

Funktionelle Charakterisierung der Gliom- amplifizierten Sequenz GAS41 während der Mitose

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften der

Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften

der Universität des Saarlandes

von

Sabrina M. Heisel

Saarbrücken, 2009

Tag des Kolloquiums: 14. Dezember 2009

Dekan: Prof. Dr. Stefan Diebels

Berichterstatter: Prof. Dr. Eckart Meese
Prof. Dr. Uwe Walldorf
Prof. Dr. Nikolaus Blin

Vorsitz: Prof. Dr. Elmar Heinzle

Akad. Mitarbeiter: Dr. Britta Diesel

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	I
2	EINLEITUNG	1
2.1	Der Zellzyklus	1
2.2	Der Spindelapparat	5
2.3	Der Centrosomzyklus.....	6
2.4	Mikrotubuli-assoziierte Proteine	9
2.5	Glioma amplified sequence 41	12
3	ZIELSETZUNG	15
4	MATERIAL UND METHODEN	17
4.1	Zellbiologische Methoden.....	17
4.1.1	Kultivierung adhärenter Zellen.....	17
4.1.2	Kryokonservierung von Zellen	17
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	18
4.1.4	Zellviabilität.....	19
4.1.5	Transiente Transfektion adhärenter Monolayer Zellen.....	19
4.1.6	Synchronisation von Zellen	21
4.1.7	Propidiumiodid-Färbung	22
4.1.8	Immunfluoreszenzfärbung	22
4.1.9	Life Cell Mikroskopie.....	24
4.1.10	Konfokalmikroskopie.....	25
4.2	Molekularbiologische Methoden	25
4.2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> DH5 α	25
4.2.2	Plasmidisolation	26
4.2.3	RNA Isolation.....	26
4.2.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	27
4.2.5	Agarosegelelektrophorese	28
4.2.6	Northern Blot.....	30
4.2.7	Proteinisolation aus Säugerzellen	33
4.2.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
4.2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
4.2.10	Western Blot.....	36
4.3	Microarray Analyse	37
5	ERGEBNISSE	39

5.1	RNAi-vermittelter Knockdown von GAS41	39
5.2	Genexpressionsanalyse an GAS41 depletierten TX3868 Zellen.....	44
5.2.1	Reprimierte Gene in GAS41 depletierten TX3868 Zellen	48
5.2.2	Aktivierte Gene in GAS41 depletierten TX3868 Zellen.....	48
5.2.3	GeneTrail Analyse	49
5.3	Centrosomale Lokalisation von GAS41	51
5.4	Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Zellviabilität	53
5.5	Zellzyklusanalyse GAS41 depletierter Zellen	58
5.6	Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Morphologie von Interphasezellen	62
5.7	Einfluss des GAS41 Knockdowns auf den Spindelapparat von HeLa Zellen	63
5.8	Einfluss der GAS41 Überexpression auf den Spindelapparat von HeLa Zellen	71
5.9	GAS41 Knockdown in der Zelllinie HeLa H2B-GFP	73
5.10	Life Cell Mikroskopie GAS41 depletierter HeLa H2B-GFP Zellen	76
5.11	Strukturelle Veränderungen des Spindelapparates	82
5.12	Einfluss der GAS41 Expression auf den Spindelapparat von TX3868 Zellen..	85
6	DISKUSSION	89
6.1	GAS41 spielt eine Rolle bei der Zellteilung	89
6.2	Viabilität und Zellzyklusprogression in GAS41 depletierten Zellen.....	91
6.3	Centrosomale Lokalisation von GAS41	92
6.4	Multipolare Spindelapparate	94
6.5	Centrosomenamplifikation und Centrosomenclustering	97
6.6	Anormale Spindeln und Mitosedauer	101
6.7	Spindeldefekte und Tumorgenese	105
6.8	Numerische Aberrationen und Tumorgenese.....	106
6.9	Physiologische Funktion von GAS41	108
6.10	Ausblick	109
7	TABELLENVERZEICHNIS	111

8	ABBILDUNGSSVERZEICHNIS	112
9	LITERATURVERZEICHNIS	115
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	123
11	ANHANG	128
	DANKSAGUNGEN.....	143
	LEBENS LAUF.....	144

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von GAS41 in der Zellteilung untersucht werden. Hierzu wurde ein RNAi vermittelter Knockdown in den Zelllinie HeLa und TX3868 etabliert. An GAS41 depletierten Zellen konnte mit Hilfe von Microarray Analysen gezeigt werden, dass GAS41 einen Einfluss auf die Zellteilung ausübt. Auf zellulärer Ebene konnte GAS41 als centrosomales Protein charakterisiert werden.

In mitotischen Zellen kommt es durch die Deregulation der GAS41 Expression zur Ausbildung multipolarer Spindelapparate sowie zu einer Störung der Chromosomenanordnung in der Äquatorialebene. Die Ausbildung multipolarer Spindeln führt dabei nicht zu einem Mitoseabort sondern erfolgt unter der Entstehung mehrerer Tochterzellen.

Darüber hinaus konnte in GAS41 depletierten Zellen mit multipolarem Spindelapparat beobachtet werden, dass in diesen Zellen während der Metaphase ein Centrosomenclustering zur Wiederherstellung einer bipolaren Orientierung erfolgen kann. Auch die fehlerhaft angeordneten Chromosomen können nacheinander mit Mikrotubuli verknüpft und in der Metaphaseplatte angeordnet werden. Diese komplexen Umlagerungen sind mit einer verzögerten Zellteilung verknüpft.

GAS41 ist essentiell für die Ausbildung einer bipolaren Spindel. Eine Expressionsänderung induziert die Ausbildung multipolarer, aber funktioneller Spindelapparate und führt zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität.

Summary

The aim of the presented work was, to characterize the physiological function of GAS41 during cell division. Therefore, a RNAi-mediated knockdown was established in HeLa and TX3868 cells. Microarray analysis of GAS41 depleted cells confirmed the postulated influence of GAS41 on mitosis. GAS41 was identified as protein with centrosomal localization.

In mitotic cells the deregulation of GAS41 caused metaphases with multipolar spindles and unaligned chromosomes. The development of multipolar spindles did not compromise the successful exit from mitosis. Cell division occurred under formation of multiple daughter cells. Additionally, GAS41 depleted cells were able to rescue their bipolar phenotype via centrosome clustering during metaphase. Even unaligned chromosomes were attached to microtubules and aligned to the equatorial plane. Both mechanisms to rescue the proper bipolar phenotype were connected to a mitotic delay.

GAS41 is an essential protein for the establishment of a bipolar mitotic spindle. The deregulation of GAS41 expression induces the formation of multipolar, but functional mitotic spindles and promotes chromosomal instability.

2 Einleitung

2.1 Der Zellzyklus

„Zellen entstehen aus Zellen“ (*“omnis cellula e cellula“*): mit diesem wichtigen Lehrsatz wurde RUDOLF VIRCHOW 1855 zum Mitbegründer der modernen Zelltheorie. WALTHER FLEMMING prägte 1888 den Begriff der Mitose und hielt seine Beobachtungen zum Ablauf der Kernteilung in detaillierten Zeichnungen fest (Abb. 1).¹

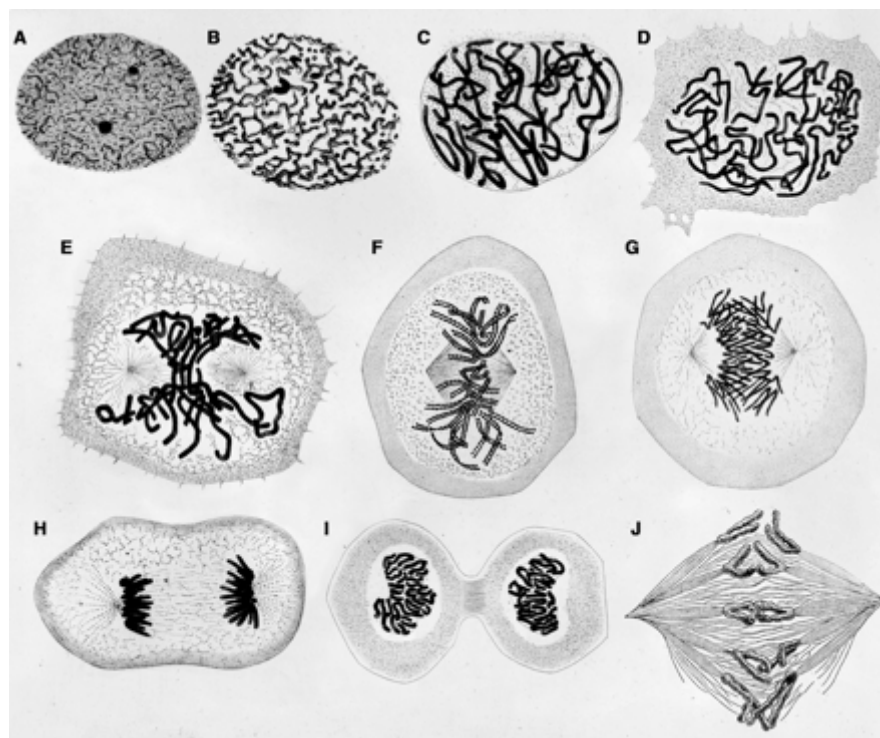


Abbildung 1: Zeichnerische Darstellung der Mitose aus W. Flemmings Buch „Zellsubstanz, Kern und Zellteilung“ (Vogel Verlag, Leipzig, 1882). (A-C) Kondensierung der Chromosomen während der Prophase (D) Zusammenbruch der Kernhülle (E-F) Ausbildung des Spindelapparates (G) Ausrichtung der Chromosomen in der Äquatorialebene in der Metaphase (H) Trennung der Schwesterchromatiden und Zug zu den Polen (I) Ausbildung zweier Tochterkerne und Cytokinese (J) Mikrotubulibindung in früher Anaphase

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden die Chromosomen von THEODOR BOVERI und WALTER SUTTON identifiziert und später von OSWALD AVERY als Träger der Erbinformation beschrieben. Diese Arbeiten waren wegweisend für das Verständnis der Zellteilung, bei der aus einer Mutterzelle zwei identische Tochterzellen entstehen. Bevor in der Mitose die Segregation der Chromosomen auf die Tochterzellen erfolgen kann, muss zunächst eine Verdopplung der Chromosomen und der Zellorganellen stattfinden. Die verschiedenen Abschnitte im Leben einer Zelle werden auch als Zellzyklus bezeichnet (Abb. 2).

Der Zellzyklus gliedert sich in vier diskrete Phasen: die M-Phase (Mitosephase), die G₁-Phase (von engl. gap), die S-Phase (Synthesephase) und die G₂-Phase.

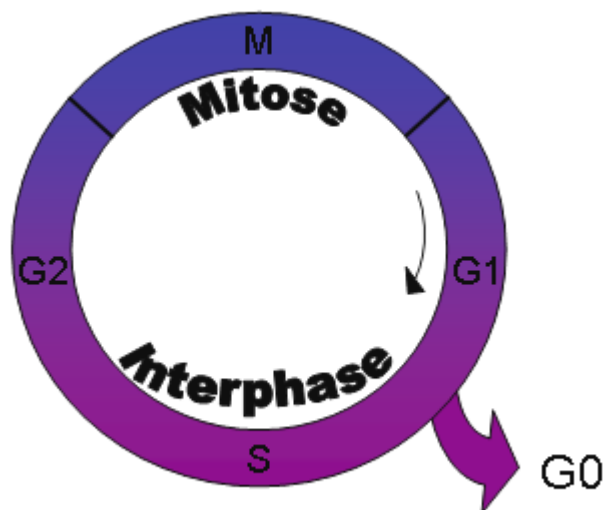


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellzyklus: Nach der Mitose (blau) gehen die beiden entstandenen Tochterzellen in die Interphase (violett) über. Die Tochterzelle kann entweder in einen Ruhezustand (G₀-Phase) oder in die G₁-Phase übergehen, um den Zellzyklus ein weiteres Mal zu durchlaufen. An die G₁-Phase schließt sich dann die Synthesephase (S-Phase) an, in der die Verdopplung des Genoms erfolgt. Anschließend geht die Zelle in die G₂-Phase über, von wo aus sie erneut in die Mitose eintritt.

In der S-Phase erfolgt die semikonservative Duplikation des Genoms. In der darauf folgenden G₂-Phase findet zum einen das Zellwachstum statt, zum anderen wird die replizierte DNA auf Schäden untersucht, die dann gegebenenfalls repariert werden. Erst wenn die Zelle diese Qualitätskontrolle besteht, gelangt sie über den G₂/M-Checkpoint in die M-Phase des Zellzyklus. In der M-Phase teilt sich die Mutterzelle in zwei identische Tochterzellen, die dann in die G₁-Phase gelangen. Aus dieser Wachstumsphase heraus können die Zellen nach Passieren des G₁/S-Checkpoints wieder in die S-Phase übergehen. Eine Zelle kann aber auch durch äußere Einflüsse aus der G₁-Phase in eine Art Ruhezustand, die so genannte G₀-Phase übergehen. Die Phasen G₁, S und G₂ werden auch unter Begriff Interphase zusammengefasst.²

Der Interphase steht die M-Phase gegenüber, in der die Teilung der Schwesterchromatiden und deren gleichmäßige Aufteilung auf die beiden Tochterzellen erfolgen. Der komplexe Vorgang der Mitose wird wiederum in einzelne Phasen gegliedert. In der Prophase beginnen sich die, während der Interphase replizierten, Chromosomen zu kondensieren. Außerdem erfolgt im Cytoplasma die Trennung der duplizierten Centrosomen. In der Prometaphase kommt es zur Auflösung der Kernmembran (*nuclear envelope breakdown*, NEB). Dadurch wird der Kontakt zwischen Chromosomen und Spindelmikrotubuli ermöglicht. Ausgehend von den Centrosomen dringen Mikrotubuli in die Kernregion ein (*nucleation*) und interagieren mit den Kinetochoren, die sich in der Centromerregion der Chromosomen gebildet haben. Diese Mikrotubuli werden, im Gegensatz zu den Polmikrotubuli, auch Kinetochormikrotubuli genannt.

In der Metaphase liegen die vollständig kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene zwischen den beiden Spindelpolen. Dabei sind die Chromosomen so angeordnet, dass die Kinetochore jedes Chromatidenpaares mit Mikrotubuli der entgegengesetzten Spindelpole interagieren. In der darauf folgenden Anaphase werden die Chromatiden voneinander getrennt. Dies erfolgt aufgrund einer polwärts gerichteten Zugspannung, die durch die Verkürzung der Kinetochormikrotubuli und gleichzeitige

Elongation der Polmikrotubuli entsteht. In der Telophase sind die getrennten Schwesterchromatiden an den entgegengesetzten Zellpolen lokalisiert und beginnen zu de-kondensieren. Gleichzeitig kommt es zur Neubildung der Kernmembran.

Im letzten Schritt der Zellteilung, der Cytokinese, kommt es im Überlappungsbe-reich der Polmikrotubuli zur Ausbildung eines kontraktilen Rings. Das Cytoplasma wird an dieser Stelle eingeschnürt und es kommt zur Entstehung zweier identischer Tochterzellen. Wenn sich die beiden Tochterzellen vollständig voneinander getrennt haben ist die Zellteilung abgeschlossen.³

2.2 Der Spindelapparat

Der Spindelapparat ist eine spindelförmige Struktur, die am Ende der Prophase von Mitose und Meiose entsteht. Er besteht aus Kinetochormikrotubuli und Polmikrotubuli, die entweder von dem im Spindelpol liegenden Centrosom ausgehen oder zu ihm hin führen. Mikrotubuli sind röhrenförmige Bestandteile des Cytoskeletts, die aus den globulären Proteinen α - und β -Tubulin bestehen. Im Ursprung der Mikrotubuli, dem *microtule organizing center* (MTOC), kommt darüber hinaus auch γ -Tubulin hinzu.⁴ Das MTOC wird von den beiden Centriolen des Centrosoms gebildet.

In der tierischen Zelle stellen Centrosomen die Hauptorganisationszentren der Mikrotubuli dar. Das Netzwerk aus Mikrotubuli spielt als Teil des Cytoskeletts eine Rolle beim Transport von Zellorganellen sowie bei der Ausbildung der Zellform und Zellpolarität. Die Centrosomen sind während der Zellteilung maßgeblich an der Organisation des Spindelapparates beteiligt^{5,6} und sind hauptverantwortlich für dessen bipolaren Aufbau und die Orientierung in der Zelle,^{7,8} wodurch die fehlerfreie Chromosomensegregation ermöglicht wird.

Der Kinetochor ist ein essentieller Bestandteil der Chromosomen, der für die korrekte Weitergabe des genetischen Materials während der Mitose unerlässlich ist. Er setzt sich aus einer Vielzahl von Proteinen zusammen, die am Centromer der kondensierten Chromosomen lokalisiert sind.⁹ Der Kinetochor besitzt eine mehrschichtige Struktur, bestehend aus der inneren Platte auf der Chromatinseite, der Mittelzone, der äußeren Platte aus dicht gepackten Fasern und der faserigen äußeren Corona.¹⁰ In der äußeren Platte und der Corona sind die meisten bekannten Mikrotubuli-interagierenden Proteine sowie die entsprechenden Checkpoint-Proteine lokalisiert.^{11,12} Die innere Schicht schließt direkt an das Centromer an und beinhaltet Heterochromatinkomponenten, wie die Histon H3 Variante CENP-A.¹³ Über die Zusammensetzung der Mittelzone ist bisher nichts bekannt. Um die korrekte Segregation der Chromosomen zu gewährleisten, muss der Kinetochor der beiden Schwesterchromatiden mit Mikro-

tubuli interagieren, die von den gegenüber liegenden Spindelpolen ausstrahlen. Erst nach der Anheftung aller Chromatiden kann die Mitose in die Anaphase übergehen.¹⁴

2.3 Der Centrosomzyklus

Ein Centrosom besteht aus zwei Centriolen, die in ein komplexes Proteinnetzwerk, die pericentriolare Matrix, eingebettet sind. Centriole sind zylindrische Strukturen aus Mikrotubuli-Tripletts in einer charakteristischen wagenradähnlichen Anordnung.¹⁵ Eine der beiden Centriolen, die ältere bzw. reife, ist am distalen Ende mit kleinen Anhängen besetzt.⁵ Die Anzahl der Centrosomen in einer Zelle ist für die Stabilität des Genoms von besonderer Bedeutung und unterliegt daher einer strengen Kontrolle. Dieser Centrosomzyklus gewährleistet die Verdopplung der Centrosomen in jeder S-Phase des Zellzyklus und deren gleichmäßige Verteilung auf die beiden Tochterzellen in jeder M-Phase. In Abbildung 2 sind die Phasen des Centrosomzyklus dargestellt.

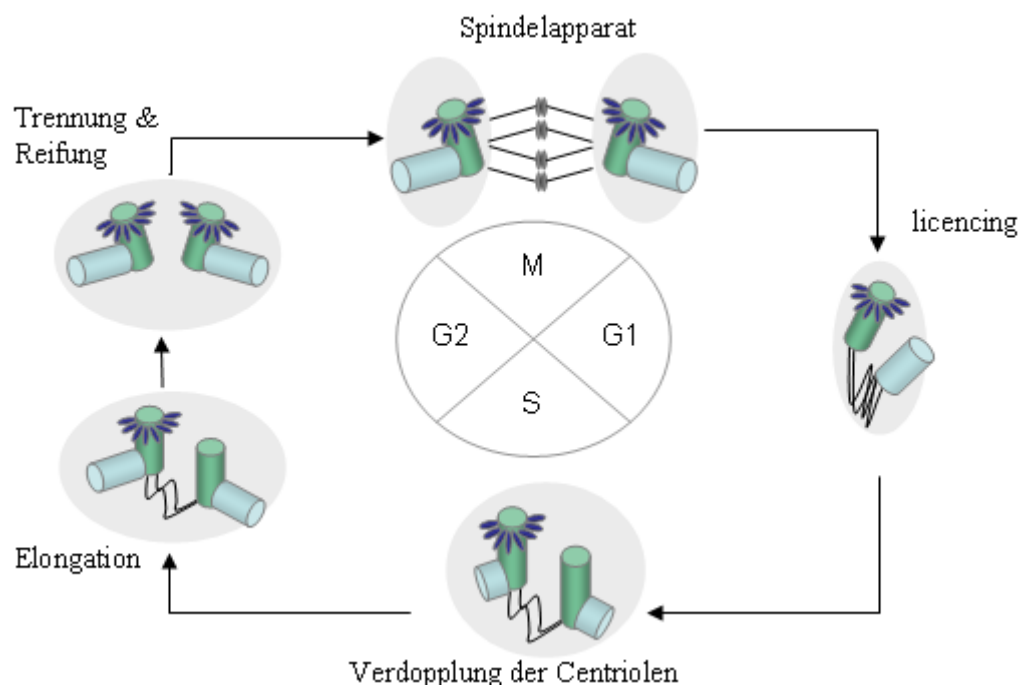


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Centrosomzyklus. Die Muttercentriolen sind grün, und die Tochtercentriolen hellblau dargestellt. In hellgrau ist die pericentriolare Matrix abgebildet. Die Chromosomen in der M-Phase sind dunkelgrau dargestellt.

In der M-Phase befindet sich ein einzelnes Centrosom, bestehend aus zwei senkrecht zueinander ausgerichteten Centriolen, an jedem Spindelpol. Jede der beiden Tochterzellen erhält also ein Centrosom. Beim Übergang der Zelle aus der M-Phase in die G₁-Phase kommt es zu einer Loslösung der beiden Centriolen, d.h. die orthogonale Ausrichtung wird aufgelöst. Dabei bleiben die beiden Centriolen dennoch locker miteinander verbunden (*disengagement* oder *licencing*). In der darauf folgenden S-Phase kommt es zur Verdopplung der Centriolen. Dabei entsteht zunächst an jeder Muttercentriole eine Procentriole, die im Verlauf der G₂-Phase zu einer vollständigen Centriole auswächst. Am Übergang von der G₂-Phase zur M-Phase wird die lockere Verbindung zwischen den beiden Muttercentriolen gelöst, die beiden Centrosomen werden getrennt und bilden den Spindelpol aus.

Weit über hundert centrosomale Proteine sind heute bekannt und viele davon weisen *coiled-coil* Domänen auf, die möglicherweise eine Gerüstfunktion ausüben.¹⁶ Die pericentriolare Matrix bildet somit ein Gerüst für den so genannten γ -Tubulin Ringkomplex (γ -TuRC), der Voraussetzung für das Eindringen der Mikrotubuli in die Kernregion ist.⁴

Die Centrosomenduplikation ist normalerweise auf eine Replikationsrunde pro Zellzyklus (*“once and only once”*) beschränkt.¹⁷ Eine Deregulation des Centrosomzyklus hat schwere Auswirkungen auf die Genomstabilität. Schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts hat THEODOR BOVERI postuliert, dass sowohl numerische als auch strukturelle Veränderungen der Centrosomen zur Missegregation der Chromosomen führen.⁸ Strukturelle Aberrationen entstehen häufig durch die Veränderung der Expression centrosomaler Proteine oder Veränderungen der posttranslationalen Modifikation. Dies führt zu einer Veränderung der Größe der Centrosomen durch eine Akkumulation von pericentriolaren Matrixproteinen.¹⁷ Numerische Aberrationen werden hauptsächlich durch zusätzliche Verdopplungsrunden (*overduplication*) und fehlgeschlagene Zellteilungen verursacht. Zusätzliche Verdopplungen können das Ergebnis multipler

Duplikationen in der S-Phase sein (*re-duplication*), oder durch die gleichzeitige Ausbildung mehrerer Procentriolen an der Muttercentriole verursacht werden. Auch die *de novo* Genese von Centrosomen stellt einen möglichen Mechanismus für das Auftreten überzähliger Centrosomen dar.¹⁷

In der Vergangenheit wurden bereits viele Proteine identifiziert, die sowohl an der Regulation des Zellzyklus und Centrosomzyklus, als auch an der Verbindung der beiden Zyklen miteinander, beteiligt sind. Dennoch sind die Faktoren, die zur Deregulation der Centrosomenduplikation führen können, seit BOVERIS Hypothese noch nicht vollständig aufgeklärt worden.

2.4 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Die Grundvoraussetzung für eine normale Segregation der Chromosomen, ist die Ausbildung einer funktionellen Mitosespindel. Der Entstehung dieser Mitosespindel in der M-Phase geht jedoch eine fehlerfreie Duplikation der Centrosomen in der Interphase voraus. Neben der korrekten Anzahl an Centrosomen spielen auch andere Faktoren bei der Ausbildung einer normalen bipolaren Mitosespindel eine Rolle. Die Ausbildung der Mikrotubuli z.B. ist abhängig von einem fehlerfreien Zusammenspiel von Polymerisierung und Depolymerisierung. Darüber hinaus spielt die Expression mikrotubuliassoziierter Motorproteine eine wichtige Rolle bei der Spindelbildung.¹⁸

Die Mikrotubuli-assoziierte ATPase KIAA1009/QN1 ist während der Mitose am Spindelapparat lokalisiert und interagiert mit α -Tubulin.¹⁹ Darüber hinaus wurde sie in massenspektroskopischen Untersuchungen des Centrosomen-Proteoms als pericentriolares Protein identifiziert (ERICH NIGG, unveröffentlichte Daten). Der Knockdown der ATPase führt zu Defekten in der Centrosomentrennung und Mikrotubulopolymerisierung wodurch die Organisation und die Orientierung der Mitosespindel stark beeinflusst werden.¹⁹

Auch die Mitglieder der *transforming acidic coiled-coil* (TACC) Familie spielen eine Rolle bei der Ausbildung des Spindelapparates.^{20,21} Bislang sind drei humane TACC Proteine bekannt, die durch eine gemeinsame konservierte *coiled-coil* Domäne im C-Terminus charakterisiert sind.²¹ Aufgrund ihrer sehr langen konservierten *coiled-coil* Domäne sind die TACC Proteine in der Lage lange Polymerketten zu bilden, die ihnen die Interaktion mit Mikrotubuli ermöglichen. Diese Interaktion begünstigt schließlich die centrosomale Lokalisation.

