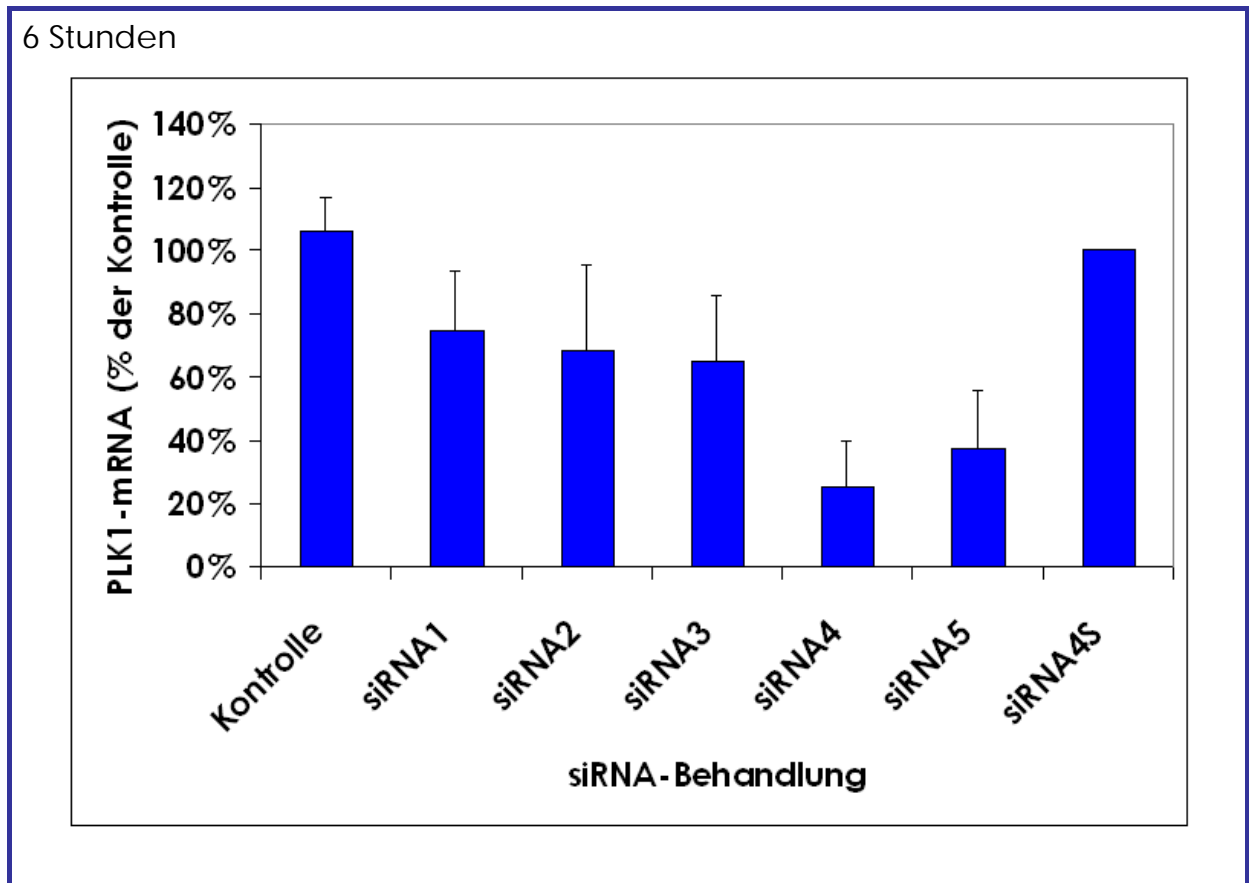


Abbildung 39: **Reduktion der PLK1-mRNA in HeLa S3-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA**

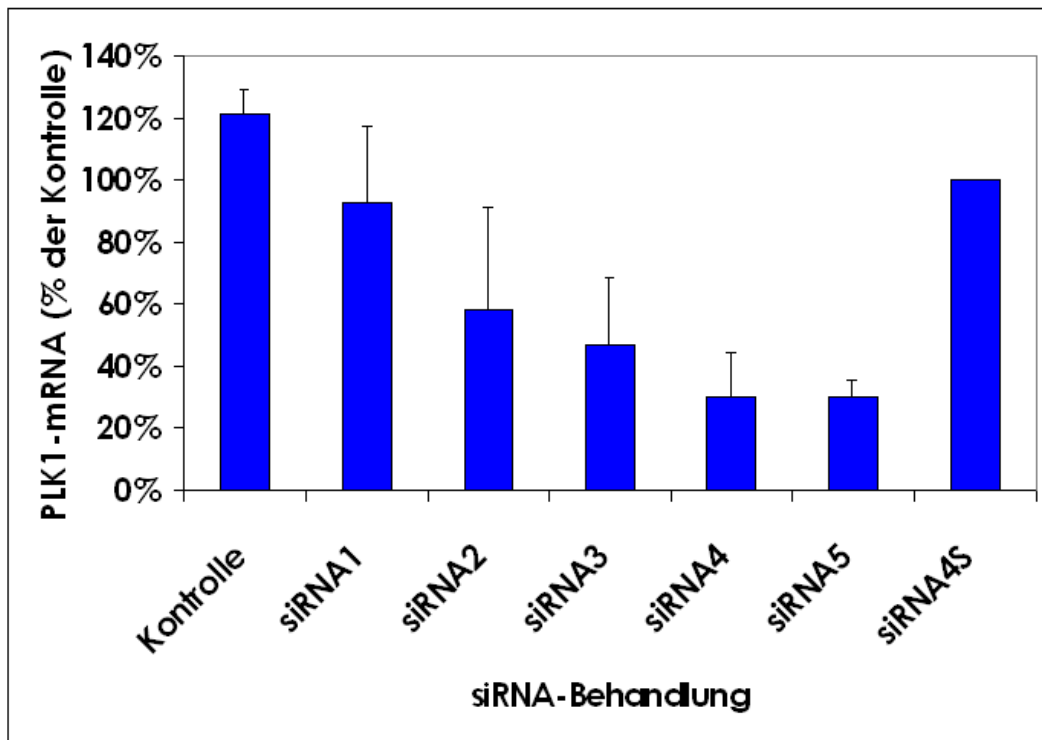
Behandelt wurde mit den siRNAs (siRNA1 – 5 und siRNA4S) in einer Konzentration von 56 nM. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle.

Auch in der Kolonkarzinom-Zelllinie SW-480 konnte eine starke PLK1-mRNA-Reduktion von 60 – 80% durch die siRNA-Behandlung verglichen mit siRNA4S beobachtet werden, und zwar trat sie bei dieser Zelllinie bereits nach 6 Stunden auf, war aber für alle drei Zeitpunkte nur für siRNA4 und siRNA5 statistisch signifikant (Abb. 40). Nach 6 Stunden war  $p < 0,05$  für siRNA4 und siRNA5, nach 24 Stunden war  $p < 0,05$  für siRNA4 und  $p < 0,01$  für siRNA5 und nach 48 Stunden war  $p < 0,01$  für siRNA4 und  $p < 0,05$  für siRNA5. Für die Bronchialkarzinom-Zelllinie A549 konnte für verschiedene Zeitpunkte und verschiedene siRNAs eine statistisch signifikante Reduktion der PLK1-mRNA um 50 – 80% gezeigt werden (Abb.

41). Die PLK1-mRNA-Reduktion war nach 6 Stunden durch siRNA2 ( $p < 0,001$ ) und siRNA5 ( $p < 0,01$ ) statistisch signifikant, nach 24 Stunden für siRNA2, 4 und 5 ( $p < 0,05$ ) und nach 48 Stunden für siRNA2, 4 und 5 ( $p < 0,05$ ) und für siRNA3 ( $p < 0,001$ ).



24 Stunden



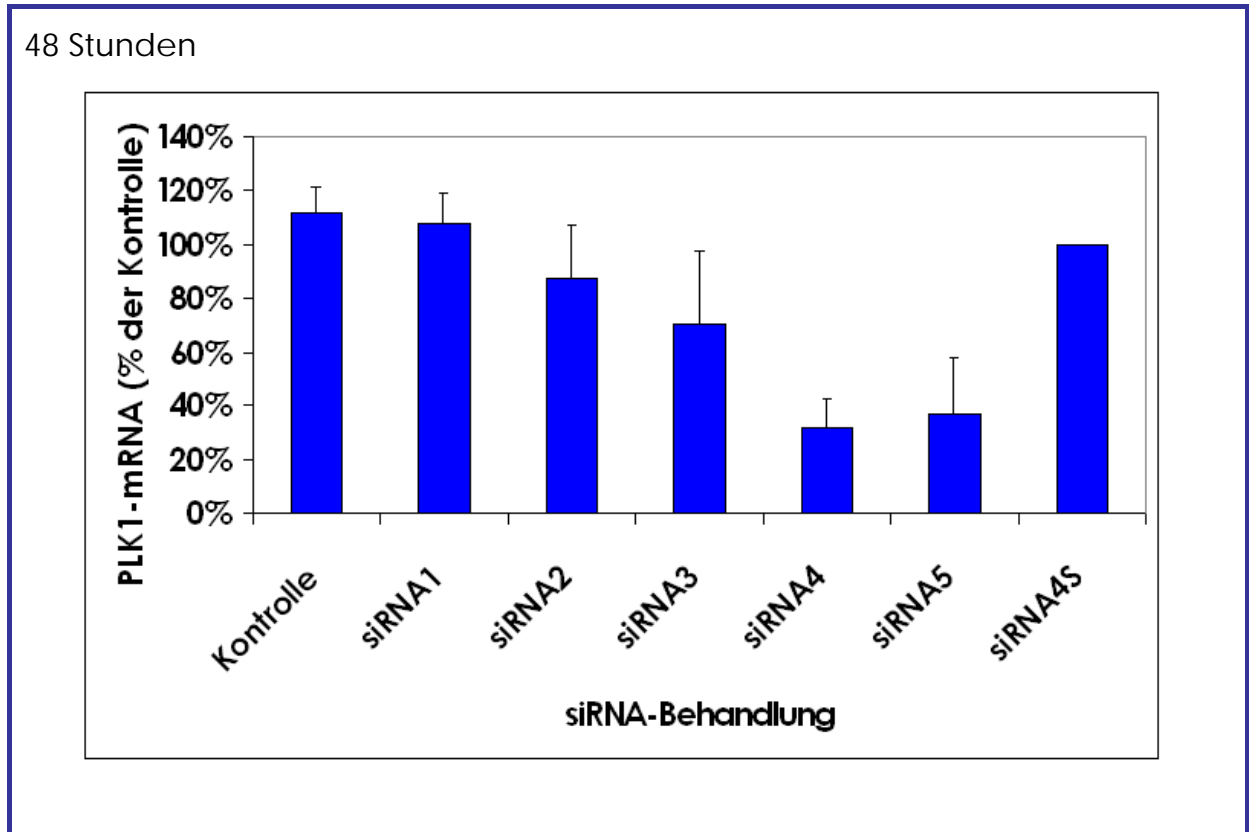
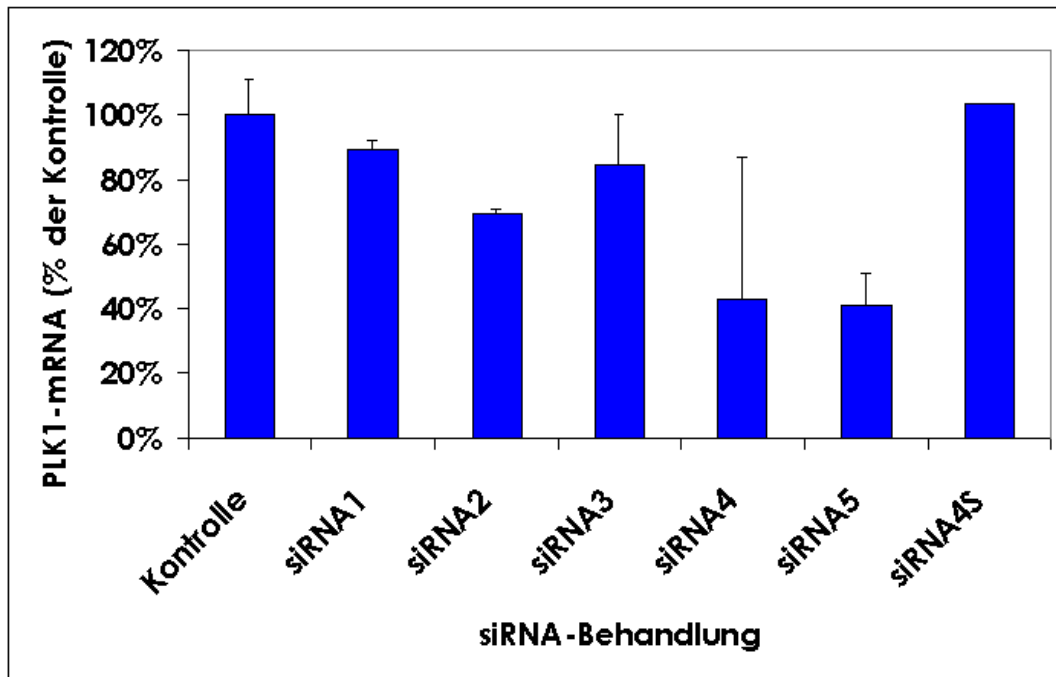


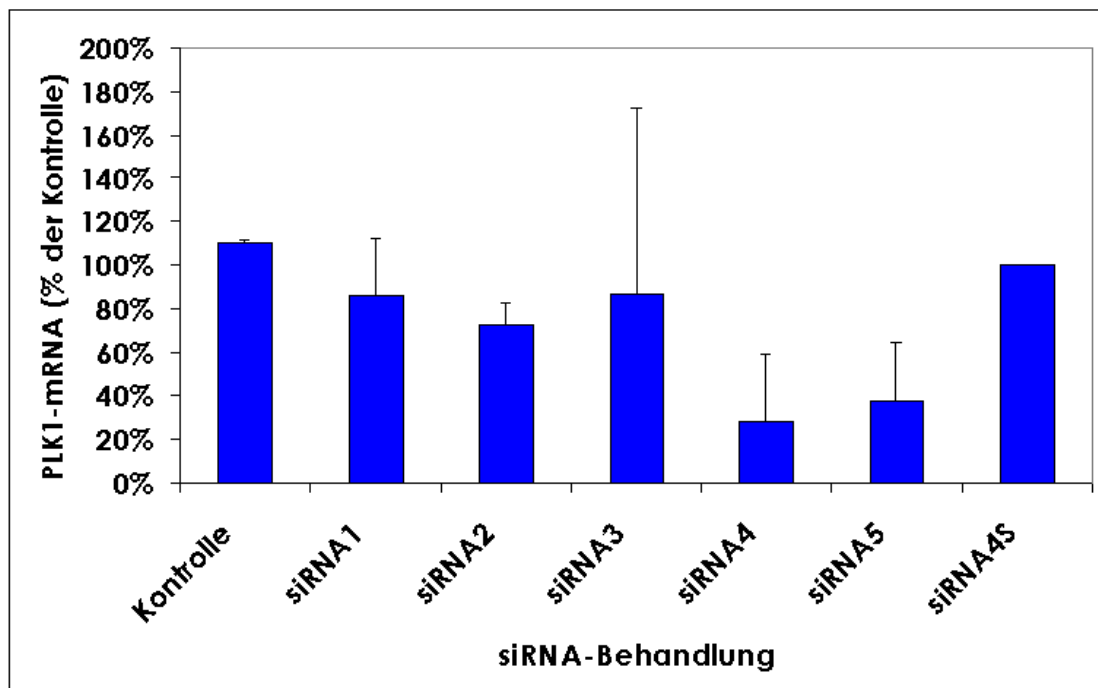
Abbildung 40: Reduktion der PLK1-mRNA in SW-480-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA

Behandelt wurde mit den siRNAs (siRNA1 – 5 und siRNA4S) in einer Konzentration von 56 nM. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 6 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle.

6 Stunden



24 Stunden



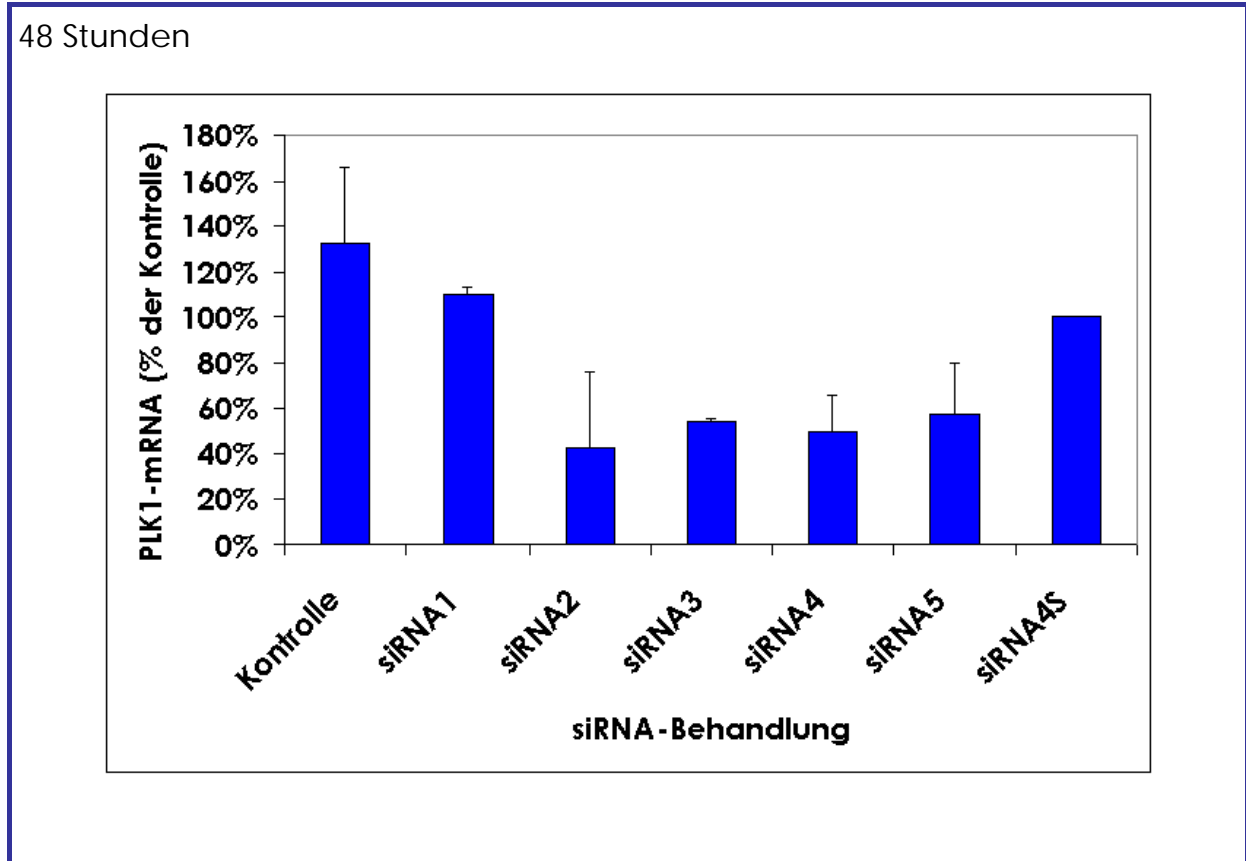


Abbildung 41: Reduktion der PLK1-mRNA in A549-Zellen 6, 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA

Behandelt wurde mit den siRNAs (siRNA1 – 5 und siRNA4S) in einer Konzentration von 56 nM. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 6 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle.

Nachdem die PLK1-mRNA-Reduktion in diversen Krebszelllinien gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob dies auch in primären, nicht-transformierten Zellen, z.B. in humanen Mammaepithelzellen (HMEC), möglich ist. Die Konzentrationen der siRNAs (0,56 – 566 nM), die in den Krebszelllinien zu signifikanten Reduktionen der PLK1-mRNA führten, zeigten jedoch in den HMECs keine Wirkung. Erst hohe Konzentrationen von 2  $\mu$ M führten zu einer statistisch signifikanten Reduktion der PLK1-mRNA-Expression verglichen mit den siRNA4S-transfizierten Zellen 48 Stunden nach der Transfektion (Abb. 42). Die Reduktion betrug für siRNA3 54% ( $p < 0,05$ ) und für siRNA4 63% ( $p < 0,05$ ).

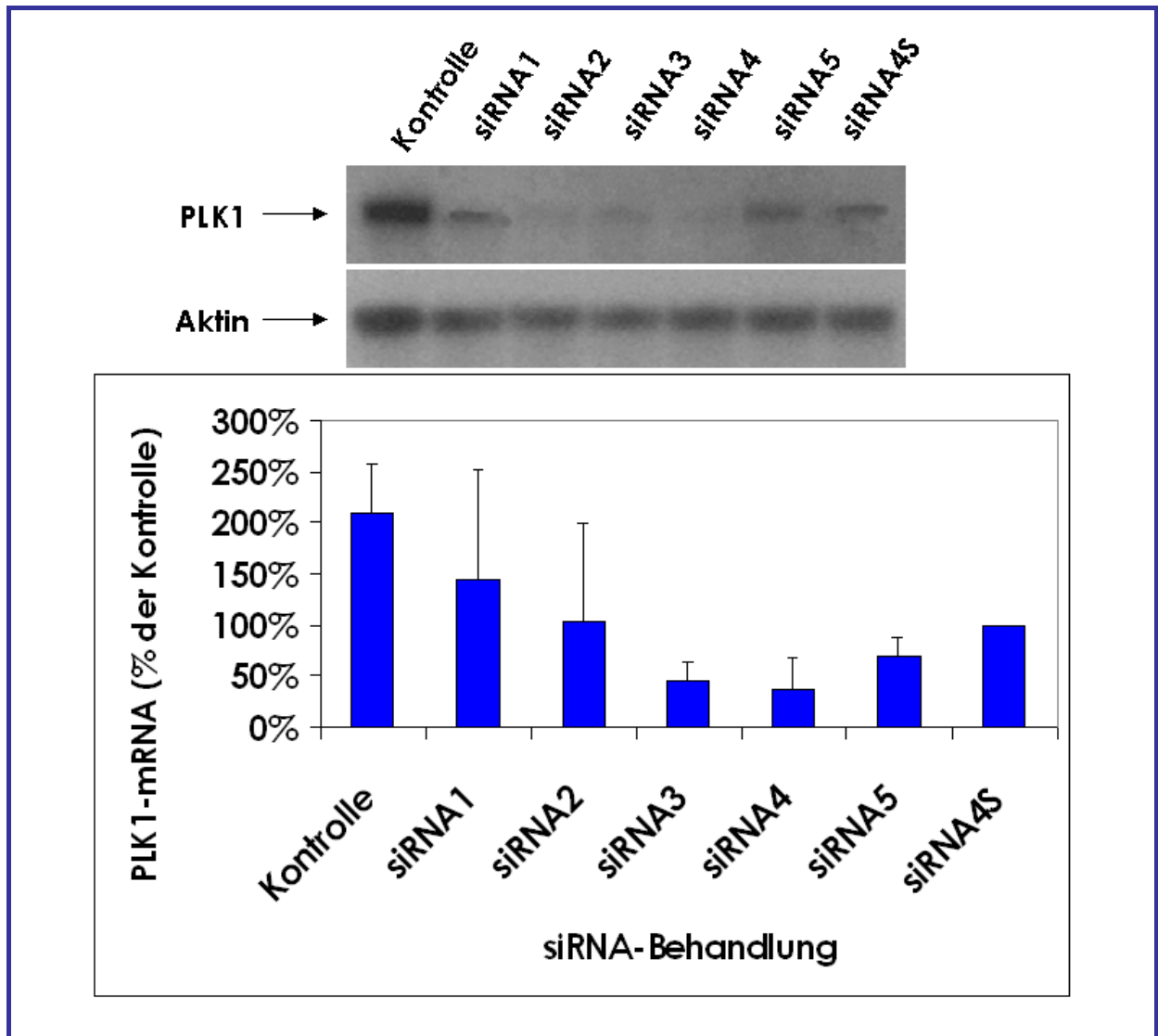


Abbildung 42: Reduktion der PLK1-mRNA in HMECs 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA

Behandelt wurde mit den siRNAs (siRNA1 – 5 und siRNA4S) in einer Konzentration von 2  $\mu$ M. Die PLK1-mRNA-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind im oberen Teil der Abbildung die Northern-Blots für PLK1 und  $\beta$ -Aktin. Im unteren Teil sind die graphische Darstellung der Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle zu sehen.

In allen eben beschriebenen Transfektionsexperimenten wurde eine weitere, bereits angesprochene siRNA eingesetzt, siRNA1, die gegen die Lamine A/C gerichtet ist. Diese hatte in keiner der untersuchten Zelllinien bzw. in den primä-

ren Zellen einen Einfluss auf die Expression der PLK1-mRNA, was ein erstes wichtiges Indiz für die spezifische Wirkung der eingesetzten siRNAs gegen PLK1 darstellt (vgl. hierzu Abb. 38 – 42).

### 5.2.2 Bestimmung der PLK1-Proteinmenge nach siRNA-Behandlung

Nach der Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression wurde die PLK1-Proteinmenge analysiert, um zu überprüfen, ob die Abnahme der PLK1-mRNA-Menge durch den Einsatz von siRNAs auch die Hemmung der PLK1-Proteinmenge zur Folge hat.

Hierfür wurden 48 Stunden nach der Transfektion der Krebszelllinien mit den siRNAs gegen PLK1 und gegen die Lamine A/C Western-Blots angefertigt, in denen die PLK1-Proteinmenge auf die jeweils korrespondierende  $\beta$ -Aktinmenge standardisiert wurde und im Anschluss daran auf die  $\beta$ -Aktinstandardisierte PLK1-Proteinmenge in siRNA4S-behandelten Zellen bezogen wurde.

In den zuerst untersuchten MCF-7-Zellen konnte eine statistisch signifikante Reduktion des PLK1-Proteins auf Werte von 5 – 15% ( $p < 0,01$  für siRNA2 – 5 verglichen mit siRNA4S) nachgewiesen werden, die der durch siRNA2 – 5 induzierten PLK1-mRNA-Reduktion (vgl. Kapitel 5.2.1) entsprach (Abb. 43).



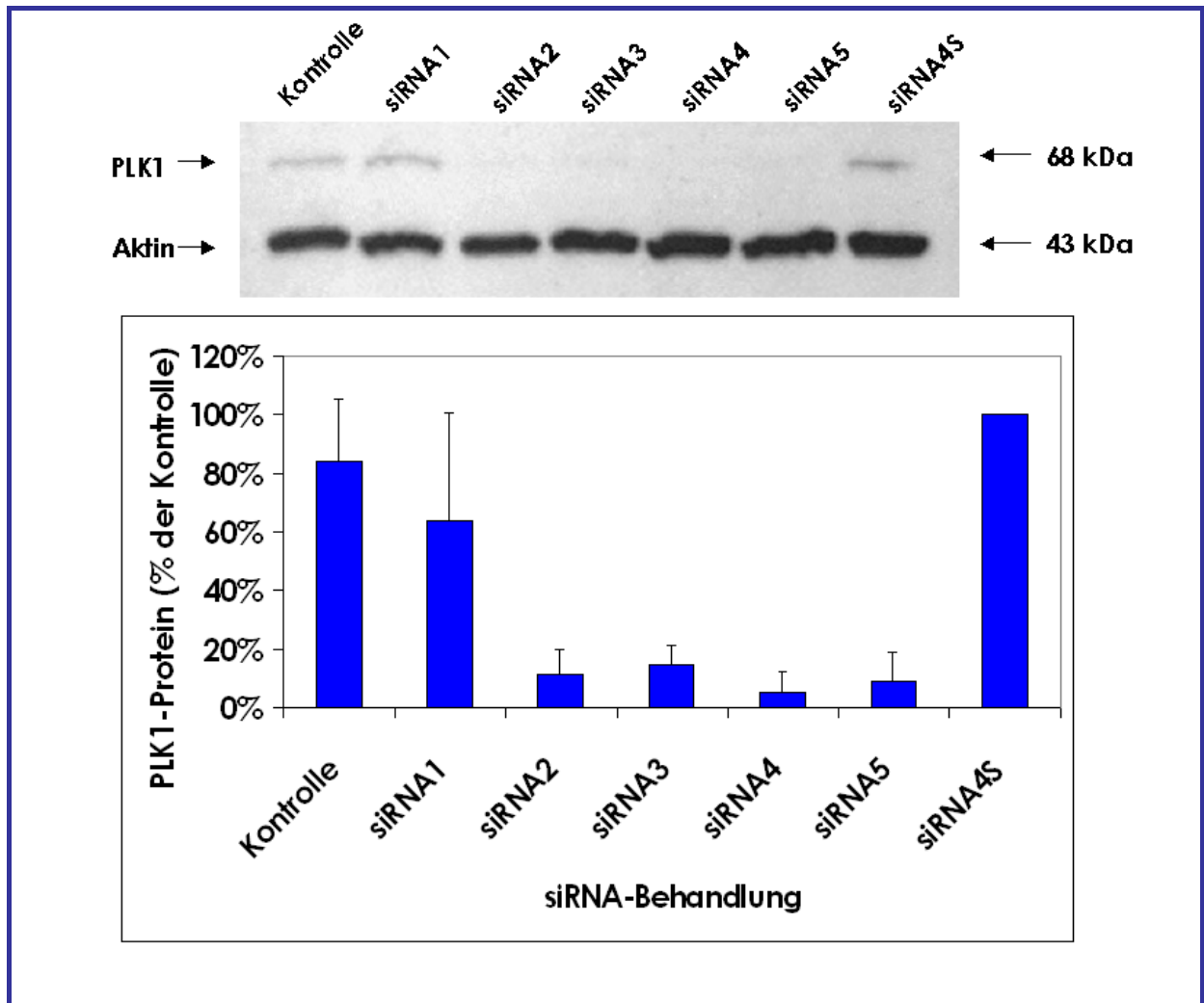
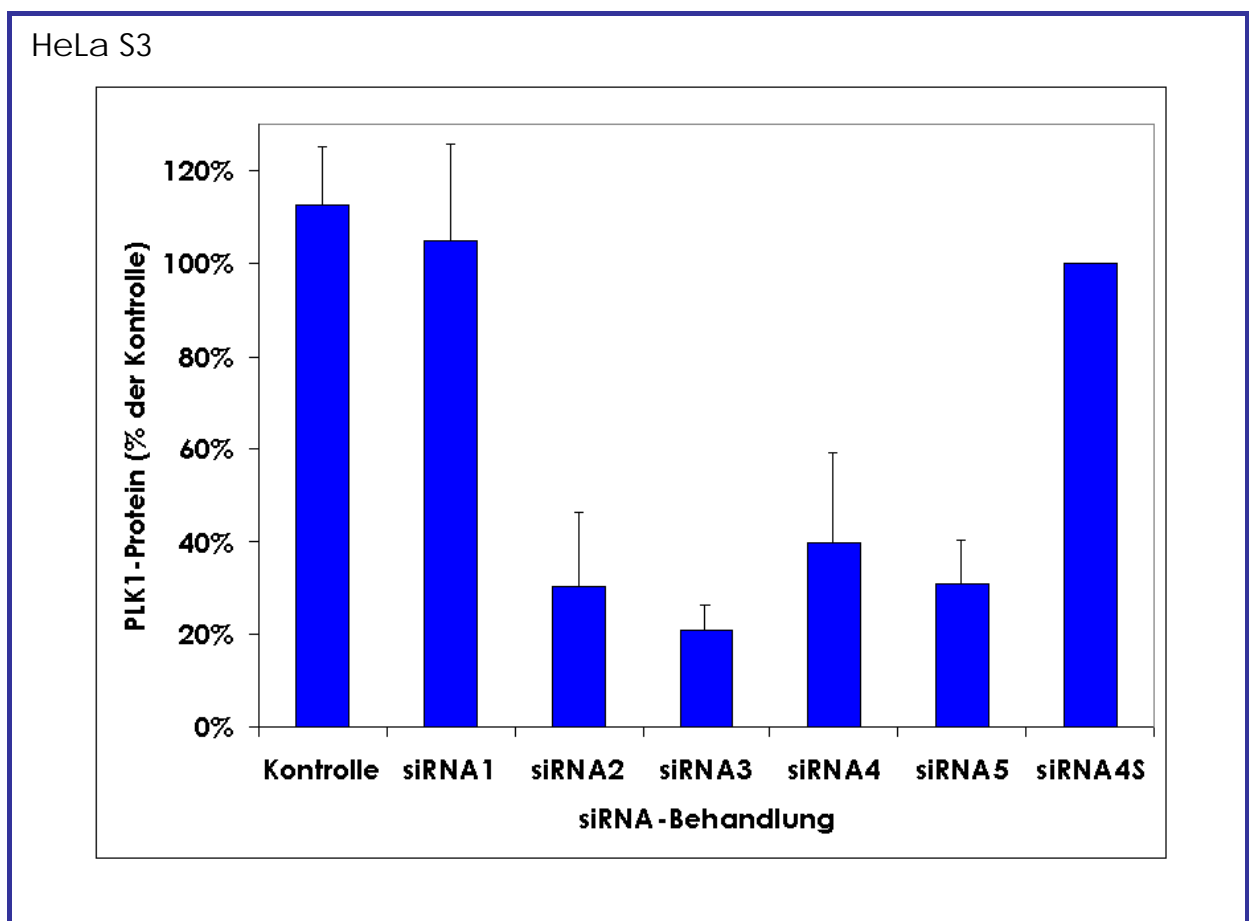


Abbildung 43: Reduktion des PLK1-Proteins in MCF-7-Zellen nach Transfektion mit siRNA

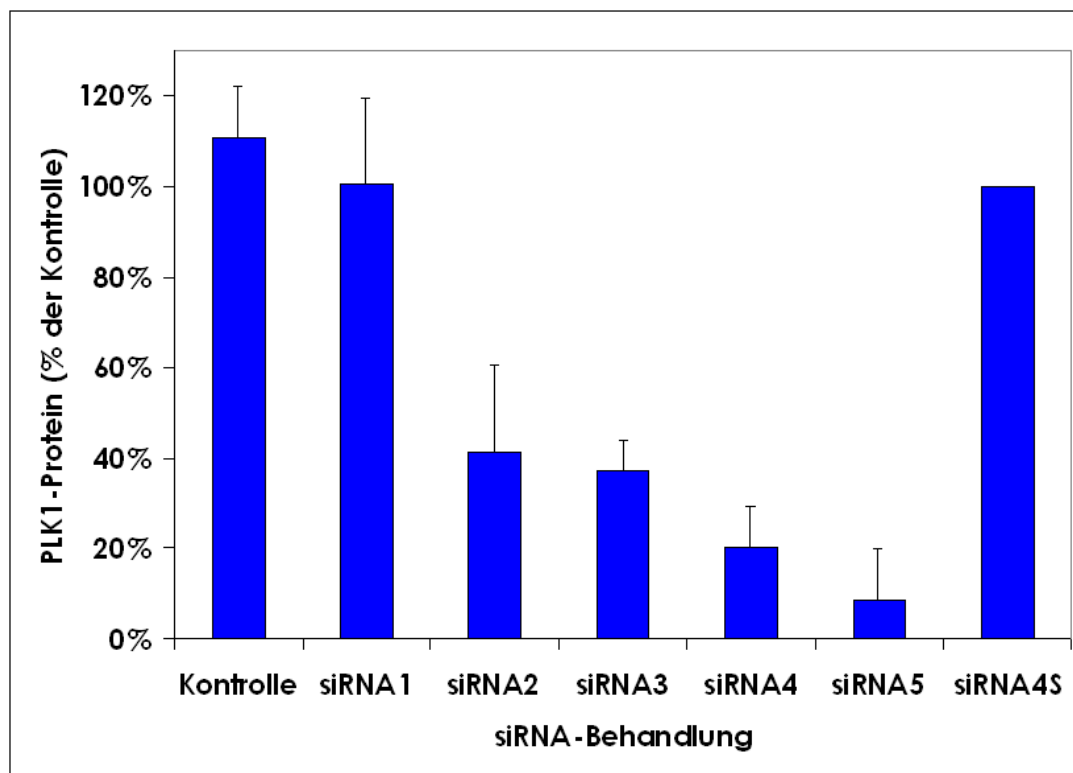
Behandelt wurde mit den siRNAs (siRNA1 – 5 und siRNA4S) in einer Konzentration von 56 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt ist im oberen Teil der Abbildung der Western-Blot zur Demonstration der Expression von PLK1 und  $\beta$ -Aktin. Im unteren Teil sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle dargestellt.

Ob auch in anderen Krebszelllinien die PLK1-Proteinmenge durch PLK1-spezifische siRNAs reduzierbar war, wurde anschließend untersucht. In HeLa S3-Zellen führten wie in MCF-7-Zellen auch alle eingesetzten siRNAs gegen PLK1 (siRNA2 – 5) zu einer statistisch signifikanten Reduktion der PLK1-Proteinexpression auf Werte von 21 – 40% verglichen mit siRNA4S ( $p < 0,05$  für

siRNA2 und siRNA4;  $p < 0,01$  für siRNA3 und siRNA5) (Abb. 44). In SW-480-Zellen war die Reduktion des PLK1-Proteins im Vergleich zu siRNA4S ebenfalls statistisch signifikant, es ergaben sich folgende Werte: Die Reduktion auf 11 – 41% war für siRNA3 – 5 statistisch signifikant mit  $p < 0,01$ , und für siRNA2 war  $p < 0,05$ . In A549-Zellen schließlich wurde das PLK1-Protein durch siRNA2 – 5 auf Werte von 17 – 34% verglichen mit siRNA4S reduziert ( $p < 0,01$  für siRNA4 und  $p < 0,05$  für siRNA3 und siRNA5). Die jeweilige graphische Auswertung der 48 Stunden nach der Transfektion angefertigten Western-Blots ist in der folgenden Abbildung 44 für HeLa S3-, SW-480- und A549-Zellen gezeigt.



SW-480



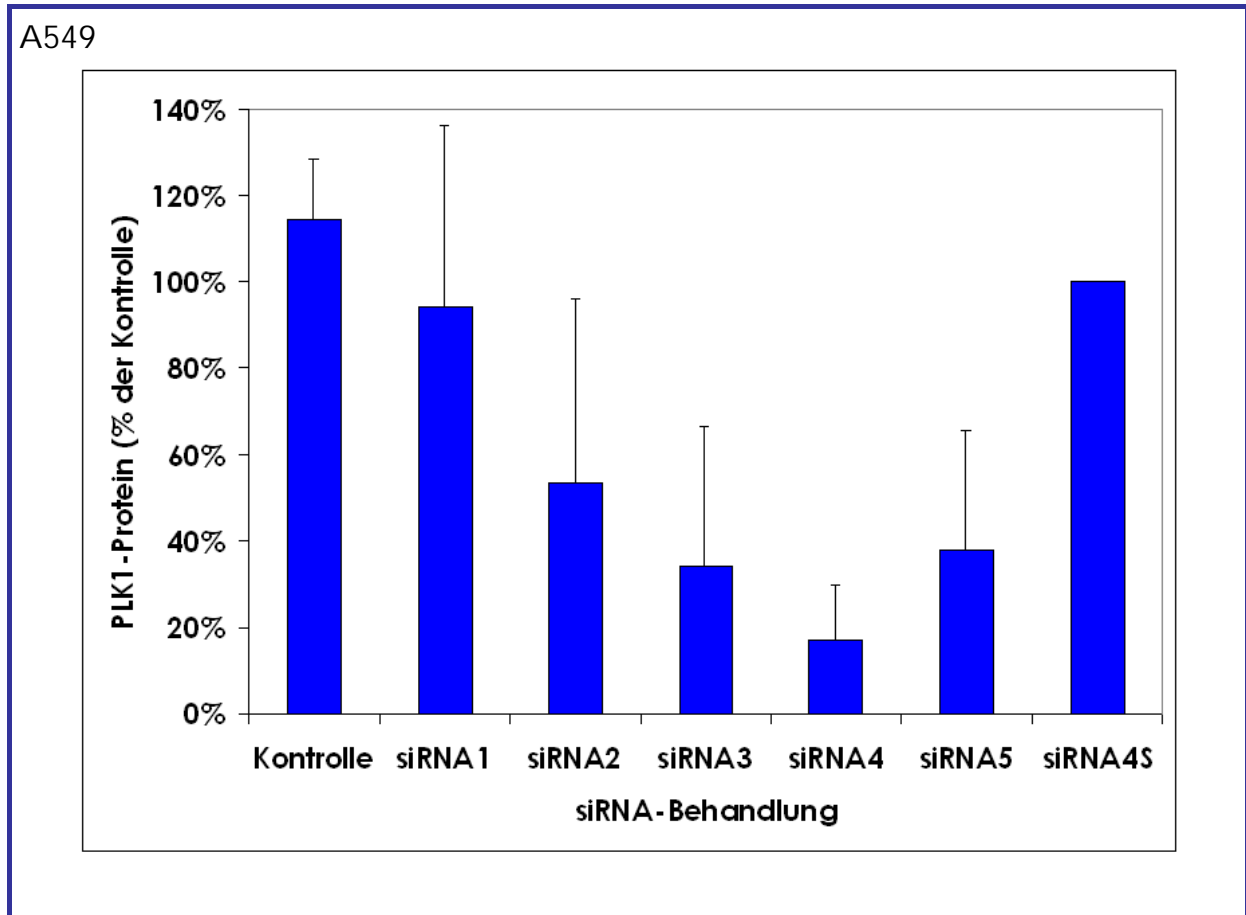


Abbildung 44: **Reduktion des PLK1-Proteins in HeLa S3-, SW-480- und A549-Zellen nach Transfektion mit siRNA**

Behandelt wurden alle drei Zelllinien mit den siRNAs (siRNA1 – 5 und siRNA4S) in einer Konzentration von 56 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle.

In den primären Mammaepithelzellen HMEC war zwar ein Nachweis der PLK1-mRNA möglich, auf Proteinebene allerdings lag in diesen Zellen die PLK1-Menge an der Nachweisgrenze, so dass die Wirkung von siRNAs auf die PLK1-Proteinmenge in diesem Zellsystem leider nicht untersucht werden konnte. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die PLK1-Proteinmenge in primären Zellen mit geringer proliferativer Aktivität gering ist (Yuan J. et. al. 1997).

Eine wichtige Untersuchung zur Spezifität der siRNAs gegen PLK1 bestand in der Analyse der konzentrationsabhängigen Reduktion des PLK1-Proteins. Dafür wurden MCF-7-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen siRNA1, siRNA4 und siRNA4S (0,5 nM, 5,6 nM, 56 nM und 566 nM) behandelt. Es konnte bei den Konzentrationen von 0,5 – 56 nM siRNA4 eine statistisch signifikante konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins auf 11 – 29% der Menge in Kontrollzellen nachgewiesen werden ( $p < 0,05$  für 5,6 nM,  $p < 0,01$  für 0,5 und 56 nM). Bei 566 nM allerdings wurde das inhibitorische Potenzial von siRNA4 wieder verringert, was eventuell durch geringere Transfektionseffizienzen bei der Applikation höherer siRNA-Konzentrationen verursacht worden sein kann (Elbashir S.M. et al. 2001a). Diese konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins durch siRNA4 im Vergleich zu siRNA1 und siRNA4S in den gleichen Konzentrationen ist in Abbildung 45 dargestellt.

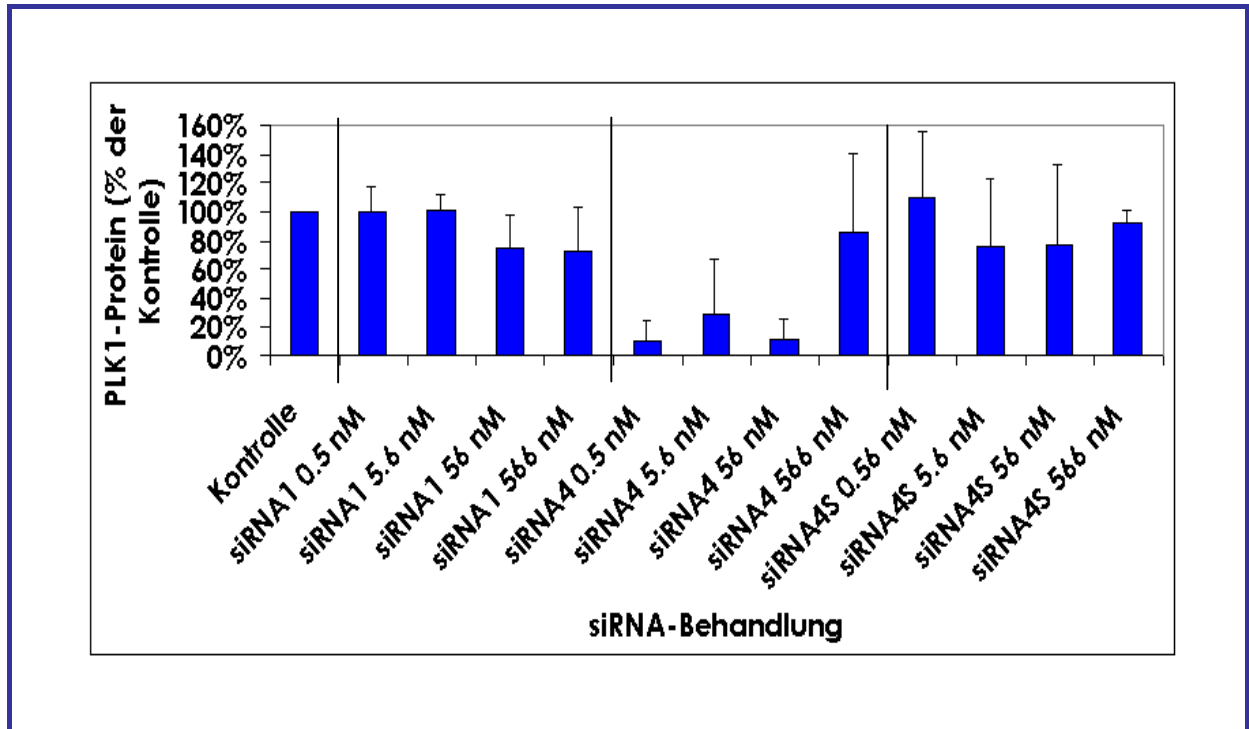


Abbildung 45: Konzentrationsabhängige Reduktion des PLK1-Proteins in MCF-7-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1, siRNA4 bzw. siRNA4S

Behandelt wurde mit den siRNAs (siRNA1, siRNA4 und siRNA4S) in verschiedenen Konzentrationen von 0,5 – 566 nM. Die PLK1-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle.

Eine weitere interessante Beobachtung konnte in MCF-7-Zellen nach der Transfektion mit siRNAs auf PLK1-Proteinebene gemacht werden. In dieser Zelllinie war die gleichzeitige Transfektion von siRNA4 zusammen mit entweder siRNA2, siRNA3 oder siRNA5, jedes in einer Konzentration von 28 nM, effektiver als die Transfektion von 56 nM siRNA4 bezüglich der Reduktion des PLK1-Proteins 48 Stunden nach der Transfektion.

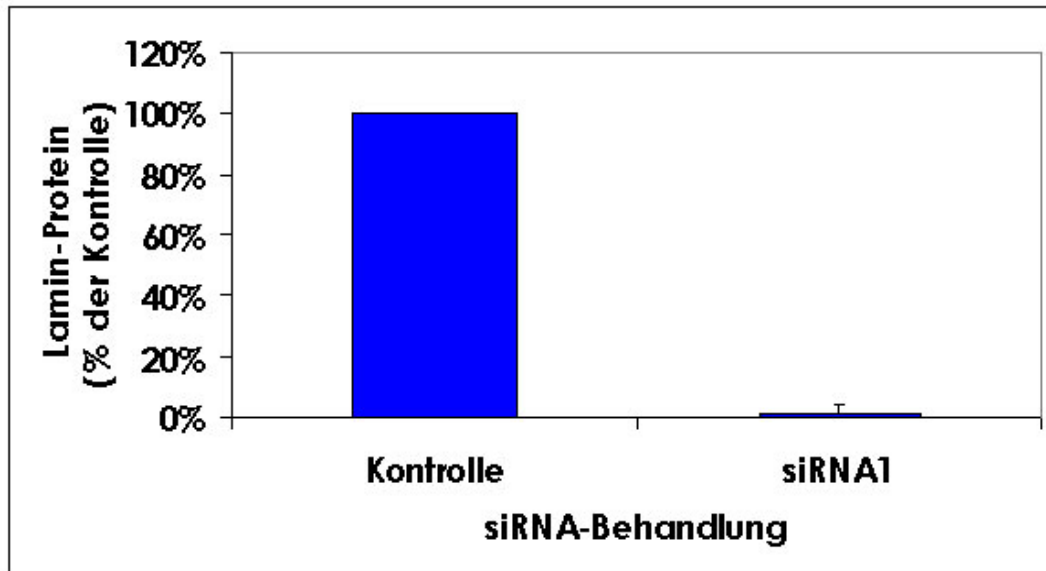
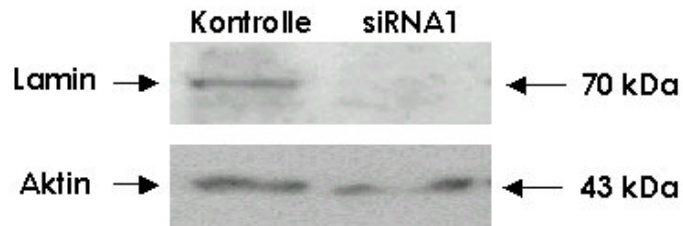
### 5.2.3 Bestimmung der Lamin A/C-Proteinmenge nach siRNA-Behandlung

Hinsichtlich der Hemmbarkeit von PLK1 stellte sich nun die Frage, ob auch nicht-tumorassoziierte Gene mit gleicher Effizienz hemmbar sind wie PLK1. Dazu diente die Bestimmung der Lamin A/C-Proteinmenge. Um dies zu untersuchen, wurden aus MCF-7-Zellen und HMECs 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1 Proteinlysate hergestellt und Western-Blots zum Nachweis der Lamin A/C-Protein-Reduktion angefertigt. Auch in diesen Versuchen diente der gleichzeitige Nachweis von  $\beta$ -Aktin der Standardisierung auf die eventuell unterschiedliche geladene Proteinmenge. Hier wurde die so erhaltene  $\beta$ -Aktin-standardisierte Lamin A/C-Proteinmenge auf die gleichermaßen standardisierte Lamin A/C-Proteinmenge in unbehandelten Kontrollzellen bezogen und so eine prozentuale Reduktion ermittelt.

Da auch in den vorangegangenen Versuchen zur Reduktion der PLK1-mRNA (vgl. Kapitel 5.2.1) mit siRNA2 – 5 in den primären Mammaepithelzellen wesentlich höhere Konzentrationen als in den Krebszelllinien eingesetzt werden mussten, waren auch bei der Behandlung mit siRNA1 zur Erzielung vergleichbarer Hemmeffekte unterschiedliche Konzentrationen erforderlich, und zwar wurden in MCF-7-Zellen 56 nM siRNA1 und in HMECs 2  $\mu$ M siRNA1 eingesetzt. Die unterschiedlichen erforderlichen Konzentrationen ergeben sich aus verschiedenen Transfektionseffizienzen in Krebszelllinien verglichen mit primären Zellen, die wahrscheinlich auf unterschiedlichen Permeabilitäten der Zellmembran beruhen (vgl. Kapitel 5.2.9).

Mit diesen Konzentrationen konnte dann allerdings sowohl in MCF-7-Zellen als auch in HMECs 48 Stunden nach der Transfektion ein (fast) vollständiger Verlust des Lamin A/C-Proteins verzeichnet werden (Abb. 46).

MCF-7





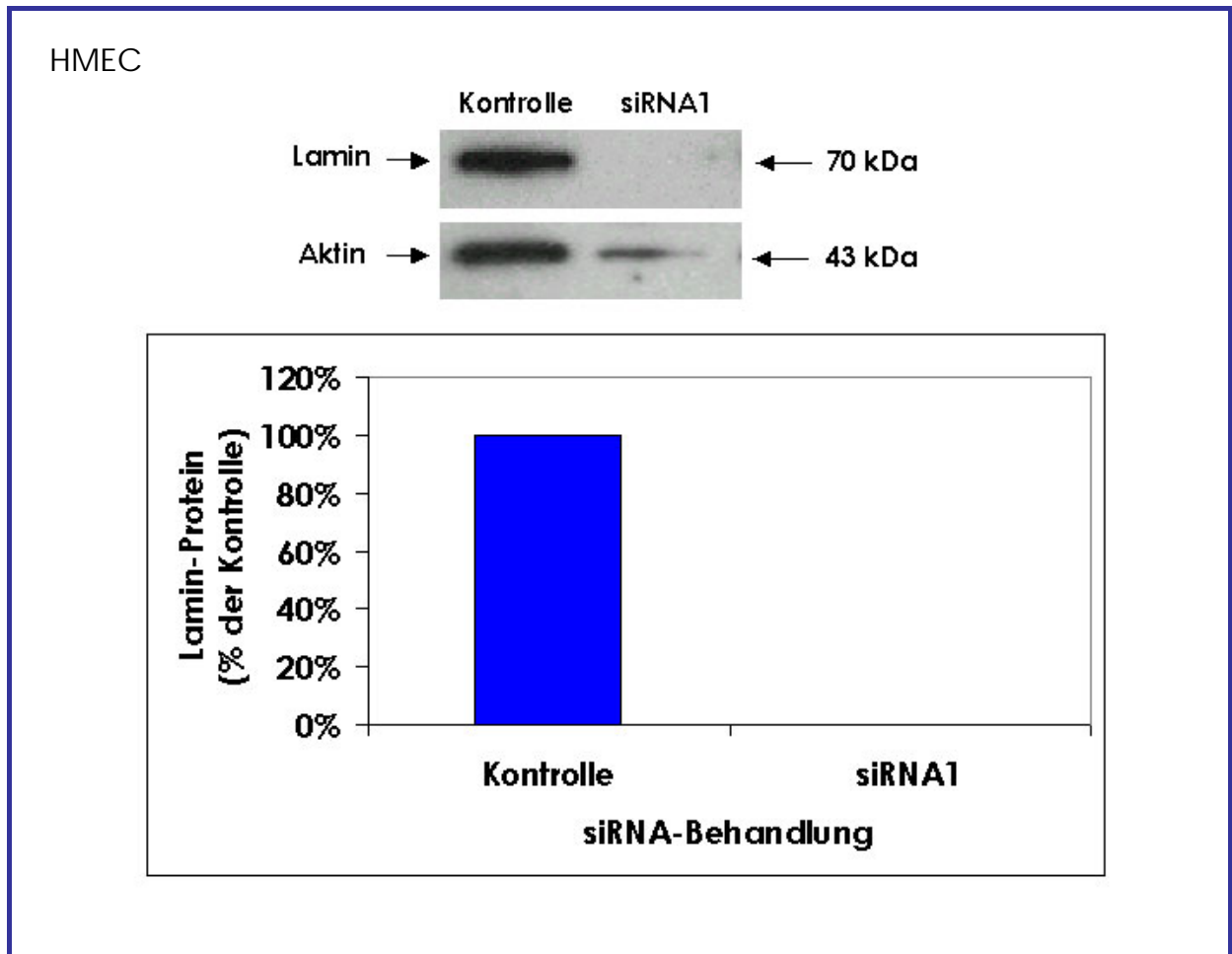


Abbildung 46: Reduktion des Lamin A/C-Proteins in MCF-7-Zellen und HMECs 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1

Behandelt wurde mit siRNA1 in einer Konzentration von 56 nM (MCF-7-Zellen) bzw. 2  $\mu$ M (HMECs). Die Lamin A/C-Protein-Bestimmung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Aktin-standardisierten Lamin A/C-Protein-Spiegel über drei unabhängige Experimente sowie die 95% Konfidenzintervalle.

Zur Spezifität der siRNA-Wirkung lässt sich zusammenfassend an dieser Stelle bereits festhalten, dass die beiden Kontroll-siRNAs – siRNA1 bzw. siRNA4S – im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, die lediglich mit Opti-MEM I ohne siRNA oder Oligofectamin inkubiert wurden, keine Effekte auf die PLK1-mRNA- oder PLK1-Proteinspiegel ausübten. Außerdem blieb die Lamin A/C-Proteinmenge in MCF-7-Zellen und in HMECs durch die Behandlung der Zellen mit siRNA2 – 5 gegen PLK1 unbeeinflusst. Das heißt, durch die siRNA-Behandlung wurde in allen untersuchten Fällen nur die Expression der jeweili-

gen Ziel-mRNA signifikant reduziert, und die Expression anderer mRNAs bzw. Proteine blieb unbeeinflusst.

#### 5.2.4 Untersuchung der Kinaseaktivität von endogenem PLK1

Auch bei der Hemmung der PLK1-Expression mit Hilfe von siRNAs ist es interessant, ob die Reduktion des PLK1-Proteins mit einer verringerten Kinaseaktivität von endogenem PLK1 einhergeht.

Um dies zu analysieren, wurden MCF-7-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA4 bzw. siRNA4S in einer Konzentration von 56 nM geerntet, die endogene Kinase PLK1 immunpräzipitiert und das resultierende Immunpräzipitat einem enzymatischen Test, dem Kinaseassay, unterworfen.

Durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue G-250 konnte bestätigt werden, dass gleiche Mengen des exogenen Substrates, der CRS-(cytoplasmic retention signal)-Region von Cyclin B1 (vgl. Kapitel 2.2.3), eingesetzt worden waren. Im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass auch gleiche Mengen an PLK1 aus der Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Um vergleichbare standardisierte Kinaseaktivitäten zu erhalten, wurde die Phosphorylierung der CRS (gemessen als Bandenintensität) auf die eingesetzte CRS-Menge (ebenfalls als Bandenintensität des Coomassie-gefärbten Gels) standardisiert. Im Prä-Immunpräzipitat zur Negativkontrolle, um unspezifische Phosphorylierungen auszuschließen, konnte keine Kinaseaktivität nachgewiesen werden.

Die Kinaseaktivität, gemessen als Phosphorylierung der CRS-Region von Cyclin B1, konnte durch die siRNA4-Behandlung auf 18% der Kinaseaktivität in Kontrollzellen, die mit Opti-MEM I inkubiert worden waren, reduziert werden (Abb. 47). Durch siRNA4S hingegen wurde die Kinaseaktivität nicht vermindert. Das bedeutet, dass die siRNA-Wirkung auch auf Ebene der Kinaseaktivität zu einer deutlichen Hemmung führt.

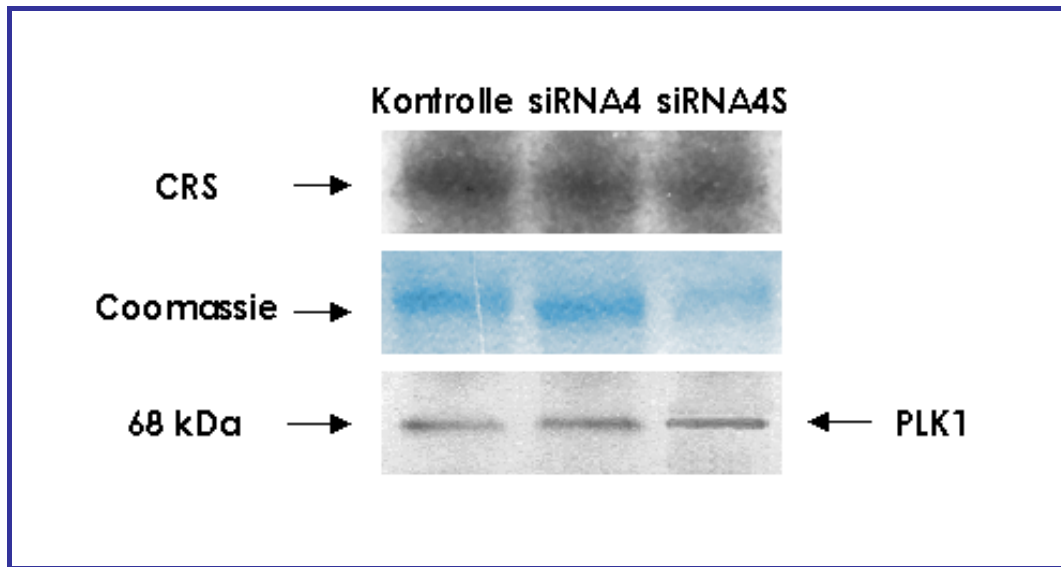


Abbildung 47: Kinaseassay mit PLK1 aus MCF-7-Zellen nach siRNA-Behandlung

Das Autoradiogramm zeigt die Phosphorylierung des Substrats CRS durch endogenes PLK1 aus MCF-7-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA4 bzw. siRNA4S im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Außerdem ist die Coomassie-Brilliant Blue G-250-Färbung desselben Gels dargestellt sowie der Western-Blot der Immunpräzipitate.

### 5.2.5 Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Detektion von morphologischen Veränderungen bei reduziertem PLK1-Proteinspiegel

Um Veränderungen in der Morphologie der transfizierten Zellen aufzudecken, wurde von den vier eingesetzten siRNAs gegen PLK1 (siRNA2 – 5) siRNA4 ausgewählt, da diese siRNA in den vorangegangenen Untersuchungen die stärkste inhibierende Wirkung auf die PLK1-mRNA- und -Protein-Expression zeigte.

Kontrollzellen von allen analysierten Zelllinien bzw. der HMECs, die anstatt mit siRNAs nur mit Opti-MEM I inkubiert wurden, waren jeweils in der Lage, völlig normale Mitosen auszuführen.

Die Zellen hingegen, die mit siRNA4 behandelt wurden, zeigten 48 Stunden nach der Transfektion in Abhängigkeit vom Zelltyp jeweils eine Anreicherung in verschiedenen Stadien der Mitose und damit verbunden abnormale Phänotypen: SW-480-Zellen beispielsweise erreichten nicht die Prophase, wie in der fol-

genden Abbildung 48 (obere Reihe) anhand der fehlenden Chromosomenkondensation (DAPI-Färbung) in den Zellkernen, die für das Erreichen der Prophase typisch wäre, zu erkennen ist. Die  $\gamma$ -Tubulin-Färbung zeigte, dass viele der Zellen getrennte Zentrosomen hatten, die bereits an gegenüberliegende Seiten des Kerns gewandert waren – viel zu früh im Verlaufe des Zellzyklus, denn normalerweise trennen sich die Zentrosomen erst in der Prophase, die die SW-480-Zellen nach siRNA4-Behandlung aber nicht erreichten. Die  $\alpha$ -Tubulin-Färbung schließlich zeigte, dass die Zentrosomen völlig losgelöst von zellulären Strukturen vorlagen, d.h. sie hatten keine Verbindung zu Mikrotubuli, was auf eine durch die PLK1-Reduktion verursachte Störung in der Mikrotubuli-Ausbildung zurückzuführen ist. Wie anhand ihrer DAPI-Fluoreszenz-Intensität zu erkennen ist, befanden sich diese Zellen in der Mitose, obwohl keinerlei Chromatinkondensation zu verzeichnen ist. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Zellen, obwohl ihre Zentrosomen die normale Prophase-Separation vollzogen haben, nach der Transfektion mit siRNA4 in der G<sub>2</sub>-Phase verharren. Die in der unteren Reihe der Abbildung 48 dargestellten Kontrollzellen zeigten normale Zentriolen, die in der frühen Prophase astrale Mikrotubuli organisierten und deren Chromosomen im Kern kondensierten.

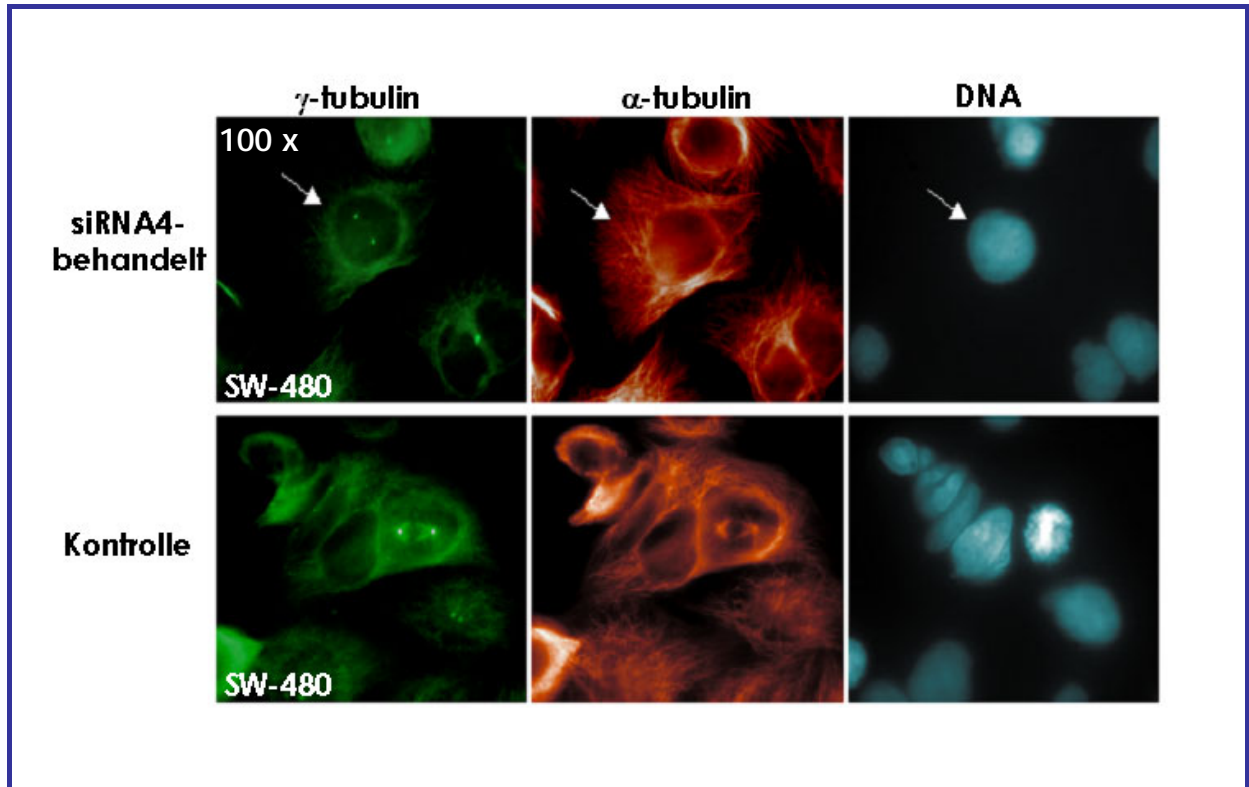


Abbildung 48: Immunfluoreszenzfärbung von SW-480-Zellen nach Behandlung mit siRNAs

Dargestellt sind die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 56 nM siRNA4 im Vergleich zu Kontrollzellen [grün:  $\gamma$ -Tubulin, rot:  $\alpha$ -Tubulin, blau: DNA-Färbung]. Die Pfeile weisen auf eine siRNA4-behandelte Zelle mit den beschriebenen morphologischen Veränderungen.

MCF-7-Zellen hingegen wiesen nach der Transfektion mit siRNA4 im Gegensatz zu den mit siRNA4-transfizierten SW-480-Zellen viele apoptotische Zellkerne auf, allerdings waren bei den adhärennten Zellen keine Mitosen zu finden. Im Überstand dieser Kulturen hingegen fanden sich diverse mitotische Zellen aus verschiedenen Mitosestadien, die offensichtlich die Adhäsion zum Zellkulturgefäß verloren hatten. Meta- oder Telophasen waren allerdings kaum zu finden, und mehr als 90% der mitotischen Zellen enthielten charakteristische kondensierte, „knopfähnliche“ Chromosomen, die in einer Struktur verblieben waren, die noch der Form des Kerns entsprach (Abb. 49). Das heißt, die Kernhülle war bereits aufgelöst, aber keine weiteren mitotischen Ereignisse, wie etwa die Spindelbildung und anschließende Chromosomenseparation, hatten stattgefunden.

den.  $\gamma$ -Tubulin war in diesen Zellen über das gesamte Zytoplasma verteilt, und es waren keine Mikrotubuli zu sehen, was aber auch eine Konsequenz davon sein könnte, dass die Zellen bereits tot waren. In Abbildung 49 sind die Chromosomen der eben beschriebenen MCF-7-Zellen nach der Auflösung der Kernmembran dargestellt. Die Pfeile weisen auf die neben dem Kern liegenden Chromosomen hin.

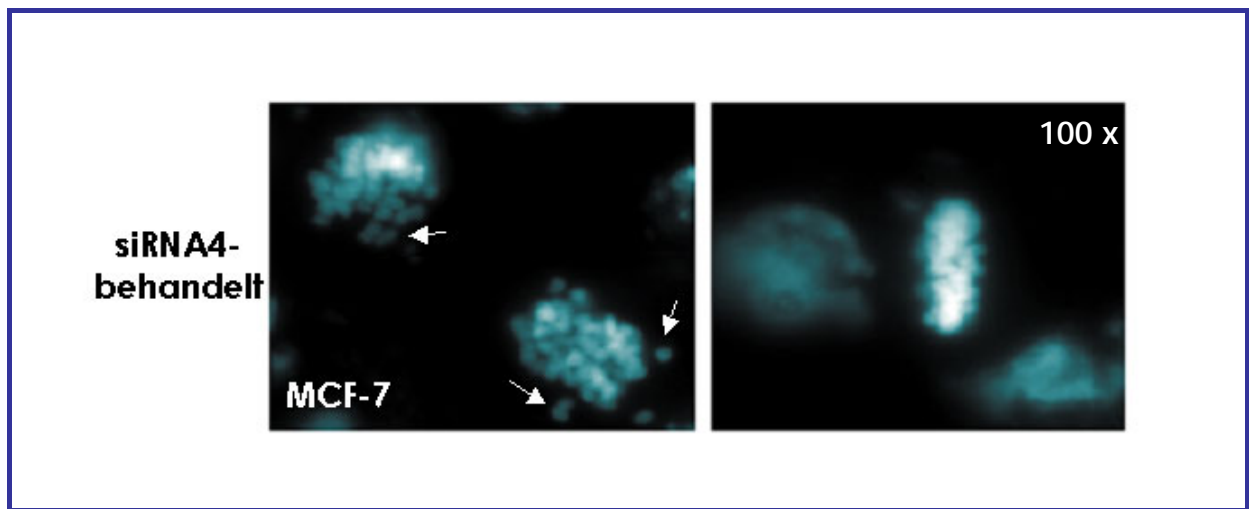


Abbildung 49: **DAPI-Färbung der MCF-7-Zellen aus den Kulturüberständen**

Gezeigt sind die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 56 nM siRNA4 [blau: DNA-Färbung].

Bisherige Vorversuche hatten Belege für eine unterschiedliche Wirkung von siRNAs auf Krebszellen im Vergleich zu normalen primären Zellen erbracht. Es sollte nun untersucht werden, ob auch auf morphologischer Ebene Unterschiede zwischen diesen Zelltypen auftreten. Hierzu wurden HMECs mit siRNA4 in einer Konzentration von 56 nM bzw. mit 2  $\mu$ M behandelt. Die Transfektion mit 56 nM, die in den Krebszelllinien schwerwiegende Störungen in der Morphologie bzw. der Mitose auslösten (Abb. 48 und 49), hatte keinerlei Effekt auf die Morphologie der primären Mammaepithelzellen. Auch die Transfektion mit 2  $\mu$ M siRNA4, die Konzentration, bei der die PLK1-mRNA-Expression in HMECs deutlich reduziert werden konnte (vgl. Kapitel 5.2.1), hatte keinen Effekt auf den Phänotyp der Zellen (Abb. 50). Die Mitosen konnten ungehindert ablaufen, und auch die Morphologie der Zellen wurde nicht verändert.