Die TACC Proteine weisen eine centrosomale Lokalisation auf, die sich jedoch in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase unterscheidet.²¹ TACC1 ist an den Centroso-

men mitotischer Zellen lokalisiert. Die Arbeitsgruppe um DANIEL BIRNBAUM konnte jedoch nachweisen, dass TACC1 in großen Mengen an den Mikrotubuli der Anaphase-spindel sowie an der Mittellamelle während der Cytokinese auftritt. Hier liegt TACC1 im Komplex mit der Kinase Aurora B vor und ist essentiell für den Austritt aus der M-Phase.²² TACC2 zeigt eine starke Konzentration an den Centrosomen während des gesamten Zellzyklus.²¹ Für TACC2 konnten ZHEN DOU *et al.* zeigen dass dieses *coiled-coil* Protein nach Phosphorylierung durch die Kinase TKK an den Centrosomen mitotischer Zellen lokalisiert wird und einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Mitosespindel ausübt.²³ TACC3 findet sich in großer Konzentration in der pericentrosomalen Matrix. Eine Überexpression von TACC3 führt zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl und Stabilität der centrosomalen Mikrotubuli.²¹

Alle Mitglieder der TACC Familie werden mit Krebs in Zusammenhang gebracht. Die Überexpression von TACC1 führt beispielsweise zur Transformation von Maus-fibroblasten.²⁴ TACC3 ist in einigen Tumorzelllinien überexprimiert.²⁵ Beide Proteine wurden in neueren Studien mit der Entstehung des Ovarialkarzinoms in Verbindung gebracht.²⁶ TACC2 wurde als potentielles Tumorsuppressorgen identifiziert, dessen Expression in einigen Brustkrebszelllinien sowie in Primärtumoren erniedrigt ist. Der maligne Phänotyp dieser Zellen konnte *in vitro* und *in vivo* durch eine Erhöhung der TACC2 Expression reduziert werden.²⁷

NuMA (*nuclear mitotic apparatus protein*) ist ein weiteres essentielles Protein für die Ausbildung einer normalen bipolaren Mitosespindel, das wie die TACC-Proteine über eine *coiled-coil* Domäne verfügt und mit Mikrotubuli interagiert. Das Kernprotein ändert schon früh in der M-Phase seine Lokalisation und ist während der Mitose an den Centrosomen lokalisiert. Dort interagiert NuMA mit den beiden Motorproteinen Dynein und Dynactin. Die Funktion dieses NuMA-Motorprotein-Komplexes besteht in der Bindung der freien Minusenden der Mikrotubuli, um sie an den Polen der Mitosespindel zu fixieren.²⁸ Darüber hinaus ist NuMA, wie durch die Injektion spezifischer Antikörper in HeLa Zellen gezeigt werden konnte, für die Aufrechterhaltung und Stabilisierung des Spindelapparates bis zur Anaphase verantwortlich.²⁹

Zur Ausbildung einer funktionellen bipolaren Mitosespindel wird ein hoch komplexes Netzwerk regulatorischer Proteine benötigt. Trotz weitreichender Screeninguntersuchungen und hochauflösender Ansätze zur Proteom-Analyse³⁰ sind noch viele Proteine zu identifizieren, die essentiell für den fehlerfreien Ablauf der Mitose sind. Alle der oben beschriebenen Proteine beeinflussen die Ausbildung bzw. die Aufrechterhaltung einer funktionellen Mitosespindel. Darüber hinaus wurden KIAA1009, TACC1, TACC2 und NuMA in unabhängigen Studien als Interaktionspartner des Proteins GAS41 beschrieben.³¹⁻³³ Für TACC3 konnte keine Interaktion mit GAS41 nachgewiesen werden. Basierend auf den bekannten Funktionen dieser Interaktionspartner, stellt sich daher die Frage, ob auch GAS41 eine Rolle beim Aufbau einer intakten Mitosespindel spielt.

2.5 Glioma amplified sequence 41

GAS41 (*Glioma amplified sequence 41*) wurde mittels Mikrodisektionsanalysen aus der Glioblastomzelllinie TX3868, die eine Amplifikationseinheit für den Bereich 12q13-15 aufweist, isoliert.³⁴ Dieses Gen ist sowohl in höhergradigen, als auch in niedergradigen Gliomen häufig amplifiziert.³⁵

Das *gas41* Gen codiert für eine 1,4 kb große mRNA mit einem *open reading frame* (ORF) und sieben Exons. Das 227 Aminosäuren lange Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 26,5 kDa ist hoch konserviert in *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces spec.* und in Vertebraten wie Ratte, Maus, Rind oder Huhn.^{33,35} Das ubiquitär exprimierte Protein weist eine Kernlokalisierung unter Aussparung der Nucleoli auf.³³ Sequenzanalysen ergaben eine hohe Homologie von GAS41 zu den Transkriptionsfaktoren AF-9 (*acute lymphoblastic leukemia 1 fused gene from chromosome 9*) in Hefe und Mensch sowie zu dem humanen Protein ENL (*eleven-nineteen leukemia gene*).³⁵ Diese beiden Proteine sind ebenfalls zueinander homolog und gehören zu einer neuen Familie von Transkriptionsfaktoren (YEATS Familie).³⁵

Zu dieser Familie der YEATS Transkriptionsfaktoren gehören neben ENL und AF-9 auch SAS5 (*something about silencing 5*), die kleine Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIIF (RAP30) und die TAF14 Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID. GAS41, auch *YEATS Domain containing 4* (YEATS4) genannt, besitzt wie alle Mitglieder dieser Familie eine ~120 Aminosäuren große YEATS Domäne. Diese Domäne kommt häufig in Untereinheiten von Proteinkomplexen vor, die an der Chromatinmodifikation und Transkriptionsregulation beteiligt sind.³⁶

Bei GAS41 überspannt die YEATS Domäne den Bereich von Aminosäure aa22 bis aa126 (Prosite profile PS 51037). Diese Domäne wurde ursprünglich als TFIIF Domäne in GAS41 identifiziert.³³ Im C-Terminus besitzt GAS41 eine 60 Aminosäuren umfassende α -helikale Domäne, die eine deutlich erhöhte Anzahl saurer Aminosäuren

aufweist. Negativ geladene α -helikale Strukturen waren die ersten definierten Aktivierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren; dies lässt eine Funktion von GAS41 als Transkriptionsfaktor vermuten.^{35,37} Im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren fehlt bei GAS41 jedoch die typische DNA-Bindungsdomäne.³⁵

Um als Transkriptionsfaktor aktiv zu sein ist GAS41 also auf die Interaktion mit anderen Proteinen, die eine DNA-Bindungsdomäne besitzen, angewiesen. Einen der ersten Nachweise für die Rolle von GAS41 als Transkriptionsfaktor erbrachten XIAOFENG DING et al.³⁸ Sie identifizierten GAS41 als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors AP-2 β und zeigten, dass GAS41 die Aktivität von AP-2 β steigert indem es dessen DNA-Bindungsaktivität erhöht. GAS41 wirkt somit als Co-Aktivatoren auf die Transkription der Zielgene von AP-2 β .³⁸ JEONG HYEON PARK und ROBERT ROEDER³⁹ konnten nachweisen, dass GAS41 an die Promotoren von zwei Genen des p53 Signalwegs bindet und in Folge von Stress-induzierter p53 Aktivierung von den Promotoren dissoziiert. GAS41 wirkt so möglicherweise als Repressor des p53 Signalweges.³⁹

Neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor wurde GAS41 auch als Komponente einiger Multiproteinkomplexe identifiziert.

Das GAS41 homologe YEATS Protein TAF14/ANC1 der Hefe ist Bestandteil vieler solcher Komplexe, darunter die Transkriptionsfaktor Komplexe TFIID und TFIIF, die Chromatin-Remodelling Komplexe SWI/SNF, RSC und INO80 und der Histon-Acetyltransferase Komplex NuA3.^{40,41} GAS41 interagiert mit INI1 (*integrase inhibitor 1*), dem Homolog zu SNF5 in Hefe, das Teil des SWI/SNF Komplexes ist. Außerdem interagiert GAS41 auch mit dem Leucin-Zipper Protein AF10, das im Zusammenhang mit akuter Leukämie bekannt ist und mit INI1 immunopräzipitiert.⁴² Der SWI/SNF-Komplex ist beteiligt am Remodelling der Chromatinstruktur und ist ausschlaggebend für die Transkription von RNA-Polymerase II Promotoren.⁴¹ Darüber hinaus bindet GAS41 an TACC2, einen weiteren Interaktionspartner des SWI/SNF-Komplexes.⁴³

GAS41 wurde auch als Untereinheit des Histon-Acetyltransferase Komplexes TIP60⁴⁴ und des SCRAP Komplexes⁴⁵ beschrieben. Damit könnte GAS41 eine Rolle beim Aufbau des basalen Transkriptionsinitiationskomplexes in der Kernmatrix spielen.⁴⁶

Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor, gibt es auch Hinweise darauf, dass GAS41 eine Rolle bei der Mitose spielen könnte. In einem Hefe-2-Hybrid Screening wurden drei weitere Bindungspartner von GAS41 identifiziert.³³ Neben dem Chaperon PFDN1 (*prefoldin subunit 1*)⁴⁷ wurde auch die Interaktion von GAS41 mit KIAA1009 und NuMA nachgewiesen. Die Bindung an das nukleäre Protein NuMA wurde von JENS HARBORTH *et al.* mittels Immunopräzipitation und Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie bestätigt.³¹ Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe von IVAN STILL, auch die Interaktion von GAS41 mit den TACC-Proteinen TACC1 und TACC2 nachweisen.

3 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Funktion von GAS41 in der M-Phase des Zellzyklus. Das Protein, das in Gliomen häufig überexprimiert vorliegt, ist bisher nur unzureichend hinsichtlich seiner möglichen Funktion als Transkriptionsfaktor beschrieben. Die Identifizierung verschiedener weiterer Interaktionspartner von GAS41 deutet jedoch eine zentrale Rolle bei der Zellteilung hin. Einige Interaktionspartner, wie TACC1, TACC2, NuMA oder KIAA1009, werden mit Strukturen der Mitosespindel sowie der Regulation der Mitose in Verbindung gebracht. Ausgehend von diesen Proteininteraktionen stellte sich die Frage, ob auch GAS41 einen Einfluss auf den Spindelapparat oder den Ablauf der Mitose haben könnte.

Um die Funktion des Proteins näher untersuchen zu können, sollte ein RNAi vermittelter Knockdown in HeLa Zellen und der Glioblastomzelllinie TX3868 etabliert werden. Mit Hilfe von Microarrayanalysen an GAS41 depletierten Zellen sollte nachgewiesen werden, ob es sich bei GAS41 tatsächlich um ein Protein handelt, das einen signifikanten Einfluss auf die Mitose ausübt. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sollten als Grundlage für weitere zellbiologische Experimente dienen.

Auf zellulärer Ebene sollte zunächst die centrosomale Lokalisation von GAS41 überprüft werden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob der Knockdown die Viabilität und Morphologie der Zellen beeinflusst. Um zu analysieren, ob GAS41 eine Rolle bei der Zellzyklusprogression spielt, sollten darüber hinaus GAS41 depletierte Zellen auf das Auftreten eines Zellzyklusarrestes untersucht werden.

Die Rolle von GAS41 in der Mitose sollte an synchronisierten Zellen mit erniedrigter bzw. erhöhter GAS41 Expression untersucht werden. Hierzu sollten sowohl die

Ausbildung als auch die Aufrechterhaltung des Spindelapparates während der Mitose beobachtet werden. Um den Einblick in die Funktion von GAS41 während der M-Phase weiter zu vertiefen, sollte der Knockdown in einer Zelllinie etabliert werden, die eine Beobachtung der Zelle mittels Life Cell Mikroskopie möglich macht. In dieser Zelllinie sollte untersucht werden, ob die Mitose auch bei veränderten Spindelphänotypen vollständig durchlaufen wird. Dabei sollten nicht nur die Struktur des Spindelapparates, sondern auch die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte sowie die Dauer der Mitose untersucht werden.

In weiteren zellbiologischen Studien sollte analysiert werden, in wie weit der Knockdown des centrosomalen Proteins GAS41, die Integrität der Centrosomen bzw. der pericentriolaren Matrix sowie die Funktionalität der Mitosespindel beeinflusst.

4 Material und Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 80 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für die Zelllinien HeLa und TX3868 wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) verwendet. Für HeLa Zellen wurde dieses Standardkulturmedium mit 10 % FBS der Firma Biochrom AG supplementiert. Für die stabile Glioblastozelllinie TX3868 wurde das Kulturmedium mit 1 % Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen) und 10 % FBS der Firma PAA supplementiert.

Die stabile Zelllinien HeLa H2B-GFP, die von der Arbeitsgruppe von THOMAS CREMER zur Verfügung gestellt wurde, exprimieren das Histon H2B als GFP-Fusionsprotein.²¹ Diese Zelllinien wurde in RPMI 1640 Medium (Invitrogen) mit 10 % FBS (Biochrom AG) kultiviert. Die Zelllinie MCF-7 wurde ebenfalls in RPMI 1640 Medium mit 10 % FBS (Biochrom AG) kultiviert.

Die verwendeten Zellen wurden zweimal wöchentlich vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Nach Abnehmen des Kulturmediums wurden die Zellen vorsichtig mit PBS (Invitrogen) gespült und dann mit einem entsprechenden Volumen Trypsin/EDTA (Invitrogen) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins im Zellkulturmedium aufgenommen. Abhängig von der Zellzahl und der Höhe der Verdünnung wurde die entsprechende Menge Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem Kulturmedium gegeben.

4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Säugerzellen lassen sich über einen langen Zeitraum in flüssigem Stickstoff lagern. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zunächst mit Trypsin abgelöst und anschließend mit Kulturmedium vom Boden der Zellkulturflasche abgespült. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden

anschließend in 2 ml 10 % DMSO/FBS aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. In einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter wurden die Zellen allmählich mit $\sim 1^\circ\text{C}/\text{min}$ auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen im 37°C warmen Wasserbad schnell erwärmt. Die Zellen wurden mit 5 ml Kulturmedium verdünnt und anschließend bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und anschließend in 8-20 ml Kulturmedium aufgenommen. In eine Neubauer *improved* Zählkammer (Abb. 4) wurden $10\ \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension gefüllt. Anschließend wurde die Zahl intakt aussehender Zellen in den vier äußeren Großquadranten gezählt. Der Mittelwert aus diesen vier Quadranten ergibt durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 die entsprechende Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension.

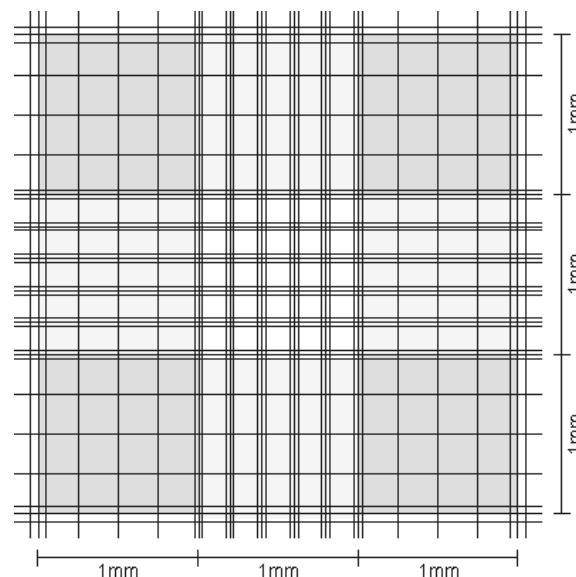


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer Neubauer *improved* Zählkammer

4.1.4 Zellviabilität

4.1.4.1 Viabilitätstest mit Trypanblau

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an zelluläre Proteine bindet. Der Farbstoff dringt durch die defekte Zellmembran toter Zellen in das Cytoplasma ein und färbt die Zelle dunkelblau. Lebende Zellen bleiben ungefärbt und leuchtend hell. Um die Lebensfähigkeit der Zellen zu überprüfen, wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl einer 0,4 % Trypanblaulösung (Sigma) vermischt. Mittels einer Neubauer Zählkammer erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie der Anzahl der blau gefärbten Zellen. Der prozentuale Anteil der ungefärbten Zellen entspricht dem Anteil vitaler Zellen.

4.1.4.2 WST-1 Assay

Dieser Viabilitätstest beruht auf der enzymatischen Spaltung des wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen. Dabei korreliert die Entstehung des dunkelroten Formazan-Farbstoffes mit der Anzahl lebensfähiger Zellen. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Multiwell-Spektralphotometers.

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen mit 1/10 Kulturvolumen der WST-1 Lösung (Roche) versetzt. Nach 0,5-2,5 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Kulturschalen für 1 min geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm und 690 nm mit dem Multiwell-Spektralphotometer (Elx 800, BioTEK Instruments) bestimmt. Die Absorption bei 690 nm dient dabei als Referenzmesswert. Zur Berücksichtigung der Hintergrundabsorption durch das Kulturmedium wurde eine Negativkontrolle ohne Zellen als Nullwert festgelegt.

4.1.5 Transiente Transfektion adhärenter Monolayer Zellen

Die Transfektion ist ein Prozess, bei dem Fremd-DNA oder -RNA in eine Säugerzelle eingebracht wird. Die Lipofektion ist eine Transfektionsmethode, bei der die fremde DNA oder RNA mit Hilfe von Liposomen in die Zelle eingeschleust wird. Bei

dem verwendeten Transfektionsreagenz handelt es sich um kationische Lipidvesikel, an deren Oberfläche die DNA oder RNA komplexiert wird. Diese Komplexe werden zu den Zellen gegeben, wo sie mit der Zellmembran fusionieren können.

4.1.5.1 Transfektion mit siRNA

Die Zellen wurden am Vortag mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen je \varnothing 35 mm Schale in 2 ml Medium ausgesät. Für die Transfektion von siRNA wurden zunächst 6,5 μ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 244,5 μ l serumfreiem Opti-MEM I Medium (Invitrogen) aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 5 μ l siRNA (20 μ M) (Tab. 1) in 245 μ l Opti-MEM I Medium aufgenommen und mit der Lipofectamine-Lösung vereinigt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 5-6 h Inkubation wurde das Kulturmedium erneuert. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden parallel Zellen mit einer unmarkierten sowie einer Fluorescein (FITC) markierten Negativkontroll-siRNA transfiziert (Tab. 1). Diese Zellen wurden 4,5 h nach Transfektion mit 500 μ l Trypsinlösung abgelöst und durch Zugabe von 500 μ l 2 % Formaldehyd/ PBS fixiert. Die Transfektionseffizienz wurde an einem Durchflusszytometer (FACScan, Beckton Dickinson) ermittelt. Zur Auswertung der Messdaten wurde die Software CellQuest Pro (Beckton Dickinson) eingesetzt.

Tabelle 1: Sequenzen eingesetzter siRNAs

Name	Sense 5' - 3'	Antisense 5' - 3'	Firma
GAS41 siRNA1	GGAU AUGUCAGCAUAUGUGtt	CACUAUUGCUGACAUAUCctc	Ambion
GAS41 siRNA2	CCAAUAGUUUACGGUAAUGtt	CAUUACCGUAAACUAUUGGtt	Ambion
GAS41 siRNA3	GCCUAUAAGCAUGAAACAGtt	CUGUUUCAUGCUUAUAGGctc	Ambion
ACTB	AGGCUGUGCUAUCCCUGUAtt	UACAGGGAUAGCACAGCCUgg	Qiagen
Negativkontrolle #1	-----	-----	Ambion
Negativkontrolle	UUCUCCGAACGUGUCACGUtt	ACGUGACACGUUCGGAGAAtt	Qiagen
Negativkontrolle-FITC	UUCUCCGAACGUGUCACGUtt-FITC	ACGUGACACGUUCGGAGAAtt	Qiagen

4.1.5.2 Transfektion mit Plasmid-DNA

Die Zellen wurden am Vortag mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro \emptyset 35 mm Schale in 2 ml Medium ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst 1 μ g Plasmid-DNA in 97 μ l Opti-MEM I Medium resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 3 μ l Fugene HD (Roche) wurde der Transfektionsansatz sorgfältig gemischt und für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium erneuert. Die Ernte bzw. Fixierung der Zellen erfolgte 24-48 h nach Transfektion.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden parallel Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für das grün fluoreszierende Protein GFP codiert (pEGFP-C3 der Firma Clontech). Die Transfektionseffizienz wurde an einem inversen Auflichtmikroskop mit UV-Lampe (Zeiss Axiovert 25) ermittelt. Desweiteren wurde ein Plasmid zur Expression von GFP-GAS41 eingesetzt, das auf dem Vektor pEGFP-C3 der Firma Clontech basiert, sowie ein Plasmid zur Expression von HA-GAS41, das auf dem Vektor pSG5 der Firma Stratagene basiert.

4.1.6 Synchronisation von Zellen

Um Zellen einer bestimmten Zellzyklusphase untersuchen zu können, müssen sie in ihrem Zellzyklus synchronisiert werden. Zur Synchronisation der Zellen wurde ein Doppel-Thymidinblock durchgeführt. Das Ribonukleotid Thymidin wirkt als allosterischer Inhibitor auf die Ribonukleotid-Reduktase. Der Überschuss an Thymidin unterbindet die Synthese von Pyrimidinnukleotiden. Durch diese Hemmung kommt es zu einem Synthese-Stopp und damit zur Synchronisation der Zellen am G₁/S-Checkpoint.

Die HeLa Zellen wurden am Vortag mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro \emptyset 35 mm Schale auf Deckgläschen ausgesät. Nach 19 h Inkubation mit 2 mM Thymidin/ Kulturmedium wurden die Zellen für 9 h in normales Kulturmedium überführt. Um die Zellen, die zum Zeitpunkt der ersten Inkubation schon über den G₁/S-Checkpoint hinaus waren, zu synchronisieren, erfolgte eine weitere Inkubation für

18 h in Thymidin-haltigem Medium. Anschließend wurde das Thymidin ausgewaschen und die Zellen in ihr normales Kulturmedium überführt. Zu definierten Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert. Für die Glioblastomzelllinie TX3868 wurden die Inkubationszeiten auf 36 h bzw. 18 h ausgedehnt.

4.1.7 Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in Nukleinsäuren interkaliert. In der Durchflusszytometrie dient er zur Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Zelle, der durch die Anzahl der Chromosomen festgelegt ist. Da die Fluoreszenz einer Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist, lassen sich in proliferierenden Zellen Populationen mit einfachem Chromosomensatz ($2n$) und doppeltem Chromosomensatz ($4n$) unterscheiden. Da Propidiumiodid auch in RNA interkaliert, muss nach Fixierung und Permeabilisierung der Zelle zusätzlich ein enzymatischer Verdau der RNA durchgeführt werden.

Die Zellen wurden aus der Kultur entnommen, in geeignete Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 2000 rpm sedimentiert. Nach Abnehmen des Kulturüberstandes wurden die Zellen in PBS aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurde in die Pipettenspitze aufgenommen und in eine entsprechende Menge eiskaltes Ethanol überführt (Endkonzentration: $\sim 1 \times 10^6$ Zellen pro ml 70 % Ethanol). Zur Fixierung wurden die Zellen 4 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von zwei Volumen eiskaltem PBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden vorsichtig in PBS resuspendiert und nach Zugabe von RNaseH (Endkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$) für 30 min bei 37°C inkubiert. Wenige Minuten nach Zugabe von Propidiumiodid (Endkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$) erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

4.1.8 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Lokalisation von Proteinen in der Zelle bzw. in verschiedenen Zellkompartimenten sichtbar zu machen benutzt man Fluoreszenzfarbstoffe. Bei der direkten Im-

munfluoreszenzfärbung setzt man fluoreszenzmarkierte Antikörper ein, die gegen das zu untersuchende Protein gerichtet sind. Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden zunächst Antikörper gegen das Zielprotein mit den Zellen inkubiert. In einem zweiten Schritt werden dann fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind. Die Immunfluoreszenzfärbung wird an fixierten Zellen durchgeführt. Zur Fixierung setzt man entweder quervernetzende Agenzien, wie Paraformaldehyd, oder präzipitierende Agenzien, wie Methanol ein.

Tabelle 2: Primärantikörper und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen

Wirt	Antigen	Fluorochrom	Firma	Verdünnung
Maus	α -Tubulin		Sigma	1:1000
Kaninchen	Pericentrin		Abcam	1:2000
Mensch	CREST		Euroimmune Antibodies Incorporated	1:50
Ziege	Maus IgG	Texas Red		1:200
Ziege	Kaninchen IgG	Alexa 488	Molecular Probes	1:2000
Ziege	Kaninchen IgG	Alexa 594	Molecular Probes	1:2000
Ziege	Kaninchen IgG	Alexa 633	Molecular Probes	1:200
Esel	Human IgG	Cy3	Sigma	1:100
Ziege	Maus IgG	Alexa 488	Molecular Probes	1:2000
Ziege	Maus IgG	Alexa 594	Molecular Probes	1:2000

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd/ PBS fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die fixierten Zellen 2 min mit 0,1 % Triton X 100/ PBS inkubiert. Nach 5 min Waschen in PBS wurden die Zellen für 30 min zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 1 % Ziegen Serum (Dianova) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Die in Tabelle 2 aufgeführten Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur eingesetzt. Nach drei Waschschriffen zur Entfernung ungebundener Primärantikörper, wurden die Zellen mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (Tabelle 2) überschichtet. Diese wurden in entsprechender Verdünnung für 45–60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Darstellung der DNA wurde eine Gegenfärbung mit dem interkalierenden Farbstoff Hoechst 33258 (Sigma) durchgeführt. Die Deckgläser wurden mit *Mounting Medium* (Histoprime, Linaris) auf Glasobjektträgern montiert und zur Aushärtung 12 h bei 4°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop AX70 (Olympus) mit Hilfe der Software *Cell F* (Olympus). Für die Aufnahmen wurden ein 100x bzw. 60x Öl-Immersion Objektiv (Olympus) und die CCD-Kamera DP71 (Olympus) verwendet.

4.1.9 Life Cell Mikroskopie

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Glasboden (*Lab-Tek Chambered Coverglass*, Nunc) ausgesät und mittels Doppel-Thymidinblock synchronisiert. Die Zellen wurden wie beschrieben mit siRNA transfiziert und aus dem Thymidinblock entlassen. Um den phototoxischen Stress bei der Lebendzell-Analyse zu minimieren, wurde den Zellen zum Zeitpunkt des zweiten Thymidinblocks ein zellpermeables, wasserlösliches Vitamin E Derivat (Trolox, Calbiochem, Endkonzentration 0,25 mM) zugesetzt. Vor der Analyse am Konfokalmikroskop wurde das Kulturmedium durch ein Phenolrot-freies 50 mM HEPES-gepuffertes Kulturmedium (Invitrogen) ersetzt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Spinning Disk Konfokalmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) mit Inkubationskammer. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Ob-

ektivs Plan Apo 63 x 1,4 Oil Dici (Zeiss) und der Software Volocity 5 durchgeführt. Die Bildbearbeitung wurde mit der Software Image J durchgeführt.