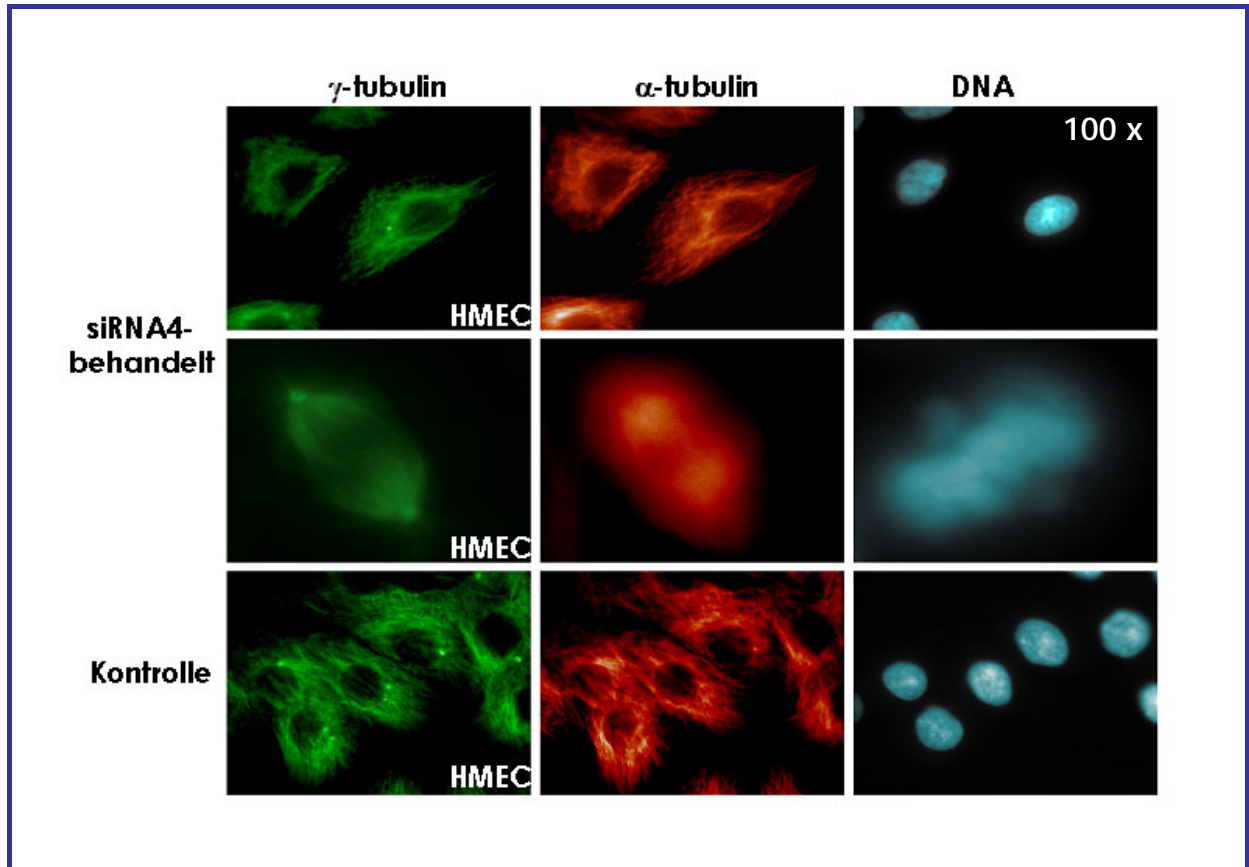


Abbildung 50: Immunfluoreszenzfärbung von HMECs nach Behandlung mit siRNAs

Gezeigt sind die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 2  $\mu$ M siRNA4 im Vergleich zu Kontrollzellen [grün:  $\gamma$ -Tubulin, rot:  $\alpha$ -Tubulin, blau: DNA-Färbung].

### 5.2.6 Immunfluoreszenzuntersuchungen zur Untersuchung der PLK1-Protein-Spiegel in MCF-7-Zellen und in HMECs

Um mit einer weiteren Technik – neben der Western-Blot-Analyse – die Reduktion des PLK1-Proteins zu untersuchen, wurden bei MCF-7-Zellen und bei HMECs Immunfluoreszenzstudien durchgeführt, bei denen  $\alpha$ -Tubulin und PLK1 gefärbt wurden. Die  $\alpha$ -Tubulin-Färbung diente zum einen der Darstellung des Spindelfaserapparates unter siRNA-Behandlung gegen PLK1, zum anderen diente sie zur Abgrenzung der Zellen gegeneinander und zur genauen Beurteilung der Zellzyklusphase, in der sich die jeweilige Zelle gerade befindet.

Bei diesen Färbungen zeigte sich für beide Zelltypen eine deutliche PLK1-Reduktion (Abb. 51). Bei unbehandelten MCF-7-Zellen waren viele Mitosen erkennbar, die entsprechend der hohen PLK1-Expression in Karzinomzelllinien normal abliefen. In den siRNA4-behandelten MCF-7-Zellen waren insgesamt nur sehr wenige mitotische Zellen zu finden. Die wenigen vorhandenen Mitosestadien zeigten darüber hinaus eine abnormale Morphologie (keine Ausrichtung der Mikrotubuli an den Zentrosomen, keine Zentrosomen-Separation, keine Chromosomen-Anordnung) und keine PLK1-Färbung (Abb. 51, untere Reihe). In HMECs sind kaum Mitosen zu finden, daher musste der Vergleich der PLK1-Färbung in Interphase-Zellen erfolgen. Doch auch hier konnte – obwohl sich die PLK1-Protein-Expression in diesem Zellsystem nahe der Nachweisgrenze bewegt – eine Reduktion in den siRNA4-transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen gezeigt werden (Abb. 51, obere Reihe).



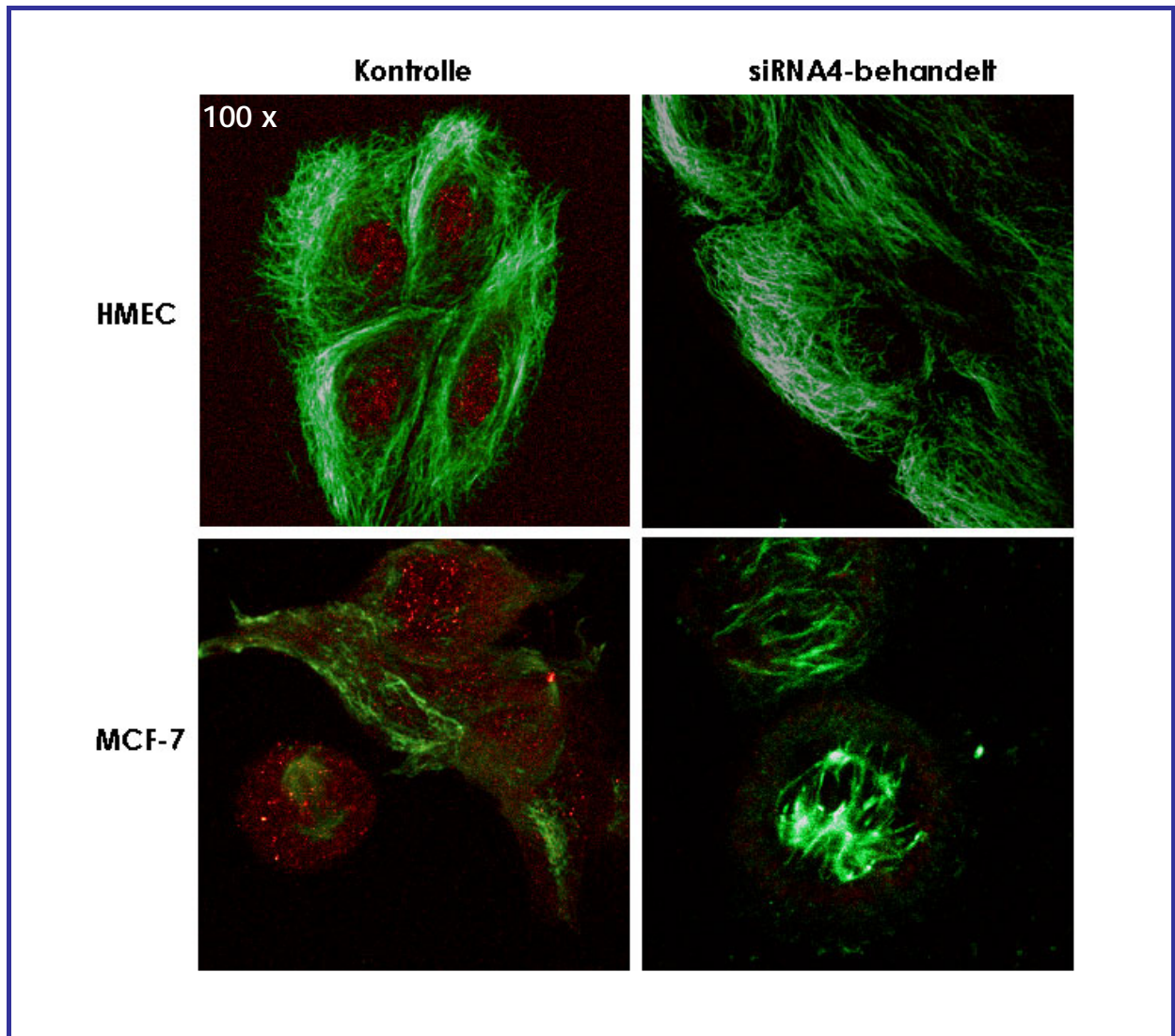


Abbildung 51: PLK1-Färbung in MCF-7-Zellen und in HMECs

Gezeigt sind in der oberen Zeile HMECs 24 Stunden nach der Transfektion mit 2  $\mu$ M siRNA4 sowie Kontrollzellen, in der unteren Zeile MCF-7-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 56 nM siRNA4 bzw. Kontrollzellen [rot: PLK1, grün:  $\alpha$ -Tubulin].

### 5.2.7 Durchflusszytometrie (FACScan-Analyse) zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung und zur Detektion von Apoptose, Apoptosenachweis mittels DNA-Färbung und Phasenkontrastmikroskopie

Um zu überprüfen, ob die Behandlung der Zellen mit siRNA gegen PLK1 und die dadurch verursachte Reduktion der PLK1-mRNA bzw. des PLK1-Proteins mit der Anreicherung der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase einhergehen,

wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und mit Propidiumiodid angefärbt, um die Menge an DNA aufgrund ihrer Fluoreszenz zu erfassen.

Alle untersuchten Krebszelllinien zeigten nach Transfektion mit siRNAs gegen PLK1 in einer Konzentration von 56 nM eine starke Anreicherung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, die jedoch bei den einzelnen Zelltypen unterschiedlich ausgeprägt war. Nach der Transfektion mit siRNA4 war bei SW-480-Zellen der Anteil an Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase auf das Fünffache im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen erhöht, bei MCF-7-Zellen auf das Dreifache, bei HeLa S3-Zellen auch auf das Fünffache und bei A549-Zellen auf das Doppelte (Abb. 52, linke und mittlere Spalte).

Im Gegensatz dazu zeigten HMECs nach der Transfektion mit 2 µM siRNA4 nur eine schwache Anreicherung in der G<sub>2</sub>/M-Phase, nämlich eine Erhöhung um 32%.

Der Effekt, den siRNA5 auf die Zellzyklusverteilung aller untersuchter Zelllinien hatte, war vergleichbar zu der von siRNA4 hervorgerufenen G<sub>2</sub>/M-Anreicherung. siRNA2 und siRNA3 hatten variable Effekte auf die Zellzyklusverteilung, in MCF-7- und SW-480-Zellen zeigten beide eine schwache G<sub>2</sub>/M-Anreicherung (Zunahme von 10 – 40%), in HeLa S3- und A549-Zellen verursachten beide eine Erhöhung des Anteils der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, der dem von siRNA4 verursachten Effekt ungefähr entsprach. In keiner dieser Analysen konnte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen ein Effekt der beiden Kontroll-siRNAs siRNA1 oder siRNA4S auf die Zellzyklusverteilung beobachtet werden (Abb. 52, rechte Spalte).

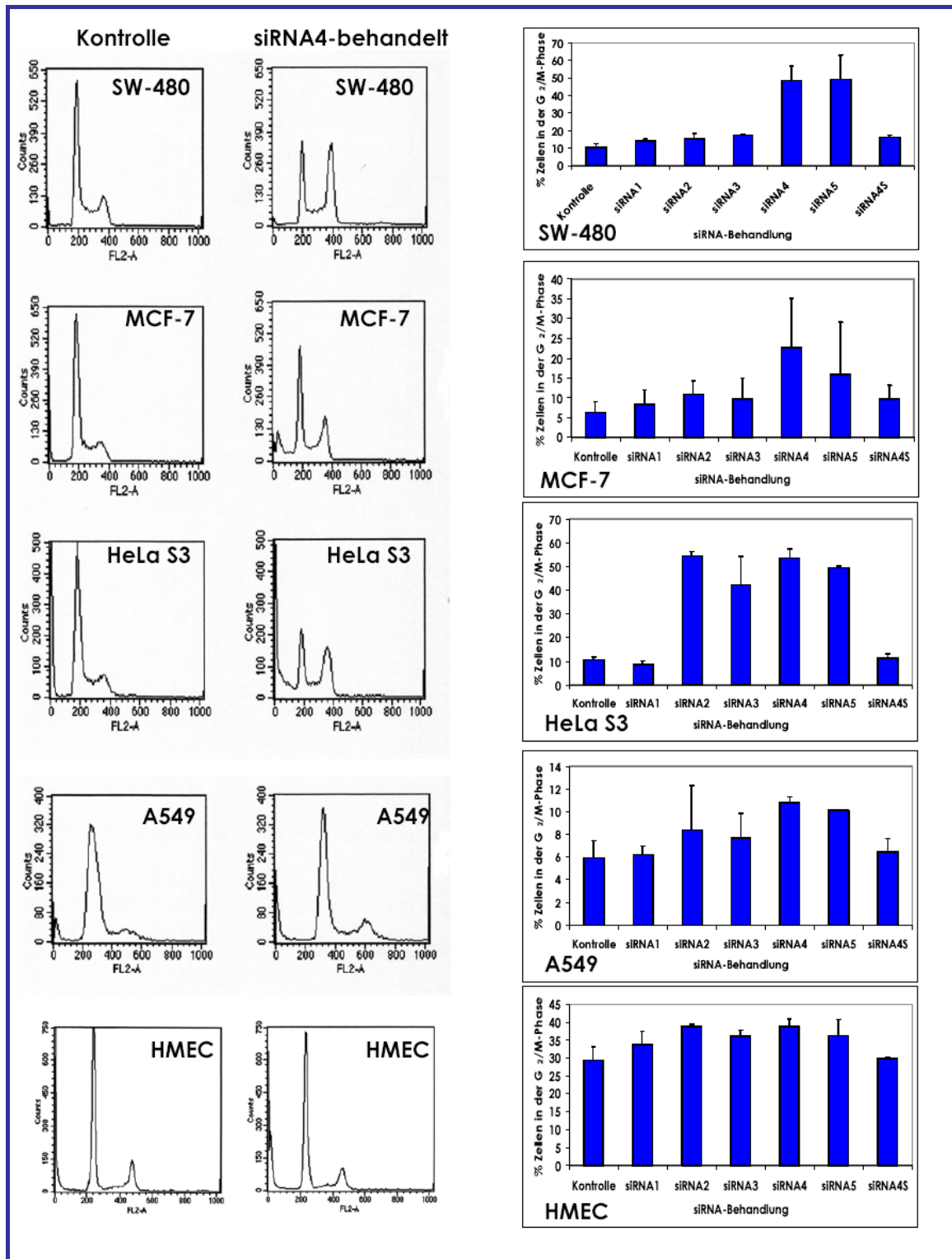


Abbildung 52: Zellzyklusverteilung der Krebszelllinien und der primären humanen Mammaepithelzellen nach siRNA-Behandlung

Gezeigt sind die Diagramme der FACScan-Analyse der verschiedenen Zelltypen (je Kontrollzellen, siRNA4-behandelte [56 nM Krebszelllinien, 2  $\mu$ M HMECs]) sowie die graphische Auswertung des prozentualen Anteils der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase aller Behandlungen 48 Stunden nach der Transfektion.

In DAPI-gefärbten MCF-7-Zellen konnte 48 Stunden nach der Transfektion mit 56 nM siRNA4 eine größere Anzahl an apoptotischen Zellen (charakterisiert durch ihre aufgelöste Zellmembran und kondensiertes Chromatin) nachgewiesen werden als in den unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 53, untere Reihe). Im Vergleich dazu war bei HMECs nach der Transfektion mit 2  $\mu$ M siRNA4 kein Unterschied zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen feststellbar (Abb. 53, obere Reihe).

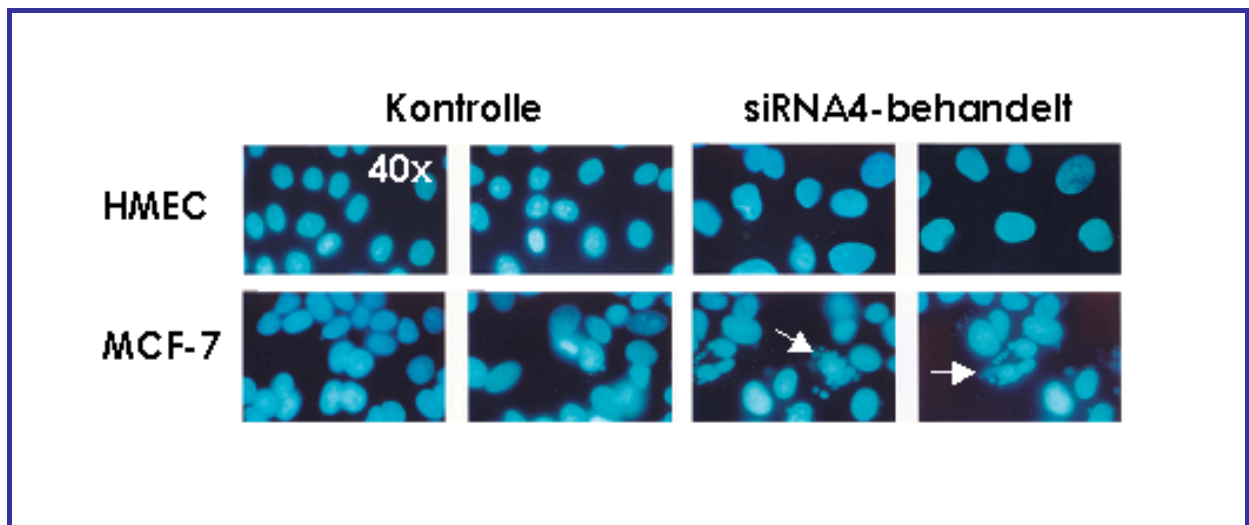


Abbildung 53: **DNA-Färbung von MCF-7-Zellen und HMECs zum Nachweis von apoptotischen Zellen nach siRNA-Behandlung**

Gezeigt sind die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA4 (MCF-7: 56 nM siRNA4; HMECs: 2  $\mu$ M siRNA4). [blau: DNA-Färbung]. Die Pfeile zeigen auf apoptotische Zellkerne in den siRNA4-behandelten MCF-7-Zellen.

Bei Analysen mit dem konfokalen Laserscan-Mikroskop konnte im Phasenkontrastbild in siRNA4-transfizierten MCF-7-Zellen ebenfalls eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. In der folgenden Abbildung 54 sind die apoptotischen Zellkerne durch weiße Pfeile gekennzeichnet, zwei normale Zellkerne sind zum Vergleich mit gelben Pfeilen markiert.

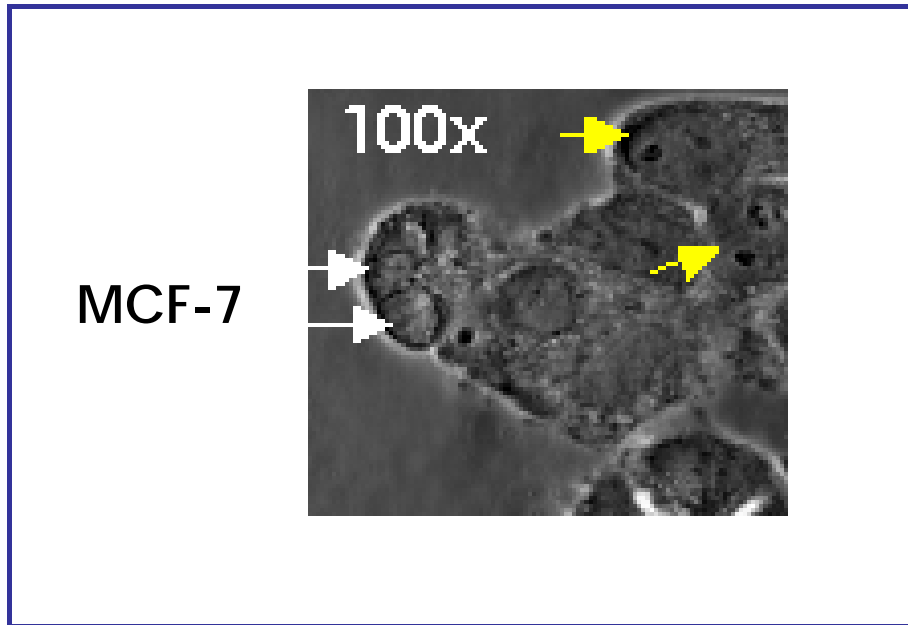


Abbildung 54: **Phasenkontrastaufnahme von siRNA4-behandelten MCF-7-Zellen**

Es sind 48 Stunden nach der Transfektion mit 56 nM siRNA4 zwei apoptotische Zellkerne mit aufgelöster Zellmembran und kondensiertem Chromatin dargestellt (weiße Pfeile) sowie zwei normale Zellkerne zum Vergleich (gelbe Pfeile).

Um dem Zusammenhang zwischen reduzierten PLK1-Spiegeln mit dem Auftreten der Apoptose weiter nachzugehen, wurde die Zunahme des sub-2N-DNA-Gehaltes mittels FACScan-Analyse bestimmt. Der sub-2N-DNA-Gehalt ist ein Indikator für apoptotische Zellen, da im Rahmen der Apoptose die DNA in einzelne Teile zerfällt. Normalerweise besitzt die Interphase-Zelle einen 2N-DNA-Gehalt, der in der S-Phase verdoppelt wird. Der Zerfall der DNA in kleinere Bruchstücke findet in Zellkultur etwa zwei Stunden nach Auslösung des programmierten Zelltodes statt (Lewin B. 2002). Der Zellkern wird dabei fragmentiert (vgl. Abb. 54). Zuletzt zerfallen die toten Zellen in membrangebundene Stücke, so dass der sub-2N-DNA-Gehalt nachweisbar ist.

Dabei zeigte sich nach der Transfektion mit 56 nM siRNA4 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen eine Erhöhung des sub-2N-DNA-Gehaltes von 1 – 5% bei den Kontrollzellen auf 17% in SW-480-Zellen, auf 33% in MCF-7-Zellen, auf 50% in HeLa S3-Zellen und auf 13% in A549-Zellen nach siRNA4-Behandlung. Durch die Transfektion mit siRNA1 oder siRNA4S wurde der sub-2N-DNA-Gehalt

nicht verändert. Auch die Transfektion der HMECs mit 2  $\mu$ M siRNA4 veränderte den sub-2N-DNA-Gehalt verglichen mit untransfizierten Zellen nicht.

Damit konnten weitere Hinweise für eine selektive Wirkung der siRNAs gegen PLK1 in Krebszelllinien verglichen mit primären Zellen geliefert werden. Diese wurden durch die Untersuchungen, die in den Kapiteln 5.2.8 und 5.2.9 beschrieben werden, noch untermauert.

### 5.2.8 Antiproliferative Wirkung der siRNAs gegen PLK1 auf Krebszelllinien

Das Entscheidende bei einem möglichen neuen Therapieansatz gegen Krebs ist die Voraussetzung, dass Krebszellen spezifisch und selektiv an der Proliferation gehindert werden müssen, während die Zellteilung der normalen, primären Zellen bzw. Gewebe möglichst unbeeinträchtigt bleibt. Um einen potenziellen Unterschied näher zu beleuchten, wurde das Proliferationsverhalten von Krebszelllinien und primären Mammaepithelzellen nach der Transfektion mit siRNAs in verschiedenen Konzentrationen gegen PLK1 über einen Zeitraum von bis zu 96 Stunden ermittelt.

Dabei zeigten alle siRNAs in MCF-7-Zellen eine statistisch signifikante Reduktion der Zellteilung: siRNA2 reduzierte die Proliferation um 83% ( $p < 0,05$ ; 95% CI = 27 – 138%), siRNA3 um 81% ( $p < 0,05$ ; 95% CI = 49 – 113%), siRNA4 um 97% ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 82 – 111%) und siRNA5 um 89% ( $p < 0,05$ ; 95% CI = 68 – 112%) (Abb. 55). Der Bezugspunkt für diese Reduktionen waren die Zellzahlen der unbehandelten Kontrolle 96 Stunden nach der Transfektion. In diesem Experiment konnte keine inhibierende Wirkung durch das Transfektionsreagenz Oligofectamin oder durch die Kontroll-siRNA siRNA1 beobachtet werden.

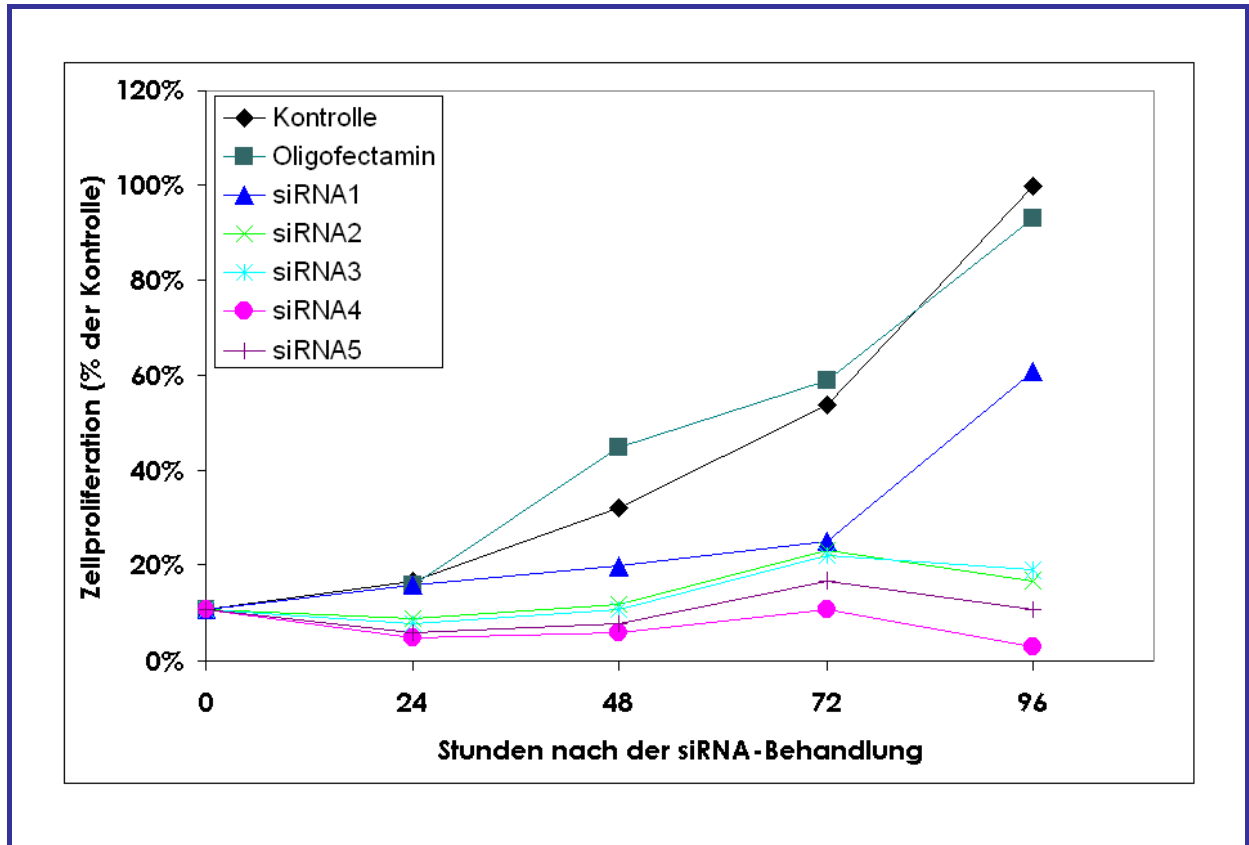


Abbildung 55: **Antiproliferative Wirkung von siRNAs gegen PLK1 in MCF-7-Zellen**

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1 – 5 in einer Konzentration von 56 nM im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der Oligofectamin-Kontrolle. Es sind hierbei keine 95% Konfidenzintervalle dargestellt, um bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

Zur weiteren Evaluation der Spezifität wurden MCF-7-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (5,6 nM, 56 nM bzw. 566 nM) von siRNA1, siRNA4 und siRNA4S inkubiert und über einen Zeitraum von 72 Stunden die Zellzahlen ermittelt (Abb. 56). Hier konnte eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Zellteilung durch siRNA4 nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden waren bei Gabe von siRNA4 in allen Konzentrationen die Zellen vollständig abgestorben. Die mit siRNA1 oder siRNA4S transfizierten Zellen zeigten in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Hemmung der Proliferation, sondern teilten sich im gleichen Maße weiter wie die Oligofectamin-behandelten MCF-7-Zellen (Abb. 56).



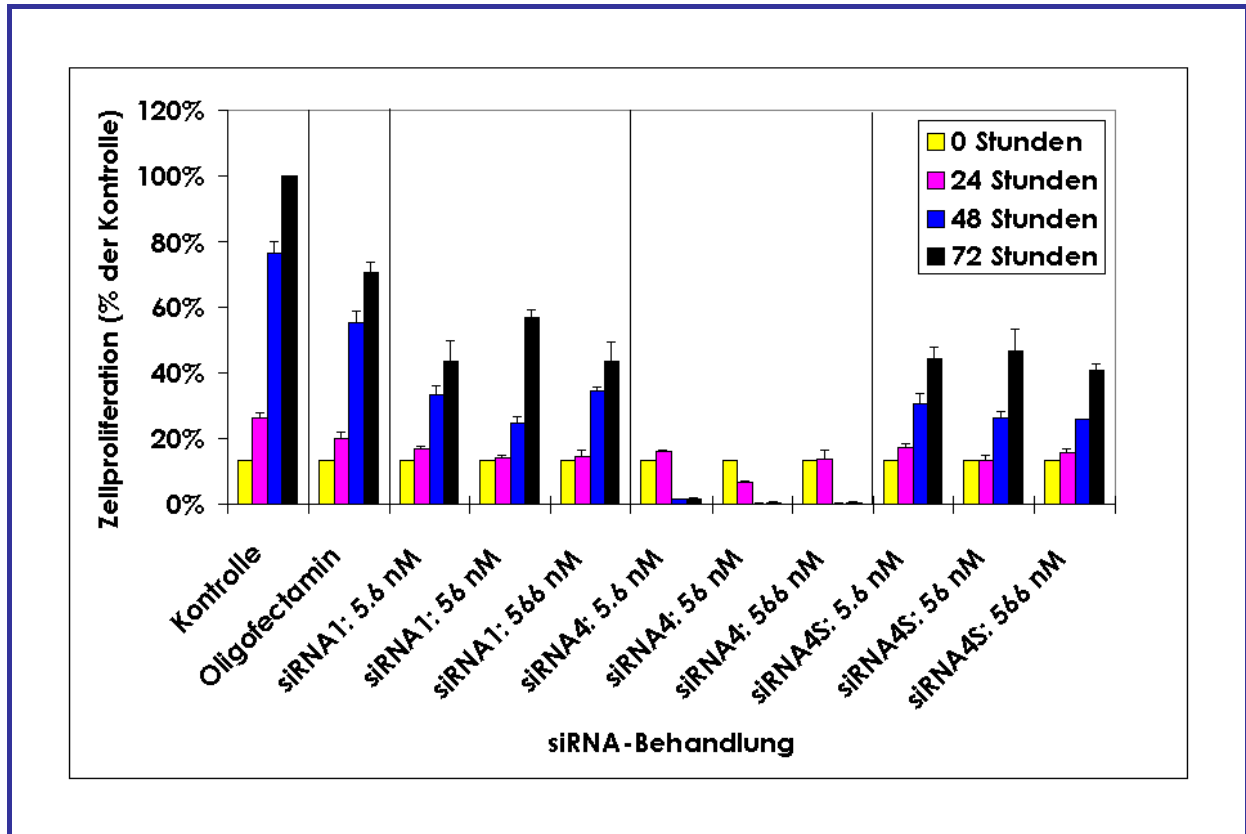


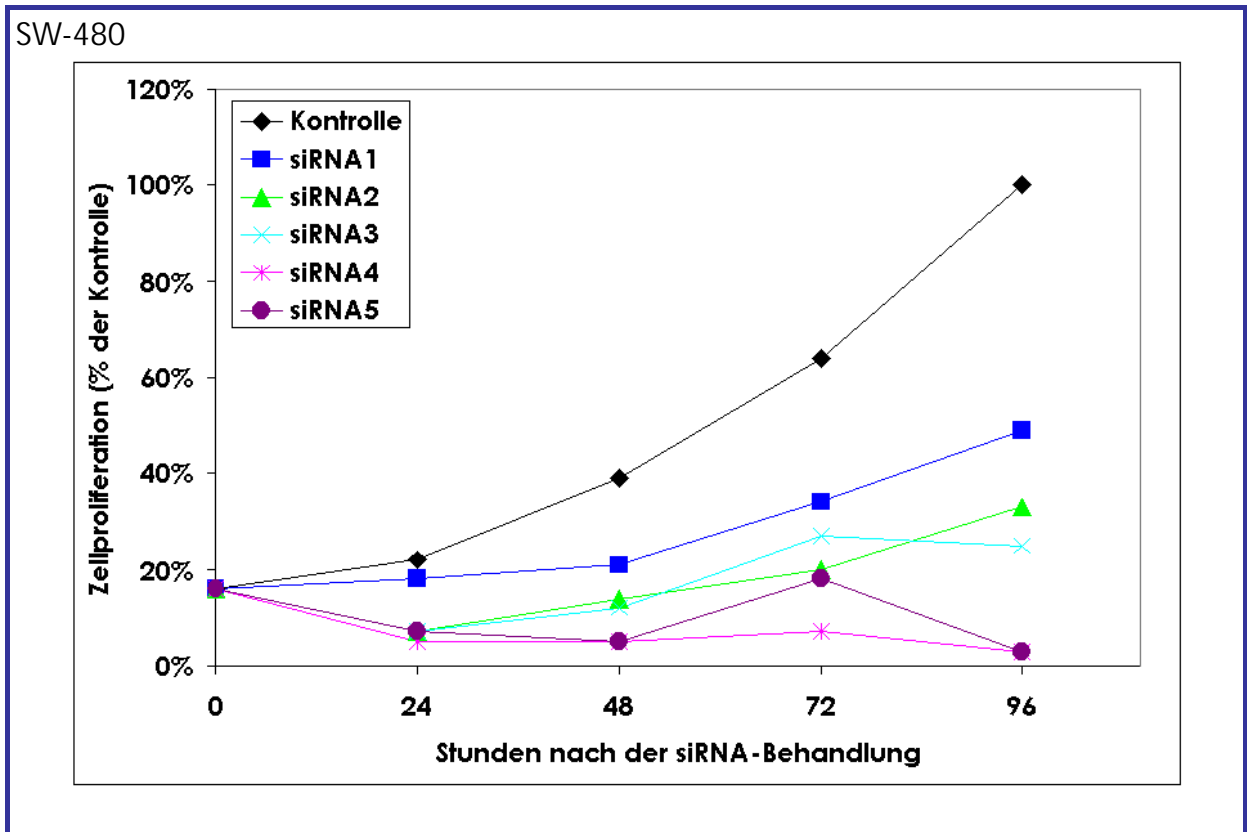
Abbildung 56: Konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation durch siRNA4 in MCF-7-Zellen

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1, siRNA4 und siRNA4S in verschiedenen Konzentrationen von 5,6 – 566 nM im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der Oligofectamin-Kontrolle. Zusätzlich zu den Mittelwerten sind die 95% Konfidenzintervalle dargestellt.

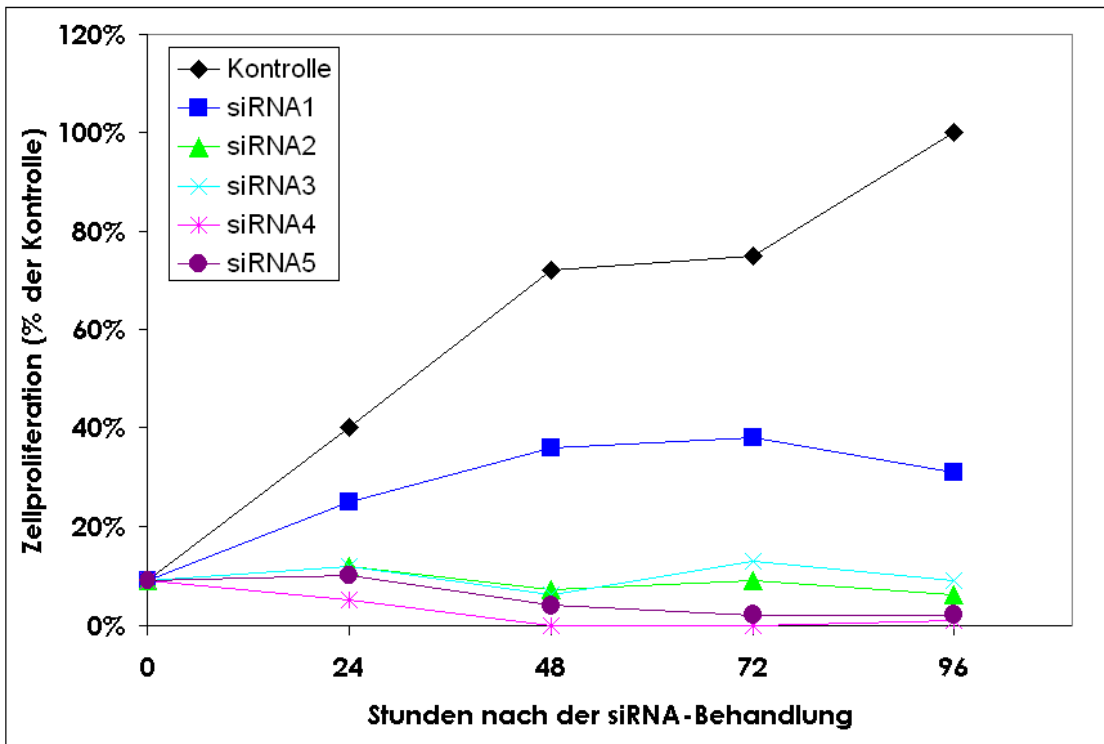
In den anderen untersuchten Krebszelllinien kam es ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Hemmung der Proliferation durch PLK1-spezifische siRNAs (56 nM). Dabei wurde die Proliferation in SW-480-Zellen nach 96 Stunden durch siRNA2 um 67% ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 55 – 79%), durch siRNA3 um 75% ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 73 – 77%), durch siRNA4 um 97% ( $p < 0,001$ ; 95% CI = 95 – 99%) und durch siRNA5 um 98% reduziert ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 95 – 99%). In HeLa S3-Zellen reduzierte siRNA2 die Proliferation nach 96 Stunden um 94% ( $p < 0,05$ ; 95% CI = 94 – 96%), siRNA3 um 91% ( $p < 0,05$ ; 95% CI = 84 – 98%), siRNA4 um 99% ( $p < 0,05$ ; 95% CI = 98 – 101%) und siRNA5 um 98% ( $p < 0,05$ ; 95% CI = 91 – 102%). In A549-Zellen kam es



nach 96 Stunden zu folgenden Reduktionen der Proliferation: siRNA2 71% ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 62 – 79%), siRNA3 66% ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 64 – 68%), siRNA4 75% ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 73 – 77%) und siRNA5 73% ( $p < 0,01$ ; 95% CI = 71 – 75%). Die Zahlenwerte für die prozentuale Proliferation der verschiedenen Zelllinien sind in der folgenden Abbildung 57 zusammengefasst und graphisch dargestellt.



HeLa S3



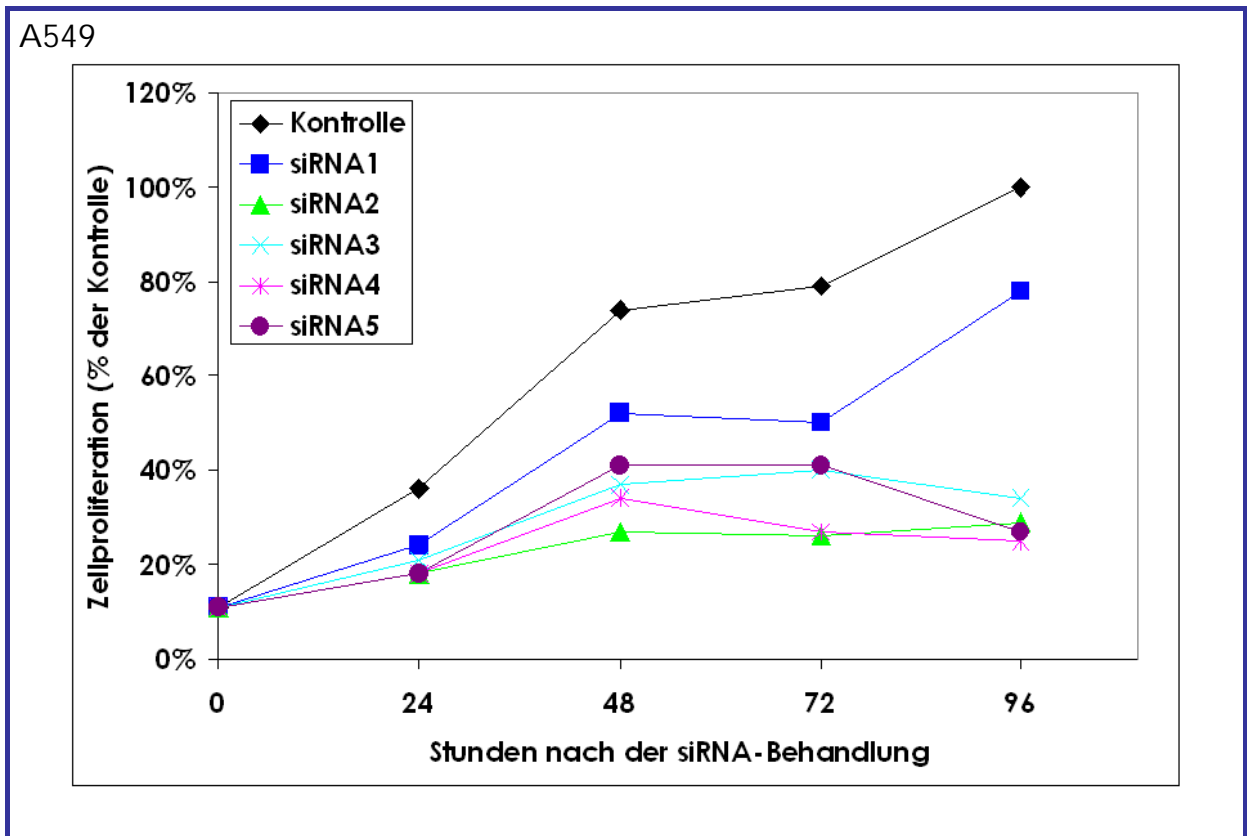


Abbildung 57: Antiproliferative Wirkung von siRNAs gegen PLK1 in SW-480-, HeLa S3- und A549-Zellen

Dargestellt ist für alle drei Zelllinien die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1 – 5 in einer Konzentration von 56 nM im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Es sind keine 95% Konfidenzintervalle dargestellt, um bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

Wie bei den in den vorigen Kapiteln beschriebenen Untersuchungen waren auch bei der Bestimmung der Zellproliferation die primären Mammaepithelzellen wesentlich weniger empfindlich als die Krebszelllinien. Bei den in Abbildung 56 gezeigten MCF-7-Zellen war eine Proliferationsreduktion durch siRNA4 von 84% 24 Stunden nach der Transfektion bereits mit einer Konzentration von 5,6 nM zu beobachten, bei HMECs hingegen waren für eine Proliferationsreduktion von 78% nach 24 Stunden 2  $\mu$ M siRNA4 erforderlich (Abb. 58). Außerdem war bei den HMECs nur eine temporäre Proliferationsverzögerung zu verzeichnen, denn nach 96 Stunden hatten alle siRNA4-behandelten Zellen unabhängig von

der Konzentration der transfizierten siRNA4 wieder ihre normale Proliferationsaktivität erreicht, und ihre Zellzahlen entsprachen wieder denen der Kontrollen.

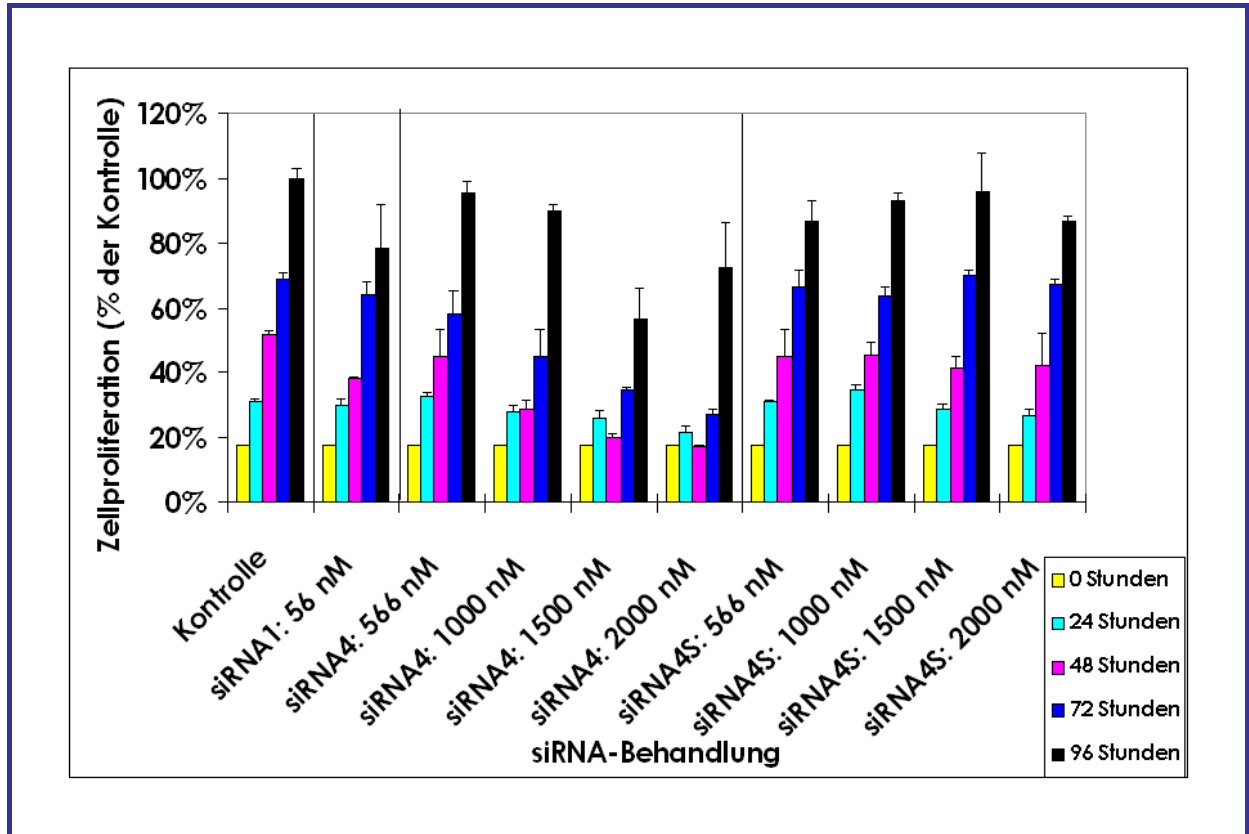


Abbildung 58: Proliferation von HMECs nach Transfektion mit aufsteigenden Konzentrationen von siRNA4, siRNA1 bzw. siRNA4S

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion mit siRNA1, siRNA4 und siRNA4S in Konzentrationen von 566 nM – 2  $\mu$ M im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der siRNA1-Kontrolle (56 nM). Zusätzlich zu den Mittelwerten sind die 95% Konfidenzintervalle dargestellt.

### 5.2.9 Vergleich der Transfektionseffizienzen in MCF-7-Zellen und HMECs

Um eine Erklärung dafür zu finden, dass für die Hemmung von primären HMECs wesentlich höhere siRNA4-Konzentrationen erforderlich waren als in den untersuchten Krebszelllinien (z.B. MCF-7-Zellen), wurde die Transfektionseffizienz in

diesen beiden Zelltypen für verschiedene siRNA4-Konzentrationen untersucht. Unterschiede in der Transfektionseffizienz könnten eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelltypen gegenüber den siRNAs gegen PLK1 oder gegen die Lamine A/C darstellen.

Zu diesem Zweck wurde Fluorescein-markierte siRNA4 eingesetzt, so dass nach der Transfektion im Durchflusszytometer die transfizierten Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenz identifiziert werden konnten und damit in Bezug zur Gesamtzellzahl (10.000 analysierte Zellen) gesetzt werden konnten. Nach Abzug eines Fluoreszenz-Hintergrundes, der alleine aufgrund der Farbstoffe im Medium immer besteht, konnte anschließend der Prozentsatz an transfizierten Zellen berechnet werden. Die eingesetzten Konzentrationen reichten von 56 nM bis 2 µM. In diesem Konzentrationsbereich waren für MCF-7-Zellen kaum Unterschiede in der Transfektionseffizienz erkennbar (56 nM: 89,8%; 100 nM: 89,4%, 150 nM: 89,3% und 1 µM: 89,3%). In HMECs waren substantielle Unterschiede nachweisbar, denn mit 56 nM konnten lediglich 49,2% der analysierten Zellen transfiziert werden, bei 1 µM waren es immerhin schon 71,3%, aber erst bei einer Konzentration von 2 µM konnte eine den MCF-7-Zellen vergleichbare Transfektionseffizienz von 75,7% erreicht werden. Die Aufnahme der Fluorescein-markierten siRNA4 ist für beide Zelltypen in Abbildung 59 dargestellt.

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede liegt in der unterschiedlichen Permeabilität der Zellmembran in Krebszellen verglichen mit primären Zellen (Caruso R.A. et. al. 2001; Mullin J.M. et. al. 2000).

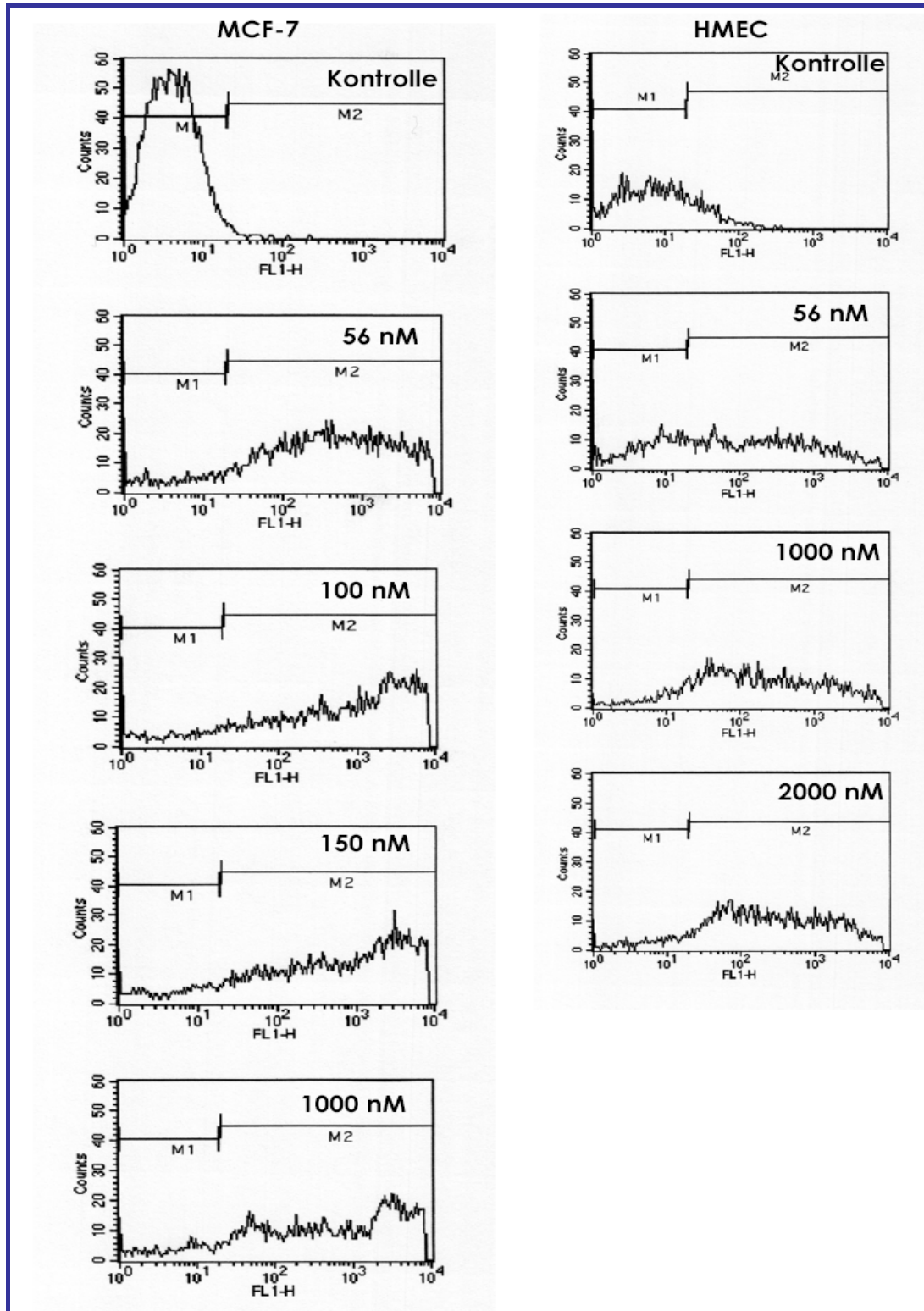


Abbildung 59: Oligofectamin-vermittelte Aufnahme Fluorescein-markierter siRNA4 in MCF-7-Zellen verglichen mit HMECs

Darstellung der Ergebnisse der FACScan-Analyse, in der die Anzahl der Zellen (y-Achse), die eine bestimmte Fluoreszenz enthalten (x-Achse) 24 Stunden nach der Transfektion mit verschiedenen siRNA4-Konzentrationen aufgetragen ist.

### 5.2.10 Xenograft-Experimente mit synthetischer siRNA

Da siRNAs gegen PLK1 bei wesentlich geringeren Konzentrationen zu einer starken Hemmung der PLK1-Expression führten, als dies für ASOs der Fall war, sollte auch mit dieser potenten Technik der Versuch unternommen werden, das Wachstum von Tumoren im humanen Xenograft-Modell zu hemmen.

In den ersten Versuchen, die mit chemisch synthetisierter, entsalzter und Gel-aufgereinigter siRNA (siRNA4 und siRNA4S) der Firma Dharmacon an den humanen Tumormodellen MCF-7 und SW-480 durchgeführt wurden, konnte durch die siRNA4-Behandlung keine signifikante Reduktion des Tumorwachstums in Nacktmäusen im Vergleich zu den Kontrollen, die siRNA4S oder nur PBS erhielten, erzielt werden. Hierbei wurden drei verschiedene siRNA4-Konzentrationen eingesetzt (44,2 µg/kg Körpergewicht/Tag, 442 µg/kg Körpergewicht/Tag und 4,42 mg/kg Körpergewicht/Tag), um ein Spektrum abzudecken, in dem im Vergleich zu den Konzentrationsbereichen in den Xenograft-Experimenten mit ASOs eine Wirkung erzielt worden war.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass siRNAs ohne Transfektionsvermittler nicht von den Zellen aufgenommen wurden, so dass im nächsten Experiment mit MCF-7-Xenograft-Tieren die siRNAs in einer Konzentration von 442 µg/kg Körpergewicht/Tag vor der Injektion mit dem Transfektionsvermittler Oligofectamin gemischt wurden. Oligofectamin ist in Zellkultur ein sehr wirksames Reagenz, um die siRNAs in die Zellen einzuschleusen und damit das Hindernis der lipophilen Zellmembran zu überwinden (vgl. Kapitel 5.2.9), so dass auch für die *in vivo*-Untersuchungen berechtigte Hoffnung bestand, dass mit dieser Ergänzung Erfolge erzielt werden können. Doch auch diese Experimente führten nicht zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums.

Der nächste Ansatzpunkt für die Erzielung einer biologischen Wirkung war, die Stabilität der siRNAs im Blut der Tiere zu erhöhen, denn siRNAs könnten im Blut schnell von Nukleasen abgebaut werden und damit vor Erreichen des Wirkortes inaktiviert sein. Zu diesem Zweck wurde RNasin<sup>®</sup>, ein Nukleaseinhibitor, verwendet, der vor der Injektion mit der siRNA (442 µg/kg Körpergewicht/Tag) gemischt wurde. Es wurden 250 Units RNasin<sup>®</sup> pro 442 µg siRNA eingesetzt,

doch auch diese Versuche mit MCF-7-Xenograft-Tieren führten nicht zur Wachstumshemmung der Tumoren.

Weiterhin wurden Versuche mit den chemisch synthetisierten siRNAs (siRNA4 und siRNA4S) der Firma Ribopharma AG durchgeführt, die keine Modifikation am 3'-Ende aufwiesen, also nicht den üblichen 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen besaßen, um zu überprüfen, ob siRNAs ohne diesen Überhang eventuell eine höhere Stabilität *in vivo* besitzen. Denn mit dieser siRNA4 konnte im *in vitro*-Vorversuch eine leicht effizientere Hemmung der Zellproliferation als mit den siRNAs der Firma Dharmacon mit 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen erzielt werden. Eine Wachstumsretardierung konnte aber im *in vivo*-Experiment weder mit A549- noch mit MCF-7-Xenograft-Tumoren verglichen mit der siRNA4S-Kontrolle und der Kontrollgruppe, die nur PBS injiziert bekam, erzielt werden. Hierbei lag die eingesetzte Konzentration für beide siRNAs bei 3,33 mg/kg Körpergewicht/Tag, also fast im Konzentrationsbereich, der bei *in vivo*-Experimenten mit ASOs erforderlich ist.



### 5.3 In vitro- und in vivo-Behandlung von HeLa S3-Zellen mit Expressionsplasmiden für hairpin-RNAs (shRNAs)

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, zu überprüfen, ob mit Plasmid-basierter Expression von shRNAs, bestehend aus der 21-Nukleotid-langen Sequenz für die PLK1-spezifische siRNA2, einer 6-Nukleotid-langen Verbindungsschleife und der invertierten 21-Nukleotid-langen Sequenz, die PLK1-Expression und die Proliferation von Krebszelllinien genauso effizient gehemmt werden kann, wie mit den in den vorangegangenen Kapiteln 5.2.1 – 5.2.10 ausführlich beschriebenen synthetischen siRNAs. Ist dies der Fall, so wäre die Herstellung über murine oder humane U6-Promoter eine Alternative zu den chemisch synthetisierten siRNAs, mit der immense Ausgaben – gerade im Hinblick auf eine mögliche Krebstherapie – gespart werden könnten und mit der die Herstellung der siRNAs bzw. shRNAs flexibler gehandhabt werden könnte. Auch ist der Effekt, der mit der synthetischen siRNA erzielt werden kann, lediglich von vorübergehender Natur, weshalb immer wieder siRNA zugeführt werden muss, um das „Silencing“-Signal aufrecht zu halten. Mit einer Vektor-basierten Strategie können bis zu  $5 \times 10^6$  shRNA-Moleküle pro Zelle exprimiert werden, so dass eine einmalige Zufuhr der Expressionsplasmide genügt, um dauerhaft ein starkes Signal auszuüben.

Zur Expression der shRNAs, die im folgenden zur Hemmung der PLK1-Expression eingesetzt werden sollten, wurde eine RNA-Polymerase III-basierte Strategie angewandt (Sui G. et. al. 2002), bei der shRNAs mit definierten Enden erhalten werden können, da keine Teilsequenzen des Promoters mit transkribiert werden. RNA-Polymerase III steuert in der Zelle die Expression von tRNAs und von kurzen RNAs, weshalb sie sich auch für die Synthese der siRNAs oder shRNAs anbietet.

Aufgrund der Anforderungen an das +1 Nukleotid der RNA III-Polymerase im U6-Promoter („G“) wurde für diesen Syntheseweg die in Kapitel 4.1.4.2 beschriebene Sequenz für siRNA2 verwendet, um pBS/U6/shRNA/PLK1 zu konstruieren, da dies die einzige der untersuchten siRNA-Sequenzen ist, die mit ei-

nem Guanosin am 5'-Ende startet. Außerdem wurde für diesen Teil der Untersuchungen zur Hemmung der PLK1-Expression auch eine hierzu korrespondierende „scrambled“-Sequenz (pBS/U6/shRNA/PLK1S) konstruiert, die die gleiche Basenzusammensetzung hat wie shRNA/PLK1.

Da in den U6-Promoter sowohl die Sequenz für siRNA2 als auch die invertierte Sequenz – getrennt durch eine Verbindungsschleife von 6 Nukleotiden – kloniert werden, ist davon auszugehen, dass sich nach der Expression in der Zelle hairpin-Strukturen ausbilden, die von Dicer erkannt werden (vgl. Kapitel 2.5.4) und zur Zerstörung der komplementären mRNA führen. Im Unterschied zu den synthetisch hergestellten siRNAs enthalten die auf diese Weise exprimierten shRNAs einen 3'-Überhang von ~5 Uridinen, die aus dem Terminationssignal von ~5 Thymidinen für die RNA-Polymerase III resultieren.

### 5.3.1 Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression in HeLa S3-Zellen nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden

Um zu analysieren, ob shRNAs gegen PLK1, die mit Hilfe des p*Silencer*<sup>TM</sup> 1.0-U6-Vektors über den U6-Promoter hergestellt wurden, überhaupt in der Lage waren, die PLK1-Expression zu hemmen, wurden HeLa S3-Zellen *in vitro* mit den Plasmiden transfiziert und 72 Stunden nach der Transfektion die mRNA isoliert. Im Northern-Blot wurden wiederum die PLK1-mRNA und die  $\beta$ -Aktin-mRNA detektiert und die PLK1-Expression auf die  $\beta$ -Aktin-Expression standardisiert (Abb. 60). Nach der erfolgten Standardisierung konnte eine signifikante PLK1-mRNA-Reduktion um ca. 50% in den mit pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelten Zellen, verglichen mit den Zellen, die mit dem parental Vektor pBS/U6 oder mit pBS/U6/shRNA/PLK1S, der „scrambled“-Sequenz von pBS/U6/shRNA/PLK1, transfiziert wurden, nachgewiesen werden. Die reduzierten PLK1-mRNA-Spiegel lagen für 3,0  $\mu$ g pBS/U6/shRNA/PLK1 bei 52% ( $p < 0,05$ ) und für 4,5  $\mu$ g pBS/U6/shRNA/PLK1 bei 56% ( $p < 0,01$ ) verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen.

Es wurde außerdem analysiert, ob die Zugabe des Nukleaseinhibitors Aurintricarboxylsäure (ATA) den Hemmeffekt, den pBS/U6/shRNA/PLK1 auf die PLK1-

mRNA-Expression ausübte, noch verstärken konnte. Doch ATA führte zu keiner Verstärkung des Effekts durch eine eventuelle stabilisierende Wirkung auf die Plasmide, sondern verringerte in diesen Untersuchungen sogar den durch das rekombinante Plasmid alleine verursachten inhibierenden Effekt auf die PLK1-mRNA-Expression. Dies ist aber im Hinblick auf die Verkapselung der Plasmide vor der Transfektion mit dem Transfektionsvermittler FuGENE™6 plausibel, denn durch diese Behandlung sind sie bereits stabilisiert und es kann keine weitere Verstärkung des Hemmeffekts erzielt werden.

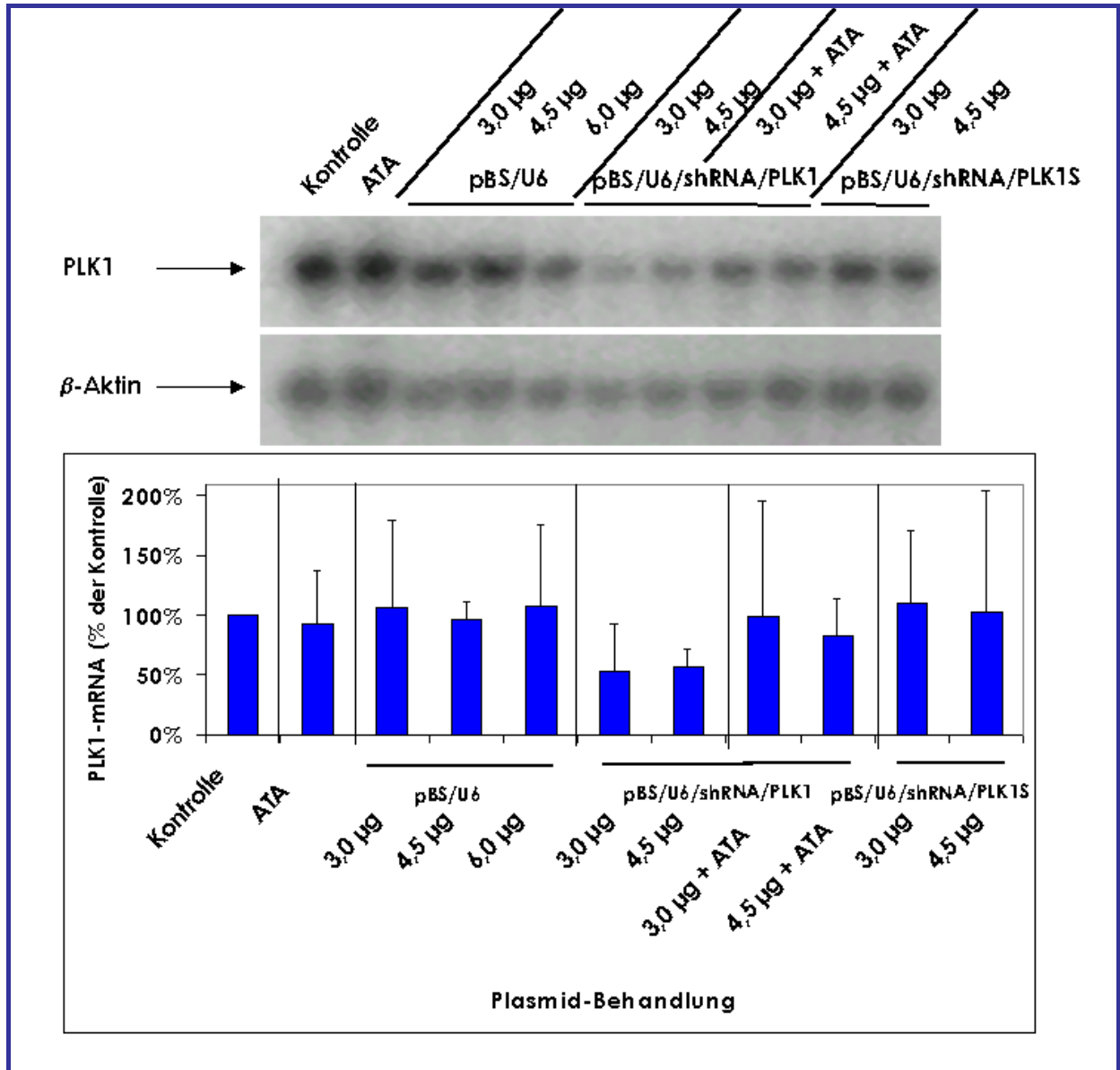


Abbildung 60: Reduktion der PLK1-mRNA-Expression in HeLa S3-Zellen nach der Transfektion mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1

Dargestellt sind im oberen Teil der Abbildung die Northern-Blots für PLK1 und  $\beta$ -Aktin 72 Stunden nach der Transfektion mit unterschiedlichen Konzentrationen der Expressionsplasmide im Vergleich zu der unbehandelten und der ATA-Kontrolle; im unteren Teil die graphische Auswertung der  $\beta$ -Aktin-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel mit Mittelwerten über drei unabhängige Experimente sowie 95% Konfidenzintervallen.

### 5.3.2 Ermittlung der Proliferation von HeLa S3-Zellen nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden

Es sollte untersucht werden, ob auch durch die Transfektion mit den rekombinanten Plasmiden pBS/U6/shRNA/PLK1 bzw. pBS/U6/shRNA/PLK1S, die für die Expression von shRNA gegen PLK1 (shRNA/PLK1) sowie die korrespondierende „scrambled“-Sequenz (shRNA/PLK1S) kodieren, die Proliferation von HeLa S3-Zellen *in vitro* gehemmt werden kann.

Allerdings kommt es bei der Transfektion mit Plasmid-DNA auch unter Verwendung von Transfektionsvermittlern wie z.B. FuGENE™6 zu geringen Transfektionseffizienzen, die 40 – 60% kaum überschreiten. Das bedeutet, dass ein beträchtlicher Teil der Zellen nicht transfiziert ist und sich daher ganz normal weiter teilen kann, so dass PLK1-spezifische Effekte dadurch getrübt werden. In den Transfektionsexperimenten konnten aus diesem Grund nur marginale Effekte durch pBS/U6/shRNA/PLK1 im Vergleich zu pBS/U6/shRNA/PLK1S auf das Wachstumsverhalten der HeLa S3-Zellen beobachtet werden (Abb. 61).

ATA bewirkte – wie auch bei der Reduktion der PLK1-mRNA – keinerlei Verstärkung des Effekts, was aber auch dadurch erklärbar ist, dass die Plasmide ohnehin durch FuGENE™6 verkapselt werden und damit überhaupt nicht dem Angriff von zelleigenen Nukleasen ausgesetzt sind.