4.1.10 Konfokalmikroskopie

HeLa H2B-GFP Zellen wurden mittels Doppel-Thymidinblock in Lab-Tek Kamern (s.o.) synchronisiert und mit siRNA transfiziert. Nach Erreichen der M-Phase wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd/ PBS fixiert und mit 0,5 % Triton X 100/ PBS permeabilisiert. Nach einer Immunfluoreszenzfärbung mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern, wurden die Zellen mit einem *Mounting* und *Antifade* Medium (Vectashield, Vector Labs) überschichtet und an einem inversen Konfokalmikroskop (Broadband Confocal TCS SP5, Leica) mit Hilfe der Software LAS AF analysiert. Die Bildbearbeitung wurde mit der Software Image J durchgeführt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Transformation von *Escherichia coli* DH5 α

LB-Medium: 10 g Trypton
 10 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 ad 1 l H₂O_{dd}

Kanamycin: 50 mg/ ml, Stammlösung (Roche)

Ampicillin: 50 mg/ ml, Stammlösung

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde *Escherichia coli* Zellen mittels Hitzeshock transformiert. Hierzu wurden 50 μ l *E. coli* DH5 α *subcloning efficiency* (In-vitrogen) langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 ng Plasmid-DNA wurden

die kompetenten Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Hitzeschocktransformation wurden die Zellen für 37 s bei 37°C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium wurden die Zellen zur Regeneration für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in antibiotikahaltigem Medium in Flüssigkultur aufgenommen und ü.N. bei 37°C und 225 rpm inkubiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Plasmid zur Expression des HA-markierten GAS41 eingesetzt, das auf dem Vektor pSG5 der Firma Stratagene beruht. Zur Expression des GFP-GAS41 Fusionsproteins wurde GAS41 in einem pEGFP-C3 Vektor der Firma Clontech exprimiert. Die Vektorkarten der eingesetzten Plasmid befinden sich im Anhang.

4.2.2 Plasmid isolation

Zur Isolation der Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, wurde der Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Hierzu wurde eine Über-Nacht-Kultur der transformierten DH5α Zellen für 15 min bei 3000 rpm sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in RNase-haltigem Puffer resuspendiert. Nach Zugabe des alkalischen Puffers wurden die Zellen zur Lyse vorsichtig invertiert und auf Eis inkubiert, wobei die Lösung aufklarte. Die Zugabe des Neutralisationspuffers führte anschließend zur Präzipitation von Proteinen und genomischer DNA. Nach der Zentrifugation wurde der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand mit Hilfe einer Säule zur Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit H₂O_{dd}.

4.2.3 RNA Isolation

Zur Isolation von RNA aus adhärennten Zellen wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden die pelletierten Zellen in der entsprechenden Menge Lysispuffer resuspendiert und anschließend über QIA Shredder

Säulen mechanisch aufgeschlossen. Das Lysat wurde auf eine RNeasy Säule überführt und zentrifugiert. Die an die Säulenmatrix gebundene RNA wurde in mehreren Schritten gewaschen und nach einem optionalen Trocknungsschritt mit H_2O_{dd} eluiert.

4.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren basiert auf der Tatsache, dass Nukleinsäuren in Lösung ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen. Aus der dabei gemessenen optischen Dichte lässt sich unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors die Nukleinsäurekonzentration über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmen.

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E = \log I_0/I = \epsilon * c * d$

E	Extinktion (optische Dichte)
I_0	Intensität des einfallenden Lichtes
I	Intensität des transmittierten Lichtes
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient (l/mol * cm)
c	Konzentration (mol/l)
d	Schichtdicke (cm)

Eine bei 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm gemessene optische Dichte von 1,0 entspricht dabei einer Nukleinsäurekonzentration von:

50 μ g/ ml doppelsträngige DNA

40 μ g/ ml RNA

Zur Bestimmung der Reinheit und Qualität der gemessenen Nukleinsäurelösung nutzt man die Absorption aromatischer Aminosäuren bei 280 nm aus. Der Quotient OD 260/280 einer proteinfreien Nukleinsäurelösung sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Für die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde ein Photometer der Firma Eppendorf eingesetzt.

4.2.5 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können isolierte Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt und durch interkalierende Farbstoffe, wie Ethidiumbromid, sichtbar gemacht werden. Als Gelmatrix dient dabei das Polysaccharid Agarose, welches durch Erhitzen im Elektrophoresepuffer in Lösung gebracht wird. Beim Erkalten der Lösung entsteht eine großporige Matrix, in der DNA oder RNA aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Gleichspannungsfeld zur Anode wandern.

4.2.5.1 RNA-Gelelektrophorese

10x MOPS	2 M MOPS
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
	pH 7,0
	Zugabe von 0,1% DEPC
	ü.N. bei 37°C
	nach Autoklavieren dunkel lagern
RNA-Probenpuffer (1,5 ml)	720 µl deionisiertes Formamid
	160 µl 10x MOPS
	360 µl DEPC-H ₂ O
	100 µl Ethidiumbromid (10 mg/ ml)
	80 µl Glycerin
	80 µl gesättigte Bromphenolblau Lösung

RNA unterliegt einer ausgeprägten Sekundärstrukturbildung. Um eine reproduzierbare Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht zu erzielen, muss die RNA vollständig denaturiert vorliegen. Durch die Zugabe von Formaldehyd in das Agarosegel erfolgt die elektrophoretische Auftrennung unter kontinuierlichen denaturierenden Bedingungen. Zusätzlich wurde die RNA mit einem denaturierenden Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 65°C erhitzt. Um eine Renaturierung zu verhindern wurde die RNA bis zum Auftragen auf Eis gestellt.

Zur Inaktivierung der ubiquitär vorkommenden RNasen wurden Gelkammer, Schlitten, Trennwände und Kamm 30 min in einer 1 % SDS Lösung inkubiert. Zur Herstellung eines RNA-Gels wurde 1 g Seakem Agarose (Lonza) in 95 ml 1x MOPS-Puffer durch Erhitzen gelöst. Die geschmolzene Agarose wurde in einem Wasserbad auf 55°C abgekühlt und mit 5,4 ml vorgewärmtem 37 % Formaldehyd versetzt. Die Lösung wurde in den vorbehandelten Schlitten mit Trennwänden und Kamm gegossen und ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und beladen. Nach Anlegen einer Spannung von 90 V wurde die Elektrophorese durchgeführt bis die Lauffront ca. 2/3 der Laufstrecke durchwandert hatte. Mit Hilfe einer CCD-Kamera wurden unter UV-Licht die Banden der 18S und 28S RNA detektiert.

4.2.5.2 DNA-Gelelektrophorese

50x TAE	1 M Essigsäure
	50 mM EDTA pH 8,0
	2 M Tris/ HCl pH 8,0
10x DNA-Probenpuffer	1x TAE
	70 % Glycerin
	40 mM EDTA pH 8,0
	wenige Kristalle Bromphenolblau und Xylencyanol

Bei der Gelelektrophorese von DNA erfolgt die Trennung der Moleküle ebenfalls nach dem Molekulargewicht. Die Konzentration des Agarosegels hängt dabei von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente ab. Zur Herstellung eines Agarosegels wur-

de die entsprechende Menge Agarose (Invitrogen) in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen mit 3 μ l Ethidiumbromid (Roth) versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde das Gel in einen abgedichteten Gelschlitten gegossen, polymerisiert und dann in eine puffergefüllte Gelkammer überführt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/10 Volumen DNA Probenpuffer versetzt. Zusätzlich wurde zur Größenbestimmung der Fragmente der 100 bp *extended* Marker (Biorad) als Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V in 1x TAE durchgeführt, bis 2/3 der Laufstrecke durchwandert waren. Die Detektion erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera unter UV-Licht.

4.2.6 Northern Blot

4.2.6.1 Aufbau eines Northern Blots

Phosphatpuffer pH 6,5	400 ml 0,5 M Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O
	400 ml 0,5 M NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O
Phosphatpuffer pH 7,2	1600 ml 0,5 M Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O
	400 ml 0,5 M NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O

Zur Durchführung eines Northern Blots wurde zunächst ein RNA-Gel wie oben beschrieben hergestellt. Für jede Probe wurden 12-15 μ g Gesamt-RNA mit 3-5 μ l RNA-Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 65°C denaturiert. Als Längenstandard wurde 3 μ l RNA-Ladder (Invitrogen) mit 3 μ l Probenpuffer versetzt und denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben wurde für 90-120 min die Elektrophorese bei 100 V durchgeführt. Anschließend wurde der Gellauf mit einer CCD-Kamera dokumentiert. Zur Vorbereitung des Northern Blots wurde das Gel zurechtgeschnitten. Dabei wurden die Geltaschen sowie alle nicht benötigten Spuren entfernt. Das verbleibende Gelstück wurde 2 x 10 min in 25 mM Phosphatpuffer pH 6,5 äquilibriert. Für den Blot wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) auf die exakte Gelgröße geschnitten, 10 min in H₂O_{dd} und 10 min in 25 mM Phosphatpuffer pH 6,5 äquilibriert. Auf einer

Glasplatte wurden vier puffergetränkte Filterpapierstreifen von 40 cm Länge und exakt der Gelbreite luftblasenfrei aufgebracht. Dabei ragten die Enden der Filterpapierstreifen in eine Plastikwanne, die mit 1,5 l 25 mM Phosphatpuffer pH 6,5 als Transferpuffer gefüllt war. Auf diese Filterpapierstreifen wurde das äquilibrierte RNA-Gel mit der Geloberfläche nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Die Ränder des Gels wurden mit Verschlussfolie abgedichtet, um einen Kurzschluss des Transfers zu verhindern. Auf die Unterseite des Gels wurde die äquilibrierte Nylonmembran luftblasenfrei aufgebracht. Auf das Gel-Membran-Sandwich wurden zwei feuchte und zwei trockene Filterpapiere mit exakter Gelgröße aufgelegt, bevor der Aufbau mit einem Stapel Papierhandtücher überschichtet wurde. Zusätzlich wurde der Blotaufbau mit einem 1 kg schweren Gewicht beschwert. Der Transfer der RNA aus dem Gel auf die positiv geladene Membran erfolgt dabei durch den Flüssigkeitsstrom, der durch die Kapillarkräfte hervorgerufen wird. Nach ca. 24 h wurde der Blot abgebaut und der vollständige Transfer der RNA auf die Membran mittels CCD-Kamera dokumentiert. Die Nylonmembran wurde 2 x 10 min in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,2 neutralisiert, getrocknet und zum Crosslinking mit 0,12 kJ UV-Licht bestrahlt.

4.2.6.2 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden wurden dsDNA-Templates eingesetzt. Zur Markierung wurde der High Prime DNA Labeling Kit (Roche) eingesetzt.^{33,48,49}

In ein Schraubdeckelgefäß wurden 6 µl H₂O_{dd} gegeben und mit 25 ng DNA versetzt. Zur Denaturierung der DNA wurde die Lösung 10 min bei 100°C inkubiert. Um eine schnelle Renaturierung zu verhindern wurde die DNA-Lösung sofort in ein Eis-Ethanol Bad überführt, kurz zentrifugiert und mit 4 µl Reaktionsmix versetzt. Nach Zugabe von je 1 µl nicht-radioaktivem dATP, dGTP und dTTP wurden 5 µl α-³²P-dCTP (250 µCi, Hartmann Analytik) zugegeben. Die Markierungsreaktion wurde für 15 min bei 37°C durchgeführt.

4.2.6.3 Hybridisierung und Detektion

Hybridisierungslösung	7 % SDS 1 mM EDTA Phosphatpuffer pH 7,2
Phosphatpuffer pH 7,2	1600 ml 0,5 M Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 400 ml 0,5 M NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O
Strip-Lösung	1 % SDS 0,1x SSC

Die Northern Blot Membran wurde mit der RNA-Seite nach innen in eine Hybridisierungsröhre überführt. Zur Prähybridisierung wurde die Membran für mindestens 30 min bei 65°C mit 10 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung inkubiert. Während dessen wurde die radioaktiv markierte Sonde in 10 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung überführt und für 15 min bei 100°C denaturiert. Nach Dekantieren der Prähybridisierungslösung wurde die radioaktive Hybridisierungslösung in die Glasröhre überführt. Die Hybridisierung erfolgte unter Rotation bei 65°C ü.N. im Hybridisierungssofen.

Am darauf folgenden Tag wurde die radioaktive Sonde in ein 50 ml Reaktionsgefäß dekantiert und bei -20°C gelagert. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Sonde wurde die Membran zunächst 15 min mit 450 mM Phosphatpuffer/1 % SDS bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran für weitere 10-15 min in 350 mM Phosphatpuffer/1 % SDS gewaschen. Je nach gemessener Aktivität wurde noch ein dritter Waschschrift mit 250 mM Phosphatpuffer/1 % SDS durchgeführt. Anschließend wurde die Membran in Folie eingeschweißt und zur Detektion in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie bzw. in eine Phosphor Imager Kassette überführt. Zur Visualisierung der Banden wurden Autoradiographie Filme (GE Healthcare) bzw. ein Flächenscanner (Typhoon 9410, GE Healthcare) eingesetzt.

Zum Entfernen der radioaktivmarkierten Sonden von bereits hybridisierten Membranen wurden diese 2 x 30 min in 90°C heißer Striplösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zwischen Filterpapieren getrocknet und gelagert.

4.2.7 Proteinisolation aus Säugerzellen

Lysispuffer	150 mM NaCl
	50 mM Tris/ HCl pH 8,0
	1 % NP40
	Proteaseinhibitor Complete Mini EDTA-free (Roche)

Zur Isolation von Gesamtprotein aus Säugerzellen wurden diese nach dem Ablösen für 4 min bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert. Das Zellpellet wurde je nach Größe in 50 µl bis 200 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat zur Entfernung des Zelldebris für 45 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

In einem Lysat aus eukaryontischen Zellen lässt sich die Proteinkonzentration photometrisch in alkalischer Lösung einfach bestimmen. Hierzu wurden 2 µl des Zellysats mit 98 µl 0,1 M NaOH versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 280 nm gegen 0,1 M NaOH als Leerwert gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wird der Wert der Absorption bei 280 nm in folgende Formel eingesetzt:

$$15 \mu\text{g} = 6,4 / A_{280}$$

4.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer 1 M Tris/ HCl

pH 6,8

Trenngelpuffer 3 M Tris/ HCl

pH 8,8

1 x Laufpuffer 1 % SDS

25 mM Tris

200 mM Glycin

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Dazu werden die Proben mit einem denaturierenden Probenpuffer versetzt, der neben reduzierenden Agenzien zur Auflösung von Disulfidbrücken auch einen Überschuss an Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. Erhitzt man die Probe dann auf 95°C werden die Proteine denaturiert, d.h. ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wird zerstört. Dabei lagert sich das SDS gleichmäßig an die Proteine an, so dass deren Eigenladung überdeckt wird und die Proteine ein konstantes Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufweisen. Die SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei sie durch den Molekularsiebeffekt der Gelmatrix nach ihrem Stokes-Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Es wurde ein diskontinuierliches Lämmli-System verwendet, bei dem ein großporiges Sammelgel das kleinporige Trenngel überschichtet. Dabei ist die Porengröße abhängig vom Vernetzungsgrad des Polymers.

Für die SDS-PAGE wurde das XCell Sure-Lock System der Firma Invitrogen verwendet. Zur Herstellung eines 15 % Trenngels wurden 3,55 ml H₂O_{dd}, 1,25 ml Trenngelpuffer, 5 ml Acrylamid-Bisacrylamid Lösung 37,5:1 (Bio-Rad), 100 µl 10 % SDS Ultrapure (Roth), 100 µl 10 % APS (Ammoniumpersulfat) (Roth) und 10 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Sigma) gemischt und in eine leere Kunststoffgelkassette gegossen. Zur Polymerisation wurde das Gel mit H₂O_{dd} überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vollständiger Polymerisati-

on wurde das Wasser entfernt und das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet. Zur Herstellung des 4 % Sammelgels wurden 3,6 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, 630 μl Sammelgelpuffer, 670 μl Acrylamid-Bisacrylamid Premix 37,5:1, 50 μl 10 % SDS, 50 μl 10% APS und 10 μl TEMED gemischt und luftblasenfrei auf das Trenngel gegeben. Zur Ausbildung der Probenaschen wurde in das Sammelgel ein PVC-Kamm gesteckt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel zur SDS-PAGE eingesetzt. Dazu wurden der Kamm und das untere Dichtungsband der Gelkassette entfernt und die Taschen wurden zur Entfernung von SDS-Resten mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gespült. Nach dem Einspannen des Gels in die Gelkammer wurden die obere und untere Pufferkammer mit 1 x Laufpuffer gefüllt.

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese mit $\frac{1}{4}$ Volumen Roti-Load I (Roth) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Zusätzlich wurden auf das SDS-Gel auch 10 μl des Größenstandards Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad) (s. Anhang) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für ca. 40 min bei 125 V durchgeführt.

4.2.10 Western Blot

Transferpuffer 250 mM Tris
 192 mM Glycin
 20 % Methanol

Tabelle 3: Primärantikörper und Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Wirt	Antigen	Firma	Verdünnung/ Puffersystem
Kaninchen	GAS41	Universität des Saarlandes ³³	1:50/ PBS
Maus	β-Aktin	Sigma	1:10000/ TBST
Ziege	Kaninchen IgG	Dianova	1:5000/ PBS
Ziege	Maus IgG	Sigma	1:30000/ TBST

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Transfer durch SDS-PAGE aufgetrennter Proteine auf eine Trägermatrix, z.B. eine PVDF-Membran. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die, durch das SDS negativ geladenen, Proteine zur Anode und werden auf der Membran immobilisiert.

Für den Blot wurde die Tank-Blotting-Apparatur XCell Sure-Lock der Firma Invitrogen verwendet. Bei diesem System wurden auf die Kathodenplatte (Minus-Pol) zwei in Transferpuffer befeuchtete Schwämme und zwei Lagen befeuchtetes Filterpapier gelegt. Darauf wurde das Gel luftblasenfrei aufgebracht. Nach dem Reaktivieren einer PVDF-Membran (GE Healthcare) mit Methanol und Äquilibrieren mit Transferpuffer, wurde die Membran luftblasenfrei auf das Gel aufgebracht. Auf die Membran folgten erneut zwei Filterpapiere und anschließend drei Schwämme, die jeweils zuvor in Transferpuffer getränkt wurden. Zum Schluss wurde die Anodenplatte (Plus-Pol) aufgelegt und die Blotkassette senkrecht in den Puffertank eingebracht. Der Blot wurde 90-120 min bei 25 V durchgeführt.

Anschließend wurde die Membran zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen in eine Lösung mit 10 % fettfreiem Milchpulver (Roth) überführt und für 1 h bei

Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Verdünnen des Primärantikörpers (s. Tab. 3) in einer 3 % Milchpulver Lösung wurde die Membran entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Lösung inkubiert. Nach drei Waschschritten von je 15 min, wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz (ECL Plus, GE Healthcare). Zur Detektion wurden Chemilumineszenzfilme der Firma GE Healthcare eingesetzt. Das verwendete Puffersystem, PBS/ PBST oder TBST, war abhängig vom eingesetzten Antikörper (s. Tab. 3).

4.3 **Microarray Analyse**

Zur Durchführung der Genexpressionsanalysen an GAS41 depletierten Zellen, wurde Gesamt-RNA aus $\sim 2,5 \times 10^6$ TX3868 Zellen isoliert, die mit GAS41 siRNA bzw. Negativkontroll-siRNA transfiziert waren. Hierfür wurden jeweils drei biologische Replikate erzeugt. Die isolierte RNA wurde zunächst mit Hilfe eines Bioanalyzers (Agilent Technologies) auf ihre Qualität hin überprüft. Für die Microarray Analysen wurden die Human Whole Genome Arrays HG U133 Plus 2.0 der Firma Affymetrix ausgewählt. Die Vorbereitung der Proben, die Hybridisierung der Microarrays und die Auswertung der Daten wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von VLADIMIR BENES, am EMBL Genomics Core Facility in Heidelberg durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Proben wurde das *Two Cycle Target Labeling* Protokoll entsprechend den Herstellerangaben angewandt. Hierzu wurden jeweils 3 μg Gesamt-RNA in die Erststrang cDNA Synthese eingesetzt, wobei die RNA mit Hilfe von T7 Oligo (dT) Promotor-Primern revers transkribiert wurde. Nach erfolgter Zweitstrangsynthese wurde die erhaltene doppelsträngige cDNA aufgereinigt und als Template in die darauf folgende *in vitro* Transkription (IVT) eingesetzt. Die IVT wurde in Anwesenheit einer T7 Promoter RNA Polymerase und biotinylierter Nukleotidanaloga durchgeführt.

Am nächsten Tag wurde die erhaltene cRNA aufgereinigt und anschließend mittels Bioanalyzer auf ihre Transkriptlänge hin überprüft. Nach erfolgter Qualitätskontrolle wurde die cRNA fragmentiert und in das Hybridisierungsgemisch eingesetzt. Die Microarrays wurden für 16 h mit der Hybridisierungslösung inkubiert. Die Detektion und alle erforderlichen Waschschriffe wurden am darauf folgenden Tag in einer vollautomatisierten Waschstraße (GeneChip[®] Fluid Station, Affymetrix) durchgeführt. Anschließend wurden die Microarrays mit einem GeneChip[®] 3000 Scanner (Affymetrix) bei 570 nm gescannt. Die Rohdaten wurden unter Verwendung der Gene Expression Console Software (Affymetrix) auf die Qualität der gemessenen Signale hin überprüft. Dabei wurden Spots mit einem negativen *Quality Flag* (z.B. *near background*, *missing spot*) von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die bereinigten Rohdaten wurden anschließend mit Hilfe der GeneSpring Software analysiert.

Die einzelnen Replikate wurden nach der Spearman Korrelation geclustert und einem t-Test unterzogen. Alle Spots mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Nach dem Ausschluss aller Signale die zu nahe an der Nachweisgrenze lagen, wurden die verbleibenden Messdaten nach ihrer *fold change* analysiert. Sequenzen die sich zwischen *treatment* (GAS41 Knockdown) und Kontrolle um mindestens den Faktor 1,7 unterschieden haben, wurde als Sequenzen mit signifikanter Änderung der Expressionsstärke angesehen. Dieser Datensatz wurde nun in einer ANOVA-Analyse einem einseitigen parametrischen t-Test (Welch t-Test) unterzogen. Parallel dazu wurde der Datensatz in einem *Volcano Plot* gleichzeitig nach *fold change* und p-Wert analysiert. Aus all diesen Analysemethoden wurde die gemeinsame Schnittmenge ermittelt. Die sich daraus ergebende statistisch signifikant veränderten exprimierten Sequenzen wurden in die darauf folgenden Over-/Under-Representation Analysen mit Hilfe der GeneTrail Software⁵⁰ eingesetzt. Als Referenzset diente hier das Affymetrix HG U-133 2.0 Plus Datenset. Als statistische Methode wurden die hypergeometrische Verteilung sowie eine FDR-Kontrolle nach Benjamini & Hochberg⁵¹ angewandt.

5 Ergebnisse

5.1 RNAi-vermittelter Knockdown von GAS41

Die RNA Interferenz ist eine der wichtigsten Techniken zur Untersuchung von Genfunktionen in Säugerzellen geworden. Durch den Einsatz von dsRNA Oligonukleotiden mit einer Länge von 21-23 Basen, die auch als *small interfering RNA* (siRNA) bezeichnet werden, kommt es bei Anlagerung des *antisense* Stranges an den RISC Komplex (*RNA-induced silencing complex*) zu dessen Aktivierung. Dies führt zum endonukleolytischen Abbau der mRNA des Zielgens, wodurch es zum Verlust der Proteinexpression kommt.⁵²⁻⁵⁴

Um die Rolle von GAS41 in der Zellteilung zu untersuchen, wurde zunächst ein RNAi-vermittelter Knockdown in verschiedenen Zelllinien etabliert. Zum einen wurde die Zervixkarzinomzelllinie HeLa eingesetzt, die eine normale Expression von GAS41 aufweist. Zum anderen wurde die Glioblastomzelllinie TX3868 eingesetzt, die eine starke Amplifikation und Überexpression von GAS41 aufweist.^{34,55}

Der 1,4 kb große offene Leserahmen von GAS41 besteht aus sieben Exons. Zur Etablierung des Knockdowns wurden drei verschiedene siRNAs, sowohl einzeln als auch in verschiedenen Kombinationen, eingesetzt. Die erste siRNA ist gegen eine Zielsequenz in Exon 2 gerichtet. Die Zielsequenz der zweiten siRNA überspannt den Übergang von Exon 2 zu Exon 3. Die dritte siRNA richtet sich gegen eine Zielsequenz in Exon 6 (Abb. 5A). Zur Auswahl der am besten geeigneten siRNA wurden HeLa Zellen mit den siRNAs, einzeln und in Kombination, transfiziert. Nach 24 h erfolgten die Ernte der transfizierten Zellen und die Isolation der Gesamt-RNA.

Der Knockdown von GAS41 wurde mittels Northern Blot überprüft. Hierzu wurde die Gesamt-RNA in einem Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine positiv geladene

Nylonmembran transferiert. Zur Detektion wurde eine radioaktiv markierte Sonde eingesetzt.