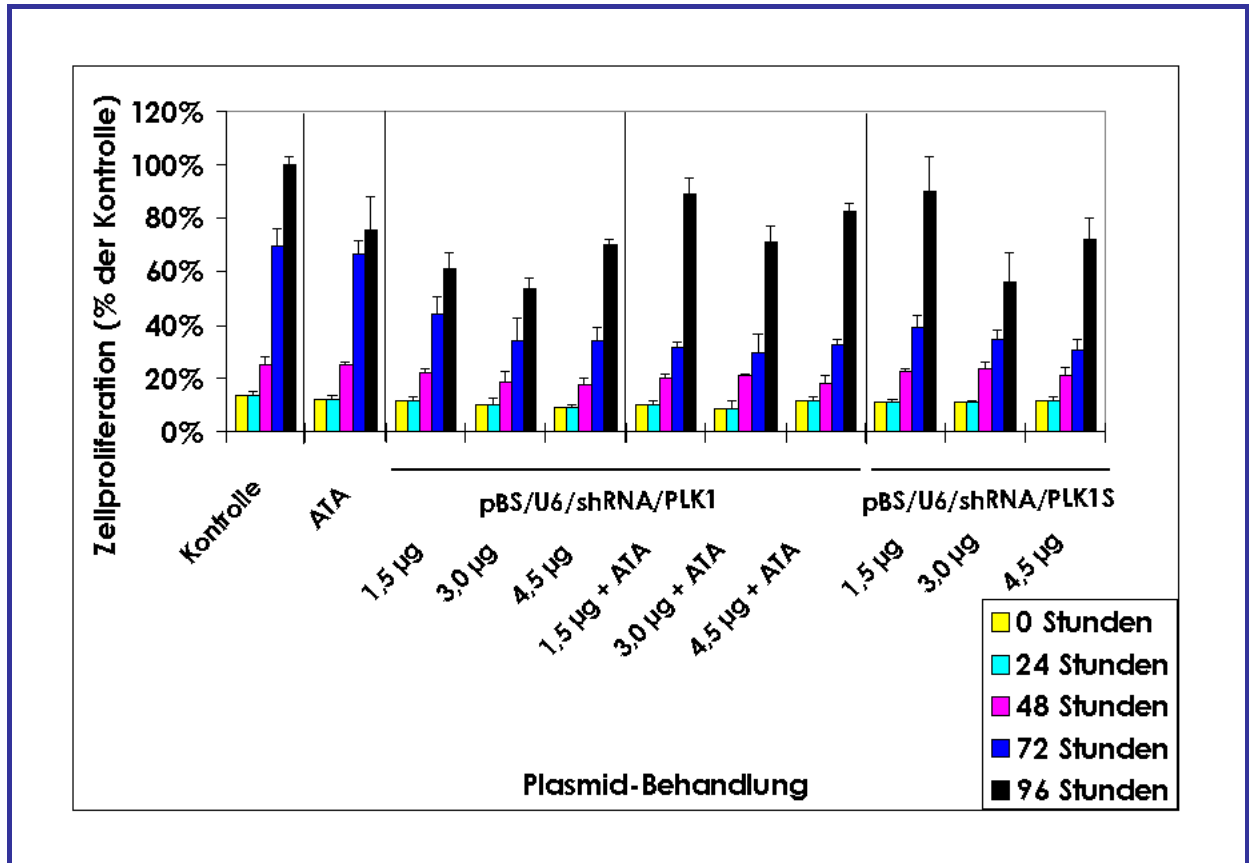


Abbildung 61: Proliferation der HeLa S3-Zellen nach der Transfektion mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1

Dargestellt ist die Zahl der Zellen am Tag vor der Transfektion sowie die Mittelwerte über die Zellzahlen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Transfektion mit den unterschiedlichen Konzentrationen an pBS/U6/shRNA/PLK1 mit und ohne ATA sowie pBS/U6/shRNA/PLK1S im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und der ATA-Kontrolle und die 95% Konfidenzintervalle.

Im Northern-Blot (Kapitel 5.3.1) konnte trotz der geringen Transfektionseffizienz der Plasmid-DNA eine signifikante Reduktion der PLK1-mRNA detektiert werden, da dies eine sehr sensitive Technik darstellt, mit der die Unterschiede in der Expression sehr präzise erfasst werden können. Dies liefert Anhaltspunkte dafür, dass die so exprimierten shRNAs effiziente Hemmstoffe der PLK1-Expression sind, denn die erreichte Hemmung auf ca. 50% der Expression in Kontrollzellen bei einer Transfektionseffizienz von ca. 50% entspräche einem vollständigen Abbau der PLK1-mRNA.

### 5.3.3 Vorversuch zum Xenograft-Experiment: *Ex vivo*-Bestimmung der Plasmid-DNA-Stabilität in Mäuseblut mit verschiedenen ATA-Konzentrationen

Es sollte überprüft werden, ob der Nukleaseinhibitor ATA (vgl. Kapitel 4.2.4) die Stabilität der Plasmide im Blut von Mäusen gegenüber dem Angriff der im Blut vorhandenen Nukleasen (Hill I.R. et. al. 2001) erhöhen kann und dadurch möglicherweise eine längere Wirksamkeit der Plasmide erzielt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Nacktmäuse entblutet und das Blut im Anschluss mit Plasmid-DNA und verschiedenen ATA-Konzentrationen für verschiedene Zeiten (5 min., 30 min., 2 Stunden und 4 Stunden) bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Stabilität der Plasmide in Abhängigkeit von der ATA-Konzentration. Die verwendeten ATA-Konzentrationen betragen ATA : Plasmid-DNA 1 : 50, 1 : 5 und 1 : 0,5. Eine Blutprobe als Negativkontrolle wurde jeweils nur mit Plasmid ohne ATA inkubiert. Nach Aufreinigung der DNA jeweils direkt nach Ende der Inkubationszeiten wurden Southern-Blots angefertigt, um die drei Formen der Plasmid-DNA (linear, zirkulär und supercoiled) zu detektieren und untereinander vergleichen zu können. Zum Größenvergleich wurden das parentale Plasmid sowie ein mit *Kpn I* geschnittenes und so linearisiertes Plasmid auf alle Gele aufgetragen, damit sowohl für die Größe der Banden für die zirkuläre und die supercoiled Form, als auch für die lineare Form auf allen Gelen Vergleichsbanden zu sehen waren.

Die beiden Banden für die zirkuläre und die lineare Form liegen zu allen Zeitpunkten bei Verwendung von 1%igen Agarosegelen als Doppelbande vor, die fast auf der gleichen Höhe laufen und damit kaum als Doppelbande erkennbar sind.

Es konnte beobachtet werden, dass bei direkter Isolation der Plasmid-DNA 5 min. nach Zugabe zum frisch isolierten Blut mit den drei verschiedenen ATA-Konzentrationen, aber auch ganz ohne ATA noch alle drei Formen der Plasmid-DNA (zirkulär, linear und supercoiled) nachweisbar waren. Hier waren die

Banden, die die zirkuläre bzw. lineare Form repräsentieren, schwach, die supercoiled Form hingegen stark ausgeprägt (Abb. 62).

Nach 30 min. konnte die supercoiled-Form bereits nur noch in den beiden Präparationen mit der höchsten ATA-Konzentration (ATA : Plasmid-DNA 1 : 5 und 1 : 0,5) nachgewiesen werden, hier allerdings noch als deutliche Bande erkennbar. Nach 2 Stunden war die supercoiled-Form ebenfalls noch in den beiden Spuren mit den höheren ATA-Konzentrationen nachweisbar, allerdings nur noch als schwache Bande (hervorgehoben durch blaue Pfeile), und nach 4 Stunden ist die Bande der supercoiled-Form nur noch in der Spur mit der höchsten ATA-Konzentration (ATA : Plasmid-DNA 1 : 0,5) schwach zu sehen (blauer Pfeil), in der Spur mit der zweithöchsten ATA-Konzentration (1 : 5) ist sie zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht mehr nachweisbar.

Darüber hinaus ist bei den Zeitpunkten 30 min., 2 Stunden und 4 Stunden eine stabilisierende Wirkung von ATA auf die lineare und die zirkuläre Form erkennbar, denn die Doppelbande, die diese beiden Formen repräsentiert, ist zu diesen drei Zeitpunkten wesentlich stärker zu sehen als bei der direkten Isolation nach 5 min.



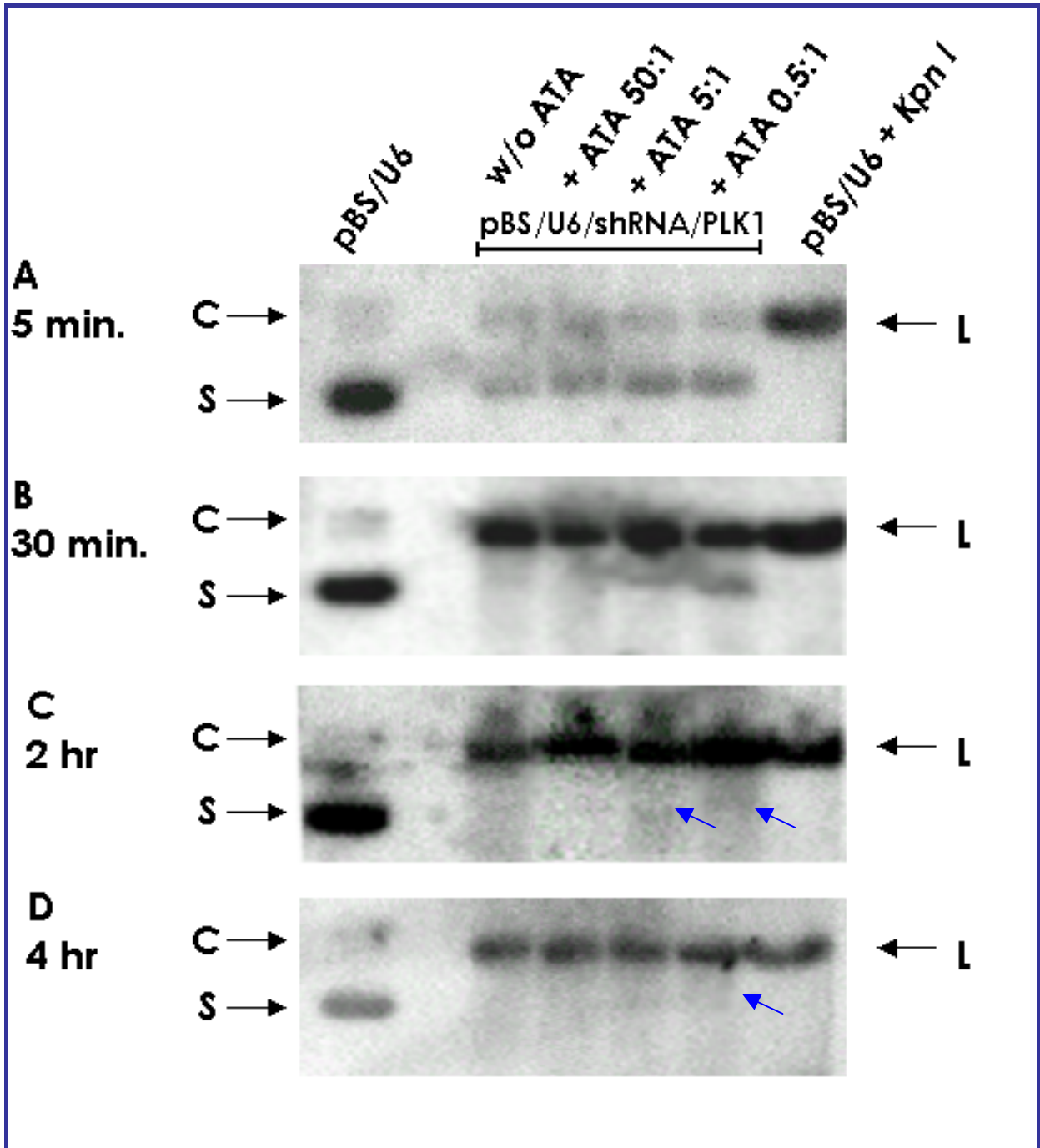


Abbildung 62: *Ex vivo*-Analyse der stabilisierenden Wirkung von ATA auf Plasmid-DNA in Mäuseblut mittels Southern-Blot

Dargestellt sind die Southern-Blots nach den verschiedenen Inkubationszeiten (A: 5 min.; B: 30 min.; C: 2 Stunden und D: 4 Stunden) mit pBS/U6/shRNA/PLK1 und verschiedenen ATA-Konzentrationen (Plasmid-DNA : ATA 1 : 50, 1 : 5 und 1 : 0,5). [C=zirkulär; S=supercoiled; L=linearisiert]

#### 5.3.4 Xenograft-Experiment mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1

In dem sich anschließenden ersten Xenograft-Experiment mit HeLa S3-tumortragenden Mäusen sollte untersucht werden, ob die Gabe von Plasmiden, die shRNA gegen PLK1 exprimieren, zur Hemmung der PLK1-Expression *in vivo* führt.

Dafür wurden das parentale Plasmid, der p*Silence*<sup>TM</sup> 1.0-U6-Vektor pBS/U6, sowie die rekombinanten Plasmide pBS/U6/shRNA/PLK1 und pBS/U6/shRNA/PLK1S eingesetzt. Diese wurden allerdings für die *in vivo*-Experimente nicht selber hergestellt, sondern bei der PlasmidFactory (Bielefeld) in Auftrag gegeben. Durch diese besondere Reinheit, insbesondere Endotoxinfreiheit durch chromatographische Aufreinigung, konnte eine gleichbleibende Qualität bzw. Reinheit über den Verlauf des gesamten Experiments erreicht werden. ATA wurde entsprechend den Ergebnissen des Vorversuchs mit Mäuseblut (vgl. Kapitel 5.3.3) in einem Verhältnis ATA : Plasmid-DNA von 1 : 5 eingesetzt, um die Stabilität der Plasmid-DNA im Blut zu verbessern. Neben den verwendeten Plasmiden (das parentale Plasmid pBS/U6 sowie die beiden rekombinanten Plasmide pBS/U6/shRNA/PLK1 bzw. pBS/U6/shRNA/PLK1S) wurde eine vierte Gruppe mit dem gegen PLK1 gerichteten rekombinanten Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelt, wobei hier allerdings kein ATA zugesetzt wurde, um zu prüfen, inwieweit ATA tatsächlich die Wirkung der shRNA durch Verlängerung der Lebensdauer der Plasmide im Blut verstärkt, und um Nebenwirkungen durch ATA ausschließen zu können.

Bei diesem Experiment konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden: Mit dem parental Plasmid pBS/U6 ergab sich eine exponentielle Wachstumskurve, die parallel zur Kurve verlief, die bei den mit dem rekombinanten Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1S, der „scrambled“-Kontrolle, behandelten Mäusen entstand (Abb. 63). Das heißt, dass die Tumoren in den Kontrollgruppen erwartungsgemäß exponentiell gewachsen sind, und nicht durch die Behandlung mit den Plasmiden als solche oder durch den Nukleaseinhibitor ATA im Wachs-

tum gehemmt wurden. Die beiden Gruppen, die mit pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelt wurden, zeigten vermindertes Tumorstadium, und zwar war das Tumorstadium bei den mit pBS/U6/shRNA/PLK1 ohne ATA behandelten Mäusen bereits signifikant gehemmt. Bei den mit pBS/U6/shRNA/PLK1 und ATA behandelten Mäusen kam es zur fast vollständigen Wachstumsunterdrückung der Tumoren. Die Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1 ohne ATA reduzierte das Tumorstadium auf 32% der pBS/U6-behandelten Mäuse ( $p < 0,05$ ). Durch die Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1 mit ATA wurde das Tumorstadium auf nur noch 13% ( $p < 0,01$ ) der mit dem parentalen Plasmid behandelten Mäuse reduziert.

Nach Beendigung der Therapie wurden bei einem Teil der Mäuse die Tumoren entnommen, um immunhistochemische Färbungen (vgl. Kapitel 5.3.7) sowie Northern- bzw. Southern-Blots und PCR (vgl. Kapitel 5.3.5 und 5.3.6) durchzuführen. Bei den restlichen Tieren aus den vier Behandlungsgruppen wurde weiterhin einmal pro Woche die Tumorstadium gemessen, um eine Aussage darüber machen zu können, wie sich das Tumorstadium nach Beendigung der Therapie verhielt. Hierbei zeigte sich bei weitergehender Messung der Tumorstadium über 28 Tage nach Ende der Behandlung, dass die Tumoren der Kontrollgruppen mit pBS/U6 + ATA bzw. pBS/U6/shRNA/PLK1S + ATA weiter exponentiell wuchsen. Die Tumoren der Tiere, die mit pBS/U6/shRNA/PLK1 + ATA behandelt worden waren, wuchsen auch weiterhin nicht, sondern verharrten in etwa bei der Endgröße unter der Therapie. Die mit pBS/U6/shRNA/PLK1 ohne ATA behandelten Tumoren wuchsen auch hier in intermediärem Ausmaß weiter, denn sie verharrten nicht, zeigten aber auch kein exponentielles Wachstum nach Therapieende (vgl. Abb. 63). Das zeigt, dass der Effekt, der durch die Therapie mit pBS/U6/shRNA/PLK1 erzielt wurde, nicht von vorübergehender Natur ist, sondern vier Wochen über das Therapieende hinaus anhält, so dass unter Umständen auch eine Remission des Tumors verhindert werden kann.

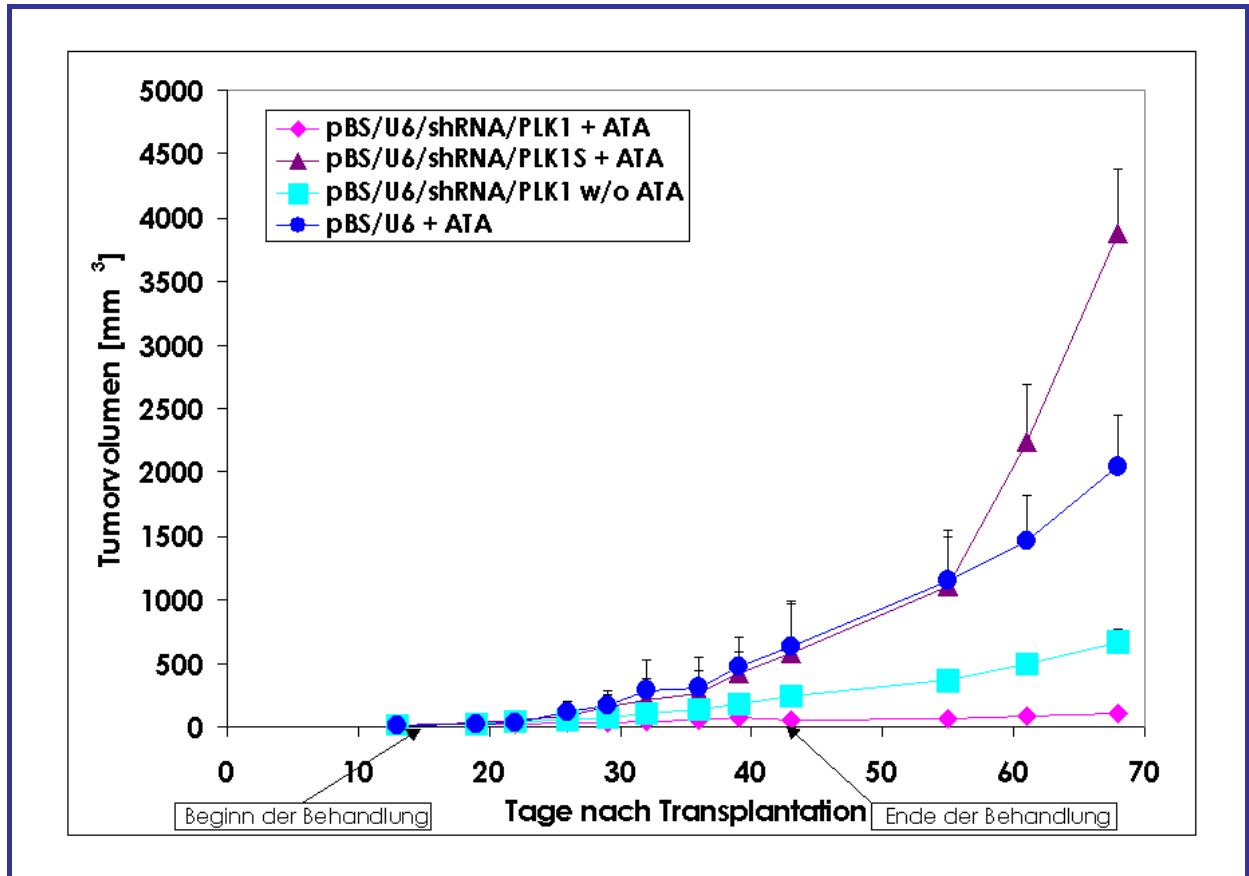


Abbildung 63: Hemmung des Tumorwachstums durch pBS/U6/shRNA/PLK1 *in vivo* im humanen HeLa S3-Xenograft-Modell

Dargestellt sind die Mittelwerte über die Tumorzvolumina [ $\text{mm}^3$ ] sowie die 95% Konfidenzintervalle. Alle Tumorzvolumina sind in Beziehung gesetzt zum Anfangsvolumen von jeweils  $100 \text{ mm}^3$ . Außerdem sind der Beginn und das Ende der Behandlung eingetragen.

Während der gesamten Therapiedauer wurde bei jeder Messung der Tumorzvolumina auch das Gewicht der Mäuse bestimmt, und es zeigte sich in keiner der Therapiegruppen ein Gewichtsverlust, d.h. es traten keine toxikologischen Effekte durch die Plasmide oder ATA an sich auf. Auch kann daraus geschlossen werden, dass die Behandlung mit rekombinanten Plasmiden gegen PLK1, aber auch mit dem parentalen Plasmid keine Beeinträchtigung des Gastrointestinaltraktes zur Folge hatte, denn offensichtlich konnten die therapierten Mäuse die aufgenommene Nahrung verwerten.

Es war kein Unterschied zwischen den Mäusen, die ATA erhielten, zu denen, die ohne Zusatz von ATA behandelt wurden, zu erkennen, so dass ATA in den hier

eingesetzten Dosierungen keinen Einfluss auf die Plättchenaggregation zu haben scheint. Die verwendete Dosierung (80 µg ATA/kg Körpergewicht 3x wöchentlich) lag auch wesentlich niedriger als die von Alwayn *et al.* (Alwayn I.P. et. al. 2000) oder Glasspool-Malone *et al.* (Glasspool-Malone J. et. al. 1999) ermittelten toxischen Konzentrationen bei Pavianen bzw. die LD<sub>50</sub> von 6 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag bei der Maus.

Die Hemmung des Tumorwachstums durch die Behandlung über 26 Tage mit dem rekombinanten Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1 wird zusätzlich zu der in der vorigen Abbildung dargestellten Wachstumskurve in der folgenden Abbildung 64 verdeutlicht. Es ist eine Maus – am Tag der letzten Behandlung – dargestellt, die mit pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelt wurde (A), und eine Maus, die mit dem parentalen Vektor pBS/U6 behandelt wurde (B). Es ist deutlich zu erkennen, dass bei der Maus auf dem oberen Bild, die mit pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelt wurde, der Tumor in der Flanke seit der Transplantation kaum gewachsen ist, im Vergleich dazu ist auf dem unteren Foto bei der mit dem parentalen Vektor pBS/U6 behandelten Maus ein deutlich größerer Tumor in der Flanke zu sehen. Die Pfeile deuten auf die Orte der Transplantation.

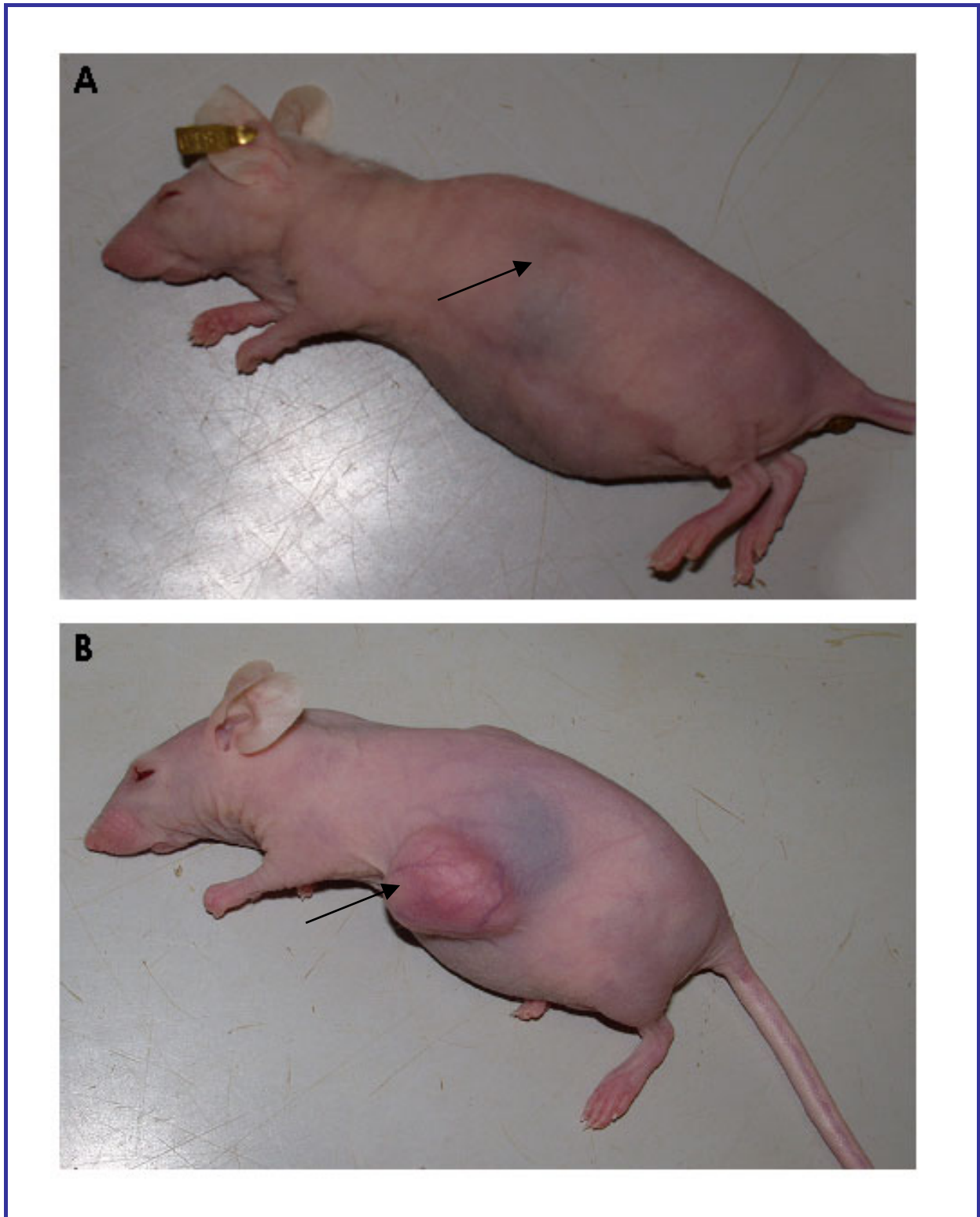


Abbildung 64: HeLa S3-Tumorgröße einer pBS/U6/shRNA/PLK1-behandelten Maus [A] im Vergleich zu einer pBS/U6-behandelten Maus [B]

Beide Mäuse sind nach 26 Tagen Behandlung mit pBS/U6 bzw. pBS/U6/shRNA/PLK1 fotografiert worden.

### 5.3.5 Northern-Blot-Analyse zur Bestimmung der PLK1-mRNA-Expression in den HeLa S3-Tumoren nach Beendigung der Therapie mit den Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1

Am Tag nach Beendigung der Therapie im HeLa S3-Xenograft-Experiment wurden die Tumoren entnommen, in RNAlater asserviert, um die RNA vor Degradation zu schützen, und aus diesen die mRNA isoliert, um im Northern-Blot überprüfen zu können, ob durch die pBS/U6/shRNA/PLK1-Behandlung auch die PLK1-mRNA reduziert werden konnte. Hier wurde die PLK1-mRNA-Expression ermittelt und auf die durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemachte Gesamt-RNA-Menge (18S- und 28S-rRNA) standardisiert. Die so standardisierte PLK1-mRNA-Menge wurde mit der Ethidiumbromid-standardisierten PLK1-mRNA-Menge in den Tumoren von pBS/U6-behandelten Mäusen verglichen.

Nach der pBS/U6/shRNA/PLK1-Behandlung war die PLK1-mRNA-Menge in der mit ATA behandelten Gruppe verglichen mit dem parentalen Vektor pBS/U6 signifikant um 73% reduziert ( $p < 0,01$ ), in der ohne ATA behandelten Gruppe lag die Reduktion der PLK1-mRNA bei 72% ( $p < 0,01$ ) (Abb. 65). Die Behandlung mit der „scrambled“-Kontrolle pBS/U6/shRNA/PLK1S führte zwar zu einer leichten Reduktion der PLK1-mRNA von 19%, diese war aber nicht signifikant.

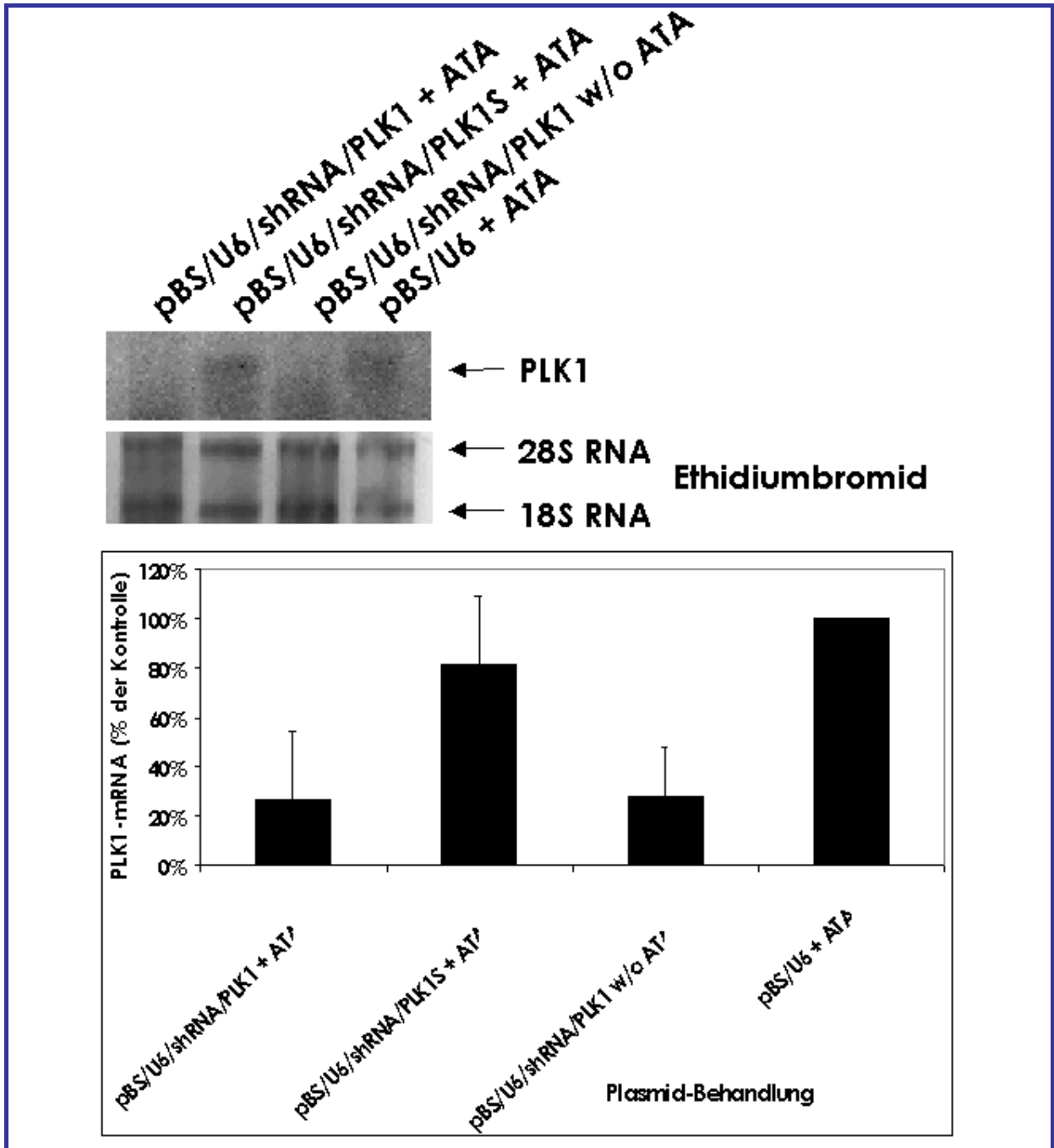


Abbildung 65: Reduktion der PLK1-mRNA-Expression in HeLa S3-Tumoren nach Behandlung mit dem rekombinanten Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1

Dargestellt sind der Northern-Blot für PLK1 sowie das Ethidiumbromid-gefärbte Gel der einen Tag nach der letzten Behandlung aus den Tumoren isolierten RNA. Darunter ist die graphische Auswertung der Ethidiumbromid-standardisierten PLK1-mRNA-Spiegel mit Mittelwerten über drei unabhängige Experimente sowie 95% Konfidenzintervallen dargestellt.



### 5.3.6 Southern-Blot-Analyse der HeLa S3-Tumoren und PCR zum Nachweis der Expressionsplasmide

Um den Mechanismus der Hemmung weiter zu ergründen, stellte sich die Frage, ob die Plasmide auch in die Tumoren gelangen, um dort die shRNA zu exprimieren. Um dies zu untersuchen, wurden am Tag nach der letzten Therapie Tumoren entnommen und aus diesen dann die Gesamt-DNA isoliert.

Aus diesen Proben wurden Southern-Blots angefertigt, um auf diesen über eine spezifische Sonde die Expressionsplasmide zu detektieren. Zum Vergleich der resultierenden Plasmid-Banden wurde in einer Spur das pure Plasmid pBS/U6 aufgetragen. Dabei war es für alle vier Behandlungen (die rekombinanten Plasmide pBS/U6/shRNA/PLK1 und pBS/U6/shRNA/PLK1S sowie pBS/U6) nur möglich, eine sehr schwache Bande auf der Höhe der zirkulären bzw. linearen Form zu detektieren, aber keine supercoiled-Form (Abb. 66).

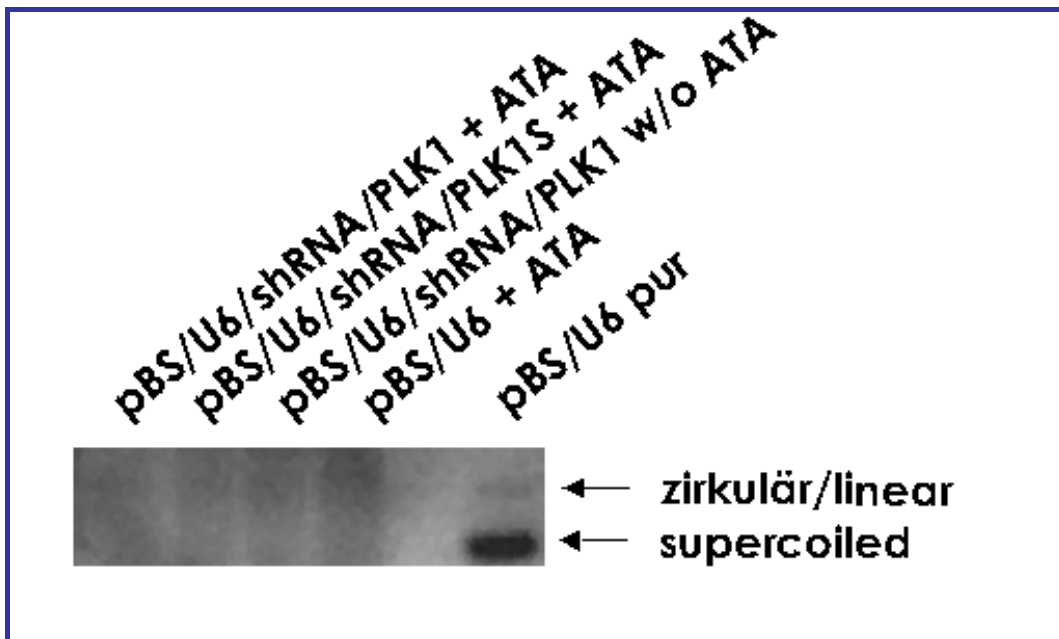


Abbildung 66: Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der Expressionsplasmide in den Tumoren

Gezeigt ist der Southern-Blot zum Nachweis der Plasmide am Tag nach der letzten Behandlung. Zirkuläre und lineare Form liegen als Doppelbande vor.

Darüber hinaus wurde auf Grundlage der am Tag nach der letzten Therapie isolierten Gesamt-DNA eine PCR mit Primern, die ein 500 bp-langes Fragment des pBS/U6-Vektors amplifizieren, durchgeführt, um auf diese Weise die in den DNA-Präparationen vorhandene Plasmid-DNA zusätzlich auch auf diesem sehr sensitiven Weg nachzuweisen. In den Tumoren von allen vier Behandlungsgruppen ließ sich die Vektor-DNA nachweisen (Abb. 67), so dass damit auf zweierlei Wegen bestätigt werden konnte, dass die Plasmide die Zellmembran überwinden können und von den Tumorzellen aufgenommen wurden, wo sie ihre Wirkung entfalten können.

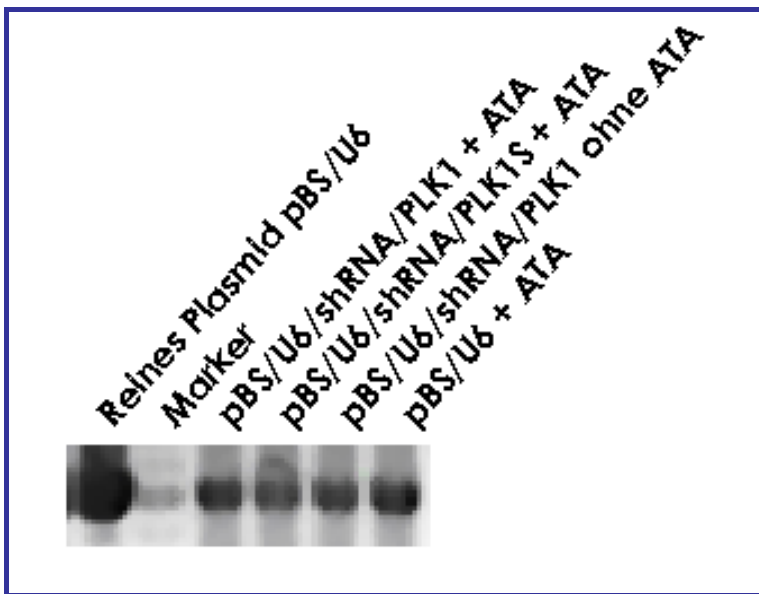


Abbildung 67: PCR zum Nachweis der Expressionsplasmide in den Tumoren

Dargestellt ist das Ethidiumbromid-gefärbte Gel, auf dem die Banden für das 500 bp-Fragment der Plasmide für alle Behandlungsgruppen am Tag nach der letzten Behandlung zu sehen sind. Das reine Plasmid pBS/U6 dient zum Größenvergleich.

### 5.3.7 Immunhistochemische Färbung von PLK1 und Ki-67 in den Tumoren nach Behandlung mit Plasmiden zur Expression von hairpin-RNA gegen PLK1

Um neben dem Nachweis der PLK1-mRNA-Reduktion mittels Northern-Blots einen weiteren Hinweis für die Wirksamkeit des Expressionsplasmids pBS/U6/shRNA/PLK1 im Vergleich zu den Kontrollplasmiden pBS/U6 und

pBS/U6/shRNA/PLK1S zu erlangen, wurden die Tumoren nach der Entnahme eingebettet und mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten und im Anschluss daran immunhistochemisch gegen PLK1 und Ki-67 gefärbt.

Die Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1S veränderte die Ki-67- oder PLK1-Färbung des Tumors im Vergleich zu den mit dem parentalen Vektor pBS/U6 behandelten Mäusen nicht. Die PLK1-Expression konnte in den pBS/U6/shRNA/PLK1-behandelten Tumoren auf 12% reduziert werden, in den pBS/U6-behandelten Tumoren lag sie hingegen bei 89% (Abb. 68 A, B). Die Ki-67-Expression ging nach Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1 ebenso stark zurück, so dass in diesen Tumoren nur noch geringe Proliferationsaktivität vorhanden war (Abb. 68 C, D). Damit konnten also durch die shRNA/PLK1-Behandlung der Proliferationsmarker Ki-67 und das zu hemmende Protein PLK1, das ebenfalls einen Proliferationsmarker darstellt, deutlich in ihrer Expression im Tumor gehemmt werden.

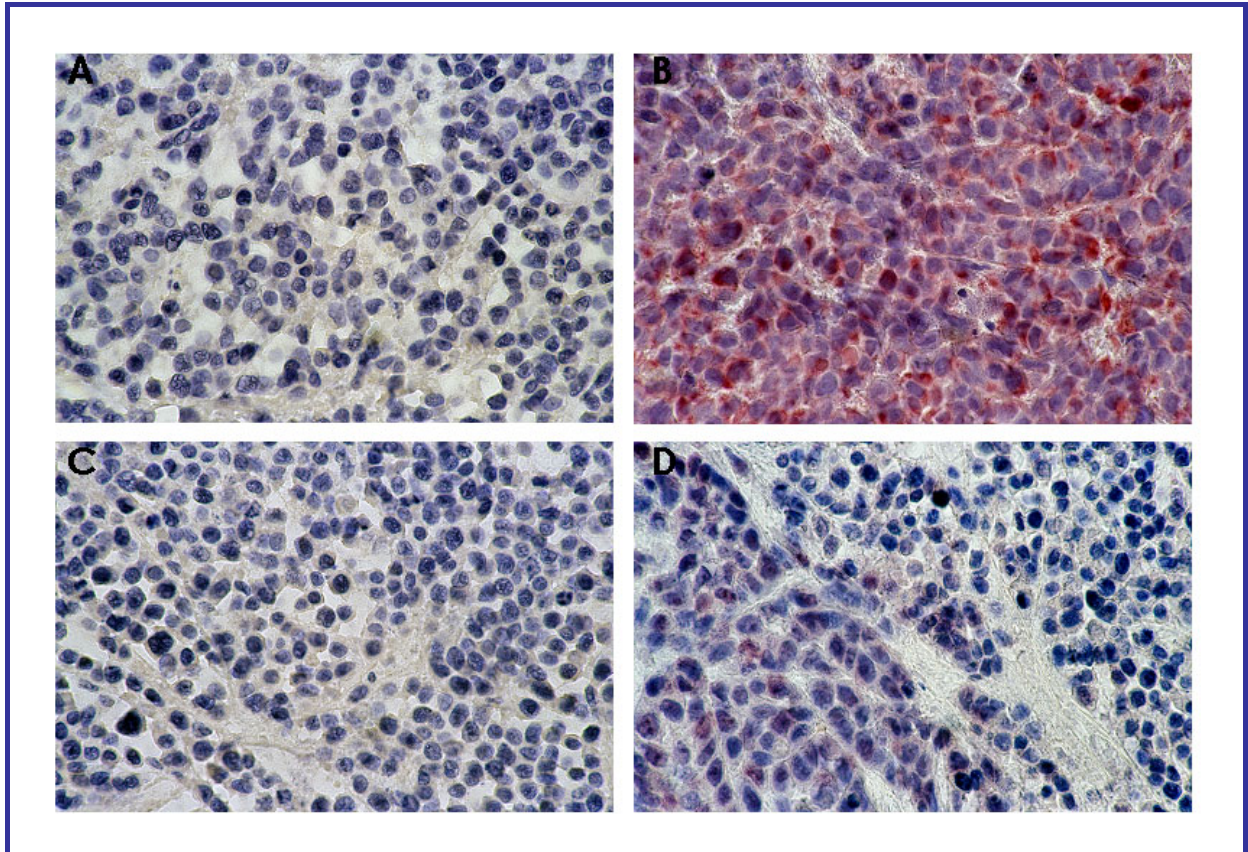


Abbildung 68: **Immunhistochemische Färbung von PLK1 und Ki-67**

Gefärbt wurden Tumoren von Mäusen nach Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1 im Vergleich zur Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1S.

A: PLK1-Expression nach pBS/U6/shRNA/PLK1-Behandlung; B: PLK1-Expression nach pBS/U6-Behandlung; C: Ki-67-Expression nach pBS/U6/shRNA/PLK1-Behandlung; D: Ki-67-Expression nach pBS/U6-Behandlung.

## 6. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden (ASOs) und durch small interfering RNAs (siRNAs) im Rahmen der RNA-Interferenz Verfahren entwickelt werden, mit denen die Grundlage für eine spezifische auf ein Gen gerichtete Krebstherapie geschaffen werden kann. Vor allem sollte der Versuch unternommen werden, eine spezifischere Therapie als die bislang in der Anwendung befindlichen wie Chemotherapie oder Bestrahlung zu finden, denn bei diesen Methoden werden auch Gewebe geschädigt, die wie die Tumorgewebe stark proliferieren (bei der Chemotherapie), bzw. alle Gewebe, die in direkter Umgebung des bestrahlten Tumors liegen (bei der Bestrahlung). Bei beiden Therapieformen konnten zwar im Laufe der Zeit die Heilungschancen bei bestimmten Tumortypen deutlich verbessert werden, indem Chemotherapien gezielt an die Eigenschaften des jeweiligen Tumors und auch an die Patienten angepasst werden, doch die Beeinträchtigungen des Lebens der Betroffenen sind weiterhin schwerwiegend. Vor allem kommt es häufig zum Auftreten von Rezidiven.

Es gibt schon jetzt gezielte Krebstherapien, wie z.B. die Injektion von Antikörpern, wodurch einige Tumorentitäten angegriffen werden können. Die Tumoren müssen z.B. beim Mammakarzinom die Anforderung erfüllen, dass ein bestimmter Rezeptor – in diesem Fall der Her-2/neu-Rezeptor – überexprimiert wird und damit einen spezifischen Angriffspunkt für die Antikörper bietet. Die Nebenwirkungen sind begrenzt, da dieser Rezeptor in anderen Geweben nur auf basalem Niveau exprimiert wird, er wird aber auch nur in 20 – 30% der Mammakarzinome exprimiert, was die breite Anwendbarkeit wiederum einschränkt.

Diese Fakten verdeutlichen, dass neben den Antikörper-basierten Ansätzen dringend weitere spezifisch wirkende Therapieformen benötigt werden. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Prinzipien zur Hemmung der Tumorzellproliferation *in vitro* und *in vivo* erfüllen diese Anforderungen, da sie auf

der Ebene der mRNA angreifen, die für jedes Protein einzigartig ist. Das hier gewählte Target, die Polo-Like Kinase 1 (PLK1), ist ebenso vielversprechend, da PLK1 nur in Geweben mit hohem mitotischen Index exprimiert wird (Clay F.J. et. al. 1993; Golsteyn R.M. et. al. 1994; Holtrich U. et. al. 1994; Holtrich U. et. al. 2000; Yuan J. et. al. 1997) und in normalem proliferierendem Gewebe die Expression nur basale Spiegel erreicht (Yuan J. et. al. 1997). Dadurch ist es möglich, mit der Hemmung von PLK1 durch ASOs oder durch siRNAs gezielt nur die Proliferation der Tumorzellen bzw. Tumorgewebe zu hemmen und die normalen gesunden Gewebe nicht oder nur wenig zu beeinträchtigen. Außerdem ist PLK1 ein geeignetes Zielgen für die Krebstherapie, da seine erhöhte Expression in den malignen Geweben mit schlechten Prognosen für die Patienten einhergeht (Knecht R. et. al. 1999; Strebhardt K. et. al. 2000; Tokumitsu Y. et. al. 1999; Wolf G. et. al. 1997).

### **6.1 Die Bedeutung von PLK1 als Zielgen für die Tumorthherapie**

Weitere Studien untermauern zusätzlich PLK1 als potenzielles Target für die Tumorthherapie. Die Auswirkungen einer Hemmung von PLK1 wurde schon in verschiedenen anderen Studien untersucht, hierbei war das Ziel allerdings nicht die Therapie, sondern der „proof of principle“, nämlich zu zeigen, inwieweit die Hemmung der PLK1-Funktion die Biochemie der Säugetierzelle und insbesondere die normale Zellteilung beeinträchtigt. Außerdem gelang in diesen Studien lediglich eine Partialhemmung der PLK1-Expression. Lane *et al.* (Lane H.A. et. al. 1996) mikroinjizierten Antikörper gegen PLK1 und konnten so in humanen Fibroblasten und in HeLa-Zellen die Zentrosomenreifung blockieren. Hierbei verharrten die primären Fibroblasten in der G<sub>2</sub>-Phase, die HeLa-Zellen wiesen verschiedene Störungen der Mitose auf, was dafür spricht, dass die Fibroblasten einen Zentrosomenreifungs-Kontrollpunkt besitzen, der bei Krebszellen verlorengegangen zu sein scheint. In einer Studie von Mundt *et al.* (Mundt K.E. et. al. 1997) führte die transiente Expression einer dominant-negativen Form von PLK1 im Gegensatz zu der Mikroinjektion von PLK1-Antikörpern zu bipolaren mitotischen HeLa-Zellen bzw. zu ge-

störter Zytokinese. Cogswell *et al.* (Cogswell J.P. et. al. 2000) konnten in verschiedenen Tumorzelllinien durch Adenovirus-vermittelte Expression der dominant-negativen Form von PLK1 Apoptose induzieren. Normale humane Mammaepithelzellen (HMECs) verharrten in der Mitose und konnten dadurch die mitotischen Defekte und die gestörte Zentrosomenreifung, wie sie bei den Krebszelllinien auftraten, verhindern.

Mit diesen unterschiedlichen Ansatzpunkten konnte schon im Vorfeld dieser Arbeit die PLK1-Funktion gemindert werden und damit die Rolle von PLK1 für die Mitose in Mammaliazellen *in vitro* analysiert werden. Es kam durch Antikörperinjektion sowie durch die Expression der dominant-negativen Form von PLK1 zu einer teilweisen Hemmung der PLK1-Expression. Außerdem konnte in der Studie von Cogswell *et al.* schon ein differentieller Unterschied in der Sensitivität von Krebszelllinien und primären Zellen auf die Hemmung bzw. Ausschaltung von PLK1 gezeigt werden. All diese Versuche dienten jedoch der Untersuchung biochemischer Auswirkungen, die eine teilweise Hemmung der PLK1-Funktion auf das Fortschreiten der Zellen in der Mitose hat. Für die Anwendung *in vivo*, um damit gezielt entartete Zellen in die Apoptose zu treiben und dadurch die Tumorprogression und Metastasierung zu verhindern, sind weder die Mikroinjektion von Antikörpern noch die Expression von dominant-negativen Formen von PLK1 geeignet. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Ansätze mit ASOs (Kapitel 6.2), siRNAs (Kapitel 6.3) sowie mit den durch Expressionsplasmide hergestellten shRNAs (Kapitel 6.4) gewählt, da diese prinzipiell auch eine Anwendung *in vivo* ermöglichen.

## **6.2 Untersuchungen mit Antisense-Oligonukleotiden gegen PLK1 an verschiedenen Krebszelllinien *in vitro* und im Xenograft-Experiment**

### **6.2.1 Antisense-Ansätze**

Da immer umfassenderes Wissen über die genetische Kontrolle der zellulären Proliferation erlangt wird, können therapeutische Strategien gerade im

Kampf gegen proliferative Erkrankungen wie Krebs immer gezielter konzipiert werden. Eine dieser Strategien ist die Antisense-Technologie, wenn auch hierbei noch verschiedene unbeantwortete Fragen verbleiben, die die Anwendbarkeit der Technik betreffen (Stein C.A. 1995; Wagner R.W. 1995). Trotzdem ist dieser experimentelle Ansatz in der Lage, die Entwicklung von Krebs zu hemmen oder gar zu stoppen, wenn die ASOs gegen Schlüsselemente der proliferations-relevanten Signaltransduktionskaskaden eingesetzt werden. Verschiedene ASOs gegen unterschiedliche Targets – vergleiche hierzu Kapitel 2.4, Tabelle 1 – werden in der Krebstherapie bereits am Patienten eingesetzt (Agrawal S. et. al. 2000; Crooke S.T. 2000).

### 6.2.2 Hemmung der PLK1-Funktion – Spezifität der ASOs

Der Vorteil ist die Spezifität des Wirkstoffes. Um genau diesen Aspekt zu untersuchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zuerst die Fähigkeit von 26 gegen PLK1 gerichteten ASOs untersucht, die endogene PLK1-Expression zu unterdrücken und die Proliferation der Krebszellen *in vitro* und *in vivo* zu hemmen. Wie eine komplexe Sekundärstruktur der mRNA erwarten lässt, waren es nur zwei der 26 getesteten ASOs, die sowohl die PLK1-mRNA als auch das PLK1-Protein signifikant zu reduzieren in der Lage waren. Dies ist bei den ASOs unter anderem damit zu erklären, dass aufgrund der dreidimensionalen Struktur der mRNA nur bestimmte Sequenzbereiche frei zugänglich für die Bindung der ASOs sind (Sohail M. et. al. 2000). Nur in diesen Bereichen können die ASOs an die mRNA binden und dadurch die illegitimen DNA-RNA-Heteroduplices ausbilden, die das Ziel für RNase H sind, wodurch die mRNA zerstört und die Bildung des Proteins verhindert wird (Dirksen M.L. et. al. 1981). Diese beiden ASOs – P12 und P13 – liegen in der 3'-untranslatierten Region der humanen PLK1-mRNA, wo vermutlich weniger Sekundärstrukturen ausgebildet werden als beispielsweise im offenen Leseraster. P12 und P13 reduzierten in allen untersuchten Krebszelllinien die PLK1-mRNA und das PLK1-Protein statistisch signifikant mit einer IC<sub>50</sub> von 50 – 75 nM. Die Hemmung der Proliferation durch P12 und P13 ging in allen drei



Zelllinien mit einem leichten Anstieg des Anteils der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase einher. Dieser Anstieg könnte die Ursache für den Zelltod sein, denn eine Erhöhung des G<sub>2</sub>/M-Phasen-Anteils der Zellen ist ein Signal für den Beginn der Apoptose (Nishii K. et. al. 1996). Im Zusammenhang mit Apoptose bzw. morphologischen Veränderungen der Zellen konnten auch multiple Zentrosomen sowie nur teilweise getrennte Chromosomen in den Zellen beobachtet werden. Diese könnten dadurch entstanden sein, dass die Chromosomen die Ausbildung der Kernmembran induzieren, bevor die neu gebildeten Tochterzellen getrennt sind. Auf diese Art würden mehrere Zentrosomen von der neu entstehenden Zellmembran umschlossen. In gesunden Zellen werden die Zentrosomen von der perizentriolären Matrix dicht zusammengehalten. Da in den analysierten Zellen auch getrennte bzw. multiple Zentrosomen beobachtet werden konnten, könnte durch die PLK1-Reduktion die perizentrioläre Matrix gestört sein.

Interessanterweise war die Reaktion der verschiedenen Zelllinien entsprechend ihrer endogenen PLK1-mRNA-Spiegel unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Zelllinie A549, die am meisten PLK1-mRNA exprimiert, zeigte in allen Untersuchungen (PLK1-mRNA, PLK1-Protein, Proliferation) nur eine moderate Reduktion. Die beiden anderen getesteten Zelllinien mit geringeren endogenen PLK1-mRNA-Spiegeln wiesen stärkere Reduktionen auf. Es könnte sich bei der Reaktion der Zelllinie A549 aber auch um eine homöostatische Regulation der Zellen handeln, die auf verringerte PLK1-mRNA-Spiegel mit erhöhter metabolischer Aktivität reagieren und die reduzierten PLK1-mRNA-Level so kompensieren. *In vivo* hingegen konnte im humanen A549-Xenograft-Modell durch P12 und P13 die ausgeprägteste Hemmwirkung auf das Tumorwachstum erzielt werden, weshalb der Schluss von den *in vitro*-Untersuchungen auf die *in vivo*-Situation wiederum nicht möglich ist.

Ein weiterer wichtiger Teil der Untersuchungen galt der Spezifität der eingesetzten ASOs. Es wurden alle PLK1-spezifischen ASOs zu einem Kontroll-ASO, das gegen das Herpes simplex-Virus (HSV) gerichtet ist, in Beziehung gesetzt.

Mit diesem ASO gegen ein Gen, das in normalen Zellen nicht vorliegt, lag der Effekt auf die Zellen *in vitro* jeweils in der Größenordnung des Effektes, der schon alleine durch das Transfektionsreagenz DOTAP ausgelöst wurde. *In vivo* zeigten beide Kontrollgruppen (HSV-ASO-behandelt, PBS-behandelt) exponentielles Tumorwachstum, was ebenfalls die Spezifität der ASO-Wirkung unterstützt. Außerdem wurde der Einfluss der PLK1-ASOs auf die Expression anderer Gene untersucht. Hierbei zeigte sich keine Änderung der Expression von  $\beta$ -Aktin bzw. von p38. Weitere Hinweise für die Spezifität der PLK1-ASOs lieferte zum einen die Tatsache, dass von 26 analysierten ASOs gegen PLK1 lediglich zwei die PLK1-Expression effizient hemmen konnten, und zum anderen die Beobachtung, dass diese Hemmwirkung konzentrationsabhängig war. Hier hatte zudem auch keine der eingesetzten Konzentrationen des HSV-ASOs einen signifikanten Hemmeffekt.

### **6.2.3 Der Vorteil von PLK1 in der Antisense-Therapie von humanen Tumorzellen**

In vorangegangenen Studien wurden bereits verschiedenste ASOs gegen Krebs eingesetzt, die sich auch schon teilweise in Phase II der klinischen Prüfung befinden, z.B. gegen Proteinkinase C- $\alpha$ , bcl-2, c-raf oder H-ras (Cunningham C.C. et. al. 2000; Nemunaitis J. et. al. 1999; O'Dwyer P.J. et. al. 1999; Waters J.S. et. al. 2000; Yuen A.R. et. al. 1999). Verschiedene Studien lieferten aber auch Hinweise, dass die Hemmung früher Schritte in der Signaltransduktionskaskade die Aktivierung von alternativen parallelen Signalwegen induziert, so dass die Hemmwirkung aufgehoben werden kann und die Zellen trotzdem weiter proliferieren können. Beispielsweise führte die Hemmung der c-Raf-Kinase mittels ASOs lediglich zu einer vorübergehenden Hemmung der Zellproliferation (Monia B.P. et. al. 1996b; Monia B.P. et. al. 1996a). Diese Beobachtung kann zweierlei Ursachen haben: Entweder werden die ASOs zu schnell abgebaut, oder es liegt daran, dass c-Raf an einer frühen Position in der Signalkaskade liegt und die Zelle dadurch ausreichend Möglichkeiten hat, eine Hemmung von c-Raf durch parallele al-

ternative Signalwege zu umgehen. Im Gegensatz zu diesen frühen Schritten in der Signaltransduktion, die durch c-Raf, PKC oder Ras repräsentiert werden, ist PLK1 die erste Kinase, die mit ASOs ausgeschaltet wurde, die einen späten Schritt in der Signaltransduktionskaskade repräsentiert, wodurch die Möglichkeiten der Zelle, die Hemmung durch parallele alternative Signalwege aufzuheben, sehr gering sind. Dies konnte – neben den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit – in Studien, in denen die zentrale Rolle von PLK1 für das Fortschreiten von Zellen in der Mitose konstatiert wurde, belegt werden, denn es war den Zellen hier nicht möglich, alternative Signaltransduktionswege zu nutzen, um so die Hemmung von PLK1 durch einen anderen Weg zu umgehen (Cogswell J.P. et. al. 2000; Lane H.A. et. al. 1996; Mundt K.E. et. al. 1997). Vielmehr führte die Hemmung von PLK1 – wie bereits weiter oben beschrieben – zur selektiven Apoptose in Tumorzellen verglichen mit normalen Epithelzellen.

#### **6.2.4 Schwierigkeiten bei der Anwendung von ASOs**

Obwohl ASOs interessante Wirkstoffe darstellen, selektiv die Genexpression eines bestimmten Gens zu hemmen, wurden Untersuchungen mit ASOs für lange Zeit immer wieder durch verschiedene Probleme behindert, die zu Rückschlägen in der therapeutischen Umsetzung führten. ASOs und im Speziellen Phosphorothioate, die aufgrund ihrer besseren Stabilität in vielen Studien eingesetzt werden, sind künstliche Makromoleküle, die toxische Effekte hervorrufen können oder aber die Funktionen der Zelle verändern können, indem sie mit endogenen Proteinen assoziieren und dadurch nicht-Antisense-vermittelte Mechanismen induzieren (Kuss B. et. al. 1999). In diesem Fall wäre die biologische Aktivität der ASOs nicht das Ergebnis einer spezifischen Hemmung des Zielgens, sondern eine unspezifische Reaktion.

Ein allgemeines Problem bei der Anwendung von ASOs der ersten Generation (Phosphorothioate) ist, dass sie in relativ hoher Dosierung eingesetzt werden, was die Gefahr unspezifischer Effekte und damit von Nebenwir-

kungen stark erhöht. Die Differenz zwischen der spezifisch wirkenden Dosis und der Dosis, die zu unspezifischer Toxizität führt, ist gering (Braasch D.A. et. al. 2002). Außerdem können ASOs an Proteine binden und dadurch artifizielle Effekte verursachen, die den Antisense-Effekt überdecken (Stein C.A. 1999). Ein großes Problem bei der Verwendung der ersten Generation von ASOs sind die sogenannten CpG-Motive, die zu unspezifischer Bindung an die mRNA und auf diesem Weg zu einer unspezifischen Stimulation des Immunsystems führen (Agrawal S. et. al. 2001; Krieg A.M. 2001). Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, sind andere Modifikationen der bislang verwendeten ASOs nötig, um die Bindung an die mRNA zu verbessern und die Selektivität zu erhöhen. Eine Möglichkeit dabei sind die sogenannten ASOs der zweiten Generation, bei denen 2'-O-Methyl- und 2'-Methoxyethyl-modifizierte RNAs verwendet werden, die aber mindestens sechs DNA-Basen enthalten müssen, damit sie noch als Substrat für RNase H dienen können (Agrawal S. et. al. 1997; Monia B.P. et. al. 1993). Diese auch „Mixed-Backbone“-Oligonukleotide genannten ASOs befinden sich gerade in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung (Agrawal S. et. al. 2001; Braasch D.A. et. al. 2002). Mit einem Phosphodiester-Rückgrat anstelle des Phosphorothioat-Rückgrats kann die unspezifische Aktivierung des Immunsystems (Stimulation von Lymphozyten) um ein Vielfaches reduziert werden, denn das Phosphorothioat-Rückgrat alleine besitzt unabhängig von der Sequenz die Fähigkeit, das Immunsystem zu stimulieren (Agrawal S. et. al. 1997; Hartmann G. et. al. 1996; Krieg A.M. et. al. 1996). Weitere Modifikationen sind Morpholino-Oligonukleotide, bei denen es sich um nicht-ionische DNA-Analoga handelt, Peptid-Nukleinsäuren, die DNA/RNA-Hybride nachahmen, indem das Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat durch ungeladene *N*-(2-Aminoethyl)-Glycin-Verbindungen ersetzt wird, oder LNAs („locked nucleic acids“), bei denen es sich um „geschlossene“ Nukleinsäuren handelt, deren Basen RNA-Analoga sind, die eine Methylenbrücke enthalten, die den 2'-Sauerstoff der Ribose mit ihrem 4'-Kohlenstoff verbindet (Braasch D.A. et. al. 2002). Morpholino-Oligonukleotide und auch die Peptid-Nukleinsäuren bei-

spielsweise aktivieren nicht die RNase H, sondern hemmen die Genexpression über einen sterischen Mechanismus (Braasch D.A. et. al. 2002). Wie auch die anderen 2'-Modifikationen reduziert auch in den LNAs der 2'-4'-Ringschluss die Aktivierung von RNase H. Mit diesen ungeladenen Molekülen anstelle der geladenen ASOs der ersten Generation können aber unspezifische Effekte deutlich reduziert werden.

### 6.2.5 Fazit aus den Studien mit Antisense-Oligonukleotiden gegen PLK1

Werden die Ergebnisse aus früheren Studien auf Zellkulturebene mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit über die Hemmung von PLK1 mittels ASOs im Kontext betrachtet, kann PLK1 durchaus als neues vielversprechendes Target für die Krebstherapie mit ASOs angesehen werden.

Um den Weg in diese Richtung zu ebnet, muss im Xenograft-Modell die minimal erforderliche Dosis ermittelt werden. Durch Verkapselung der ASOs in Nanopartikel (aus Gelatine oder humanem Serum-Albumin) kann eventuell die so ermittelte minimale Dosis noch reduziert werden. Momentan werden ASOs gegen andere Tumortargets in den verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung in einer Dosierung von 2 – 6 mg ASO/kg Körpergewicht/Tag eingesetzt (Braasch D.A. et. al. 2002), was nur wenig unter der Dosierung im Xenograft-Experiment der vorliegenden Arbeit liegt. Aber auch die Suche nach Hemmstoffen, die in geringerer Konzentration bereits ähnliche Hemmeffekte erzielen, stellt einen weiteren Ansatzpunkt für die Verbesserung der bislang im Einsatz befindlichen Technologien dar. Dies könnten beispielsweise niedermolekulare Hemmstoffe sein, aber auch Substanzen mit natürlicher Zusammensetzung.

Im Laufe der Arbeit wurde eine neue Technik publiziert, die diese Anforderungen teilweise erfüllt und ebenfalls zur gezielten und spezifischen Hemmung der Expression bestimmter Gene eingesetzt werden kann. Es handelt sich um die RNA-Interferenz, mit der ebenfalls die Expression von PLK1 ge-

hemmt werden sollte, um die Effekte mit den Hemmeffekten durch ASOs zu vergleichen.

### **6.3 Untersuchungen mit siRNAs an Krebszelllinien und an primären humanen Mammaepithelzellen *in vitro* und im Xenograft-Experiment**

#### **6.3.1 Bedeutung von siRNAs für die Hemmung von PLK1**

Nachdem im Jahre 2001 entdeckt wurde, dass siRNAs auch zur Regulation der Genexpression über Elemente der RNAi-Maschinerie eingesetzt werden können (Sharp P.A. 2001), und dieses Phänomen auch in Mammalia-Zellen nachgewiesen werden konnte (Elbashir S.M. et. al. 2001a), wurde diese neue Methode in Betracht gezogen, um die PLK1-Funktion auch über diesen Mechanismus auszuschalten und so eine weitere Technik für die Behandlung von Krebserkrankungen zu entwickeln, die eventuell sogar noch spezifischer und effizienter als die eben diskutierte Antisense-Technologie ist. Mit der Technik der RNA-Interferenz konnte in der vorliegenden Arbeit noch genauer als mit dem Einsatz von ASOs die Bedeutung von PLK1 für die Proliferation von Krebszellen und auch im direkten Vergleich von primären Mammaepithelzellen untersucht werden.

#### **6.3.2 Vorteile, Spezifität und differentielle Wirkung von siRNAs gegen PLK1**

Die Transfektion verschiedener Krebszelllinien mit siRNAs gegen PLK1 führte zu einer signifikanten Hemmung der PLK1-Expression schon in einer Konzentration von nur 5,6 nM. Bei Konzentrationen unter 0,56 nM verschwand dieser Effekt allerdings wieder. Dennoch lag der Konzentrationsbereich, in dem bereits signifikante Effekte auf die PLK1-Expression erzielt werden konnten, weit unter den Konzentrationen, die beim Einsatz von ASOs für vergleichbare Effekte verwendet werden mussten (250 nM). Auch in anderen Studien waren vergleichbare bzw. noch höhere ASO-Konzentrationen von 100 nM –

20  $\mu\text{M}$  für eine signifikante Hemmung der jeweiligen Genexpression nötig (Bost F. et. al. 1999; Herness E.A. et. al. 2003; Russo P. et. al. 2003; Yang D.C. et. al. 2002). Die siRNA-Konzentrationen hingegen lagen in diversen Studien (Caplen N.J. et. al. 2001; Elbashir S.M. et. al. 2001a; Harborth J. et. al. 2001; Liu X. et. al. 2002; Mailand N. et. al. 2002b) in einem Bereich von 25 – 200 nM, was im Konzentrationsbereich der vorliegenden Arbeit und damit weit unter den bei ASOs erforderlichen Konzentrationen liegt. Daher fällt ein Grund, aus dem die Phosphorothioate bislang als pharmakologische Wirkstoffe ihre Grenzen haben, bei siRNAs weg, da hier die Gefahr toxischer Wirkungen aufgrund der niedrigeren Konzentrationen wesentlich geringer ist. Hierzu trägt noch die Tatsache bei, dass siRNAs *in vitro* länger stabil sind als ASOs, die auch trotz Modifikationen leichter durch Nukleasen degradiert werden (Bertrand J.R. et. al. 2002).

Doch auch bei der Verwendung von siRNAs muss gezeigt werden, dass ihre Wirkung spezifisch für die jeweilige Sequenz ist, damit sie als pharmakologische Wirkstoffe in Betracht kommen. Hierfür konnten verschiedene Hinweise gefunden werden: Zum einen hatten unter den vier getesteten siRNAs gegen PLK1 nur zwei eine wirklich signifikante Hemmwirkung auf die PLK1-Expression. Diese Unterschiede in der Effektivität verschiedener PLK1-spezifischer siRNAs in einer bestimmten Zelllinie können mit deren Fähigkeiten, einen RNAi-Silencing-Komplex zu bilden, korrelieren. Diese Möglichkeit wiederum könnte durch die Zugänglichkeit bestimmter Regionen der Ziel-mRNA determiniert sein.

Der nächste Hinweis auf die Spezifität der siRNAs gegen PLK1 gelang mittels Transfektion mit einer „scrambled“-Sequenz, die zu der wirksamsten siRNA4 korrespondiert, und einer siRNA gegen die Lamine A/C, die beide keinen Effekt auf die PLK1-Expression sowie auf die Proliferation in den untersuchten Krebszelllinien und dem primären Zellsystem HMEC hatten.

Alle vier getesteten Krebszelllinien sprachen auf die antiproliferative Wirkung von siRNA4 an, weshalb auch aus den Ergebnissen, die mit dieser Technik

erzielt werden konnten, geschlossen werden kann, dass die Hemmung von PLK1 als potenzielles Instrument für die Krebstherapie untersucht werden könnte. Diese Perspektive wird zudem durch die Beobachtung bekräftigt, dass in der vorliegenden Arbeit die siRNAs gegen PLK1 keinen antiproliferativen Effekt auf primäre humane Mammaepithelzellen hatten, obwohl sie durchaus fähig waren, in diesen Zellen die PLK1-Expression signifikant zu reduzieren. Für diese Reduktion der Expression waren allerdings um ein Vielfaches höhere Konzentrationen (350-fach höher) erforderlich als in den Krebszelllinien, was wiederum den differentiellen Effekt zwischen primären und entarteten Zellen unterstreicht. Diese Unterschiede der effektiven Konzentrationen beruhen wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Transfektionseffizienzen in primären Zellen versus Krebszelllinien (vgl. Kapitel 5.2.9, Abbildung 59), die ihrerseits auf die unterschiedliche Permeabilität der Zellmembranen in den beiden Zelltypen zurückzuführen sein könnten (Caruso R.A. et. al. 2001; Mullin J.M. et. al. 2000).