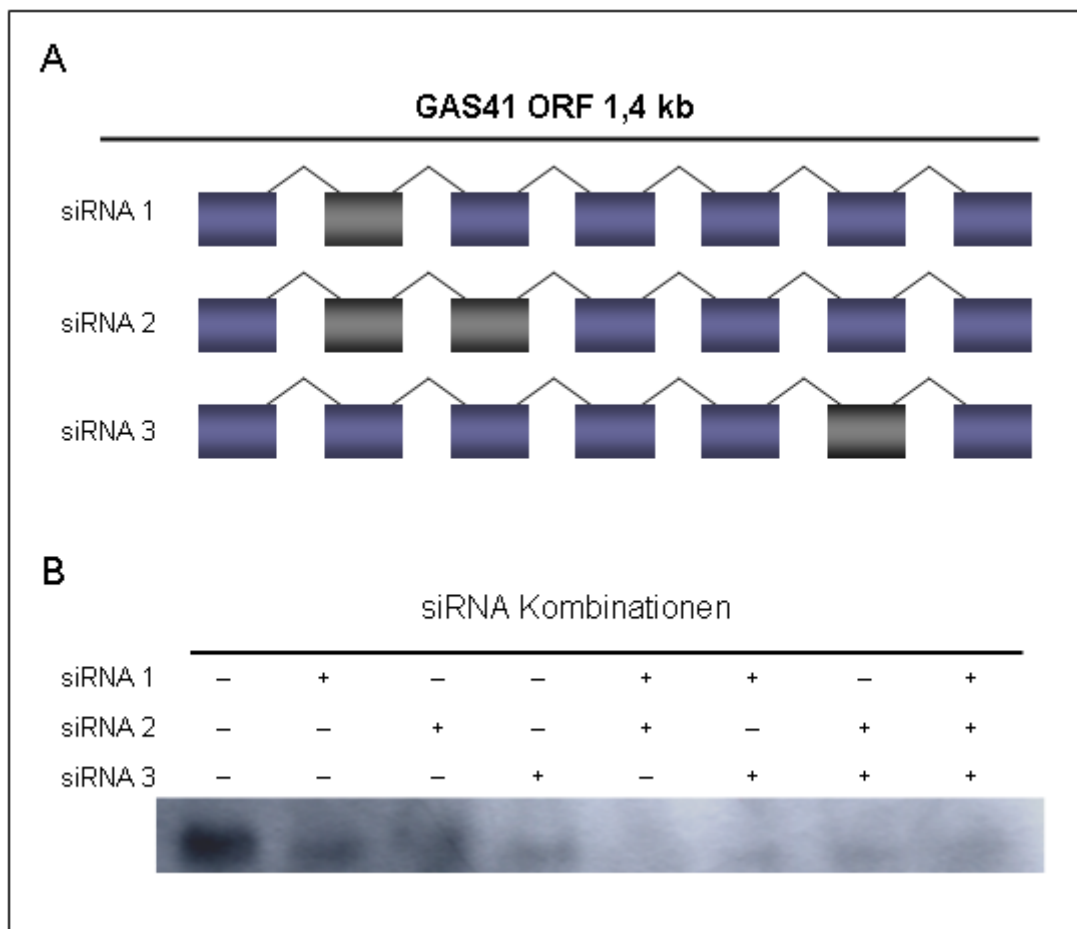


Abbildung 5: Auswahl der effektivsten siRNA Kombination zum Knockdown von GAS41.

(A) Lage der Zielsequenzen der siRNAs 1-3 im 1,4 kb langen ORF. Die Exons mit Zielsequenz sind in schwarz dargestellt. (B) Northern Blot Analyse des GAS41 Knockdowns in HeLa Zellen. Der Vergleich der verschiedenen siRNAs einzeln oder in Kombination ergab den stärksten Knockdown von GAS41 bei der Kombination von siRNA 1 und 2.

Beim Vergleich der Expressionsstärke zeigte sich, dass alle verwendeten siRNAs, einzeln und in Kombination, für den Knockdown von GAS41 geeignet sind. Die Kombination der siRNAs 1 und 2 bewirkt dabei den stärksten Knockdown (Abb. 5B). Für die nachfolgenden Experimente wurde eine äquimolare Kombination beider siRNAs für den Knockdown eingesetzt.

Um die Inkubationszeit zu ermitteln nach der die GAS41-Expression am niedrigsten ist, wurden über einen Zeitraum von 36 h Stunden regelmäßig Proben genommen und im Northern Blot untersucht. Diese Analyse ergab, dass in TX3868 Zellen die Expression 18 h nach Transfektion am niedrigsten ist. Bei HeLa Zellen ist die Expression von GAS41 bereits nach 12 h nahezu vollständig reprimiert. Der Knockdown bleibt in HeLa Zellen länger als 36 h stabil. In TX3868 Zellen zeigt sich dagegen nach 36 h wieder eine leichte Zunahme der Expression. Die Expression der Haushaltsgene ACTB und GAPDH bleibt vom GAS41 Knockdown unbeeinflusst (Abb. 6). Vergleicht man die Expressionsstärke von GAS41 in beiden Zelllinien, so ist die Überexpression von GAS41 in der Glioblastomzelllinie deutlich zu erkennen (Abb. 6).

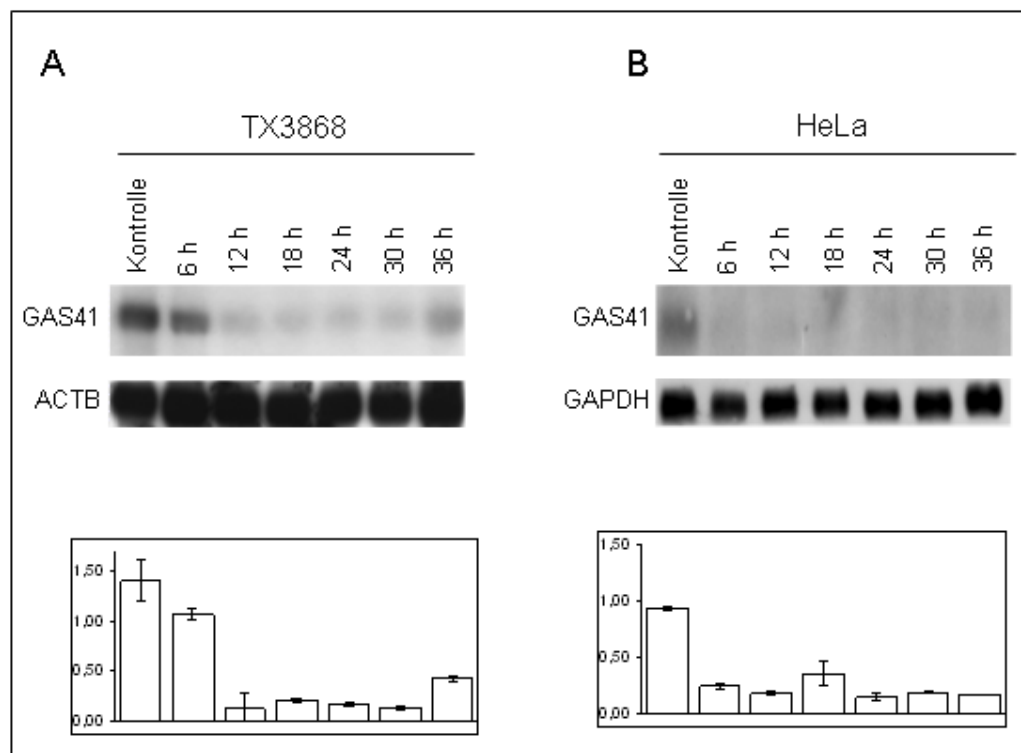


Abbildung 6: Northern Blot Analyse des GAS41 Knockdowns. (A) Der GAS41 Knockdown in TX3868 Zellen führt nach 18 h zum niedrigsten Expressionslevel. Nach 36 h kommt es bereits zu einem Anstieg der GAS41-mRNA. Die Expression von β -Aktin bleibt durch den Knockdown von GAS41 unverändert. (B) Der Knockdown von GAS41 in HeLa Zellen führt nach 12 h zum niedrigsten Expressionslevel. Der Knockdown bleibt in HeLa Zellen länger als 36 h erhalten. Die Expression von GAPDH bleibt durch den Knockdown von GAS41 unverändert. (C) Quantitative Auswertung der GAS41 Expression in TX3868 normalisiert gegen die β -Aktin Expression. (D) Quantitative Auswertung der GAS41 Expression in HeLa normalisiert gegen die GAPDH Expression.

Da der RNAi-vermittelte Knockdown von Genen auf RNA- und Proteinebene oftmals zeitversetzt abläuft, wurde die Expression von GAS41 auch im Western Blot untersucht. Hierbei zeigt sich, dass GAS41 in TX3868 Zellen erst nach 24 h die niedrigste Proteinexpression aufweist. In HeLa Zellen ist die Proteinexpression von GAS41 bereits nach 18 h auf ein Minimum reduziert. In beiden Zelllinien ist auch nach 36 h der Knockdown auf Proteinebene noch stabil. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden für die folgenden Experimente Inkubationszeiten von 24 h zugrunde gelegt (Abb. 7).

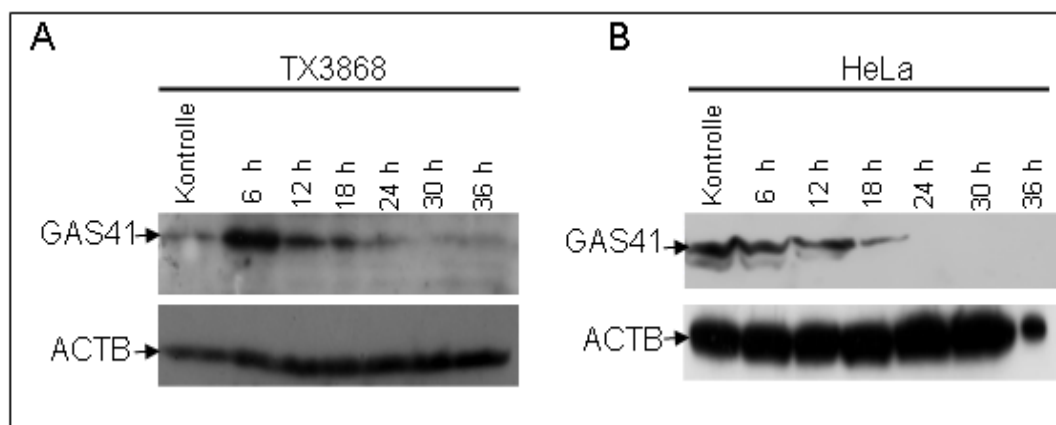


Abbildung 7: Western Blot Analyse des GAS41 Knockdowns. (A) Der Knockdown von GAS41 in TX3868 Zellen führt nach 24 h zur niedrigsten Proteinexpression. Auf Proteinebene ist der Knockdown auch nach 36 h noch stabil. Die Proteinexpression von β -Aktin bleibt durch den Knockdown von GAS41 unverändert. (B) Der Knockdown von GAS41 in HeLa Zellen führt bereits nach 18 h zur niedrigsten Proteinexpression von GAS41. Der Knockdown bleibt in HeLa Zellen länger als 36 h erhalten. Die Expression von β -Aktin bleibt durch den Knockdown von GAS41 auch in HeLa Zellen unverändert.

Um die Spezifität des Knockdowns durch den Einsatz der beiden GAS41 siRNAs zu bestätigen, wurde die Expression von GAS41 nach der Transfektion mit einer anderen siRNA analysiert. Hierfür wurde das Haushaltsgen ACTB gewählt. β -Aktin wird ubiquitär und unabhängig vom Zellzyklus exprimiert. Die Expression von GAS41 sollte sich bei der Transfektion von ACTB siRNA nicht verändern. Um dies zu überprüfen wurden TX3868 Zellen 48 h nach der Transfektion mit ACTB siRNA sedimentiert. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde die Expressionsstärke im Northern Blot über-

prüft. Hierzu wurde eine α - ^{32}P -dCTP markierte ACTB-Sonde eingesetzt. Abbildung 8 zeigt den RNAi vermittelten Knockdown von β -Aktin. Die Expression des Haushaltsgens GAPDH bleibt dabei unbeeinflusst. Die Northern Blot Analyse der GAS41 Expression ergibt ebenfalls keine Veränderung der Expression durch die Depletierung von β -Aktin mRNA. Somit kann der Knockdown von GAS41 durch die eingesetzten siRNAs als spezifisch angesehen werden.

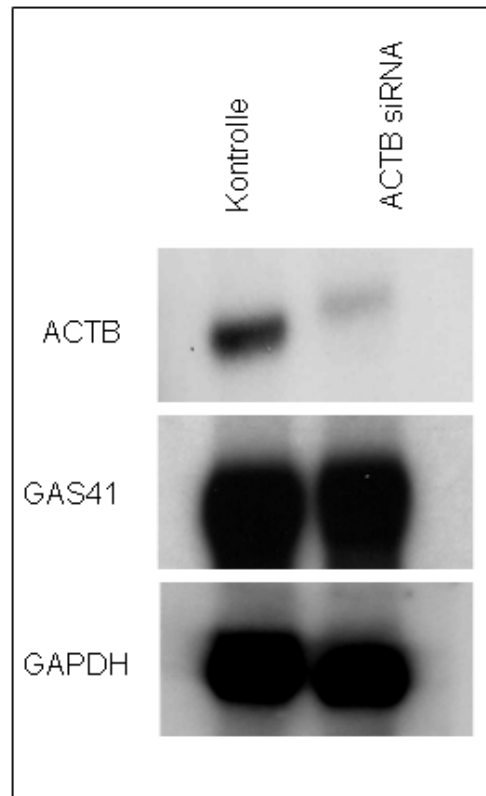


Abbildung 8: Northern Blot Analyse des β -Aktin Knockdowns. Der Knockdown des Haushaltsgens ACTB führt nach 48 h zu einer deutlich verminderten Expression von β -Aktin. Dagegen bleiben die Expressionen von GAS41 und GAPDH unbeeinflusst.

5.2 Genexpressionsanalyse an GAS41 depletierten TX3868 Zellen

In verschiedenen Proteininteraktionsstudien wurde die Wechselwirkung von GAS41 mit Proteinen gezeigt, die am Aufbau bzw. an der Regulation des Spindelapparates beteiligt sind.^{31-33,43} Aufgrund dieser Proteininteraktionen kann man eine Funktion von GAS41 im Verlauf der Zellteilung vermuten.

Mit Hilfe des etablierten siRNA Knockdowns sollte nun in Genexpressionsanalysen nachgewiesen werden, dass der Knockdown von GAS41 einen signifikanten Einfluss auf die Zellteilung hat.

Hierzu wurden TX3868 Zellen mit einer Kombination aus den beiden GAS41 siRNAs (siRNA 1 und siRNA 2) bzw. mit einer Negativkontroll-siRNA transfiziert. Aus jeweils $\sim 2,5 \times 10^6$ Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert. Zur Durchführung von biologischen Replikaten wurde die RNA aus drei unabhängigen Experimenten für die nachfolgenden Microarrays eingesetzt.

Für die Expressionsstudien wurden HG U-133 Plus 2.0 Microarrays der Firma Affymetrix verwendet. Diese *Whole Genome Chips* ermöglicht eine Expressionsanalyse von mehr als 47.000 Transkripten und Transkriptvarianten. Bei der verwendeten Plattform sind Oligonukleotidsequenzen einer definierten Länge (25-mer) auf eine Trägermatrix aufgebracht. Neben den Oligonukleotidsequenzen zur Expressionsanalyse sind auf den Chip auch Hybridisierungskontrollen, poly-A Kontrollen sowie 100 Normalisierungskontrollen aufgebracht. Zur Normalisierung der Daten umfasst dieser Chip zusätzlich ein Set an konstitutiv exprimierten Haushaltsgenen, wie GAPDH oder β -Aktin.

Die zu analysierende Gesamt-RNA wird zunächst in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Dazu wird die RNA in der Erststrangsynthese mit einem T7 Oligo (dT) Promotor-Primer revers transkribiert. Nach der Zweitstrangsynthese wird die doppelsträngige cDNA aufgereinigt und dient dann als Template in der nachfolgenden *in vitro* Transkription (IVT).

Die IVT wird in Anwesenheit einer T7 Promoter RNA Polymerase und biotinylierter Nukleotidanaloga durchgeführt. Die komplementäre biotinylierte cRNA wird aufgereinigt, fragmentiert, in einen Hybridisierungscocktail überführt und mit dem Mic-

roarray inkubiert. Der zugefügte Hybridisierungscocktail enthält alle benötigten Hybridisierungskontrollen.

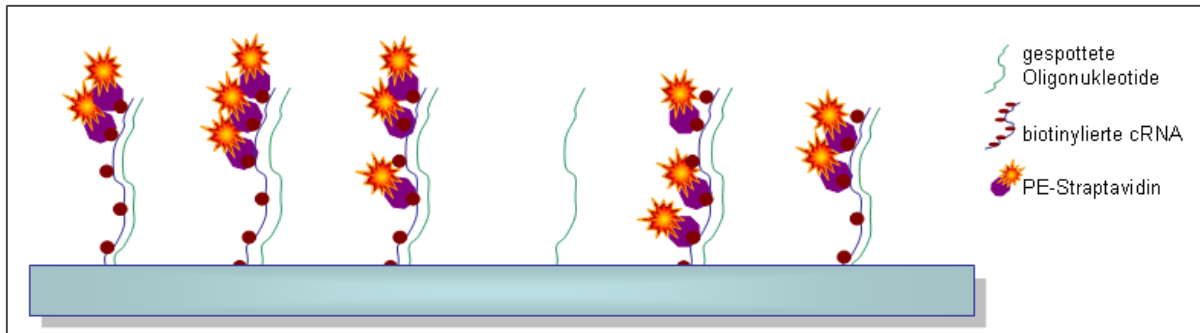


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweise von Affymetrix HG U-133 Plus 2.0 Microarrays.

Nach der Hybridisierung wird der Microarray in einem vollautomatisierten System gewaschen, um ungebundene cRNA zu entfernen. Anschließend wird der Chip mit Phycoerythrin-konjugiertem Streptavidin, das an die biotinylierte cRNA bindet, inkubiert und mit einem Fluoreszenzscanner bei 570 nm detektiert (Abb. 9).

Vor Beginn der Datenanalyse wurden die Rohdaten der sechs Microarrays mit der Gene Expression Console Software zunächst auf die Qualität der gemessenen Signale hin überprüft. Dabei wurden Spots mit einem negativen *Quality Flag* (z.B. *near background*, *missing spot*) von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die bereinigten Rohdaten wurden mit Hilfe der Genespring GX Software statistisch ausgewertet. In einem ersten Schritt wurden zunächst die Replikate der GAS41 siRNA behandelten Proben und die Kontrollen gruppiert. Dieses Array-Clustering erfolgte nach der Spearman Korrelation. Die geclusterten Datensätze wurde anschließend einem t-Test unterzogen, nachdem alle Proben mit einem p-Wert $< 0,05$ aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Die verbleibenden 45.792 Sequenzen wurden anschließend nach ihrer Expressionsstärke gefiltert. Dabei wurden all jene Proben ausgeschlossen, die lediglich eine sehr schwache Expression aufwiesen. Nach diesen Prozessen zur Datenreduktion wurden die verbliebenen 22.899 Sequenzen nach ihrer *fold change* gefiltert. Sequenzen die sich zwischen *treatment* (GAS41 Knockdown) und Kontrolle um min-

destens den Faktor 1,7 unterschieden haben, wurde als Sequenzen mit signifikanter Änderung der Expressionsstärke angesehen. Insgesamt resultierten noch 667 Sequenzen aus diesem Filtervorgang. Parallel wurde der 22.899 Sequenzen umfassende Datensatz in einer ANOVA-Analyse einem einseitigen parametrischen t-Test (Welch t-Test) unterzogen. Aus dieser Analyse gingen 1905 Sequenzen mit statistisch signifikant veränderter Expression (p-Wert < 0,05) hervor. In einem dritten Filtervorgang wurde der Datensatz in einem Volcano Plot gleichzeitig nach *fold change* und p-Wert analysiert. Bei dieser zweidimensionalen Analyseverfahren werden die Daten nach der biologischen Bedeutung ihrer Veränderung (erste Dimension) und nach der statistischen Verlässlichkeit (zweite Dimension) aufgetragen. Als Ausschlusskriterien galten hierbei eine *fold change* < 1,7 und ein p-Wert > 0,05. Aus diesem Volcano Plot resultierten 376 statistisch signifikant veränderte Sequenzen (Abb. 10).

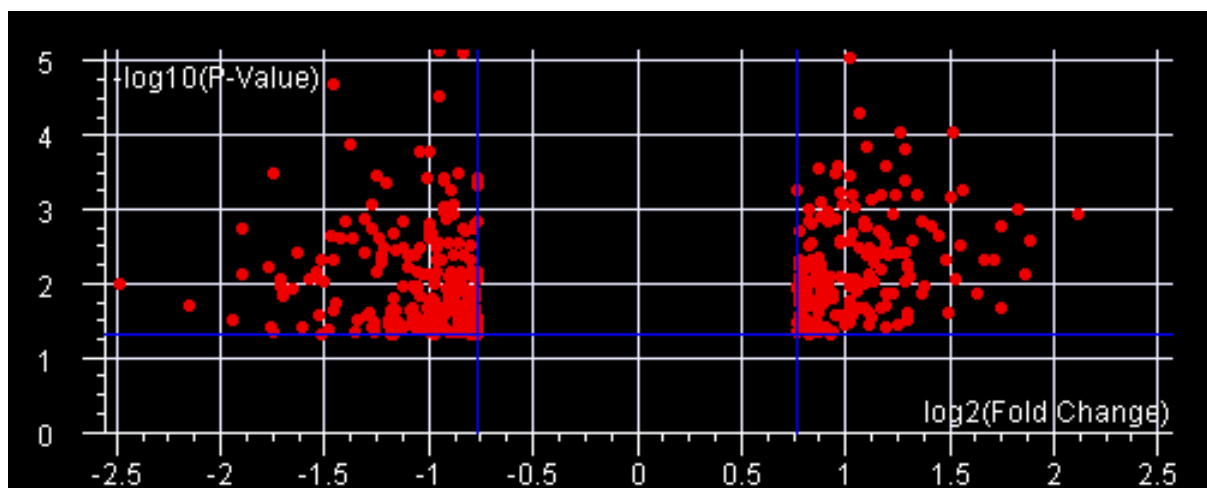


Abbildung 10: Volcano Plot zur Ermittlung aller differentiell exprimierten Sequenzen mit einer *fold change* $\geq 1,7$ und einem p-Wert < 0,05. Logarithmische Auftragung der *fold change* und p-Werte. Auf der x-Achse ist die *fold change* als Logarithmus zur Basis 2 aufgetragen, auf der y-Achse der p-Wert als dekadischer Logarithmus.

Die drei parallel durchgeführten Analysemethoden wurden in einem Venn-Diagramm zusammengeführt um die gemeinsame Schnittmenge statistisch und biologisch signifikant veränderter Sequenzen zu ermitteln (Abb. 11).

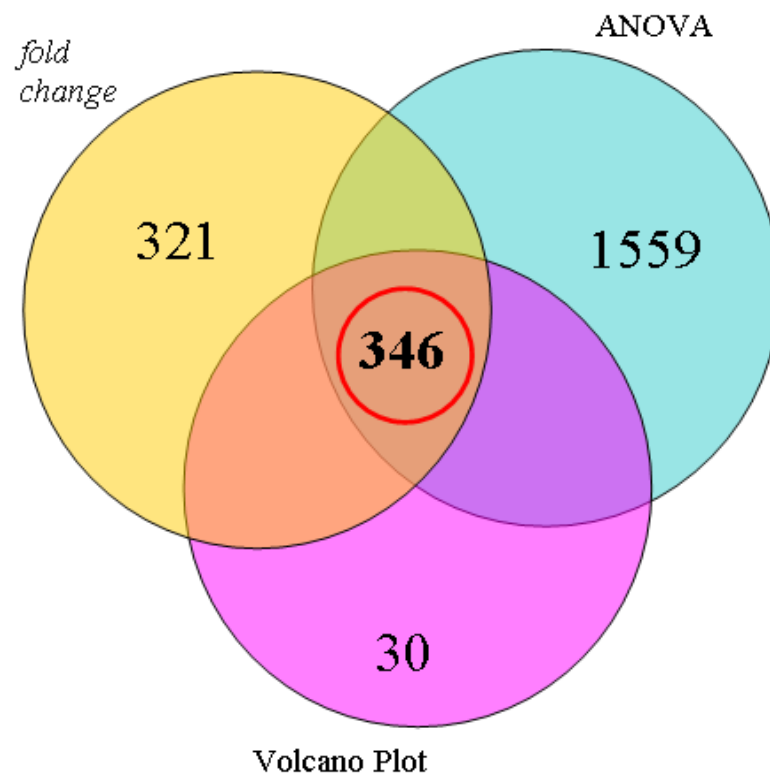


Abbildung 11: Venn-Diagramm zur Ermittlung der Anzahl der Transkripte mit signifikant veränderter Expression beim Vergleich von GAS41 depletierten Zellen und Negativkontrollen. Ermittlung der Schnittmenge der drei angewandten Analysemethoden.

Aus dieser Analyse resultierten 346 signifikant veränderte Transkripte, die zu weiteren Analysen verwendet wurden. Diese 346 Transkripte gliedern sich in 153 hochregulierte und 193 reprimierte Sequenzen. Unter den hochregulierten Transkripten können 143 Sequenzen in Datenbanken niedergelegten bekannten Genen zugeordnet werden. Unter diesen bekannten Genen befinden sich 107 verschiedene Gene. Unter den reprimierten Transkripten können 161 Sequenzen niedergelegten bekannten Genen zugeordnet werden. Darunter befinden sich 131 verschiedene Gene (Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl der durch GAS41 Knockdown differentiell exprimierten Gene

	gesamt	hochreguliert	reprimiert
N° differentiell exprimierter Transkripte	346	153	193
N° bekannter Gene	304	143	161
N° verschiedener bekannter Gene	238	107	131

fold change $\geq 1,7$ und $p < 0,05$

5.2.1 Reprimierte Gene in GAS41 depletierten TX3868 Zellen

Bei der Auswertung der Microarraydaten ergaben sich 131 verschiedene GenBank annotierte Gene, deren Expression in den biologischen Replikaten statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$) um mindestens das 1,7-fache reduziert ist (Tabelle 4). Etwa 40 % der reprimierten Gene sind dabei um mindestens das Doppelte in ihrer Expression vermindert. Das am stärksten reprimierte Gen mit einer *fold change* von 5,62 war PI4K2B (*phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta*). Das am zweitstärksten reprimierte Gen war das siRNA depletierte GAS41 mit einer *fold change* von 4,46. Anhand der mittleren Spotintensitäten in den drei Replikaten ergibt sich ein Knockdown von GAS41 um 78 %. Die niedrigste Repression mit einer *fold change* von 1,70 zeigte das *Ras-associated protein Rap1* (RBJ). Eine Aufstellung der 161 signifikant reprimierten Transkripte befindet sich in Tabelle 5 im Anhang.

5.2.2 Aktivierte Gene in GAS41 depletierten TX3868 Zellen

Bei der Analyse der Microarraydaten ergaben sich 107 verschiedene GenBank annotierte Gene, deren Expression in den biologischen Replikaten statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$) um mindestens das 1,7-fache gesteigert ist (Tabelle 4). Mehr als 50 % der aktivierten Gene weisen dabei eine mindestens doppelt so hohe Expression in den GAS41 depletierten Zellen auf. Das am stärksten aktivierte Gen mit einer *fold change* von 4,33 war HIPK3 (*Homeodomain interacting protein kinase 3*). Das am wenigsten

stark aktivierte Gen war das *formin binding protein 1* (FNBP1) mit einer *fold change* von 1,70. Eine Aufstellung der 143 signifikant aktivierten Transkripte befindet sich in Tabelle 6 im Anhang.