In früheren Studien, in denen dominant-negative Formen von PLK1 über Adenoviren in Krebszelllinien und in primäre Zellen eingebracht wurden, konnte ebenfalls die PLK1-Funktion gehemmt werden (Cogswell J.P. et. al. 2000), aber es gibt noch beträchtliche Einschränkungen für eine mögliche Therapie von Krebspatienten mit rekombinanten adenoviralen Vektoren (Vorburger S.A. et. al. 2002). Obwohl die adenoviralen Vektoren (der zweiten und dritten Generation) eine geringere Toxizität besitzen und auch *in vivo* länger das gewünschte Gen exprimieren (Schiedner G. et. al. 1998), besteht weiterhin das Problem, dass bei einer zweiten Gabe der adenoviralen Vektoren neutralisierende Antikörper ausgebildet werden und es so nicht zu einem ausreichenden Gentransfer kommen kann. Da kleine Nucleinsäuren keine antigenen Eigenschaften besitzen, ist es unwahrscheinlich, dass siRNAs die Bildung entsprechender Antikörper induzieren.



Die Möglichkeit, mit siRNAs selektiv Target-Proteine wie PLK1, die an der Tumorigenese beteiligt sind, auszuschalten, könnte eventuell dazu führen, dass diese siRNAs nicht nur als neue Klasse chemotherapeutischer bzw. ge-  
notherapeutischer Wirkstoffe für die systemische Behandlung von Krebspa-  
tienten eingesetzt werden können, sondern auch zum besseren Verständnis  
der kritischen molekularen Geschehnisse, die verantwortlich für Initiation  
und Progression von malignen Tumoren sind, beitragen können.

### **6.3.3 Neue Gesichtspunkte über die Funktion von PLK1 in mitotischen Zellen**

Die vorliegenden Ergebnisse liefern interessante neue Aspekte über die Rol-  
le von PLK1 in Krebszellen. Zum Beispiel spielen Zentrosomen eine kritische  
Rolle bei der genetischen Instabilität von Krebszellen (Brinkley B.R. 2001; Dox-  
sey S.J. 2001). Sie tragen zu Spindelabnormalität und ungeordneter Chro-  
somentrennung bei, was häufig zu Veränderungen in zellulären Schlüs-  
selereignissen führt, wie die Regulation der Apoptose, die Kontrolle des Zell-  
zyklus an den diversen Kontrollpunkten oder die Regulation der Zellprolifera-  
tion. In frühen Formen von humanen Mamma- und Prostatakarzinomen  
konnten kürzlich abnormale Zentrosomen detektiert werden (Pihan G.A. et.  
al. 2001). Dabei könnten eventuell zusätzliche Zentrosomen in den Krebszel-  
len zu der gestörten Aufteilung der Chromosomen oder aber zu Schäden  
an den Chromosomen führen, wodurch aneuploide Zellen entstehen kön-  
nen, was wiederum die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder die  
Aktivierung von Onkogenen hervorrufen könnte. Möglicherweise sind also  
abnormale Zentrosomen nicht die Konsequenz aus der Entartung der Zellen,  
sondern eine Ursache für die Krebsentstehung (Pihan G.A. et. al. 2001).

Gerade der Zusammenhang zwischen der Funktion von PLK1 und der Funk-  
tion der Zentrosomen wurde neben der vorliegenden Arbeit schon in diver-  
sen Studien beleuchtet (Cogswell J.P. et. al. 2000; do Carmo A.M. et. al.  
2001; Doxsey S.J. 2001; Lane H.A. et. al. 1996). In der Studie von Lane und  
Nigg (Lane H.A. et. al. 1996) führte die PLK1-Antikörper-Mikroinjektion in He-  
La-Zellen zu monoastralen Mikrotubuli und zu zwar verdoppelten, aber un-

getrennten Zentrosomen. Dennoch war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Behandlung der Zellen mit siRNA erstmals möglich, die PLK1-Expression komplett zu hemmen und damit die Teilung der Zentrosomen von der Funktion der Mikrotubuli zu trennen, denn in SW-480-Kolonkarzinom-Zellen führte die Transfektion mit siRNA4 dazu, dass sich die Zentrosomen teilen und auch voneinander trennten, aber dies geschah hier ganz offensichtlich in Abwesenheit von Mikrotubuli. Wurde durch die siRNA-Behandlung die PLK1-Expression gehemmt, konnte der Mikrotubulikomplex, der für die Aster- und Spindelformation benötigt wird, nicht ausgebildet werden, weshalb das Ausschalten der PLK1-Funktion verschiedenste mitotische Phänotypen in den unterschiedlichen Zelllinien induzieren konnte – jeweils abhängig von den verschiedenen Defekten der Kontrollpunkte.

Eine frühere Studie zeigte die aberrante Funktion von PLK1 in Krebszellen. Hierbei wurden die PLK1-Protein-Spiegel in Krebszellen mit dem Ausmaß der Interaktion der PLK1-mRNA mit Hsp90 in Beziehung gesetzt (Simizu S. et al. 2000). Es wurden in einem Teil der analysierten Krebszelllinien (z.B. in A549-Zellen) Mutationen in der 3'-untranslatierten Region der PLK1-mRNA gefunden, die eventuell dazu führen, dass PLK1 nicht mehr mit Hsp90 interagieren kann und dadurch geringere PLK1-Proteinspiegel resultieren. Daher könnten auch variierende Spiegel an endogenem PLK1 in den Krebszellen das Ausmaß der Wirkung einer siRNA-Behandlung und damit den daraus resultierenden Phänotyp beeinflussen. Auch in der Studie von Simizu *et al.* konnte jedoch die PLK1-mRNA-Menge nicht mit der PLK1-Proteinmenge korreliert werden, was durch die Beobachtung der vorliegenden Arbeit unterstrichen wird, denn in der Bronchialkarzinom-Zelllinie A549 konnten die höchsten PLK1-mRNA-Spiegel nachgewiesen werden, in der Studie von Simizu *et al.* hingegen sehr geringe PLK1-Proteinspiegel.

#### 6.3.4 Anwendbarkeit von siRNAs *in vivo* und mögliche Modifikationen zur Verbesserung der Stabilität

Im Anschluss an diese Beobachtungen in Zellkultur wurde die Auswirkung der Behandlung mit PLK1-siRNAs im humanen Xenograft-Modell an Nacktmäusen untersucht. Hierbei wurden die *in vitro* am besten wirkende siRNA4 in chemisch synthetisierter Form sowie ihre „scrambled“-Sequenz siRNA4S als Negativkontrolle eingesetzt. Dabei zeigten erste Experimente mit Konzentrationen, die den *in vitro*-Ergebnissen mit siRNA und den *in vivo*-Ergebnissen mit den ASOs entsprachen, also ein Bereich, in dem unter Berücksichtigung der um ein Vielfaches besseren Wirksamkeit der siRNAs *in vitro* ein Hemmeffekt auch *in vivo* zu erwarten gewesen wäre, keine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum von MCF-7- oder SW-480-Tumor-Xenograft-Modellen durch siRNA4. Es ist bei der Injektion von reiner siRNA jedoch fraglich, wie lange die siRNA stabil ist bzw. ob die siRNA überhaupt von den Zellen aufgenommen wird, denn auch *in vivo* stellt die lipophile Zellmembran der Blutgefäße wie auch der Tumorzellen, die beide überwunden werden müssen, eine Barriere für im Blut befindliche Nukleinsäuren dar. Doch auch die mit der Kombination aus dem Transfektionsvermittler Oligofectamin (in Anlehnung an die *in vitro*-Untersuchungen) und siRNA4 durchgeführten Experimente an MCF-7-Xenograft-Modellen blieben erfolglos. Das nächste Experiment diente der Untersuchung, ob eventuell keine wachstumshemmende Wirkung zu beobachten ist, weil die siRNAs von Nukleasen im Blut der Tiere abgebaut werden, bevor sie das Tumorgewebe erreichen können. Deshalb wurde der Nukleaseinhibitor RNasin<sup>®</sup> mit den siRNAs gemischt und diese dann erst injiziert. Aber auch diese Xenograft-Experimente mit der Krebszelllinie MCF-7 blieben ohne Hemmeffekt auf das Tumorwachstum.

In den eben diskutierten *in vivo*-Experimenten wurden siRNAs mit einem 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen eingesetzt, die die Stabilität von siRNAs gegenüber dem Angriff durch Nukleasen erhöhen sollen (Elbashir S.M. et. al. 2001a) und mit denen *in vitro* eine signifikante Hemmwirkung erzielt werden konnte. Da – wie schon in den ASO-Experimenten beobachtet –

eine Wirkung in Zellkultur nicht unbedingt auf Effekte *in vivo* schließen lässt, wurden weitere Versuche mit synthetischen siRNAs ohne 3'-Überhang durchgeführt, um zu überprüfen, ob mit diesen *in vivo* ein Hemmeffekt erzielt werden kann, denn es konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass das 5'-Ende wichtig für die Phosphorylierung und damit die RNA-Interferenz ist (Nykanen A. et. al. 2001), das 3'-Ende hingegen war in Studien von Chiu *et al.* (Chiu Y.L. et. al. 2002) bezüglich der Wirksamkeit unempfindlich gegenüber Modifikationen. In diesen Versuchen lag die siRNA-Konzentration mit 3,3 mg/kg Körpergewicht/Tag wiederum fast in der Größenordnung der bei ASOs im *in vivo*-Experiment eingesetzten Dosierung, aber auch in diesen HeLa S3- und A549-Xenograft-Experimenten konnte das Tumorstadium nicht gehemmt werden, obwohl die siRNAs ohne den 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen *in vitro* sogar leicht effektiver als die mit entsprechendem 3'-Überhang waren.

Das Fazit aus diesen Versuchen mit synthetischer siRNA, das Prinzip der RNA-Interferenz-vermittelten Hemmwirkung auch auf die systemische Applikation der siRNAs an Nacktmäusen zu übertragen und für die Tumorthherapie zugänglich zu machen, ist, dass wahrscheinlich die Stabilität der siRNAs erhöht werden muss. Dies könnte durch Modifikationen erreicht werden, denn auch die anfangs rein und unmodifiziert applizierten ASOs waren wirkungslos und erst mit der Entwicklung verschiedener Modifikationen (z.B. Phosphorothioate, Mixed-Backbone-Oligonukleotide) fand das Prinzip verbreitete Anwendung in der Entwicklung für die Therapie verschiedener Erkrankungen.

Ein Ansatzpunkt zur Verbesserung der Stabilität der siRNAs wäre die Modifikation der Überhänge. In den meisten *in vitro*-Untersuchungen wurden bislang siRNAs mit einem 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen (Elbashir S.M. et. al. 2001c) eingesetzt, und diese waren in *Drosophila*, *C. elegans* und in Mammaliazellen *in vitro* wirksam. Dennoch waren in der vorliegenden Arbeit siRNAs gegen PLK1 mit dieser Art der Überhänge *in vivo* bei systemi-

scher Applikation an Nacktmäusen nicht in der Lage, das Tumorwachstum zu hemmen. Auch die siRNAs ganz ohne 3'-Überhang versagten trotz ihrer exzellenten *in vitro*-Wirkung bei der Behandlung der HeLa S3- oder A549-Xenograft-Tiere. Also kann bislang keine genaue Aussage über die Notwendigkeit eines 3'-Überhangs für die Stabilität der siRNAs getroffen werden, denn beide Varianten waren anscheinend nicht lange genug stabil oder konnten die Zellmembranen nicht überwinden, um ihre Wirkung *in vivo* zu entfalten.

Einige Studien befassten sich bisher schon mit der Struktur der Überhänge von siRNAs und mit der Struktur der siRNAs selber: In früheren Studien an *Drosophila melanogaster* konnten Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. *et al.* 2001c) zeigen, dass 21-Nukleotid-lange siRNAs mit 2 Nukleotiden Überhang am 3'-Ende die effektivste Gen-Silencing-Wirkung hatten. Wurde entweder einer der beiden oder beide RNA-Stränge durch 2'-Deoxy- oder 2'-O-Methyloligonukleotide ersetzt, verschwand der RNAi-Effekt vollständig, wurden nur bis zu vier Nukleotide je Strang durch 2'-Deoxy- oder 2'-O-Methyloligonukleotide ersetzt, blieb die Wirksamkeit erhalten. In einer anderen Studie von Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. *et al.* 2001b) zeigten siRNAs mit langen 3'-Überhängen noch schlechtere Hemmwirkungen als die siRNAs ganz ohne 3'-Überhang. Amarzguioui *et al.* (Amarzguioui M. *et al.* 2003) untersuchten in ihrer Studie diverse Modifikationen des 3'-Überhangs beider Stränge. Das 5'-Ende ließen sie unmodifiziert, da hier die für die Aktivität erforderliche Phosphorylierung erfolgt (Nykanen A. *et al.* 2001). Im Gegensatz zu Elbashir *et al.* (Elbashir S.M. *et al.* 2001c) konnte in den Untersuchungen von Amarzguioui *et al.* mit 2'-O-methylierten siRNAs in HaCaT-Zellen die gleiche Aktivität erzielt werden wie ohne die Modifikation. Die Wirkung hielt sogar länger an. Wurden beide 3'-Enden Allyl-modifiziert, verschwand die Wirkung, aber maximal sechs Modifikationen – entweder durch Methylierung des Zuckers oder Thiolation des Rückgrats – führten zu einer leicht reduzierten, aber dafür länger anhaltenden Hemmwirkung.

Dennoch sind dies zumeist Strukturuntersuchungen, die an *Drosophila melanogaster* oder in Zellkultur durchgeführt wurden, und können daher nicht zwangsläufig auch auf die Situation *in vivo* übertragen werden. Trotzdem könnte über die Entwicklung anderer chemischer Modifikationen als der bislang häufigste 3'-Überhang von zwei Deoxythymidinen die Stabilität erhöht werden und damit auch das erste erfolgreiche Tierexperiment mit systemischer Applikation von chemisch synthetisierten siRNAs gegen ein endogenes Gen in der Krebstherapie gelingen.

#### **6.4 Untersuchungen mit Expressionsplasmiden an HeLa S3-Zellen *in vitro* und im Xenograft-Experiment**

Da siRNAs effiziente Inhibitoren der PLK1-Expression *in vitro* waren, dies aber zum einen nur transiente Effekte sind und zum anderen die bisherigen *in vivo*-Experimente erfolglos geblieben sind, wurden darüber hinaus Expressionsplasmide eingesetzt, die hairpin-RNAs (shRNAs) gegen PLK1 sowie eine korrespondierende „scrambled“-Sequenz exprimieren. Mit einer solchen Vektor-basierten Strategie können in einer Zelle bis zu  $5 \times 10^6$  shRNA-Moleküle exprimiert werden, so dass eine einmalige Zufuhr der rekombinanten Plasmide genügt, um dauerhaft eine Hemmwirkung auszuüben. Auch hier wurde die „scrambled“-Sequenz eingesetzt, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen.

Diese Herangehensweise wurde bisher in verschiedenen *in vitro*-Studien analysiert, die alle RNA-Polymerase III-Promoter verwendeten, die genau definierte Start- und Stoppsignale besitzen, wodurch siRNAs hergestellt werden können, die keine Teile der Promoter-Sequenz enthalten, sondern nur die 21-Nukleotid-langen Sequenzen sowie die 6-Nukleotid-lange Verbindungsschleife für die shRNAs exprimieren. Insbesondere der U6-snRNA-Promoter und der H1-RNA-Promoter sind bisher ausgiebig untersucht worden (Chong S.S. et. al. 2001; Hannon G.J. et. al. 1991; Lobo S.M. et. al. 1990). Einige Gruppen konnten mit diesem Ansatz bereits die Hemmung verschiedener

Gene in Zellkultur-Experimenten zeigen (Brummelkamp T.R. et. al. 2002b; Lee N.S. et. al. 2002; Paul C.P. et. al. 2002; Sui G. et. al. 2002; Yu J.Y. et. al. 2002).

#### 6.4.1 Anwendung der Expressionsplasmide für shRNAs gegen PLK1 *in vitro*

Auf der Grundlage der eben beschriebenen Studienergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls unter Verwendung des U6-snRNA-Promoters eine shRNA hergestellt, die gegen PLK1 gerichtet ist, bzw. ihre korrespondierende „scrambled“-Sequenz, um mit den rekombinanten Plasmiden zuerst *in vitro* HeLa-S3-Zellen zu transfizieren und deren Proliferation bzw. PLK1-mRNA-Expression zu ermitteln. In den Untersuchungen mit diesen shRNAs zeigte sich eine signifikante, aber nur ca. 50%ige Reduktion der PLK1-mRNA durch das rekombinante Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1. Da aber in diesem Fall berücksichtigt werden muss, dass bei der Transfektion von Plasmid-DNA auch unter Verwendung von Transfektionsvermittlern wie FuGENE™6 nur Transfektionseffizienzen im Bereich von 40 – 60% erzielt werden können, sind diese Werte mehr als vielversprechend für die Anwendung der Expressionsplasmide *in vivo*. Sowohl das parentale Plasmid pBS/U6 als auch die „scrambled“-Kontrolle pBS/U6/shRNA/PLK1S hatten keinen Einfluss auf die PLK1-mRNA-Expression, was wiederum auch in diesen Studien die Spezifität der shRNA-Wirkung unterstreicht. Die Proliferation der HeLa S3-Zellen konnte allerdings mit dem rekombinanten Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1 kaum bzw. gar nicht inhibiert werden, aber bei den erwähnten Transfektionseffizienzen befinden sich zu viele nicht-transfizierte Zellen in den Kulturen, die sich normal weiter teilen können – unter Umständen, da ihnen durch den Zelltod der transfizierten Zellen mehr Platz und mehr Nährstoffe für die eigene Zellteilung zur Verfügung stehen, sogar schneller als normal – und dadurch eventuell eine Hemmwirkung der PLK1-spezifischen shRNAs auf die Zellproliferation maskieren. In beiden *in vitro*-Untersuchungen (Proliferation und PLK1-mRNA-Bestimmung) konnte der Zusatz des Nukleaseinhibitors ATA die Wirkung des rekombinanten Plasmids pBS/U6/shRNA/PLK1 nicht verstärken, was aber wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass durch die Ver-

kapselung der Plasmide mit dem Transfektionsvermittler FuGENE™6 die Plasmide ohnehin gegenüber dem Angriff der zelleigenen Nukleasen geschützt sind und daher durch den Zusatz von ATA keine Erhöhung der Stabilität erzielt werden kann, was zu deutlicheren Hemmeffekten führen würde.

#### 6.4.2 Kombination der rekombinanten Plasmide mit ATA *ex vivo*

Da der virale Gentransfer durch die Induktion von Antikörpern limitiert ist (vgl. Kapitel 6.3.2), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals analysiert, ob Expressionsplasmide im Blut durch den Zusatz eines Nukleaseinhibitors (ATA) so stabilisiert werden können, dass ein ausreichender Gentransfer ohne virale Vektoren erzielt werden kann. Die Wirkung von ATA wurde daher zuerst in einem *ex vivo*-Versuch beleuchtet, um das sich anschließende Xenograft-Experiment vorzubereiten. ATA soll später *in vivo* die injizierten Plasmide im Blut der Mäuse gegenüber dem Angriff von Nukleasen schützen, da es als kompetitiver Inhibitor mit der Nukleinsäure um die Bindungsstelle der jeweiligen Nuklease konkurriert und so die Nukleaseaktivität direkt ausschaltet (Gonzalez R.G. et. al. 1980).

Für diesen Versuch wurden gleiche Mengen Blut unter standardisierten Bedingungen mit gleichen Mengen an Expressionsplasmid und verschiedenen ATA-Konzentrationen inkubiert (ATA : Plasmid-DNA 1 : 50, 1 : 5 und 1 : 0,5). Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Plasmide im Southern-Blot detektiert, und es konnte hier im Gegensatz zu den *in vitro*-Untersuchungen an HeLa S3-Zellen eine stabilisierende Wirkung von ATA auf alle drei Formen der Plasmide (linear, zirkulär und supercoiled) nachgewiesen werden. Auch konnte durch den Zusatz von ATA die Degradation der Plasmide vermindert werden. Diese Untersuchungsergebnisse machten eine Anwendung von ATA für das nachfolgende Tierexperiment sinnvoll, um die Lebensdauer der Plasmide und ihre Aufnahme in die Zellen zu erhöhen und damit die Menge der gebildeten shRNAs, die die eigentliche Hemmwirkung ausüben, zu steigern.



Ähnliche Ergebnisse über die Plasmid-stabilisierende Wirkung von ATA erzielten auch schon Glasspool-Malone *et al.* in ihren Experimenten, in denen sie Plasmide mit und ohne ATA *in vitro* mit Lungenflüssigkeit aus Mäusen und Makaken inkubierten (Glasspool-Malone J. *et al.* 1999; Glasspool-Malone J. *et al.* 2002). Auch in ihren Experimenten konnte die supercoiled-Form der Plasmide durch die Zugabe von ATA stabilisiert werden und die Degradation der Plasmide verringert werden.

#### 6.4.3 Anwendung der Expressionsplasmide für shRNAs gegen PLK1 *in vivo*

Im sich anschließenden Xenograft-Experiment mit HeLa S3-tumortragenden Nacktmäusen wurden ebenfalls pBS/U6 und pBS/U6/shRNA/PLK1S als Kontrollen eingesetzt. Das Expressionsplasmid pBS/U6/shRNA/PLK1, das die shRNA gegen PLK1 exprimiert, wurde in zwei Variationen eingesetzt, und zwar einmal wie die beiden Kontrollgruppen unter Verwendung des Nukleaseinhibitors ATA (Plasmid-DNA : ATA 5 : 1) und einmal ohne Zusatz von ATA, um den Einfluss der stabilisierenden Wirkung von ATA festzustellen und um toxische Nebenwirkungen durch ATA ausschließen zu können. In beiden Gruppen, die mit dem rekombinanten Plasmid pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelt wurden, konnte das Tumorwachstum im Vergleich zu der mit dem parental Vektor pBS/U6 behandelten Gruppe signifikant reduziert werden. Diese wachstumshemmende Wirkung konnte durch den Nachweis der Reduktion der PLK1-mRNA in den Tumoren bestätigt werden. Das bedeutet, dass *in vivo* ein Plasmid-stabilisierender Effekt durch ATA auftrat, was *in vitro* nicht der Fall war. Die Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1S, der „scrambled“-Sequenz, hatte keine das Tumorwachstum hemmende Wirkung. Auch die PLK1-mRNA blieb bei Behandlung mit pBS/U6/shRNA/PLK1S im Vergleich zu pBS/U6 unverändert, was einen wichtigen Hinweis auf die Spezifität der shRNAs *in vivo* darstellt.

Da die Mäuse über den gesamten Versuchsverlauf keinen Gewichtsverlust zeigten, traten potenzielle Nebenwirkungen der Plasmide, z.B. Störungen im Gastrointestinaltrakt, nur begrenzt auf. Nebenwirkungen durch ATA waren

aufgrund der Konzeption der Experimente äußerst unwahrscheinlich, denn bereits in früheren Studien wurde der Effekt von ATA auf die Plättchenaggregation in Pavianen ermittelt, indem diesen ATA intravenös injiziert wurde (Alwayn I.P. et. al. 2000). Eine Dosis von 24 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag verminderte bei den Pavianen die Plättchenaggregation, mit einer Dosis von 12 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag konnten aber bereits wieder normale Blutparameter erreicht werden. Glasspool-Malone *et al.* (Glasspool-Malone J. et. al. 1999) ermittelten bei Mäusen die LD<sub>50</sub>, die bei 6 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag und damit unter der toxischen Dosis bei Pavianen lag. Im vorliegenden Xenograft-Experiment lag die eingesetzte ATA-Dosis bei dreimal wöchentlich 80 µg ATA/kg Körpergewicht und damit weit unter der LD<sub>50</sub> von 6 mg ATA/kg Körpergewicht/Tag. Neben dem Nachweis der PLK1-mRNA-Reduktion im *in vivo*-Experiment gelang in der immunhistochemischen Färbung der Nachweis einer spezifischen PLK1-Reduktion in Tumorschnitten, die am Tag nach der letzten Behandlung angefärbt wurden. Auch die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 konnte durch die pBS/U6/shRNA/PLK1-Behandlung deutlich gegenüber der pBS/U6-Behandlung reduziert werden. Da Ki-67 ein etablierter Proliferationsmarker ist, hat diese Beobachtung neben der Reduktion der Expression von PLK1 große Bedeutung, denn mit zwei unabhängigen Markern konnte somit die Hemmung der Zellteilung beschrieben werden. Dies konnte im durchgeführten Xenograft-Experiment auch insofern beobachtet werden, als die Tumoren der mit pBS/U6/shRNA/PLK1 behandelten Mäuse nach Beendigung der Therapie über einen Beobachtungszeitraum von weiteren vier Wochen nicht weiterwuchsen, während die Tumoren aller anderen Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen weiterwuchsen. Eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum als vier Wochen über die Therapie hinaus war leider nicht möglich, da die Tumoren der Kontrollgruppen zu groß wurden und die Mäuse aus diesem Grund gemäß dem Tierschutzgesetz getötet werden mussten.

In bisherigen Ansätzen ist der nicht-virale *in vivo*-Gentransfer mit nackter DNA immer daran gescheitert, dass er weniger effizient war als der mit viralen Vektoren, obwohl beide Techniken reproduzierbar, einfach und sicher sind (Latchman D.S. 2001; Lechardeur D. et. al. 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten daher eine Strategie, mit der der Gentransfer mit reiner Plasmid-DNA durch den Einsatz von ATA wieder neu in Betracht gezogen werden sollte, denn mit der beschriebenen Strategie existiert eine sehr wirkungsvolle Methode, über die Reduktion der PLK1-Expression das Tumorwachstum in Nacktmäusen signifikant zu hemmen.

#### **6.4.4 Fazit aus der Vektor-basierten Expression von shRNAs gegen PLK1**

In der vorliegenden Arbeit ist auf der Basis des U6-snRNA-Promoters erstmals die systemische Behandlung von tumortragenden Tieren mit shRNA-exprimierenden Plasmiden durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene gelungen. Bisher sind weltweit noch keine Daten über die systemische Therapie tumortragender Tiere bekannt. Daher könnte das erste Hindernis auf dem Weg zur Anwendung der RNA-Interferenz in der Krebstherapie überwunden sein. Dies wird vor allem durch die Tatsache interessant, dass die Tumoren auch nach Ende der Behandlung über den Beobachtungszeitraum von vier Wochen im Wachstum stagnierten, so dass das Auftreten von Rezidiven oder von Metastasen minimiert werden kann. Auch ist ein immenser Vorteil dieser Strategie, dass sie – wie auch die beiden vorher beschriebenen – hoch spezifisch ist. Darüber hinaus ist sie im Vergleich zu allen synthetischen ASOs oder siRNAs kosteneffizient, und es sind keine langen Synthesewege erforderlich. Es handelt sich um biotechnologisch herstellbare Stoffe (Fermenterproduktion) und nicht um höchstkomplexe Makromoleküle, die immer ein Risiko für unspezifische Reaktionen und damit Nebenwirkungen darstellen. Die Transfektion von Zellen und damit auch die Behandlung von Patienten mit Plasmid-DNA hat den praktischen Vorteil gegenüber der Transfektion oder Injektion von siRNA, dass DNA wesentlich stabiler ist als RNA. Zudem ist die Applikation nicht täglich erforderlich, sondern es ist ein

für die Patienten besser verträgliches Regime von drei Injektionen pro Woche (beispielsweise Montag, Mittwoch, Freitag) möglich, das eventuell sogar noch reduziert werden kann.

An PLK1 ist damit der Beweis der RNA-Interferenz-vermittelten Hemmung der Genexpression an einem tumorassoziierten Target-Gen gelungen. Die U6-Promoter-basierte Strategie bietet außerdem Anwendungsmöglichkeiten bei vielen weiteren Erkrankungen, die durch die Expression unerwünschter Gene gekennzeichnet sind (z.B. virale Infektionen wie die Hepatitiden oder AIDS). Bei der Abwehr von AIDS wäre es zum Beispiel möglich, Knochenmarksstammzellen des Patienten zu entnehmen und so zu manipulieren, dass sie gegen HIV resistent werden, indem entweder die HIV-RNA selber ausgeschaltet würde oder aber die für die HIV-Infektion nötigen Rezeptoren. Unter Umständen ist es sogar möglich, *in vivo* ein krankheitsverursachendes mutiertes Allel spezifisch auszuschalten – z.B. ein aktiviertes Onkogen –, ohne dass das normale gesunde Allel betroffen ist (Tuschl T. 2002). *In vitro* ist dies bereits gelungen, denn Brummelkamp *et al.* konnten spezifisch das Onkogen K-Ras ausschalten, ohne die Expression des Wild-Typ-Allels zu beeinträchtigen, obwohl die beiden Allele sich nur durch ein Basenpaar unterscheiden (Brummelkamp T. et. al. 2002a). Diese Selektivität zwischen zwei Allelen auch in solchen Fällen, wo beide Allele sich nur durch ein Basenpaar unterscheiden, wird dadurch gewährleistet, dass die RNA-Interferenz eine dermaßen spezifische Reaktion darstellt, dass ein „Mismatch“ alleine schon genügt, um das Phänomen RNA-Interferenz zu unterbinden.

## 6.5 Schlussfolgerung und Perspektive

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Expression von PLK1 durch verschiedene Techniken *in vitro* und *in vivo* effizient zu hemmen, um auf diesem Wege die Funktion von PLK1 in Säugetierzellen zu ergründen, weiterhin

die Proliferation von Krebszellen spezifisch zu hemmen und so möglicherweise neue Therapieansätze gegen Krebs zu entwickeln.

Nachdem bei der U6-Promoter-basierten Strategie zur Hemmung des Tumorstwachstums in Nacktmäusen der Nachweis von Plasmiden im Tumor erbracht werden konnte, was für eine effiziente Aufnahme von Plasmid-DNA auch *in vivo* spricht, müsste nun der Nachweis der Funktion des Plasmids im Tumor erbracht werden. Doch dies ist aufgrund der geringen Länge des shRNA-Fragments von 21 bp, das von den Plasmiden exprimiert wird, und der geringen Stabilität von shRNA sehr anspruchsvoll.

Außerdem müssten die mit den Expressionsplasmiden und den ASOs erzielten Ergebnisse mit anderen Zelllinien evaluiert werden, um zu untersuchen, ob die Hemmwirkung allgemeine Gültigkeit besitzt und damit auch bei Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten einsetzbar sein könnte. Hierzu bietet sich für die den Einsatz von Expressionsplasmiden beispielsweise die Bronchialkarzinom-zelllinie A549 an, mit der bereits in den dargestellten ASO-Untersuchungen erfolgreich ein Xenograft-Tierexperiment durchgeführt werden konnte, oder auch die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435, die in Nacktmäusen auch Metastasen zu bilden vermag. Weitere Tierexperimente mit anderen Tumorentitäten sowie mit primärem Tumormaterial müssten folgen. Auf dem Gebiet der ASOs könnte der Schritt in die klinische Phase am schnellsten vollzogen werden, denn in diesem Themenkomplex liegen schon weitreichende Daten über die Auswirkungen der Wirkstoffgruppe ASOs am Menschen vor (vgl. Kapitel 2.4, Tabelle 1). Wesentliche weitere Schritte sind in toxikologischen und pharmakologischen Studien zu sehen, die eine zentrale Voraussetzung für einen Antrag an die Ethik-Kommission der Universitätsklinik für die Zulassung von klinischen Studien am Menschen darstellen.

Insgesamt ist mit den hier beschriebenen Experimenten erstmals die Kinase PLK1 als Zielgen für die Krebstherapie vorgeschlagen worden. Darüber hinaus sind auch mit der U6-Promoter-basierten Expression Methoden zur Hemmung unerwünschter Genexpression in Säugetieren entwickelt worden,

die über eine systemische Applikation mit einem relativ ungefährlichen Vektor möglich ist. D.h. nicht nur Krebserkrankungen sind mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode gezielt angreifbar geworden, sondern auch virale Infektionen mit HIV, HCV und HPV oder andere Erkrankungen, die durch Hemmung von bestimmten Genfunktionen eindämmbar sind.

Abschließend stellt sich die Frage, ob es auch gelingen kann, mit dem dargestellten neuen Hemmprinzip eine vererbare Immunität gegen Krebs zu konzipieren, indem die induzierbare Expression von siRNAs gegen PLK1 in Oozyten von Säugetieren manifestiert wird.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Techniken entwickelt, um die Polo-Like Kinase 1 (PLK1), eine Kinase aus der Familie der hochkonservierten Serin/Threonin-Kinasen in ihrer Funktion zu hemmen. Alle Zellen des Säuger-Organismus benötigen für ihre Zellteilung PLK1. PLK1 wird vor allem in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus exprimiert und wird in malignen, d.h. sich schnell und unkontrolliert teilenden Geweben, verglichen mit normalem, primärem Gewebe überexprimiert. Damit liegt hier ein differentieller Unterschied zwischen normalem, primärem Gewebe und malignem Tumorgewebe vor, denn in normalem Gewebe sind nur sehr niedrige PLK1-Spiegel vorhanden (Gewebshomöostase), so dass eine Krebstherapie, die über die Hemmung von PLK1 wirkt, keine oder nur geringe Auswirkungen auf das normale gesunde Gewebe haben sollte. Insgesamt bietet sich PLK1 daher als interessantes Ziel für eine molekularbiologisch basierte Krebstherapie an.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandten Techniken waren zum einen die Antisense-Technologie und zum anderen die RNA-Interferenz (Einsatz synthetischer small interfering RNAs [siRNAs] und Einsatz rekombinanter Plasmide zur Expression von hairpin-RNAs [shRNAs]). Antisense-Oligonukleotide (ASOs) sind schon seit ca. einem Jahrzehnt im Einsatz, um verschiedene Zellzykluselemente zu hemmen. Auch sind ASOs gegen verschiedene Targets bereits in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung, doch mit PLK1 ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals die Hemmung eines späten Elements der Signaltransduktionskaskade, das essentiell für die Mitose ist, gelungen. Somit sind die Auswirkungen auf die Zellen wesentlich stärker als bei weiter am Anfang der Signaltransduktionskaskade gelegenen Elementen, wie z.B. c-Raf, PKC oder Ras, bei denen die Zelle noch die Möglichkeit hat, die Hemmung durch alternative parallele Signalwege zu umgehen. siRNAs sind generell erstmals zum Einsatz gekommen, um in Mammalia-Zellen die Krebszellproliferation bzw. das Tumorwachstum im humanen Krebs-Xenograft-Modell zu hemmen. Auch der Einsatz von shRNA-exprimierenden Plasmiden erfolgte

erstmals, um ein endogenes Gen *in vitro* zu hemmen und dies durch systemische Applikation der Plasmid-DNA auch im humanen Krebs-Xenograft-Modell *in vivo* zu erreichen.

Bei Anwendung der RNA-Interferenz konnte darüber hinaus ein für die Anwendung am Menschen wichtiger differentieller Unterschied zwischen primären Zellen und Krebszelllinien *in vitro* beobachtet werden, denn für die Hemmung der Proliferation von primären humanen Mammaepithelzellen war eine 350-fach höhere siRNA-Konzentration nötig als in den Krebszelllinien. Auch für die Reduktion der mRNA- und Protein-Expression (PLK1 und die Lamine A/C) waren in den primären Mammaepithelzellen diese weitaus höheren Konzentrationen nötig, um vergleichbare Effekte wie in den Krebszelllinien zu erreichen. Die Konzentrationen, mit denen die Krebszellproliferation signifikant gehemmt werden konnte, hatten auf die primären Zellen überhaupt keine Auswirkungen, womit ein Meilenstein auf dem Weg zu einer spezifischen Krebstherapie erreicht werden konnte.

Dabei konnten mit allen drei eingesetzten Techniken die PLK1-mRNA- und -Protein-Expression *in vitro* und die Zellproliferation *in vitro* gehemmt werden. Das Tumorwachstum konnte mit ASOs und mit den rekombinanten Plasmiden *in vivo* in Krebs-Xenograft-Modellen an Nacktmäusen erfolgreich gehemmt werden. Mit U6-Promoter-basiert exprimierten shRNAs konnten im humanen Xenograft-Modell auch die Expression der PLK1-mRNA, das PLK1-Protein sowie der Proliferationsmarker Ki-67 reduziert werden. Auf diese Weise kam es zu einem starken Antitumor-Effekt *in vivo*, der nach Behandlung mit den Expressionsplasmiden vier Wochen über das Ende der Therapie hinaus anhielt.

Ausgehend von diesen Daten sollte für beide Techniken – sowohl für die Antisense-Strategie als auch für die RNA-Interferenz mit dem Target PLK1 – über Toxizitätsuntersuchungen und Ausweitung auf weitere Tumormodelle der Weg in die präklinische Phase eingeschlagen werden, um möglichst schnell die Grundlagen für einen Heilversuch oder eine klinische Studie zu schaffen.



## 8. LITERATURVERZEICHNIS

mittels „Reference Manager Professional Edition Version 9.5“ der Firma ISI ResearchSoft (Californien/USA) erstellt

- Agrawal,S., Jiang,Z., Zhao,Q., Shaw,D., Cai,Q., Roskey,A., Channavajjala,L., Saxinger,C., Zhang,R. 1997.** Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2620-2625.
- Agrawal,S., Kandimalla,E.R. 2000.** Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol. Med. Today* 6, 72-81.
- Agrawal,S., Kandimalla,E.R. 2001.** Antisense and/or immunostimulatory oligonucleotide therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets*. 1, 197-209.
- Ahr,A., Karn,T., Solbach,C., Seiter,T., Strebhardt,K., Holtrich,U., Kaufmann,M. 2002.** Identification of high risk breast-cancer patients by gene expression profiling. *Lancet* 359, 131-132.
- Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Watson,J.D., 1995.** Molekularbiologie der Zelle. *VCH Verlagsgesellschaft mbH*, Weinheim.
- Alwayn,I.P., Appel,J.Z., Goepfert,C., Buhler,L., Cooper,D.K., Robson,S.C. 2000.** Inhibition of platelet aggregation in baboons: therapeutic implications for xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 7, 247-257.
- Amarzguioui,M., Holen,T., Babaie,E., Prydz,H. 2003.** Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 31, 589-595.
- Ames,B.N. 1983.** Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221, 1256-1264.
- Barton,G.M., Medzhitov,R. 2002.** Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14943-14945.
- Bass,B.L. 2001.** RNA interference. The short answer. *Nature* 411, 428-429.
- Bernards,R., Weinberg,R.A. 2002.** A progression puzzle. *Nature* 418, 823.
- Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., Hannon,G.J. 2001 .** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

- Bertrand,J.R., Pottier,M., Vekris,A., Opolon,P., Maksimenko,A., Malvy,C. 2002.** Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1000-1004.
- Blaszczyk,J., Tropea,J.E., Bubunenko,M., Routzahn,K.M., Waugh,D.S., Court DL, Ji,X. 2001.** Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure. (Camb. )* 9, 1225-1236.
- Blumenthal,T., Landers,T.A. 1973.** The inhibition of nucleic acid-binding proteins by aurintricarboxylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 680-688.
- Bohmert,K., Camus,I., Bellini,C., Bouchez,D., Caboche,M., Benning,C. 1998.** AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* 17, 170-180.
- Bost,F., McKay,R., Bost,M., Potapova,O., Dean,N.M., Mercola,D. 1999.** The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 19, 1938-1949.
- Braasch,D.A., Corey,D.R. 2002.** Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 41, 4503-4510.
- 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.
- Brinkley,B.R. 2001.** Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol.* 11, 18-21.
- Brummelkamp,T., Bernards,R., Agami,R. 2002a.** Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R., Agami,R. 2002b.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Byers,B., Goetsch,L. 1974.** Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 38, 123-131.
- Caplen,N.J., Parrish,S., Imani,F., Fire,A., Morgan,R.A. 2001.** Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 98, 9742-9747.

- Carmichael,G.G. 2002.** Medicine: silencing viruses with RNA. *Nature* 418, 379-380.
- Carpick,B.W., Graziano,V., Schneider,D., Maitra,R.K., Lee,X., Williams,B.R. 1997.** Characterization of the solution complex between the interferon- induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I transactivating region RNA. *J. Biol. Chem.* 272, 9510-9516.
- Carroll,S.S., Chen,E., Viscount,T., Geib,J., Sardana,M.K., Gehman,J., Kuo,L.C. 1996.** Cleavage of oligoribonucleotides by the 2',5'-oligoadenylate-dependent ribonuclease L. *J Biol. Chem.* 271.
- Caruso,R.A., Speciale,G., Inferrera,A., Rigoli,L., Inferrera,C. 2001.** Ultrastructural observations on the microvasculature in advanced gastric carcinomas. *Histol. Histopathol.* 16, 785-792.
- Chiu,Y.L., Rana,T.M. 2002.** RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell* 549-561.
- Chong,S.S., Hu,P., Hernandez,N. 2001.** Reconstitution of transcription from the human U6 small nuclear RNA promoter with eight recombinant polypeptides and a partially purified RNA polymerase III complex. *J. Biol. Chem.* 276, 20727-20734.
- Clarke,P.A., Mathews,M.B. 1995.** Interactions between the double-stranded RNA binding motif and RNA: definition of the binding site for the interferon-induced protein kinase DAI (PKR) on adenovirus VA RNA. *RNA.* 1, 7-20.
- Clay,F.J., McEwen,S.J., Bertoncillo,I., Wilks,A.F., 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., Elia,A. 1997.** The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res.* 17, 503-524.
- Cogoni,C., Macino,G. 1999.** Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 286, 2342-2344.

- Cogswell, J.P., Brown, C.E., Bisi, J.E., Neill, S.D. 2000.** Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. *Cell Growth Differ.* 11, 615-623.
- Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., Lin, H. 1998.** A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* 12, 3715-3727.
- Crooke, S.T. 2000.** Potential roles of antisense technology in cancer chemotherapy. *Oncogene* 19, 6651-6659.
- Cuddihy, A.R., Li, S., Tam, N.W., Wong, A.H., Taya, Y., Abraham, N., Bell, J.C., Koromilas, A.E. 1999a.** Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol. Cell Biol.* 19, 2475-2484.
- Cuddihy, A.R., Wong, A.H., Tam, N.W., Li, S., Koromilas, A.E. 1999b.** The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* 18, 2690-2702.
- Cunningham, C.C., Holmlund, J.T., Schiller, J.H., Geary, R.S., Kwoh, T.J., Dorr, A., Nemunaitis, J. 2000.** A phase I trial of c-Raf kinase antisense oligonucleotide ISIS 5132 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 1626-1631.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C. 2000.** An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for post-transcriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 543-553.
- Der, S.D., Yang, Y.L., Weissmann, C., Williams, B.R. 1997.** A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 94, 3279-3283.
- Dirksen, M.L., Crouch, R.J. 1981.** Selective inhibition of RNase H by dextran. *J Biol. Chem.* 256, 11569-11573.
- do Carmo, A.M., Tavares, A., Glover, D.M. 2001.** Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat. Cell Biol.* 3, 421-424.

- Domeier,M.E., Morse,D.P., Knight,S.W., Portereiko,M., Bass,B.L., Mango,S.E. 2000.** A link between RNA interference and nonsense-mediated decay in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 289, 1928-1931.
- Donaldson,M.M., Tavares,A.A., Hagan,I.M., Nigg,E.A., Glover,D.M. 2001.** The mitotic roles of Polo-like kinase. *J Cell Sci.* 114, 2357-2358.
- Dong,B., Silverman,R.H. 1997.** A bipartite model of 2-5A-dependent RNase L. *J Biol. Chem.* 272, 22236-22242.
- Doxsey,S.J. 2001.** Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev.* 2, 688-698.
- Dudley,N.R., Labbe,J.C., Goldstein,B. 2002.** Using RNA interference to identify genes required for RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4191-4196.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., Tuschl,T. 2001a.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir,S.M., Lendeckel,W., Tuschl,T. 2001b.** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W., Tuschl,T. 2001c.** Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20, 6877-6888.
- Filippov,V., Solovyev,V., Filippova,M., Gill,S.S. 2000.** A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* 245, 213-221.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., Mello,C.C. 1998.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Floyd-Smith,G., Slattery,E., Lengyel,P. 1981.** Interferon action: RNA cleavage pattern of a (2'-5')oligoadenylate-- dependent endonuclease. *Science* 212, 1030-1032.
- Furnari,B., Rhind,N., Russell,P. 1997.** Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277, 1495-1497.

- Futami,J., Maeda,T., Kitazoe,M., Nukui,E., Tada,H., Seno,M., Kosaka,M., Yamada,H. 2001.** Preparation of potent cytotoxic ribonucleases by cationization: enhanced cellular uptake and decreased interaction with ribonuclease inhibitor by chemical modification of carboxyl groups. *Biochemistry* 40, 7518-7524.
- Garbe,J., Wong,M., Wigington,D., Yaswen,P., Stampfer,M.R. 1999.** Viral oncogenes accelerate conversion to immortality of cultured conditionally immortal human mammary epithelial cells. *Oncogene* 18, 2169-2180.
- Gil,J., Esteban,M. 2000.** Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*. 5, 107-114.
- Glasspool-Malone,J., Malone,R.W. 1999.** Marked enhancement of direct respiratory tissue transfection by aurintricarboxylic acid. *Hum. Gene Ther.* 10, 1703-1713.
- Glasspool-Malone,J., Steenland,P.R., McDonald,R.J., Sanchez,R.A., Watts,T.L., Zabner,J., Malone,R.W. 2002.** DNA transfection of macaque and murine respiratory tissue is greatly enhanced by use of a nuclease inhibitor. *J Gene Med.* 4, 323-2.
- Glover,D.M., Hagan,I.M., Tavares,A.A. 1998.** Polo-like kinases: a team that plays throughout mitosis. *Genes Dev.* 12, 3777-3787.
- Golsteyn,R.M., Mundt,K.E., Fry,A.M., 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., 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.
- Gonzalez,R.G., Haxo,R.S., Schleich,T. 1980.** Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein--nucleic acid interactions. *Biochemistry* 19, 4299-4303.

- Grishok,A., Pasquinelli,A.E., Conte,D., Li,N., Parrish,S., Ha,I., Baillie,D.L., Fire,A., Ruvkun,G., 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.
- Grishok,A., Tabara,H., Mello,C.C. 2000. Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* 287, 2494-2497.
- Guo,S., 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.
- Guo,Z., Weinstein,M.J., Phillips,M.D., Kroll,M.H. 1993. M(r) 6,400 aurin tricarboxylic acid directly activates platelets. *Thromb. Res.* 71, 77-88.
- Ha,I., Wightman,B., Ruvkun,G. 1996. A bulged *lin-4/lin-14* RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* *lin-14* temporal gradient formation. *Genes Dev.* 10, 3041-3050.
- Hahn,W.C., Counter,C.M., Lundberg,A.S., Beijersbergen,R.L., Brooks,M.W., Weinberg,R.A. 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- Hahn,W.C., Weinberg,R.A. 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 331-341.
- Hallick,R.B., Chelm,B.K., Gray,P.W., Orozco,E.M., Jr. 1977. Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic Acids Res.* 4, 3055-3064.
- Hamanaka,R., Maloid,S., Smith,M.R., O'Connell,C.D., Longo,D.L., 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.
- Hamilton,A.J., Baulcombe,D.C. 1999. A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond,S.M., Bernstein,E., Beach,D., Hannon,G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.

- Hammond,S.M., Boettcher,S., Caudy,A.A., Kobayashi,R., Hannon,G.J. 2001a.** Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146-1150.
- Hammond,S.M., Caudy,A.A., Hannon,G.J. 2001b.** Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2, 110-119.
- Hanahan,D., Weinberg,R.A. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hannon,G.J. 2002.** RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
- Hannon,G.J., Chubb,A., Maroney,P.A., Hannon,G., Altman,S., 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.
- Harborth,J., Elbashir,S.M., Bechert,K., Tuschl,T., Weber,K. 2001.** Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114, 4557-4565.
- Hartmann,G., Krug,A., Waller-Fontaine,K., Endres,S. 1996 .** Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin. *Mol. Med.* 2, 429-438.
- Hassel,B.A., Zhou,A., Sotomayor,C., Maran,A., Silverman,R.H. 1993.** A dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO J* 12, 3297-3304.
- Heald,R., McLoughlin,M., McKeon,F. 1993.** Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* 74, 463-474.
- Herness,E.A., Naz,R.K. 2003.** A Novel Human Prostate-specific Gene-1 (HPG-1): Molecular Cloning, Sequencing, and Its Potential Involvement in Prostate Carcinogenesis. *Cancer Res.* 63, 329-336.
- Hill,I.R., Garnett,M.C., Bignotti,F., Davis,S.S. 2001.** Determination of protection from serum nuclease activity by DNA- polyelectrolyte complexes using an electrophoretic method. *Anal. Biochem.* 291, 62-68.



- Holen,T., Amarguioui,M., Wiiger,M.T., Babaie,E., Prydz,H. 2002. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* 30, 1757-1766.
- Holtrich,U., Wolf,G., Brauninger,A., Karn,T., Bohme,B., Rubsamen-Waigmann,H., 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., Strebhardt,K. 2000. Adhesion induced expression of the serine/threonine kinase Fnk in human macrophages. *Oncogene* 19, 4832-4839.
- Hutvagner,G., McLachlan,J., Pasquinelli,A.E., Balint,E., Tuschl,T., Zamore,P.D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
- Ito,T., Matsuno,H., Kozawa,O., Niwa,M., Sakai,N., Uematsu,T. 1999. Comparison of the antithrombotic effects and bleeding risk of fractionated aurin tri-carboxylic acid and the GPIIb/IIIa antagonist GR144053 in a hamster model of stenosis. *Thromb. Res.* 95, 49-61.
- Izumi,T., Walker,D.H., Maller,J.L. 1992. Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus cdc25* phosphatase regulate its activity. *Mol. Biol. Cell* 3, 927-939.
- Jacque,J.M., Triques,K., Stevenson,M. 2002. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418, 435-438.
- Johnson I., Williamson,G., Musk,S. 1994. Anticarcinogenic factors in plant foods: A new class of nutrients? *Nutr. Res. Rev.* 7, 175-204.
- Jones,L., Ratcliff,F., 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.
- Kamath,R.S., Fraser,A.G., Dong,Y., Poulin,G., Durbin,R., Gotta,M., Kanapin,A., Le Bot,N., Moreno,S., Sohrmann,M., Welchman,D.P., Zipperlen,P., Ahringer,J. 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-237.

- Kataoka,Y., Takeichi,M., Uemura,T. 2001.** Developmental roles and molecular characterization of a *Drosophila* homologue of *Arabidopsis* *Argonaute1*, the founder of a novel gene superfamily. *Genes Cells* 6, 313-325.
- Kennerdell,J.R., Carthew,R.W. 1998.** Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the *wingless* pathway. *Cell* 95, 1017-1026.
- Kennerdell,J.R., Carthew,R.W. 2000.** Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat. Biotechnol.* 18, 896-898.
- Ketting,R.F., Fischer,S.E., Bernstein,E., Sijen,T., Hannon,G.J., 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.
- Ketting,R.F., Haverkamp,T.H., van Luenen,H.G., Plasterk,R.H. 1999.** Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99, 133-141.
- Kisielow,M., Kleiner,S., Nagasawa,M., Faisal,A., Nagamine,Y. 2002.** Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochem. J* 363, 1-5.
- Kita,K., Saito,S., Morioka,C.Y., Watanabe,A. 1999.** Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes. *Int. J. Cancer* 80, 553-558.
- Kitada,K., Johnson,A.L., Johnston,L.H., 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., 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.
- Kneisel,L., Strebhardt,K., Bernd,A., Wolter,M., Binder,A., 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., 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.
- Krieg,A.M. 2001.** From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 11, 181-188.
- Krieg,A.M., Matson,S., Fisher,E. 1996.** Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6, 133-139.
- Kumagai,A., Dunphy,W.G. 1996.** Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* 273, 1377-1380.
- Kumar,A., Yang,Y.L., Flati,V., Der,S., Kadereit,S., Deb,A., Haque,J., Reis,L., Weissmann,C., Williams,B.R. 1997.** Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB. *EMBO J* 16.
- Kuss,B., Cotter,F. 1999.** Antisense--time to shoot the messenger. *Ann. Oncol.* 10, 495-503.
- LaCount,D.J., Bruse,S., Hill,K.L., Donelson,J.E. 2000.** Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 67-76.
- Lagos-Quintana,M., Rauhut,R., Lendeckel,W., Tuschl,T. 2001.** Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lane,H.A., 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.
- Langland,J.O., Kao,P.N., Jacobs,B.L. 1999.** Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochemistry* 38, 6361-6368.
- Latchman,D.S. 2001.** Gene delivery and gene therapy with herpes simplex virus-based vectors. *Gene* 264, 1-9.

- Lau,N.C., Lim,L.P., Weinstein,E.G., Bartel,D.P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.
- Lechardeur,D., Lukacs,G.L. 2002. Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr. Gene Ther.* 2, 183-194.
- Lee,K.S., Yuan,Y.L., Kuriyama,R., 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., 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., Ambros,V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.
- Lee,S.B., Esteban,M. 1994. The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199, 491-496.
- Levin,D., London,I.M. 1978. Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 1121-1125.
- Lewin,B., 2002. Molekularbiologie der Gene. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*, Berlin.
- Lewis,D.L., Hagstrom,J.E., Loomis,A.G., Wolff,J.A., Herweijer,H. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat. Genet.* 32, 107-108.
- Lipardi,C., Wei,Q., 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., Piwnica-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., 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.

- Llamazares,S., Moreira,A., Tavares,A., Girdham,C., Spruce,B.A., Gonzalez,C., Karess,R.E., Glover,D.M., 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., 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.
- Mailand,N., Lukas,C., Kaiser,B.K., Jackson,P.K., Bartek,J., Lukas,J. 2002a. De-regulated human Cdc14A phosphatase disrupts centrosome separation and chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* 4, 317-322.
- Mailand,N., Podtelejnikov,A.V., Groth,A., Mann,M., Bartek,J., Lukas,J. 2002b. Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO J* 21, 5911-5920.
- Martienssen,R.A., Colot,V. 2001. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293, 1070-1074.
- Martinez,J., Patkaniowska,A., Urlaub,H., Luhrmann,R., Tuschl,T. 2002. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.
- McCaffrey,A.P., Meuse,L., Pham,T.T., Conklin,D.S., Hannon,G.J., Kay,M.A. 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-39.
- McKay,R.A., Miraglia,L.J., Cummins,L.L., Owens,S.R., Sasmor,H., Dean,N.M. 1999. Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C- $\alpha$  expression. *J Biol. Chem.* 274, 1715-1722.
- McManus,M.T., Sharp,P.A. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3, 737-747.
- Meurs,E., Chong,K., Galabru,J., Thomas,N.S., Kerr,I.M., Williams,B.R., Hovanessian,A.G. 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA- activated protein kinase induced by interferon. *Cell* 62, 379-390.
- Migliore,L., Coppede,F. 2002. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutat. Res.* 512, 135-153.

- Miyagishi,M., Taira,K. 2002. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 497-500.
- Molinari,M. 2000. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* 33, 261-274.
- Monia,B.P., Johnston,J.F., Geiger,T., Muller,M., Fabbro,D. 1996a. Antitumor activity of a phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide targeted against C-raf kinase. *Nat. Med.* 2, 668-675.
- Monia,B.P., Lesnik,E.A., Gonzalez,C., Lima,W.F., McGee,D., Guinasso,C.J., Kawasaki,A.M., Cook,P.D., Freier,S.M. 1993. Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol. Chem.* 268, 14514-14522.
- Monia,B.P., Sasmor,H., Johnston,J.F., Freier,S.M., Lesnik,E.A., Muller,M., Geiger,T., Altmann,K.H., Moser,H., Fabbro,D. 1996b. Sequence-specific anti-tumor activity of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide targeted to human C-raf kinase supports an antisense mechanism of action in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 15481-15484.
- Moskalenko,S., Henry,D.O., Rosse,C., Mirey,G., Camonis,J.H., White,M.A. 2002. The exocyst is a Ral effector complex. *Nat. Cell Biol.* 4, 66-72.
- Mourelatos,Z., Dostie,J., Paushkin,S., Sharma,A., Charroux,B., Abel,L., Rappsilber,J., Mann,M., Dreyfuss,G. 2002. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16, 720-728.
- Mullin,J.M., Laughlin,K.V., Ginanni,N., Marano,C.W., Clarke,H.M., Peralta,S.A. 2000. Increased tight junction permeability can result from protein kinase C activation/translocation and act as a tumor promotional event in epithelial cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915, 231-236.
- Mundt,K.E., Golsteyn,R.M., Lane,H.A., 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.

- Nemunaitis,J., Holmlund,J.T., Kraynak,M., Richards,D., Bruce,J., Ognoskie,N., Kwoh,T.J., Geary,R., Dorr,A., Von Hoff,D., Eckhardt,S.G. 1999. Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C-alpha, in patients with advanced cancer. *J Clin. Oncol.* 17, 3586-3595.
- Nigg,E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21-32.
- Nishii,K., Kabarowski,J.H., Gibbons,D.L., Griffiths,S.D., Titley,I., Wiedemann,L.M., Greaves,M.F. 1996. ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 13, 2225-2234.
- Nykanen,A., Haley,B., Zamore,P.D. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.
- O'Dwyer,P.J., Stevenson,J.P., Gallagher,M., Cassella,A., Vasilevskaya,I., Monia,B.P., Holmlund,J., Dorr,F.A., Yao,K.S. 1999. c-raf-1 depletion and tumor responses in patients treated with the c- raf-1 antisense oligodeoxynucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *Clin. Cancer Res.* 5, 3977-3982.
- Ohkura,H., Hagan,I.M., 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.
- Olsen,P.H., Ambros,V. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* 216, 671-680.
- Paddison,P.J., Caudy,A.A., Bernstein,E., Hannon,G.J., Conklin,D.S. 2002a. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16, 948-958.
- Paddison,P.J., Caudy,A.A., Hannon,G.J. 2002b. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1443-1448.

- Pal-Bhadra,M., Bhadra,U., Birchler,J.A. 2002.** RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell* 9, 315-327.
- Palauqui,J.C., Elmayan,T., Pollien,J.M., 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.
- Parrish,S., Fire,A. 2001.** Distinct roles for RDE-1 and RDE-4 during RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*. 7, 1397-1402.
- Parrish,S., Fleenor,J., Xu,S., Mello,C., Fire,A. 2000.** Functional anatomy of a dsRNA trigger. Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell* 6, 1077-1087.
- Patel,R.C., Vestal,D.J., Xu,Z., Bandyopadhyay,S., Guo,W., Erme,S.M., Williams,B.R., Sen,G.C. 1999.** DRBP76, a double-stranded RNA-binding nuclear protein, is phosphorylated by the interferon-induced protein kinase, PKR. *J Biol. Chem.* 274, 20432-20437.
- Paul,C.P., Good,P.D., Winer,I., Engelke,D.R. 2002.** Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 505-508.
- Pihan,G.A., Purohit,A., Wallace,J., Malhotra,R., Liotta,L., Doxsey,S.J. 2001.** Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res.* 61, 2212-2219.
- Pines,J. 1999.** Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* 1, E73-E79.
- Pines,J., Hunter,T. 1994.** The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* 13, 3772-3781.
- Plasterk,R.H. 2002.** RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 296, 1263-1265.
- Plasterk,R.H., Ketting,R.F. 2000.** The silence of the genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 562-567.
- Provost,P., Dishart,D., Doucet,J., Friendewey,D., Samuelsson,B., Radmark,O. 2002.** Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.* 21, 5864-5874.



- Qian,Y.W., Erikson,E., Taieb,F.E., Maller,J.L. 2001.** The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Biol. Cell* 12, 1791-1799.
- Russo,P., Arzani,D., Trombino,S., Falugi,C. 2003.** c-myc down-regulation induces apoptosis in human cancer cell lines exposed to RPR-115135 (C31H29NO4), a non-peptidomimetic farnesyltransferase inhibitor. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 37-47.
- Sandstrom,C. 1965.** [Crises of medical care in Stockholm]. *Lakartidningen* 62, 2556-2564.
- Schade,J.P., 2001.** Lexikon Medizin und Gesundheit. *Serges Medien Verlag.*
- Schiebel,W., Pelissier,T., Riedel,L., Thalmeir,S., Schiebel,R., Kempe,D., Lottspeich,F., Sanger,H.L., Wassenegger,M. 1998.** Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *Plant Cell* 10, 2087-2101.
- Schiedner,G., Morral,N., Parks,R.J., Wu,Y., Koopmans,S.C., Langston,C., Graham,F.L., Beaudet,A.L., Kochanek,S. 1998.** Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* 18, 180-183.
- Schwarz,D.S., Hutvagner,G., Haley,B., Zamore,P.D. 2002.** Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol. Cell* 10, 537-548.
- Sharp,P.A. 2001.** RNA interference--2001. *Genes Dev.* 15, 485-490.
- Shi,H., Djikeng,A., Mark,T., Wirtz,E., Tschudi,C., Ullu,E. 2000.** Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *RNA.* 6, 1069-1076.
- Sijen,T., Fleenor,J., Simmer,F., Thijssen,K.L., Parrish,S., Timmons,L., Plasterk,R.H., Fire,A. 2001.** On the Role of RNA Amplification in dsRNA-Triggered Gene Silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Simizu,S., 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.

- Slack,F.J., Basson,M., Liu,Z., Ambros,V., Horvitz,H.R., Ruvkun,G. 2000. The lin-41 RBCC gene acts in the C. elegans heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell* 5, 659-669.
- Smith,M.R., Wilson,M.L., Hamanaka,R., Chase,D., Kung,H., Longo,D.L., Ferris,D.K. 1997. Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 397-405.
- Smith,N.A., Singh,S.P., Wang,M.B., Stoutjesdijk,P.A., Green,A.G., Waterhouse,P.M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320.
- Smits,V.A., Klompmaker,R., Arnaud,L., Rijksen,G., Nigg,E.A., Medema,R.H. 2000. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 2, 672-676.
- Sohail,M., Southern,E.M. 2000. Selecting optimal antisense reagents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 44, 23-34.
- Stark,G.R., Kerr,I.M., Williams,B.R., Silverman,R.H., Schreiber,R.D. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.
- Stein,C.A. 1995. Does antisense exist? *Nat. Med.* 1, 1119-1121.
- Stein,C.A. 1999. Two problems in antisense biotechnology: in vitro delivery and the design of antisense experiments. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 45-52.
- Strebhardt,K., Kneisel,L., Linhart,C., Bernd,A., Kaufmann,R. 2000. Prognostic value of pololike kinase expression in melanomas. *JAMA* 283, 479-480.
- Stucke,V.M., Sillje,H.H., Arnaud,L., Nigg,E.A. 2002. Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J* 21, 1723-1732.
- Sui,G., Soohoo,C., Affar,e.B., Gay,F., Shi,Y., Forrester,W.C., 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.
- Sunkel,C.E., Glover,D.M. 1988. polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci.* 89 ( Pt 1), 25-38.

- Svoboda,P., Stein,P., Hayashi,H., Schultz,R.M. 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147-4156.
- Svoboda,P., Stein,P., Schultz,R.M. 2001. RNAi in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos: Effectiveness of Hairpin dsRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 1099-1104.
- Tabara,H., Grishok,A., Mello,C.C. 1998. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* 282, 430-431.
- Tabara,H., Sarkissian,M., Kelly,W.G., Fleenor,J., Grishok,A., Timmons,L., Fire,A., Mello,C.C. 1999. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132.
- Tabara,H., Yigit,E., Siomi,H., Mello,C.C. 2002. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109, 861-871.
- Tavernarakis,N., Wang,S.L., Dorovkov,M., Ryazanov,A., Driscoll,M. 2000. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nat. Genet.* 24, 180-183.
- Tijsterman,M., Ketting,R.F., Okihara,K.L., Sijen,T., Plasterk,R.H. 2002. RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science* 295, 694-697.
- Timmons,L., Court DL, Fire,A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103-112.
- Timmons,L., Fire,A. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395, 854.
- Tokumitsu,Y., Mori,M., Tanaka,S., Akazawa,K., Nakano,S., Niho,Y. 1999. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int. J. Oncol.* 15, 687-692.
- Toyoshima-Morimoto,F., Taniguchi,E., Shinya,N., Iwamatsu,A., Nishida,E. 2001. Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 410, 215-220.

- Toyoshima,F., Moriguchi,T., Wada,A., Fukuda,M., Nishida,E. 1998.** Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage- induced G2 checkpoint. *EMBO J.* 17, 2728-2735.
- Tuschl,T. 2002.** Expanding small RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 20, 446-448.
- Tuschl,T., Zamore,P.D., Lehmann,R., Bartel,D.P., Sharp,P.A. 1999.** Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13, 3191-3197.
- Tyczynski,J.E., Bray,F., Parkin,D.M. 2003.** Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol.* 4, 45-55.
- Vaistij,F.E., Jones,L., Baulcombe,D.C. 2002.** Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 14, 857-867.
- Voinnet,O., Vain,P., Angell,S., Baulcombe,D.C. 1998.** Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95, 177-187.
- Vorburger,S.A., Hunt,K.K. 2002.** Adenoviral gene therapy. *Oncologist.* 7, 46-59.
- Wagner,R.W. 1995.** The state of the art in antisense research. *Nat. Med.* 1, 1116-1118.
- Wassenegger,M., Heimes,S., Riedel,L., Sanger,H.L. 1994.** RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76, 567-576.
- Waters,J.S., Webb,A., Cunningham,D., Clarke,P.A., Raynaud,F., di Stefano,F., Cotter,F.E. 2000.** Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin. Oncol.* 18, 1812-1823.
- Weinberg,R.A., 1995.** Wie entsteht Krebs?, Spezial: Krebsmedizin edition. *Spektrum der Wissenschaft.*
- Wianny,F., Zernicka-Goetz,M. 2000.** Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol.* 2, 70-75.

- Winkler,K.E., Swenson,K.I., Kornbluth,S., Means,A.R. 2000. Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science* 287, 1644-1647.
- Winston,W.M., Molodowitch,C., Hunter,C.P. 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295, 2456-2459.
- Wolf,G., Elez,R., Doermer,A., Holtrich,U., Ackermann,H., Stutte,H.J., Altmannsberger,H.M., Rubsamen-Waigmann,H., Strebhardt,K. 1997. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non- small cell lung cancer. *Oncogene* 14, 543-549.
- Wong,A.H., Tam,N.W., Yang,Y.L., Cuddihy,A.R., Li,S., Kirchhoff,S., Hauser,H., Decker,T., Koromilas,A.E. 1997. Physical association between STAT1 and the interferon-inducible protein kinase PKR and implications for interferon and double-stranded RNA signaling pathways. *EMBO J* 16, 1291-1304.
- Wreschner,D.H., McCauley,J.W., Skehel,J.J., Kerr,I.M. 1981. Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature* 289, 414-417.
- Wu-Scharf,D., Jeong,B., Zhang,C., Cerutti,H. 2000. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290, 1159-1162.
- Wu,F., Yan,W., Pan,J., Morser,J., Wu,Q. 2002. Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 16900-16905.
- Xia,H., Mao,Q., Paulson,H.L., Davidson,B.L. 2002. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* 20, 1006-1010.
- Yang,D.C., Jiang,X., Elliott,R.L., Head,J.F. 2002. Antisense ferritin oligonucleotides inhibit growth and induce apoptosis in human breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* 22, 1513-1524.
- Yang,J., Winkler,K., Yoshida,M., Kornbluth,S. 1999. Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3- mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J* 18, 2174-2183.

- Yu, J.Y., DeRuiter, S.L., Turner, D.L. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 6047-6052.
- Yuan, J., Eckerdt, F., Bereiter-Hahn, J., Kurunci-Csacsco, E., Kaufmann, M., 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., Strebhardt, K. 1997. Polo-like kinase, a novel marker for cellular proliferation. *Am. J. Pathol.* 150, 1165-1172.
- Yuen, A.R., Halsey, J., Fisher, G.A., Holmlund, J.T., Geary, R.S., Kwoh, T.J., Dorr, A., Sikic, B.I. 1999. Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C-alpha (ISIS 3521/CGP 64128A) in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.* 5, 3357-3363.
- Zamanian-Daryoush, M., Der, S.D., Williams, B.R. 1999. Cell cycle regulation of the double stranded RNA activated protein kinase, PKR. *Oncogene* 18, 315-326.
- Zamore, P.D. 2002. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* 296, 1265-1269.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., 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.
- Zeng, Y., Wagner, E.J., Cullen, B.R. 2002. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell* 9, 1327-1333.
- Zhou, A., Hassel, B.A., Silverman, R.H. 1993. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 72, 753-765.

# BIRGIT SPÄNKUCH-SCHMITT

## LEBENS LAUF

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

- Geburtsdatum: 12. März 1973
- Geburtsort: Frankfurt am Main
- Familienstand: verheiratet

### AUSBILDUNG

---

- 1983 - 1989** Helmholtz-Gymnasium in Frankfurt am Main
- 1989 - 1992** Grimmelshausen-Gymnasium in Gelnhausen  
Schulabschluß: Abitur Juni 1992
- 1992 - 1995** Studium des Lehramts an Gymnasien für Mathematik und Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main  
Zwischenprüfung am 31. März 1995
- 1995 - 1999** Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität in Gießen  
Diplomprüfung: 15. April 1999 (Diplomnote „sehr gut“)  
Zusatzprüfung „Angewandte Biochemie“: 30. April 1999 (Note „sehr gut“)
- seit Juli 1999** Promotion im Fachbereich Biochemie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. K. Strebhardt (Abteilung Molekulare Gynäkologie und Geburtshilfe)

### TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

---

- 01.06.1996 - 15.07.1998** Studentische Hilfskraft am Institut für Mathematik der Justus-Liebig-Universität in Gießen

## PRAKTIKA

---

**11.03.1996 - 05.04.1996** AOK Schlüchtern

**21.07.1997 - 14.10.1997** Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe

**27.07.1998 - 25.09.1998** Merck KGaA in Darmstadt

## DIPLOMARBEIT

---

**1997 - 1998** „Untersuchungen zur Klärung der Mechanismen antigenotoxischer Wirkungen von Carotinoiden an humanen Lymphozyten“, durchgeführt an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe bei Frau Professor Dr. Pool-Zobel

## KONGRESSBEITRÄGE IM RAHMEN DER DIPLOMARBEIT

---

Poster auf dem DFG-Symposium in Kaiserslautern, 04. bis 07. Oktober 1998

Poster auf dem 36. Wissenschaftlichen Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. in Stuttgart-Hohenheim, 18. bis 19. März 1999

Poster bei „Food and Cancer Prevention III“ in Norwich, UK, 06. bis 09. September 1999

## PUBLIKATION IM RAHMEN DER DIPLOMARBEIT

---

Glei, M.; Spänkuch, B.; Rechkemmer, G.; Pool-Zobel, B.L. (1999): All-trans- $\beta$ -Carotin reduziert genetische Schäden in peripheren, humanen Lymphozyten. Proc. Germ. Nutr. Soc., Vol. 1.



## ERKLÄRUNG

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

Frankfurt am Main, den 12.02.2003

Birgit Spänkuch-Schmitt

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Funktionelle Studien zur Hemmung von  
PLK1 (Polo-Like Kinase 1)  
*in vitro* und *in vivo*“

selbstständig 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 der Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 12.02.2003

Birgit Spänkuch-Schmitt