5.2.3 GeneTrail Analyse

GeneTrail ist ein internet-basiertes Programm zur Untersuchung von Datensätzen auf statistisch signifikante Häufungen von Genen, die zur gleichen biologischen Kategorie, wie Signalweg, Lokalisation oder biologische Funktion, gehören.⁵⁰ Als Analysemethode wurde die Over-/Under-Representation Methode gewählt. Als Referenzset diente das Affymetrix HG U-133 2.0 Plus Datenset, welches alle Spots des Chips erfasst die einer NCBI GeneID zugeordnet werden können. Als statistische Methode wurden die hypergeometrische Verteilung sowie eine FDR-Kontrolle nach Benjamini & Hochberg⁵¹ angewandt.

Mit Hilfe von GeneTrail wurden die differentiell exprimierten Gene auf gemeinsame strukturelle Elemente untersucht. Innerhalb dieser 346 Gene, deren Expression durch den GAS41 Knockdown reprimiert oder aktiviert wurde, findet man eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an Proteinen die eine *coil* Domäne tragen (p-Wert 0,0138). Darunter befinden sich z.B. das Centromerprotein CENPE, die Tyrosinkinase WEE1, oder TACC2 (*transforming acidic coiled-coil containing protein 2*).

Bei der Analyse der *Gene Ontology* (GO) Kategorien ergaben sich Häufungen von Genen, die an verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. In der Kategorie *establishment of cellular localization* würde man theoretisch neun bis zehn Gene erwarten. Unter den 346 Genen, die durch den GAS41 Knockdown in ihrer Expression verändert wurden, findet man jedoch 25 Gene die an diesem Prozess beteiligt sind. Dabei handelt es sich um eine statistisch signifikante Anhäufung (p-Wert 0,0014). In diesem Set enthalten sind z. B. CDC23 und CENPE. Ähnlich Häufungen differentiell exprimierter Gene betreffen auch die GO Kategorien *positive regulation of transcription* (p-Wert 0,0050), *positive regulation of transcription/ DNA-dependent* (p-Wert

0,0209), *mitotic metaphase plate congression* (p-Wert 0,0133), *chromosome localization* (p-Wert 0,0356) und *regulation of mitotic metaphase-anaphase transition* (p-Wert 0,0468). Die Ergebnisse der GO-Kategorie Analysen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Gene Ontology Analyse

GO-Kategorie	N° erwartet	N° erhalten	p- Wert	N° reprimierter Gene	N° aktivierter Gene
establishment of cellular localization	9,5	25	0,0014	15 (RAB11A, STX16, VTI1B, ATG4B, HTA-TIP2, ARFGEF1, ARFIP1, CDC23, PLDN, TXNDC1, CENPE, G3BP2, LMAN1, ARSB, VAPA)	10 (SAR1B, YWHAH, RAB14, IPO11, SCAMP1, BCAP29, SEC63, BCL2L1, GOPC, RAB27A)
regulation of transcription	3,18	12	0,0050	5 (FHL2, YEATS4, TXNDC1, CBF, YAF2)	7 (PPARGC1A, FOXO3, ILF3, SMAD2, PIAS2, YWHAH, GLIS2)
positive regulation of transcription, DNA-dependent	2,5	9	0,0209	4 (FHL2, YEATS4, TXNDC1, CBF)	5 (PPARGC1A, FOXO3, ILF3, SMAD2, PIAS2)
mitotic metaphase plate congression	0,037	2	0,0133	2 (CENPE, CDC23)	0
chromosome localization	0,075	2	0,0356	2 (CENPE, CDC23)	0
regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	0,099	2	0,0468	1 (CDC23)	1 (ANAPC10)

Die Auswertung der Microarray Daten mittels GeneTrail belegt zum einen die Funktion von GAS41 in der Regulation der Transkription. Zum anderen konnte die Genexpressionsanalyse die vermutete Rolle von GAS41 in der Zellteilung bestätigen.

Die Rolle von GAS41 als Transkriptionsfaktor wurde in den letzten Jahren bereits näher beschrieben. Zum einen konnte GAS41 als Co-Aktivatoren für den Transkriptionsfaktor AP-2 β identifiziert werden,³⁸ zum anderen wurde GAS41 als Repressor des p53 Signalweges beschrieben.^{39,56} Die Funktion von GAS41 in der Zellteilung ist dagegen noch ungeklärt.

5.3 Centrosomale Lokalisation von GAS41

Basierend auf den durchgeführten Genexpressionsanalysen und den bekannten Proteininteraktionen lässt sich auf eine Beteiligung von GAS41 an der Zellteilung schließen. GAS41 wurde als Interaktionspartner der centrosomalen Proteine NuMA und KIAA1009 nachgewiesen,^{31,33} welche entscheidend am Aufbau und der Stabilisierung der Spindelpole beteiligt sind.^{19,28} Darüber hinaus konnte GAS41 als Interaktionspartner der Centrosomen- und Spindelproteine TACC1 und TACC2 nachgewiesen werden.^{32,43}

Der Einfluss von GAS41 auf die Zellteilung sowie die bekannten Interaktionen mit centrosomalen Proteinen lassen vermuten, dass es sich auch bei GAS41 um ein centrosomales Protein handeln könnte. In Interphasezellen war GAS41 bei Immunfluoreszenzanalysen mit polyklonalen Antikörpern bisher lediglich als Kernprotein beschrieben worden. Um die Lokalisation von GAS41 an den Centrosomen untersuchen zu können, wurde ein GFP-Fusionsprotein in MCF-7 Zellen exprimiert.

Die Lokalisation von GFP-GAS41 entspricht der bereits beschriebenen Kernlokalisation unter Aussparung der Nukleoli.³³ Darüber hinaus sind in den Interphasezellen zwei deutlich gefärbte, abgegrenzte Bereiche zu erkennen (Abb. 12). Immunfluoreszenzanalysen mit einem Pericentrin Antikörper, der die pericentriolare Matrix anfärbt, zeigt, dass es sich bei diesen Bereichen um die Centrosomen handelt. GAS41 konnte somit als centrosomales Protein identifiziert werden.

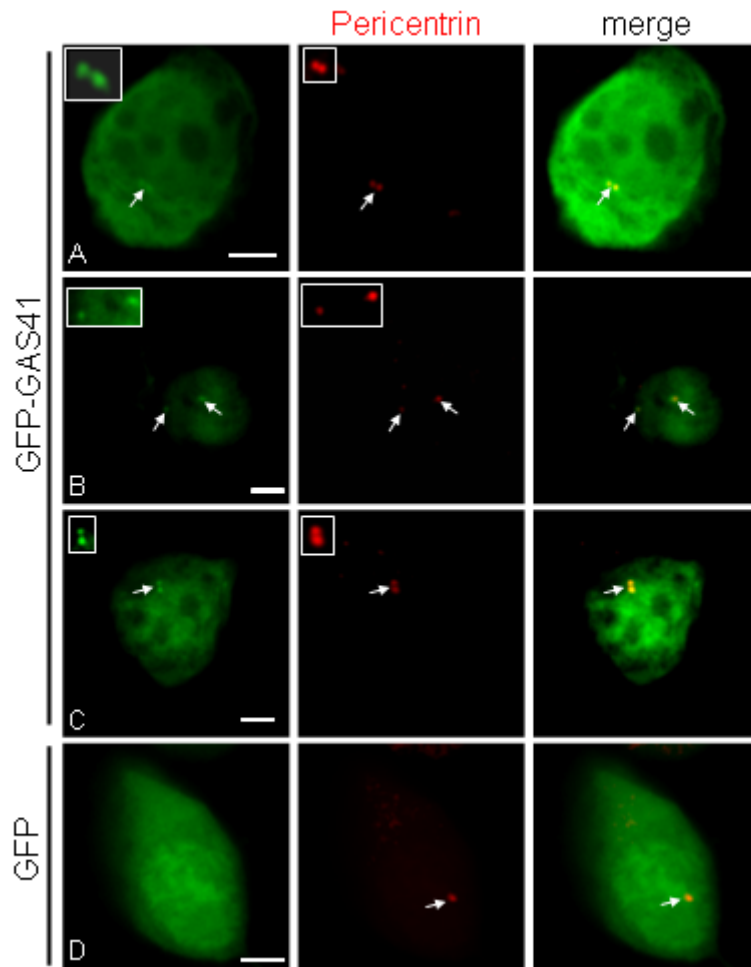


Abbildung 12: Immunfluoreszenzanalyse an MCF-7 Interphasezellen. MCF-7 Zellen wurden mit GFP bzw. GFP-GAS41 transfiziert und fixiert. GFP-GAS41 ist im Nucleolus unter Ausschluss der Nucleoli und an den Centrosomen (Pfeil) lokalisiert und mit Pericentrin co-lokalisiert. Vergrößerung mit Olympus 100x Öl-Immersionsobjektiv; Messbalken entspricht 2 μ m.

Immunfluoreszenzanalysen an GFP-GAS41 exprimierenden MCF-7 Zellen ergaben weiterhin, dass GAS41 nicht nur während der Interphase eine centrosomale Lokalisation aufweist, sondern darüber hinaus auch während der Mitose an den Spindelpolen lokalisiert ist. Dabei ist GAS41 auch in allen Stadien der M-Phase an den Spindelpolen bzw. den Centrosomen nachweisbar (Abb. 13).

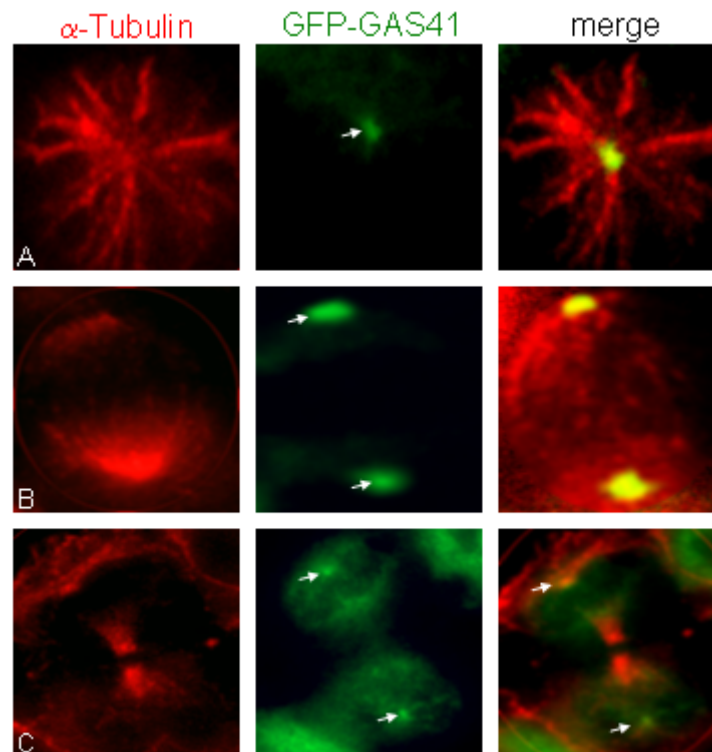


Abbildung 13: Centrosomale Lokalisation von GFP-GAS41 in mitotischen Zellen. MCF-7 Zellen wurden mit GFP-GAS41 transfiziert und mit einem α -Tubulin Antikörper gefärbt. (A) Prometaphase, (B) Metaphase, (C) Cytokinese. GFP-GAS41 ist an den Centrosomen (Pfeil) lokalisiert.

5.4 Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Zellviabilität

Um den Einfluss des Knockdowns auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden verschiedene colorimetrische Nachweismethoden eingesetzt. Bei der Trypanblaufärbung wird der saure Farbstoff Trypanblau zu den Zellen gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Der Farbstoff dringt durch die Zellmembran toter Zellen in das Cytoplasma ein und färbt diese Zellen an. Lebende Zellen bleiben dagegen ungefärbt. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Anteile gefärbter und ungefärbter Zellen ermittelt, woraus sich dann die Zellviabilität bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen berechnen ließ.

Bei HeLa Zellen ließ sich durch den Vorgang der Transfektion ein leichtes Absinken der Zellviabilität auf $\sim 80\%$ feststellen. Die Zellviabilität unterscheidet sich jedoch nicht signifikant zwischen den GAS41 depletierten Zellen und der Kontrolle.

Bei TX3868 Zellen dagegen blieben die Transfektion selbst sowie der GAS41 Knockdown ohne Auswirkung auf die Zellviabilität (Abb.14).

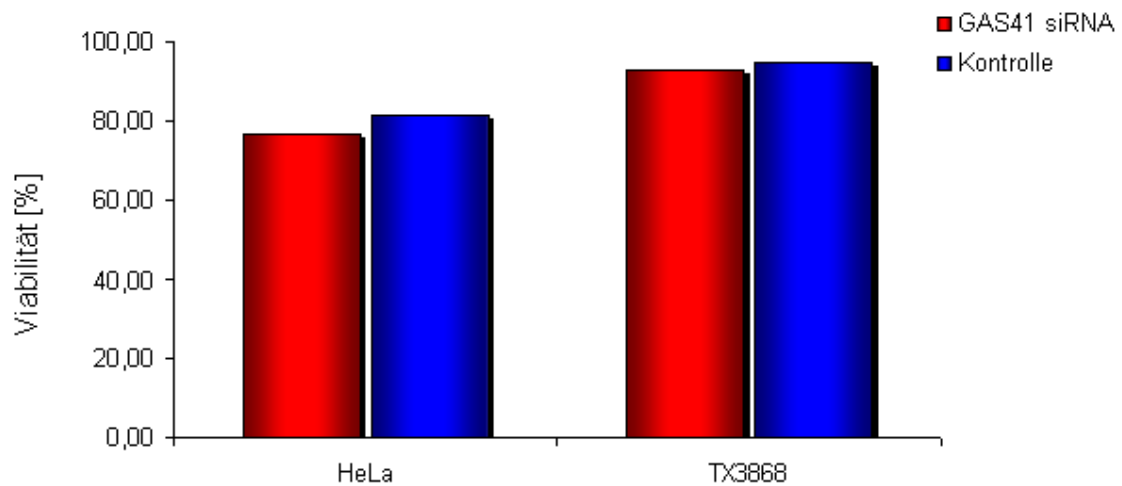


Abbildung 14: Trypanblaufärbung zur Bestimmung des Einflusses des GAS41 Knockdowns auf die Zellviabilität. HeLa und TX3868 Zellen wurden 24 h nach der Transfektion geerntet und einer Trypanblaufärbung unterzogen. Bei HeLa Zellen zeigt sich eine leicht verminderte Zellviabilität durch die Transfektion. Bei TX3868 Zellen kann kein Effekt auf die Zellviabilität festgestellt werden. Bei beiden Zelllinien kann durch den Knockdown von GAS41 keine Abnahme der Viabilität ermittelt werden.

Da es sich bei der Trypanblaufärbung um eine eher subjektive Methode handelt, bei der die angefärbten Zellen visuell bestimmt werden, kann diese Methode zunächst nur dazu dienen einen ersten Eindruck der Zellviabilität zu erhalten. Um ein objektiveres Ergebnis zu erhalten, bedient man sich anderer colorimetrischer Methoden, die mit Hilfe eines photometrisch messbaren Farbumschlags die Bestimmung der Zellviabilität ermöglichen. Der WST-1-Assay beruht auf der enzymatischen Spaltung eines wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes durch mitochondriale Dehydrogenasen. Die Entstehung des roten Formazan-Farbstoffes korreliert dabei mit der Menge funktionsfähiger Mitochondrien und dadurch mit der Anzahl lebensfähiger Zellen. Zur Durchführung dieses Viabilitätstests wurden die Zellen 24 h nach Transfektion für 0,5 – 2,5 h bei 37°C mit

dem Reagenz inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Multiwell-Spektralphotometer. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Als Referenz wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 690 nm gemessen. Als Nullwert wurde die Absorption des Kulturmediums festgelegt. Die Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte der erhaltenen Messwerte wurden gegen die Inkubationszeit grafisch aufgetragen.

Bei der Bestimmung der Zellviabilität asynchroner HeLa Zellen (Abb. 15A) ergab sich eine Absorptionskurve, die 90 min nach Zugabe des WST-1 Reagenzes in die Sättigungsphase überging. Die Absorptionskurven der GAS41 depletierten Zellen sowie der Kontrolle verlaufen nahezu deckungsgleich. Wie durch die Trypanblaufärbung bereits vermutet, lässt sich auch mit dem WST-1 Assay kein Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Zellviabilität feststellen.

Auch bei synchronisierten HeLa Zellen sollte der Einfluss des Knockdown auf die Zellviabilität untersucht werden, um festzustellen ob diese während einer bestimmten Zellzyklusphase beeinträchtigt wird. Hierzu wurden HeLa Zellen mit Hilfe eines Doppel-Thymidinblocks synchronisiert und mit siRNA transfiziert. Die Zugabe des WST-1 Reagenz erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassung der Zelle in ihr Standardkulturmedium. Nach 90 min Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung wie oben beschrieben an einem Multiwell-Spektralphotometer.

Zum ersten gemessenen Zeitpunkt befinden sich die Zellen am G₁/S Checkpoint und gehen dann über die G₂-Phase (t= 6 h) und die M-Phase (t= 9h) wieder in die G₁-Phase über. Auch in den synchronisierten HeLa Zellen lassen sich keine Unterschiede in der Zellviabilität von GAS41 depletierten Zellen und der Kontrolle feststellen (Abb. 15B).

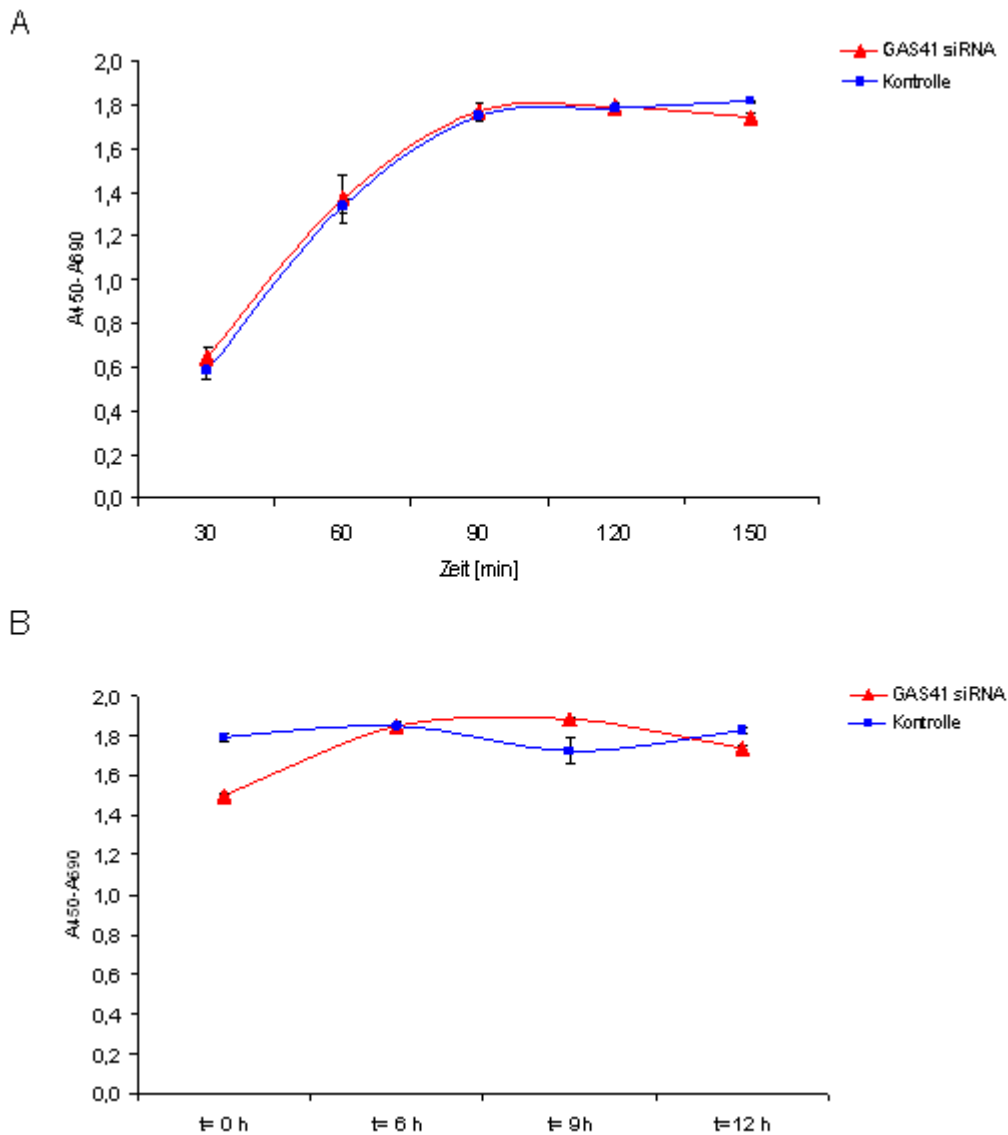


Abbildung 15: WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellviabilität GAS41 depletierter HeLa Zellen. (A) HeLa Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit WST-1 Reagenz versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Änderung der Absorption $A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$ wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Kurve geht nach 90 min in die Sättigungsphase über. Beide Kurven verlaufen nahezu deckungsgleich, d.h. der GAS41 Knockdown hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität. (B) Synchronisierte HeLa Zellen wurden mit siRNA transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Entlassung ins Standardmedium mit WST-1 Reagenz versetzt. Die Messung erfolgte nach 90 min Inkubation. Auch bei synchronisierten HeLa Zellen ist kein deutlicher Einfluss auf die Zellviabilität messbar.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Zellviabilität auch in TX3868 mit Hilfe eines WST-1 Assays bestimmt. Hierzu wurden TX3868 Zellen 24 h nach Transfektion mit WST-1 Reagenz versetzt. Bei der photometrischen Messung der Absorptionsänderung ergab sich auch bei TX3868 Zellen eine Kurve, die ca. 90 min nach Zugabe des WST-1 Reagenzes in die Sättigungsphase überging (Abb. 16). Die Absorptionskurven der GAS41 depletierten Zellen sowie der Kontrolle verlaufen auch hier nahezu gleich. Auch hier führt der Knockdown von GAS41 nicht zu einem Absinken der Zellviabilität.

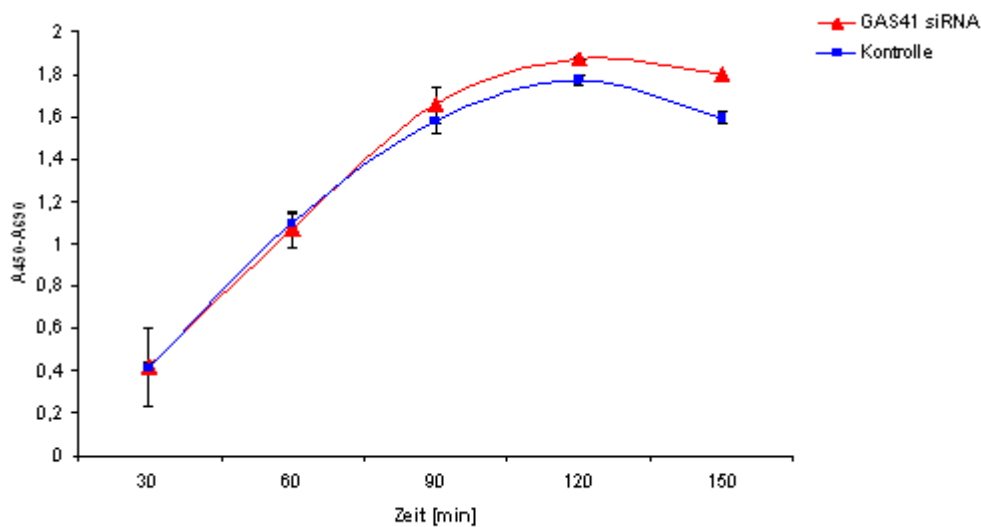


Abbildung 16: WST-1 Assay zur Messung der Zellviabilität GAS41 depletierter TX3868 Zellen. TX3868 Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit WST-1 Reagenz versetzt und bei 37°C inkubiert. Die Änderung der Absorption $A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$ wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Kurve geht nach ca. 90 min in die Sättigungsphase über. Beide Kurven verlaufen nahezu gleich zueinander, d.h. der GAS41 Knockdown hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

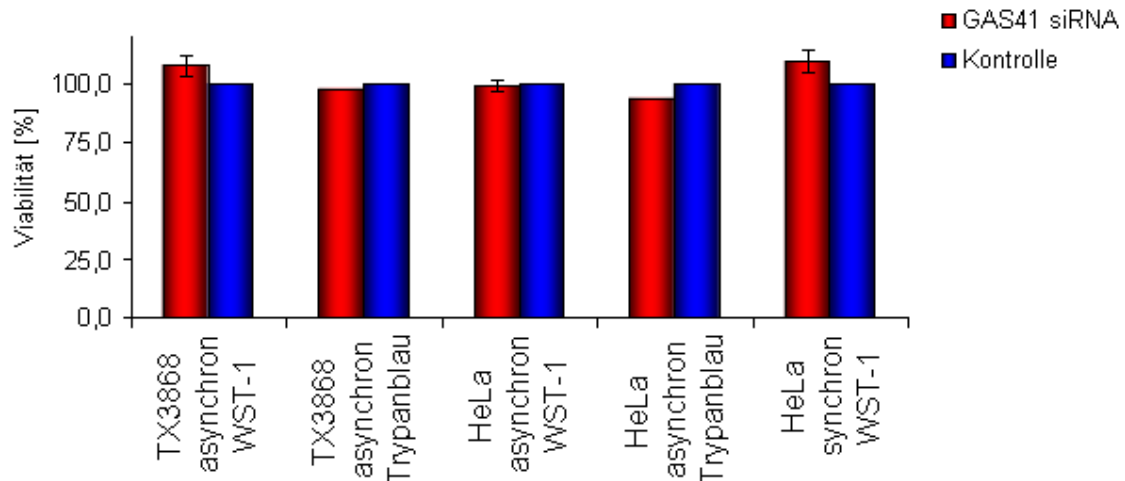


Abbildung 17: Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Zellviabilität. Zum Vergleich der beiden Messmethoden wurde die Viabilität der Zellen auf die jeweiligen Kontrollen bezogen, deren Viabilität auf 100 % festgelegt wurde.

Um die Ergebnisse der Trypanblaufärbung mit den Ergebnissen des WST-1 Assays vergleichen zu können, muss man auch hier die Viabilität der GAS41 depletierten Zellen auf die der Kontrollzellen beziehen. Aus diesen Vergleichen ergibt sich, dass die ermittelte Zellviabilität für die jeweilige Zelllinie in beiden Methoden sehr ähnlich ist (Abb. 17). Darüber hinaus wird deutlich, dass der Knockdown von GAS41 unabhängig von der Zelllinie und der Synchronität der Zellkulturen ist und keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellviabilität hat.

5.5 Zellzyklusanalyse GAS41 depletierter Zellen

Der Knockdown eines centrosomalen Proteins kann den Aufbau einer funktionellen Mitosespindel beeinflussen. Als Folge dessen wäre es denkbar, dass die Zelle einen Zellzyklus-Checkpoint nicht passieren kann und in einen Zellzyklusarrest übergeht. Um den Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Zellzyklusprogression zu untersuchen, wurden die Zellen einer Propidiumiodidfärbung unterzogen. Der fluoreszierende Farbstoff Propidiumiodid interkaliert in Nukleinsäuren und kann so zur Bestimmung

des DNA-Gehalts einer Zelle genutzt werden. Da das entstehende Fluoreszenzsignal proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist, kann man in einer Zellpopulation leicht Zellen mit einfachem Chromosomensatz ($2n$) von Zellen mit doppeltem Chromosomensatz ($4n$) trennen. Zur Auswertung dieser Färbung wird ein Durchflusszytometer eingesetzt. Die resultierende Kurve lässt sich anhand der gemessenen Fluoreszenzintensität in die verschiedenen Zellpopulationen einteilen.

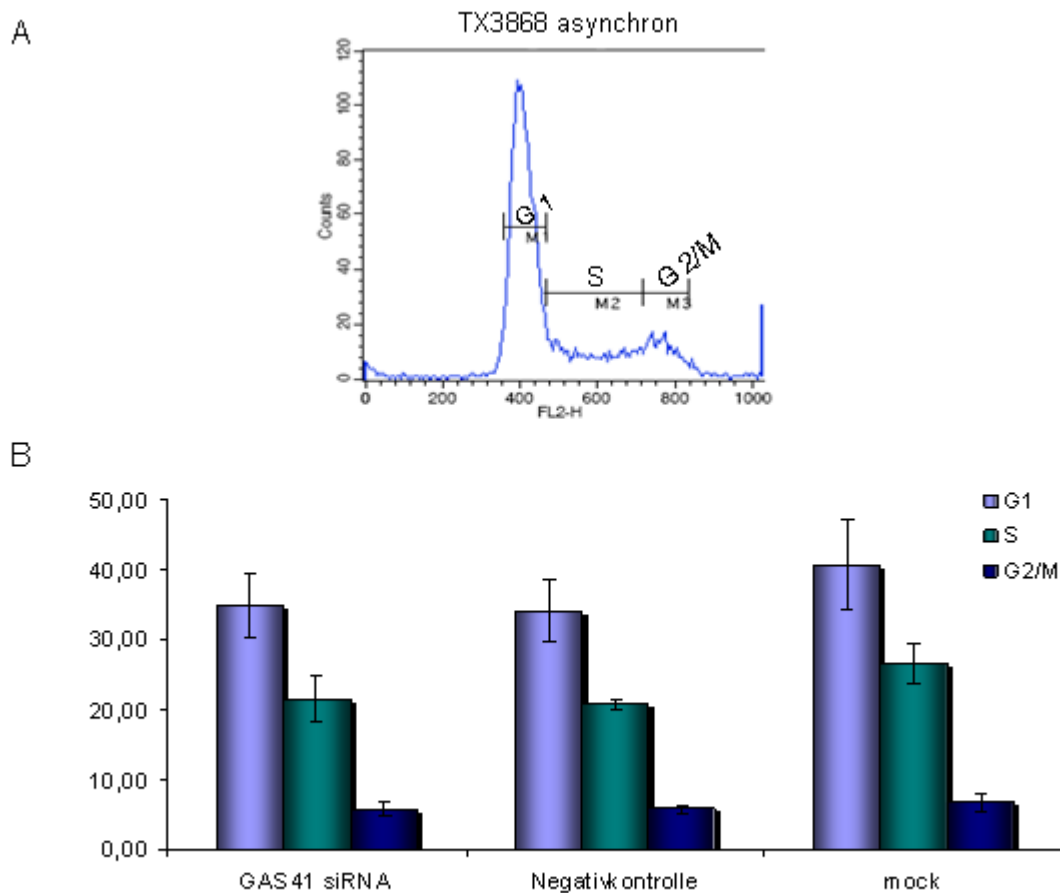


Abbildung 18: Zellzyklusanalysen von TX3868 Zellen mittels Propidiumiodidfärbung.

TX3868 Zellen wurden 24 h nach Transfektion einer Propidiumiodidfärbung unterzogen. (A) Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen un behandelter TX3868 Zellen. Messbereich M1 = G₁-Phase, Messbereich M2 = S-Phase, Messbereich M3 = G₂/M-Phase (B) Bei der Betrachtung der transfizierten TX3868 Zellen lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen zwischen GAS41 depletierten Zellen und den Kontrollen feststellen. Die Messung der transfizierten Zellen wurde an unabhängigen biologischen Triplikaten durchgeführt.

In Abbildung 18 (A) ist die Verteilung der Zellzyklusphasen unbehandelter TX3868 Zellen dargestellt. In dem gezeigten Graphen ist die Zellzahl in Abhängigkeit von der gemessenen Fluoreszenzintensität dargestellt. Das erste Maximum der Kurve repräsentiert die Zellen der G₁-Phase (Messbereich M1). Das zweite Maximum (Messbereich M3) weist eine etwa doppelt so hohe Fluoreszenzintensität auf und repräsentiert die Zellen der G₂/M-Phase, die einen doppelten Chromosomensatz aufweisen. Der dazwischen liegende Messbereich M2 repräsentiert die Zellen der S-Phase, deren Fluoreszenzintensität durch die semikonservative Verdopplung des Genoms stetig zunimmt.

Im Teil (B) der Abbildung 18 ist die Verteilung der Zellzyklusphasen transfizierter TX3868 Zellen grafisch dargestellt. Die Messung erfolgte an unabhängigen biologischen Triplikaten, die 24 h nach der Transfektion einer Propidiumiodidfärbung unterzogen wurden. Zwischen den GAS41 depletierten Zellen und den Kontrollen lassen sich keine signifikanten Unterschiede im Verteilungsmuster der einzelnen Zellzyklusphasen erkennen. Der GAS41 Knockdown führt also in der Glioblastomzelllinie TX3868 nicht zu einem Zellzyklusarrest.

In Abbildung 19 (A) ist die Verteilung der Zellzyklusphasen unbehandelter HeLa Zellen dargestellt. Der Vergleich der Verteilungsmusters von HeLa und TX3868 Zellen zeigt, dass in HeLa Zellen die Subpopulation mitotischer Zellen gegenüber TX3868 Zellen deutlich erhöht ist. Dagegen ist der Anteil von G₁-Phase Zellen in der Glioblastomzelllinie erhöht. Dies ist auf die deutlich langsamere Wachstumsrate der Glioblastomzelllinie zurückzuführen, die mit einer Verdopplungszeit von ~50 h mehr als doppelt so hoch ist wie die Wachstumsrate der HeLa Zellen (~24 h). In Abbildung 19 (B) ist der Effekt des GAS41 Knockdowns auf den Zellzyklus grafisch dargestellt. Auch bei HeLa Zellen lässt sich kein signifikanter Unterschied im Verteilungsmuster der Zellzyklusphasen zwischen GAS41 depletierten Zellen und den Kontrollen feststellen. Der Knockdown von GAS41 führt also in HeLa Zellen auch nicht zu einem Zellzyklusarrest.

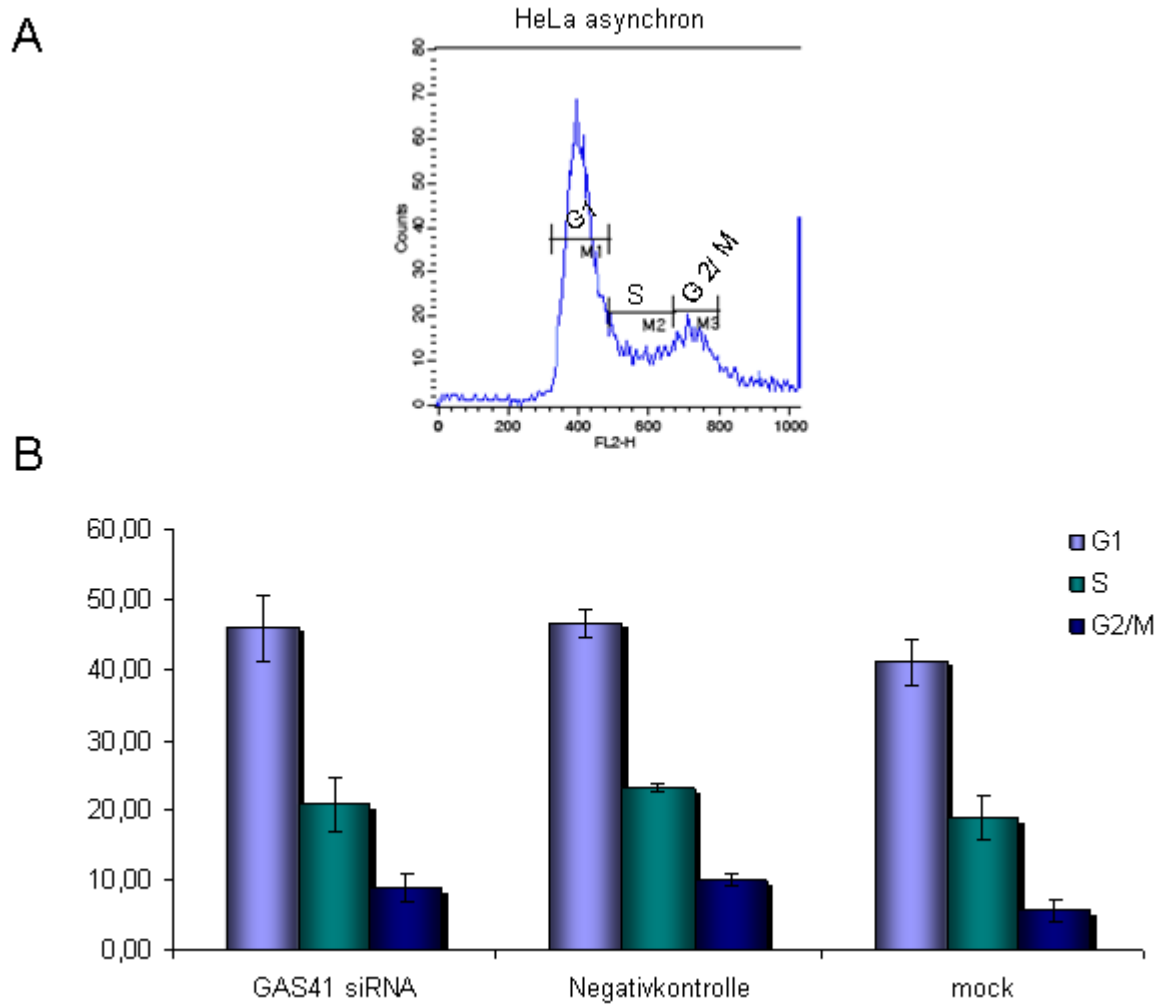


Abbildung 19: Zellzyklusanalysen von HeLa Zellen mittels Propidiumiodidfärbung. HeLa Zellen wurden 24 h nach Transfektion einer Propidiumiodidfärbung unterzogen. (A) Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen unbehandelter HeLa Zellen. Der Messbereich M1 = G₁-Phase, Messbereich M2 = S-Phase und Messbereich M3 = G₂/M-Phase (B) Bei der Betrachtung der transfizierten HeLa Zellen lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Zellzyklusphasen zwischen GAS41 depletierten Zellen und den Kontrollen feststellen. Die Messung der transfizierten Zellen wurde an unabhängigen biologischen Triplikaten durchgeführt.

5.6 Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Morphologie von Interphasezellen

Der RNAi vermittelte Knockdown von Genen kann sich auf die gesamte Struktur der Zelle auswirken. Die Zellen können sich in ihrer Form und Größe verändern und auch der Zellkern kann strukturellen Veränderungen ausgesetzt sein.

Durch den GAS41 Knockdown konnten weder Beeinträchtigungen der Zellviabilität noch der Zellzyklusprogression beobachtet werden. Aus diesem Grund kann man vermuten, dass auch die Morphologie der Zellen durch den Knockdown nicht beeinträchtigt wurde. Um dies zu bestätigen wurden Immunfluoreszenzanalysen an HeLa und TX3868 Zellen durchgeführt.

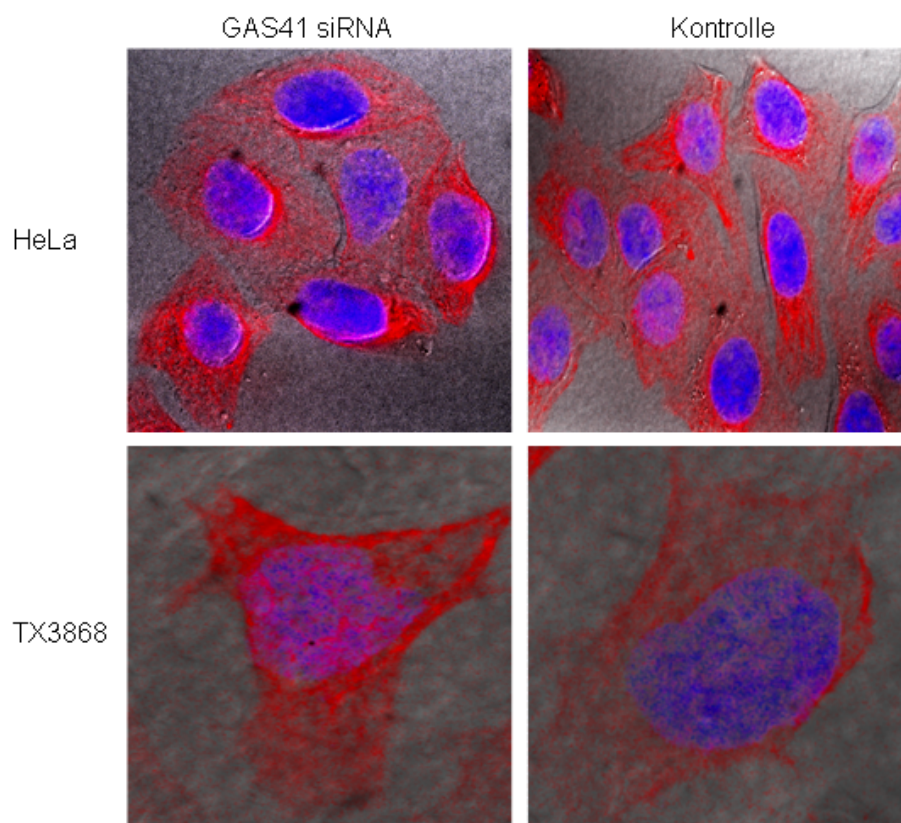


Abbildung 20: Immunfluoreszenzanalyse von Interphasezellen. Durch den Knockdown von GAS41 bleiben Form und Größe der Zellen unbeeinflusst (Hellfeld). Auch die Anordnung der Mikrotubuli (α -Tubulin, rot) und die Form des Zellkerns (blau) lassen sich zwischen GAS41 depletierten Zellen und der Kontrolle nicht unterscheiden.

HeLa und TX3868 Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit siRNA fixiert und mit einem α -Tubulin Antikörper gefärbt. Zur Darstellung des Zellkerns wurde eine Gegenfärbung mit Hoechst Lösung durchgeführt. Bei der Betrachtung der Zellen in der Interphase (Abb. 20) konnte festgestellt werden, dass der Knockdown von GAS41 keinen Einfluss auf die Form und Größe der Zelle hat. Die Zellen weisen ein normales Cytoskelett auf und auch die Form des Zellkerns bleibt durch den Knockdown unbeeinflusst.

5.7 Einfluss des GAS41 Knockdowns auf den Spindelapparat von HeLa Zellen

Die Identifikation von GAS41 als pericentriolares Matrixprotein lässt vermuten, dass der RNAi vermittelte Knockdown des Proteins einen Einfluss auf den mitotischen Spindelapparat ausübt. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden zunächst Immunfluoreszenzanalysen an asynchronen HeLa Zellen durchgeführt. Mit Hilfe eines α -Tubulin Antikörpers wurden die Mikrotubuli der Zellen gefärbt.

Die Betrachtung mitotischer Zellen ergab, dass es sowohl in GAS41 depletierten Zellen als auch in den Kontrollzellen zur Ausbildung eines Spindelapparates kommt. In der siRNA Negativkontrolle beobachtet man das Auftreten eines normalen bipolaren Spindelapparates. In HeLa Zellen, die mit GAS41 siRNA transfiziert wurden, treten neben dem normalen bipolaren Spindelapparat auch Zellen mit multipolaren Spindelapparaten auf (Abb. 21).

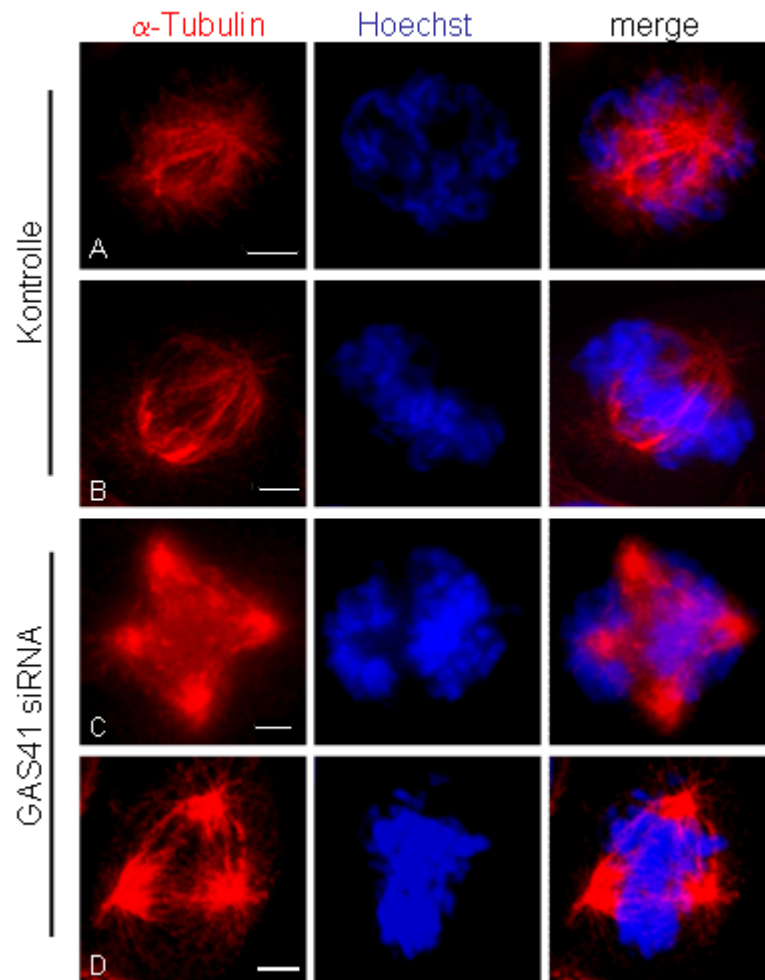


Abbildung 21: Immunfluoreszenzanalyse mitotischer HeLa Zellen. In der Negativkontrolle werden bipolare Spindelapparate detektiert (A, B). In GAS41 depletierten HeLa Zellen treten multipolare Spindelapparate auf (C, D). Vergrößerung mit Olympus 100x Öl-Immersionsobjektiv; Messbalken entspricht 5 μm .

Um das Auftreten dieser Spindelveränderungen besser untersuchen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe eines Doppel-Thymidinblocks synchronisiert. Mit dieser Methode werden die Zellen durch einen Thymidinüberschuss reversibel am G₁/S-Checkpoint arretiert. Entlässt man die Zellen wieder in ihr normales Kulturmedium, durchlaufen sie den Zellzyklus synchron weiter. Nach 9-12 h befinden sich die Zellen inmitten der M-Phase und können zur Immunfluoreszenzanalyse eingesetzt werden (Abb. 22).

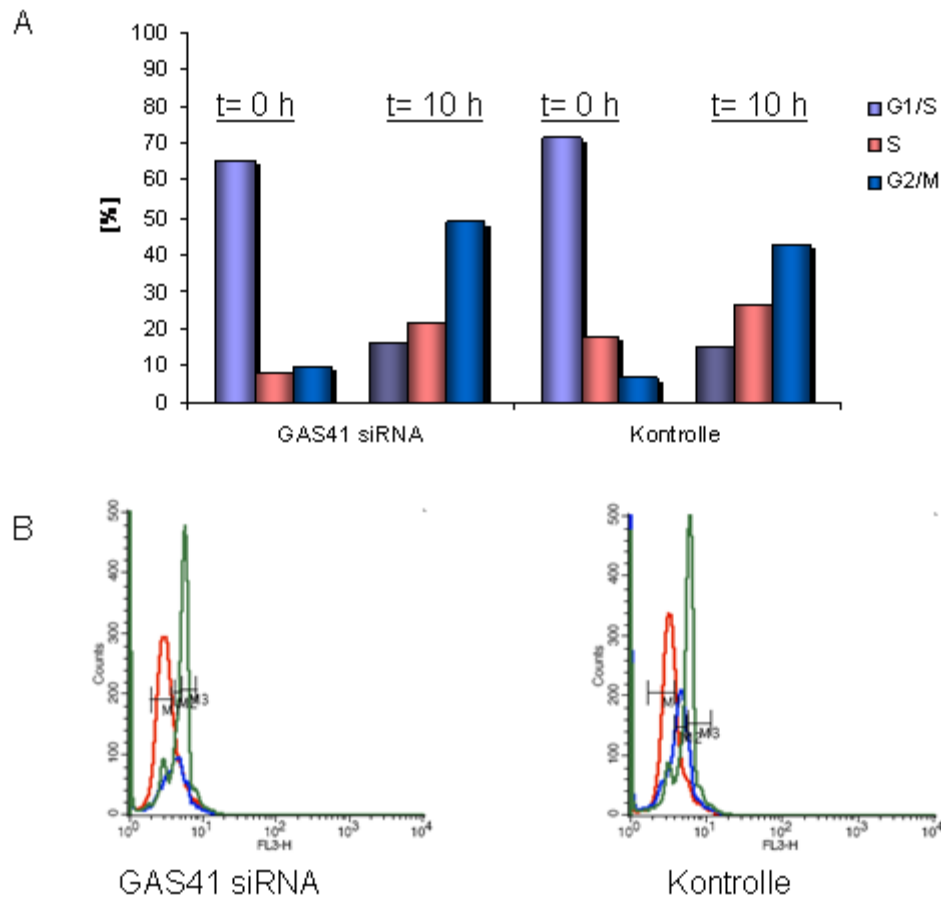


Abbildung 22: Synchronisation von HeLa Zellen mittels Doppel-Thymidinblock. (A) Grafische Darstellung der Zellzyklusphasen von HeLa Zellen, die mittels Thymidinüberschuss am G₁/S-Checkpoint reversibel arretiert wurden (t= 0 h). Nach dem Auswaschen des Thymidins durchlaufen die Zellen den Zellzyklus bis zur M-Phase (t= 10 h) weiter. Der Vergleich von GAS41 depletierten Zellen und der Kontrolle zeigt, dass beide synchronisiert wurden und den Zellzyklus weiter durchschreiten können. Die Darstellung in Teil (B) zeigt die Zellzyklusphasen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die G₁/S-Phase nach t= 0 h (rote Kurve), die S-Phase nach t= 6 h (blaue Kurve) und die G₂/M-Phase nach t= 10 h (grüne Kurve).

Sowohl GAS41 depletierte Zellen als auch die Kontrollzellen lassen sich mit Hilfe des Doppel-Thymidinblocks synchronisieren. Der überwiegende Teil der Zellen befindet sich in der G₁-Phase bzw. am G₁/S-Checkpoint. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Thymidins setzt sich die Zellzyklusprogression fort. Nach sechs Stunden befinden sich die Zellen in der S-Phase und nach zehn Stunden befindet sich der Großteil der Zellen in der M-Phase (Abb. 22). Für weiterführende Immunfluoreszenzanaly-

sen wurden die transfizierten Zellen zehn Stunden nach Auswaschen des Thymidins fixiert und gefärbt.

Wie schon in der asynchronen Zellpopulation beobachtet wurde, treten auch in den synchronisierten Zellen multipolare Spindeln auf, wenn GAS41 depletiert wurde (Abb. 23). Bei der Cytokinese dieser Zellen entstehen mehr als zwei Tochterzellen. In HeLa Zellen die mit Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden, treten normale bipolare Spindelapparate auf (Abb. 24). Diese Zellen teilen sich, wie erwartet, in zwei Tochterzellen.

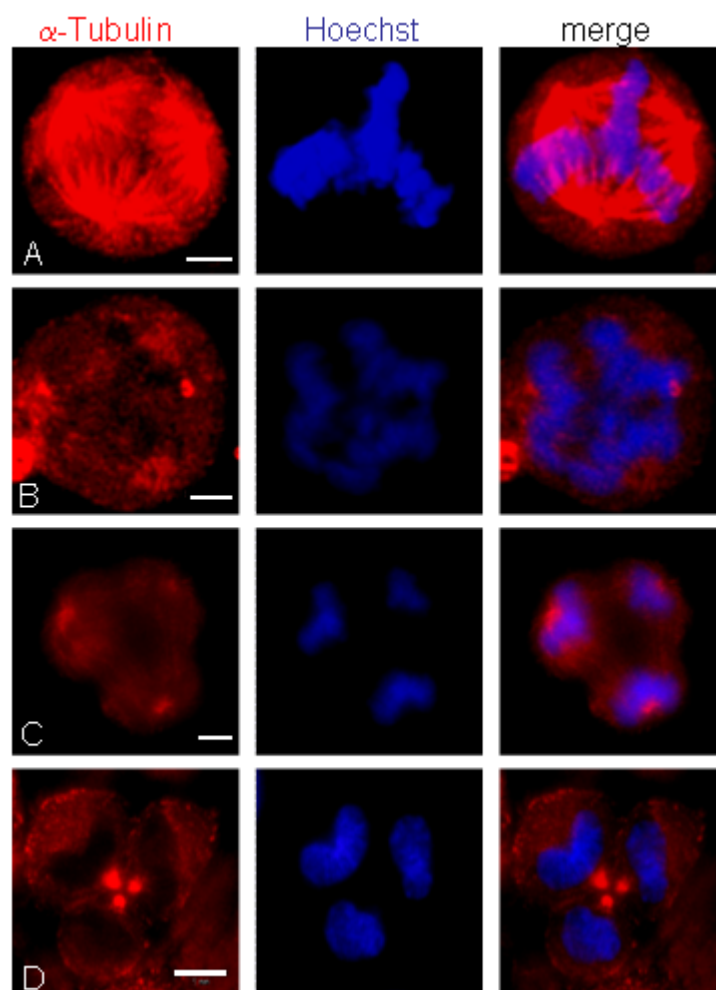


Abbildung 23: Immunfluoreszenzanalyse synchronisierter GAS41 depletierter HeLa Zellen. (A) Metaphase, (B) Anaphase, (C) Telophase, (D) Cytokinese. Vergrößerung: Olympus 60x Öl-Immersion-Objektiv; Messbalken entspricht 2 μ m.

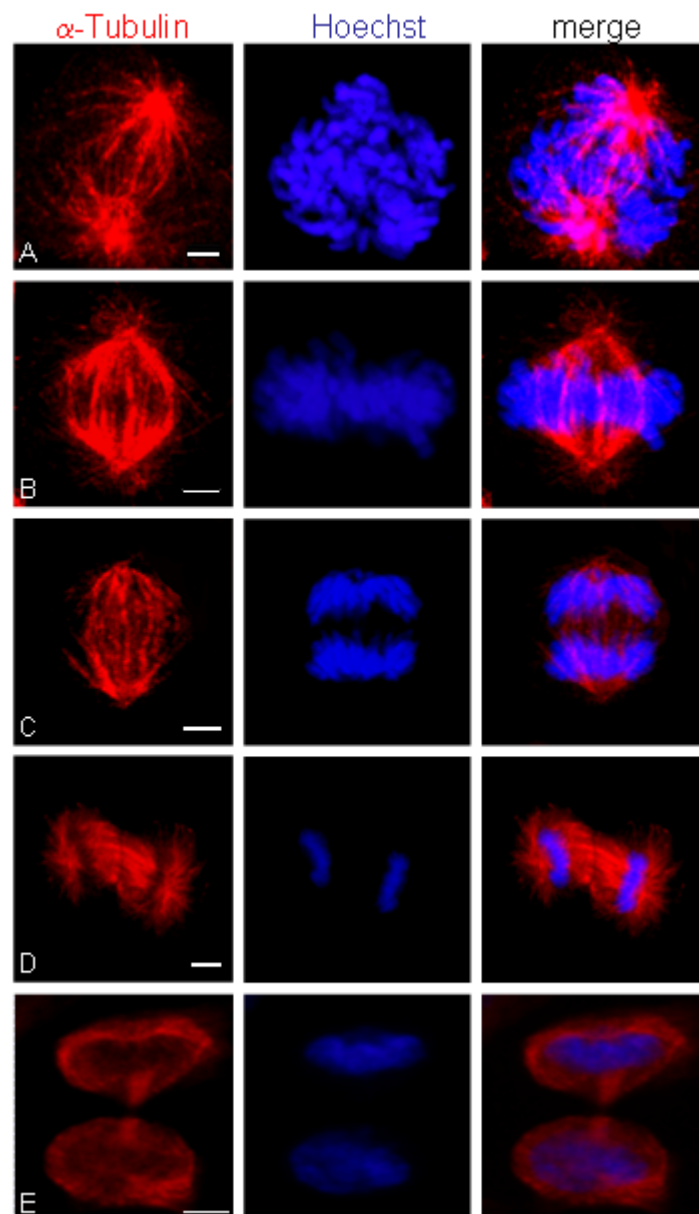


Abbildung 24: Immunfluoreszenzanalyse synchronisierter HeLa Zellen. (A) Prometaphase, (B) Metaphase, (C) frühe Anaphase, (D) Telophase, (E) Cytokinese. Vergrößerung mit Olympus 100x Öl-Immersion-Objektiv; Messbalken entspricht 5 μ m (A-D) bzw. 2 mm (E).

Um einen Eindruck über die Häufigkeit der abnormalen Spindeln zu erhalten wurden je 300 Mitosen von synchronisierten HeLa Zellen analysiert, die entweder mit GAS41 siRNA oder Negativkontroll-siRNA transfiziert waren. Bei der Negativkontrolle wiesen mehr als 95 % der betrachteten Mitosen bipolare Spindelapparate auf. Nur sehr vereinzelt konnten auch multipolige Spindeln nachgewiesen werden (Abb. 25).

In den GAS41 depletierten Zellen wurde jedoch ein signifikanter Anstieg mehrpoliger Spindeln nachgewiesen. Durch den Knockdown von GAS41 kommt es in 20,5 % der Mitosen zur Ausbildung einer multipolaren Spindel (Abb. 25).

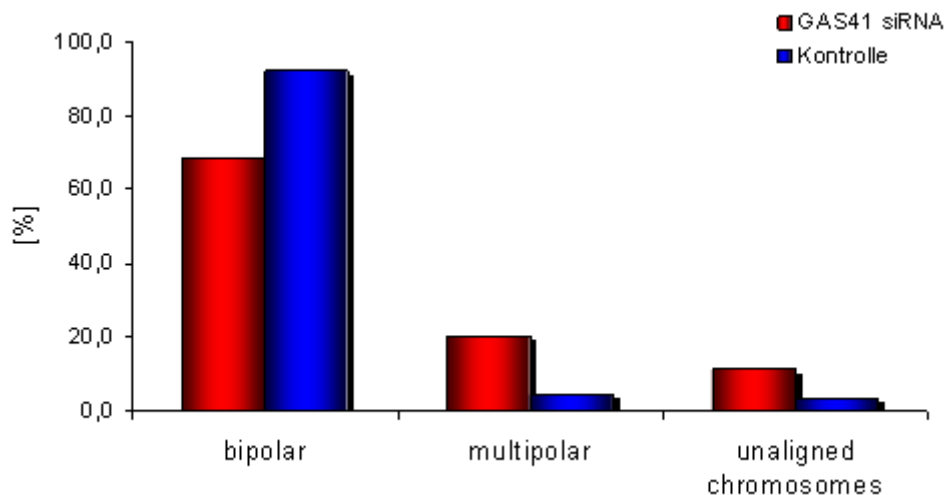


Abbildung 25: Häufigkeitsverteilung der durch den GAS41 Knockdown ausgelösten Spindelphänotypen in HeLa Zellen. Synchronisierte HeLa Zellen wurde mit siRNA transfiziert, in der M-Phase fixiert und für Immunfluoreszenzfärbungen von α -Tubulin und DNA eingesetzt. Jeweils $n=300$ Mitosen wurden auf das Vorliegen von bipolaren bzw. multipolaren Spindeln sowie das Vorkommen von *unaligned chromosomes* hin untersucht.

Neben den mehrpoligen Spindelapparaten konnte in den synchronisierten HeLa Zellen durch den GAS41 Knockdown noch ein weiterer Phänotyp hervorgerufen werden. In mehr als 10 % der betrachteten Mitosen wurde ein bipolarer Spindelapparat beobachtet (s. Abb. 25 und 26), bei dem die Chromosomen nicht vollzählig in der Äquatorialebene angeordnet waren. Bei einzelnen Chromosomen waren die Kinetochore nicht

mit Mikrotubuli verbunden. Diese Chromosomen lagen außerhalb der Äquatorialebene über den gesamten Spindelapparat verteilt. Diese Chromosomen werden auch als *unaligned chromosomes* bezeichnet.

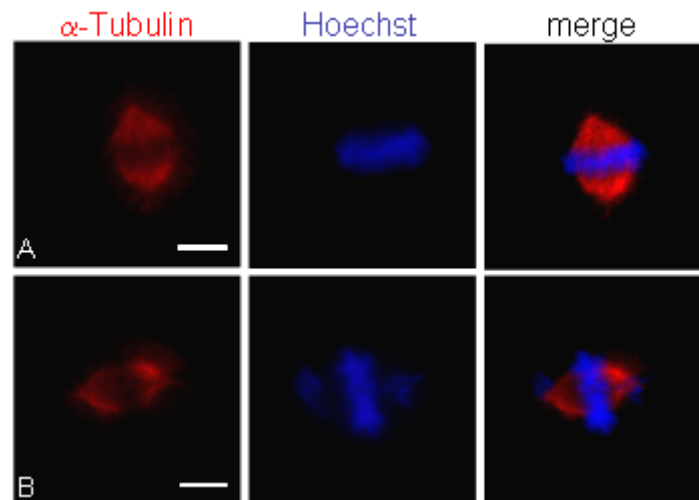


Abbildung 26: Immunfluoreszenzanalysen GAS41 depletierter HeLa Zellen. Der GAS41 Knockdown verursacht eine Fehlverteilung der Chromosomen in der Metaphaseplatte. (A) Anordnung in der Äquatorialebene, (B) *unaligned chromosomes*. Vergrößerung mit Olympus 100x Öl-Immersion-Objektiv; Messbalken entspricht 5 μm .

Der RNAi vermittelte Gen Knockdown ist eine hocheffektive Methode zur Repression der Genexpression. Dennoch ist es möglich, dass durch unspezifische Bindungen der siRNA so genannte *off target* Effekte auftreten, die zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen.

Um die Echtheit der Ergebnisse zu gewährleisten gibt es verschiedene Vorgehensweisen. Neben dem Einsatz einer Negativkontroll-siRNA, die nicht komplementär zu einem Gen des Zielorganismus ist, verwendet man auch zwei oder mehr unabhängige siRNAs für das Zielgen, die den gleichen Phänotyp hervorrufen.

In dieser Arbeit wurde, neben der Negativkontrolle mit nicht-komplementärer siRNA, eine Kombination zweier unabhängiger siRNAs (siRNA 1 und siRNA 2) eingesetzt, um den Knockdown von GAS41 zu erzielen. Die beschriebenen Phänotypen

wurden also bereits durch die Transfektion unabhängiger siRNAs erreicht. Um einen *off target* Effekt darüber hinaus auszuschließen, wurde das Auftreten der Phänotypen auch unter Einsatz der einzelnen siRNAs sowie einer dritten unabhängigen siRNA (siRNA 3) untersucht. In allen betrachteten Fällen führte der Knockdown von GAS41 zur Ausbildung mehrpoliger Spindelapparate sowie zum Auftreten von *unaligned chromosomes* bei bipolaren Spindeln. In Abbildung 27 sind die beiden Phänotypen in Immunfluoreszenzanalysen von siRNA 3 transfizierten HeLa Zellen exemplarisch dargestellt. Damit sind die beobachteten Phänotypen als spezifisch für den Knockdown von GAS41 zu betrachten.

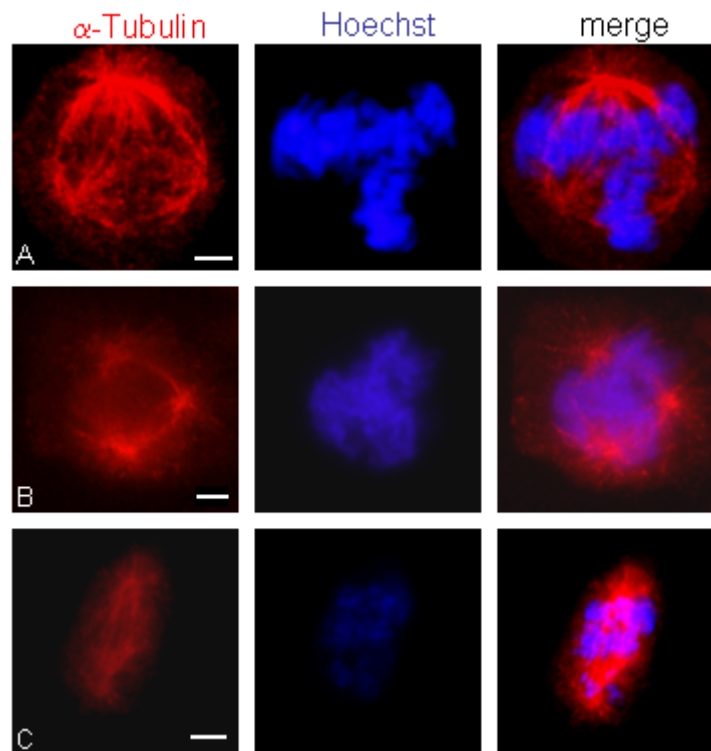


Abbildung 27: Verifizierung der Spindelphänotypen mit einer dritten GAS41 siRNA. Auch der Einsatz der siRNA 3 führt zur Ausbildung anormaler Spindelapparate. (A,B) Multipolare Spindeln, (C) *unaligned chromosomes*. Vergrößerung mit Olympus 100x Öl-Immersion-Objektiv; Messbalken entspricht 2 μ m.

5.8 Einfluss der GAS41 Überexpression auf den Spindelapparat von HeLa Zellen

Bei Genen, die an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind, spielt die Stärke der Genexpression oft eine entscheidende Rolle. Sowohl die Repression als auch die Überexpression regulatorisch wirkender Proteine, wie z.B. NuMA, können einen starken Einfluss auf die Ausbildung eines normalen Spindelapparates haben.⁵⁷ Auch für GAS41 stellt sich die Frage, ob eine Überexpression des pericentriolaren Proteins die Integrität der Mitosespindel beeinflusst. Um dies zu untersuchen wurden synchronisierte HeLa Zellen mit einem Plasmid zur Expression von GAS41 transfiziert. Beim Erreichen der M-Phase wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

Die Färbung von α -Tubulin und DNA ergab, dass die Überexpression von GAS41 dieselben Spindelphänotypen bewirkt, die bereits beim Knockdown von GAS41 beobachtet wurden. Die Überexpression von GAS41 führte ebenfalls zur Ausbildung multipolarer Spindeln sowie zum Auftreten von Chromosomen, die trotz bipolarer Spindel nicht in der Äquatorialebene angeordnet sind (Abb. 28).

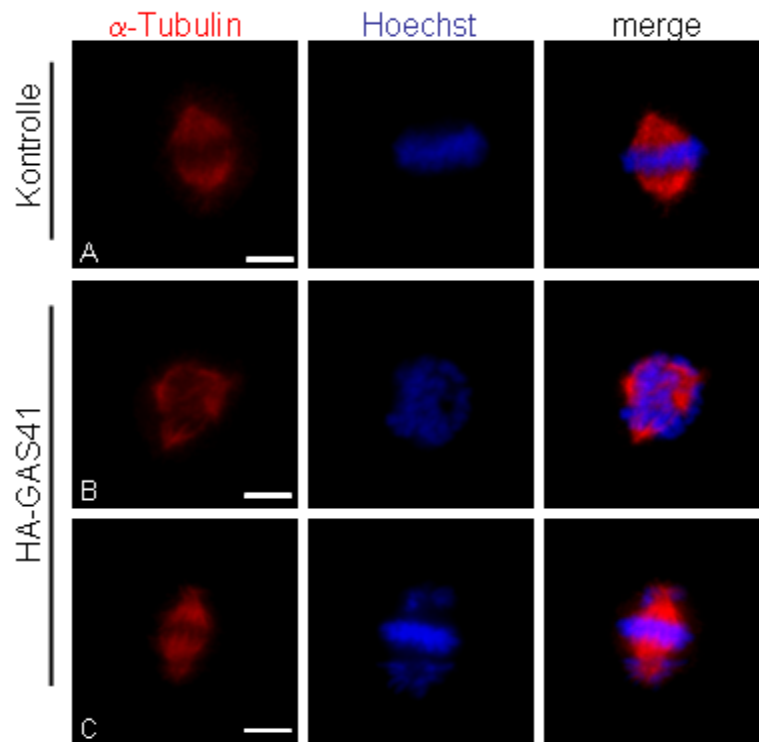


Abbildung 28: Immunfluoreszenzanalyse GAS41 überexprimierender HeLa Zellen. HeLa Zellen wurden mit dem Plasmid pSG5/ HA-GAS41 bzw. dem leeren pSG5-Vektor transfiziert und mit einem α -Tubulin Antikörper gefärbt. Die Überexpression von GAS41 führt in HeLa Zellen zu einem vermehrten Auftreten multipolarer Mitosen und veränderter Chromosomenanordnungen. Vergrößerung mit Olympus 100x Öl-Immersion-Objektiv; Messbalken entspricht 2 mm (A, B) bzw. 5 μ m (C).

Der Anteil multipolarer Spindeln liegt in den GAS41 überexprimierenden Zellen bei 16,4 %. Das Auftreten von *unaligned chromosomes* wurde bei 7 % der GAS41 überexprimierenden Zellen beobachtet (Abb. 29). Vergleicht man diese Häufigkeiten mit dem Auftreten der Phänotypen in GAS41 depletierten Zellen, ergibt ein leichter Rückgang der in der Frequenz der Spindelphänotypen. Dennoch lässt sich aus diesen Daten schließen, dass sowohl die Repression als auch die Überexpression des pericentriolaren Matrixproteins GAS41 die Ausbildung eines normalen Spindelapparates beeinflusst.

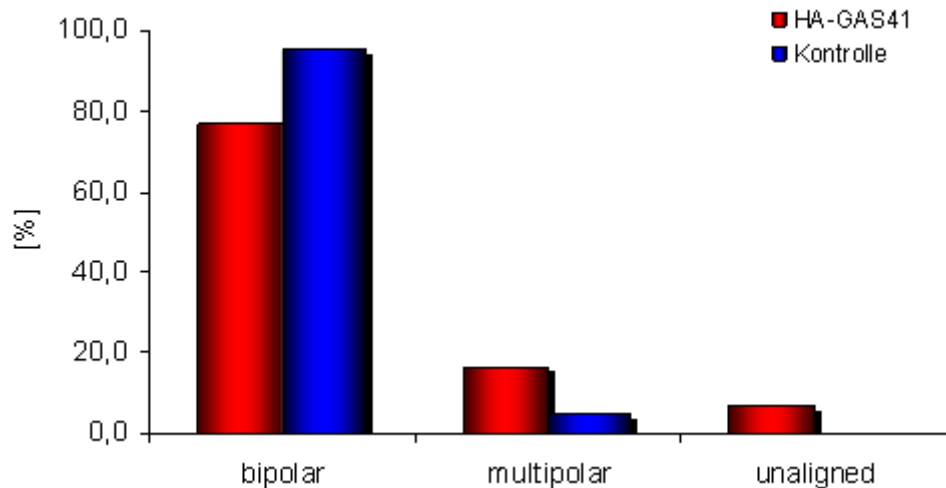


Abbildung 29: Häufigkeitsverteilung der durch die GAS41 Überexpression ausgelösten Spindelphänotypen in HeLa Zellen. Synchronisierte HeLa Zellen wurde mit den Vektoren pSG5/ HA-GAS41 bzw. pSG5 (Kontrolle) transfiziert, in der M-Phase fixiert und für die Immunfluoreszenzfärbungen von α -Tubulin und DNA eingesetzt. Jeweils n=200 Mitosen wurden am Fluoreszenzmikroskop auf das Vorliegen von normalen bipolaren bzw. multipolaren Spindeln sowie das Vorkommen von nicht in der Äquatorialebene angeordneter Chromosomen untersucht.

5.9 GAS41 Knockdown in der Zelllinie HeLa H2B-GFP

Der Knockdown des pericentriolaren Matrixproteins GAS41 führt in HeLa Zellen zu einer Beeinträchtigung der Spindelintegrität. Sowohl das Auftreten multipolarer Spindeln, als auch die fehlende Anlagerung der Metaphasechromosomen an die Mikrotubuli könnten das erfolgreiche Durchlaufen der M-Phase inhibieren. Um den Verlauf der Mitose in GAS41 depletierten Zellen analysieren zu können, sollten Lebendzelluntersuchungen durchgeführt werden. Für diese Life Cell Mikroskopie muss der Knockdown von GAS41 in einer Zelllinie etabliert werden, die ein fluoreszierendes Fusionsprotein stabil exprimiert. Hierfür werden häufig HeLa Zellen verwendet, die das Histon H2B als GFP-Fusionsprotein exprimieren.⁵⁸ Diese Zelllinie wurde mir freundlicherweise von THOMAS CREMER mit Erlaubnis von KEVIN SULLIVAN zur Verfügung gestellt.

Vor Durchführung der Lebendzelluntersuchungen wurde zunächst sichergestellt, dass bei der eingesetzten Zelllinie HeLa H2B-GFP der GAS41 Knockdown zu den

bereits beobachteten Phänotypen führt. Hierzu wurden die Zellen mittels Doppel-Thymidinblock synchronisiert und analog zu herkömmlichen HeLa Zellen mit siRNA transfiziert. Nach Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd wurden Immunfluoreszenzanalysen mit α -Tubulin Antikörpern durchgeführt.

Bei HeLa H2B-GFP Zellen die mit Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden, konnten mittels Immunfluoreszenzanalysen bipolare Spindelapparate nachgewiesen werden. Bei den GAS41 depletierten Zellen konnten dagegen die bereits beschriebenen Phänotypen der multipolaren Spindeln sowie *unaligned chromosomes* nachgewiesen werden (Abb. 30).

Da durch den Knockdown von GAS41 in dieser Zelllinie die erwarteten Phänotypen reproduziert wurden, konnte die Zelllinie HeLa H2B-GFP für die Life Cell Mikroskopie eingesetzt werden.

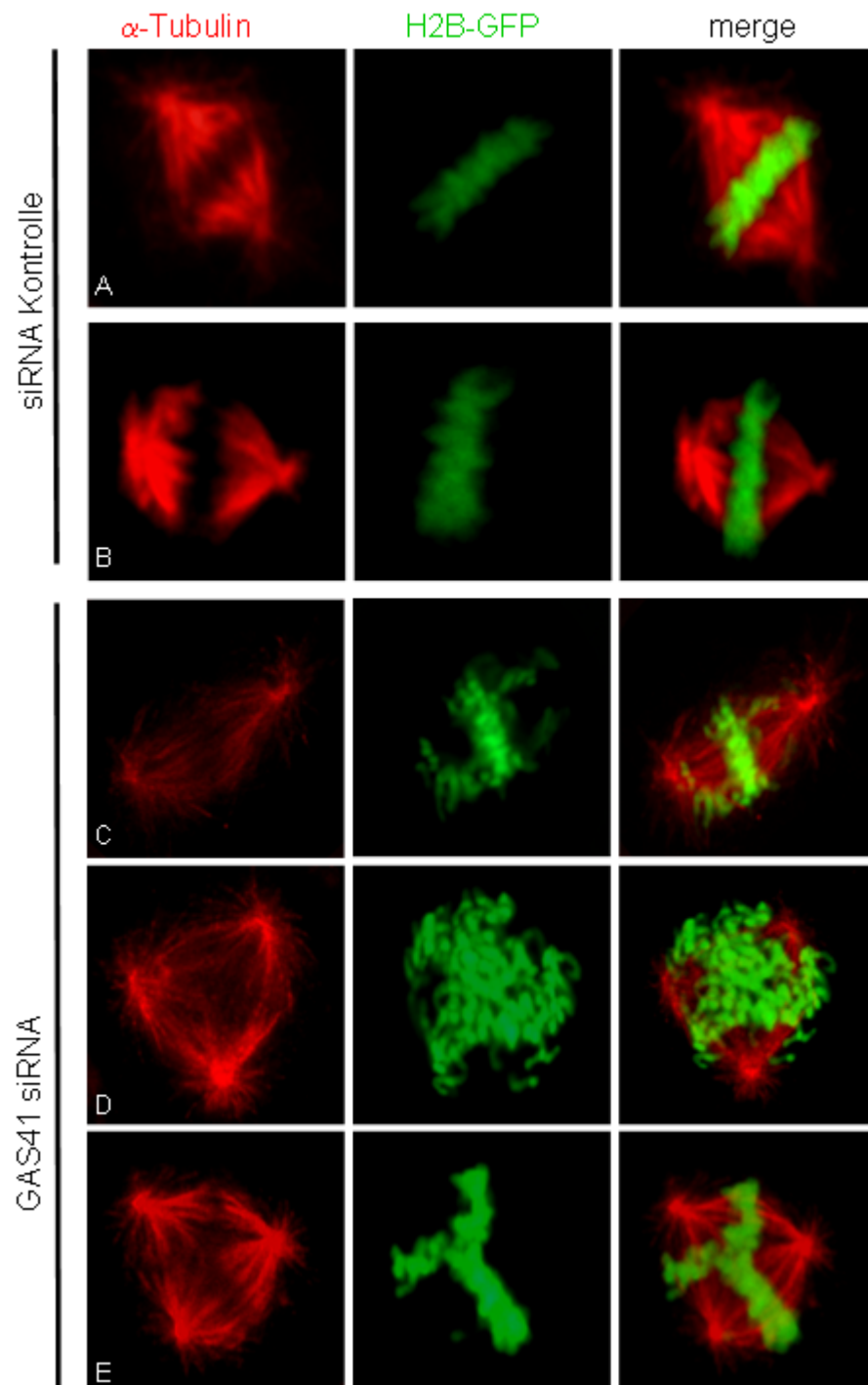


Abbildung 30: Immunfluoreszenz-analysen des GAS41 Knockdowns in HeLa H2B-GFP. (A, B) bipolärer Spindelapparat bei Zellen, die mit Negativ-siRNA transfiziert wurden. (C) Durch GAS41 Depletion induziertes Auftreten von *unaligned chromosomes*. (D, E) Induktion von multipolaren Spindel-apparaten durch den Knockdown von GAS41.

5.10 Life Cell Mikroskopie GAS41 depletierter HeLa H2B-GFP Zellen

In GAS41 depletierten HeLa H2B-GFP Zellen sollte nun mit Hilfe der Life Cell Mikroskopie die Zellteilung untersucht werden. Dabei sollte zum einen analysiert werden, ob die multipolaren Zellen die Mitose bis zur Entstehung vitaler Tochterzellen erfolgreich abschließen können. Zum anderen sollte untersucht werden, ob im Falle der falsch angeordneten Chromosomen die Zellteilung erfolgen kann. Bei beiden Phänotypen sollte analysiert werden wie sich den Knockdown von GAS41 auf die Dauer der Mitose auswirkt. Hierzu wurden synchronisierte Zellen mit siRNA transfiziert und an einem inversen Spinning Disk Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) mit Hilfe der Software Volocity 5 beobachtet.

Bei der Analyse der transfizierten HeLa Zellen konnten sowohl normale bipolare Mitosen als auch die beiden Knockdown induzierten Phänotypen beobachtet werden. In Abbildung 31 ist der vollständige Ablauf einer bipolaren Mitose, ausgehend von der Interphase der Mutterzelle bis zur Interphase der beiden Tochterzellen, dargestellt.

Ausgehend von der Metaphaseplatte (Abb. 31 C) beträgt die Dauer der Zellteilung rund eine Stunde. Nachdem alle Chromosomen so in der Metaphaseplatte angeordnet worden sind, dass eine gleichmäßige Verteilung der Schwesterchromatiden auf die beiden Tochterzellen stattfinden kann, erfolgte das Signal zur Metaphase-Anaphase-Transition durch die Aktivierung des Anaphase-Promoting-Komplexes. Nach etwa 50 min befand sich die betrachtete Zelle in der späten Anaphase, von wo aus sie in die Telophase überging. Nach erfolgter Cytokinese lagen die beiden entstandenen Tochterzellen wieder in der Interphase des Zellzyklus vor.

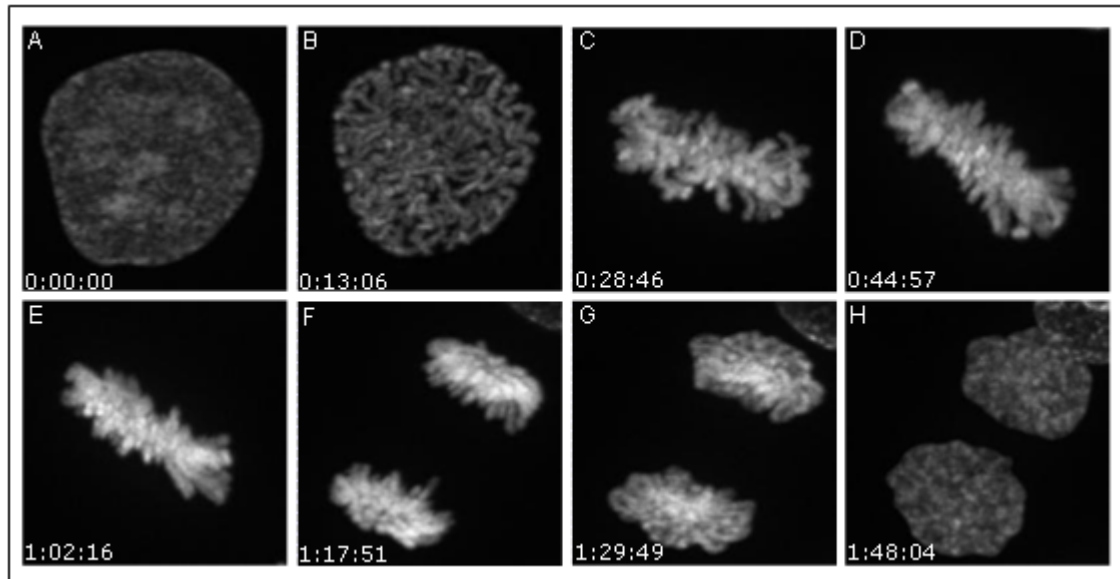


Abbildung 31: Bipolare Zellteilung einer HeLa H2B-GFP Zelle. Die Teilung der Mutterzelle wurde ausgehend von der Interphase (A), über die Prophase (B), die verschiedenen Stadien der Metaphase (C-E) bis hin zur späten Anaphase (F) und der Telophase (G) dokumentiert. Nach der Cytokinese gehen die beiden Tochterzellen in die Interphase (H) über.

Bei der Betrachtung von Zellen mit multipolarem Spindelapparat konnte festgestellt werden, dass diese Zellen die Mitose vollständig durchlaufen können. In Abbildung 32 wurde die Teilung einer tripolaren Zelle dokumentiert.

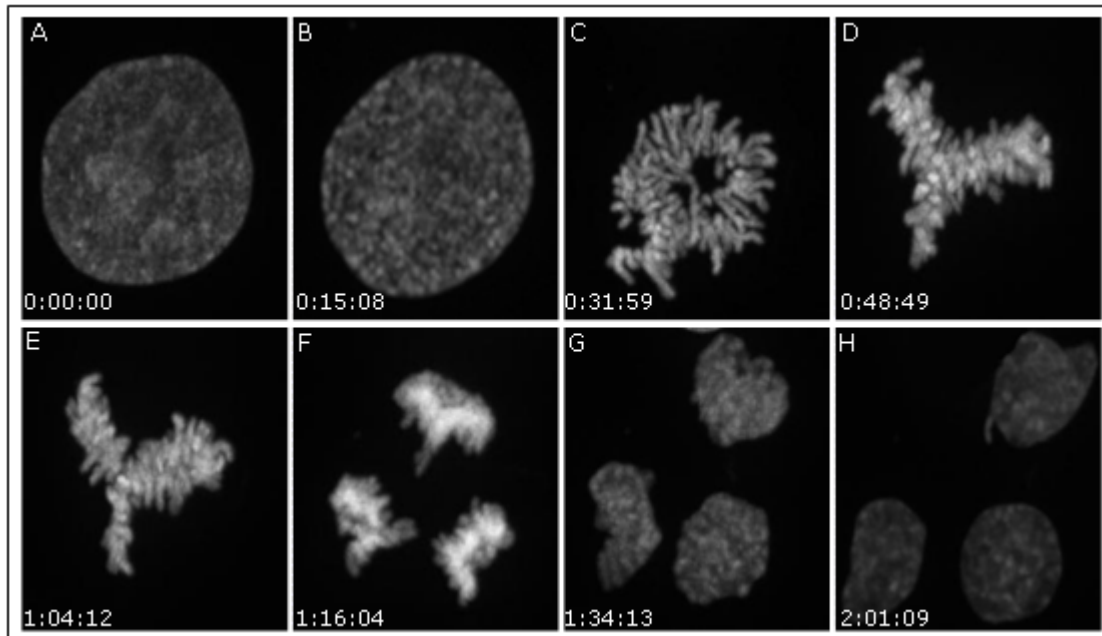


Abbildung 32: Zellteilung einer HeLa H2B-GFP Zelle mit tripolarem Spindelapparat. Die Zelle geht von der Interphase (A) über die Prophase (B) in die Metaphase über. Ausgehend von der Prometaphase (C) gehen die Chromosomen in eine dreistrahlige Metaphaseplatte über (D, E). Die Zelle geht dann in die Anaphase (F) über und teilt sich nach erfolgter Telophase (G) in drei intakte Interphasezellen (H).

Die betrachtete Zelle (Abb. 32) geht aus der Prometaphase in eine dreistrahlige Metaphaseplatte über. Im Verlauf der Metaphase kommt es zu einigen Umordnungen von Chromosomen. Schließlich erfolgt durch Aktivierung des Anaphase-Promoting-Komplexes der Übergang in die Anaphase. Die Mutterzelle teilt sich in drei intakte Tochterzellen, die nach erfolgreicher Cytokinese in die Interphase übergehen. Die Dreiteilung der Zelle erfolgt ähnlich schnell wie die normale bipolare Zellteilung. Das Auftreten überzähliger Centrosomen und die Ausbildung eines dreipoligen Spindelapparates scheinen den Ablauf der Zellteilung hier nicht zu beeinflussen.

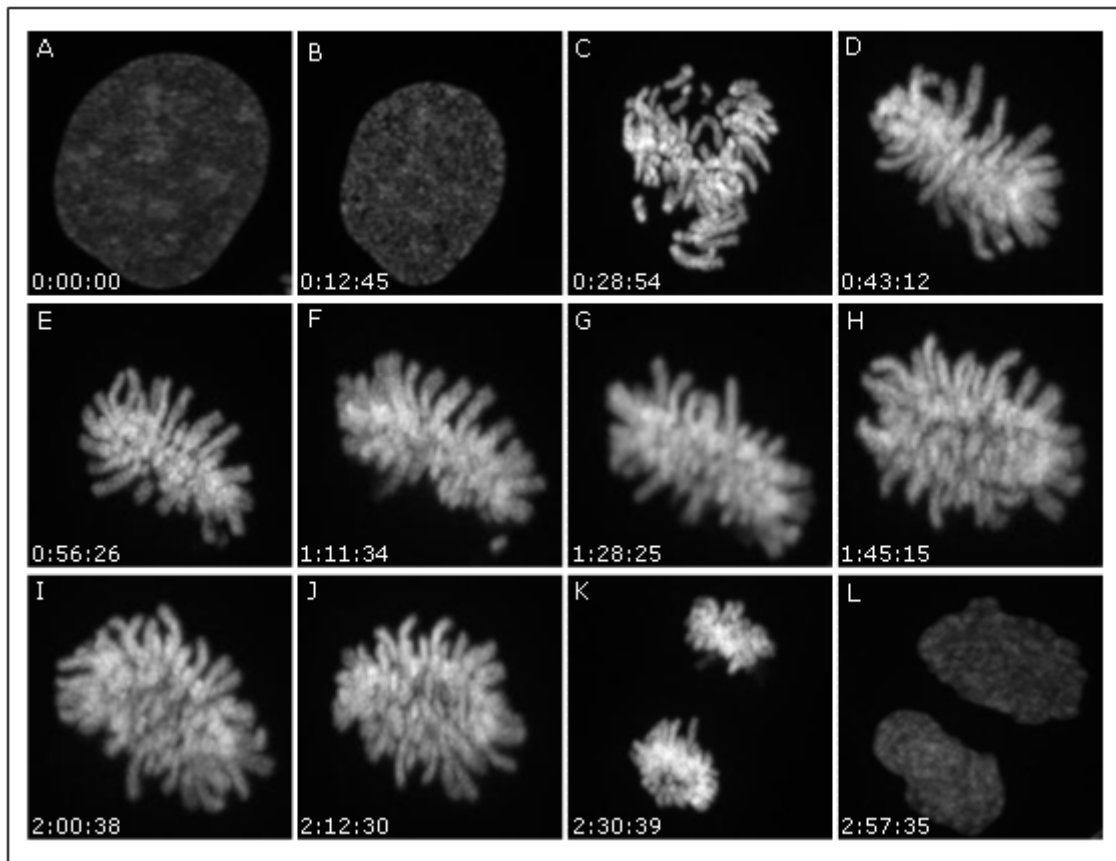


Abbildung 33: Centrosomenclustering in der M-Phase einer GAS41 depletierten Zelle. Die betrachtete Zelle geht aus der Interphase (A) in die Prophase (B) über. Anschließend kommt es zur Ausbildung einer dreistrahligen Metaphaseplatte (C), wobei zwei der Achsen im Verlauf der Metaphase zusammenklappen. Durch das Zusammenlegen zweier Spindelpole (Centrosomenclustering) kommt zur nachträglichen Ausbildung eines bipolaren Spindelapparates. Schließlich geht die Zelle in die Anaphase (K) über und teilt sich in zwei intakte Tochterzellen (L).

Ein Mechanismus von Zellen das Auftreten überzähliger Centrosomen zu kompensieren, ist das Centrosomenclustering. Dabei werden mehrere Centrosomen zu einem Spindelpol zusammengefasst, wodurch die Zelle die Anzahl der theoretisch möglichen Tochterzellen minimieren kann. Auch dieser Mechanismus konnte in GAS41 depletierten HeLa H2B-GFP Zellen dokumentiert werden (Abb. 33).

Die betrachtete Zelle geht nach Zerfall der Kernhülle zunächst in eine dreistrahlige Metaphase über, wobei hier der Winkel zwischen zwei Achsen deutlich verkleinert ist gegenüber der symmetrischen dreistrahligen Anordnung, wie sie in Abbildung 33 dar-

gestellt ist. Im weiteren Verlauf kommt es bei dieser Zelle zum Zusammenklappen zweier Achsen. Hier werden zwei der drei Spindelpole kombiniert. Die Zelle geht in eine scheinbar normale bipolare Metaphaseplatte über. Die Dauer der Mitose ist durch diese komplexen Umlagerungen auf das 2,5-fache verlängert (*mitotic delay*). Trotz dieser Verzögerung kommt es schließlich doch noch zur Aktivierung des Anaphase-Promoting-Komplexes. Die Zelle geht in eine bipolare Anaphase über und teilt sich schließlich in zwei intakte Tochterzellen. Dieser *Rescue* Mechanismus ermöglicht der Zelle also eine bipolare Teilung zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität.

Der zweite durch den GAS41 Knockdown induzierte Phänotyp, das Auftreten von *unaligned chromosomes*, konnte ebenfalls in HeLa H2B-GFP Zellen dokumentiert werden. In Abbildung 34 ist eine Zelle ausgehend von der Prophase dargestellt, bei der die Chromosomen zunächst nicht vollständig in der Metaphaseplatte angeordnet vorliegen. Diese Chromosomen werden erst nach und nach in die Äquatorialebene gebracht, wobei anschließende Umlagerungen innerhalb der Metaphaseplatte die Metaphase-Anaphase-Transition weiter verzögern. Durch das Auftreten von *unaligned chromosomes* wird die Dauer der Mitose nahezu verdoppelt.

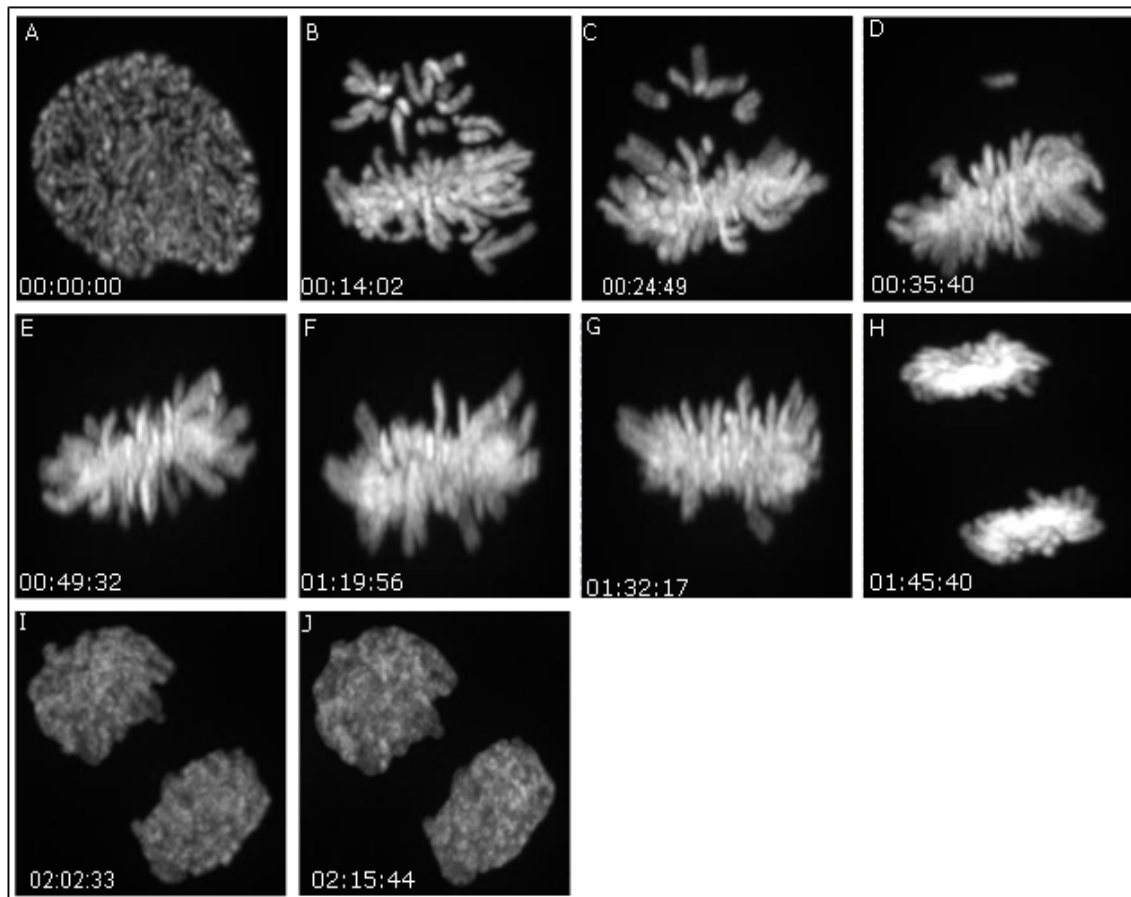


Abbildung 34: *Unaligned chromosomes* in einer GAS41 depletierten Zelle. Die Zelle geht aus der Prophase (A) in die Metaphase (B-G) über, wobei die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene nur nach und nach erfolgt. Anschließend geht die Zelle in die Anaphase (H) und schließlich in die Telophase (I, J) über.

Mit Hilfe der Life Cell Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass der Knockdown von GAS41 die Ausbildung funktioneller Spindelapparate nicht beeinträchtigt. Weder die Ausbildung multipolarer Spindeln, noch das Auftreten von *unaligned chromosomes* führen zu einem mitotischen Arrest. Bei Zellen mit multipolarem Spindelapparat ist die Anzahl der entstehenden Tochterzellen mitunter abhängig von der Symmetrie der Spindeln. Bei Zellen mit tripolarem Spindelapparat konnte beobachtet werden, dass die Symmetrieachsen der Spindel nahezu in einen 120° Winkel zueinander stehen. Wenn diese Symmetrie beim Ausbilden der Mitosespindel nicht erzielt wurde, konnte beobachtet werden, dass zwei der drei Spindelpole durch das Centrosomencustering zu einem Spindelpol vereinigt wurden. Die daraus resultierenden Umlagerungen der Chromosomen in der Äquatorialebene führen zu einer deutlich verzögerten

Metaphase-Anaphase-Transition. Auch für das Auftreten von *unaligned chromosomes* konnte eine verlängerte Mitosedauer beobachtet werden (Abb. 35). Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Ausbildung multipolarer Spindelapparate gegenüber bipolaren Spindeln nur zu einer leichten Verlängerung der Mitosedauer führt. Das Auftreten von *unaligned chromosomes* hat einen viel stärkeren Einfluss und resultiert in einer signifikanten Mitoseverzögerung (*mitotic delay*) (Abb. 35).

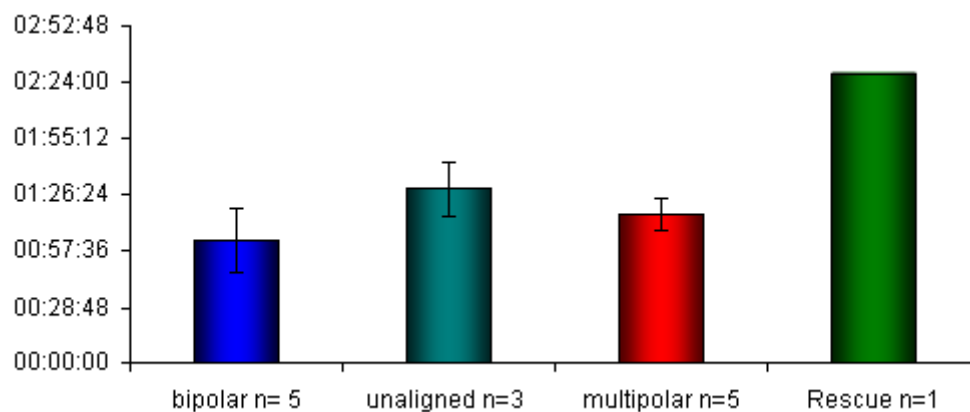


Abbildung 35: Dauer der Mitose in GAS41 depletierten HeLa Zellen. Dauer der Mitose in den beobachteten Mitosephänotypen, ausgehend von der Metaphase bis zur nächsten Interphase.

5.11 Strukturelle Veränderungen des Spindelapparates

Durch den Knockdown von GAS41 werden verschiedene strukturelle Veränderungen des Spindelapparates hervorgerufen. Das Auftreten multipolarer Spindeln geht mit dem Auftreten überzähliger Centrosomen einher. Die am häufigsten beobachtete Spindel-anomalie besteht in einer dreipoligen Spindel in deren Spindelpolen jeweils ein Centrosom lokalisiert ist. Die Cytokinese dieser Zelle resultiert dabei in drei Tochterzellen (Abb. 36 A-C). Häufig kommt es durch den Knockdown von GAS41 auch zur Entstehung von mehr als drei Centrosomen. In diesem Falle beobachtet man häufig das Centrosomenclustering, wodurch die Anzahl der entstehenden Spindelpole und der resultierenden Tochterzellen begrenzt wird. Diese Zellen teilen sich häufig in drei

Tochterzellen. In Abbildung 36 E ist eine Zelle mit fünf Centrosomen dargestellt. Drei dieser Centrosomen sind zu einem Spindelpol zusammengefasst. Nach dem Übergang in die Anaphase würde bei dieser Zelle die Ausbildung von drei Tochterzellen erfolgen. Vereinzelt konnten auch Mitosen beobachtet werden, aus denen vier Tochterzellen hervorgingen (Abb. 36 F).

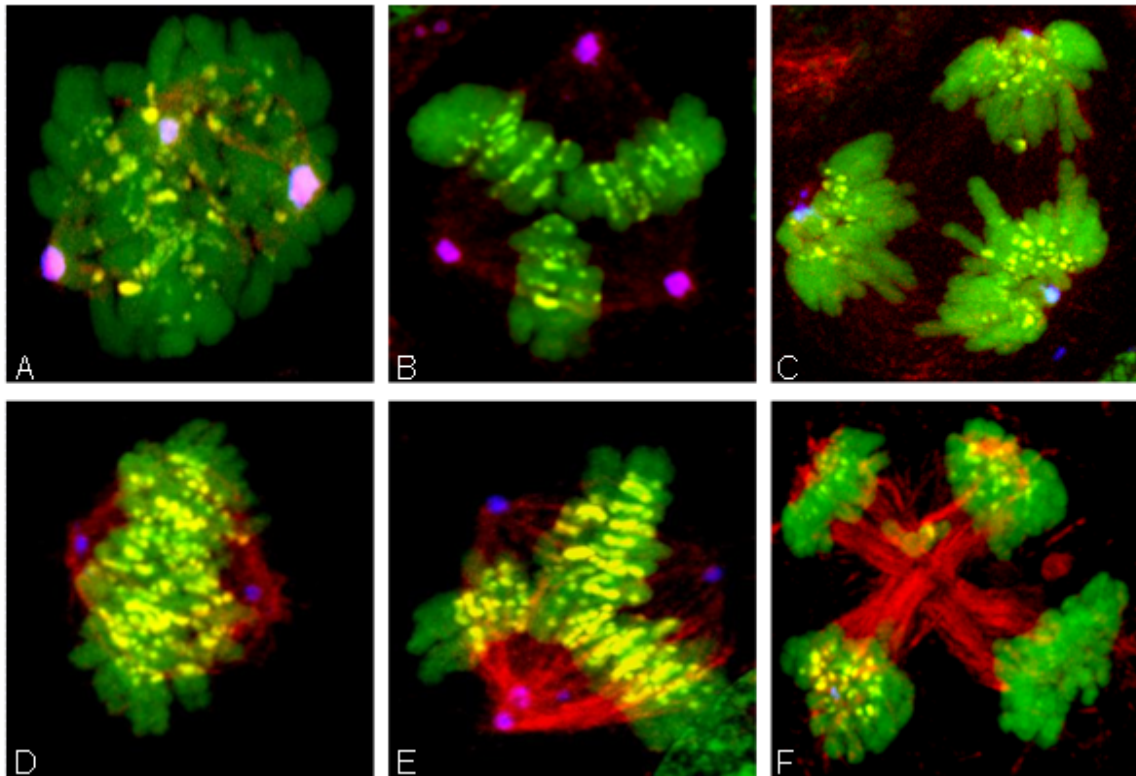


Abbildung 36: Konfokalmikroskopische Darstellung des Spindelapparates von HeLa H2B-GFP Zellen. (A-C) GAS41 depletierte Zellen in Prophase (A), Metaphase (B) und Anaphase (C). Die Zellen weisen jeweils drei Centrosomen auf. (D) HeLa Zelle mit normalem bipolarem Spindelapparat. (E) Centrosomenclustering einer multipolaren Zelle. (F) Telophase einer multipolaren Zelle aus der vier Tochterzellen entstehen. H2B-GFP (grün), α -Tubulin (rot), Pericentrin (blau), Centromere gefärbt mit CREST-Serum (gelb).

Neben der Ausbildung funktioneller Spindelapparate bildet auch die Anheftung der Kinetochore an die Spindelmikrotubuli eine entscheidende Grundlage für das erfolgreiche Ablaufen der Zellteilung. Damit diese Anheftung sowie die spätere Trennung der beiden Schwesterchromatiden erfolgen können, spielt die Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte eine wichtige Rolle. Um sich die Anordnung der Chromosomen betrachten zu können, wurden in Immunfluoreszenzanalysen die Centromere mit dem Serum eines Patienten mit CREST-Syndrom angefärbt. Patienten mit dieser Autoimmunerkrankung besitzen häufig Autoantikörper gegen Centromerbestandteile.

In GAS41 depletierten multipolaren Zellen werden die Chromosomen so in der Äquatorialebene angeordnet, dass Centromere in Innern liegen und für die angreifenden Mikrotubuli frei zugänglich sind (Abb. 36 B). Dies entspricht auch der Anordnung in einer normalen bipolaren Zelle (Abb. 36 D). Nach erfolgter Anaphase-Transition werden die Schwesterchromatiden getrennt und zu den Polen gezogen. Dabei sind die Centromere rund um den Spindelpol angeordnet. Diese Anordnung ist auch in GAS41 depletierten multipolaren Zellen nachzuweisen. (Abb. 36 C).

In den durch GAS41 Knockdown induzierten multipolaren Zellen ist, trotz der Centrosomenduplikation und der Ausbildung überzähliger Spindelpole, die räumliche Anordnung der Chromosomen bzw. der Kinetochore innerhalb der Metaphaseplatte unbeeinflusst. Nach Eindringen in die Kernregion können die Mikrotubuli an den Kinetochoren der Schwesterchromatiden angreifen und diese in der Anaphase zu den Zellpolen hin ziehen. Durch die Ausbildung einer funktionellen Metaphaseplatte wird die Zellteilung unabhängig vom Spindelphänotyp ermöglicht.

5.12 Einfluss der GAS41 Expression auf den Spindelapparat von TX3868 Zellen

GAS41 wurde ursprünglich in der Glioblastomzelllinie TX3868 identifiziert und liegt in diesen Zellen amplifiziert und überexprimiert vor. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen konnten in unbehandelten TX3868 Zellen sowie in GAS41 depletierten Zellen anormale Spindelapparate nachgewiesen werden (Abb. 37). Sowohl die GAS41 Überexpression als auch der Knockdown von GAS41 führen, wie auch bei HeLa Zellen beobachtet wurde, zum Auftreten multipolarer Spindelapparate. Im Gegensatz zu HeLa Zellen wurden bei der Glioblastomzelllinie jedoch keine Metaphasen beobachtet, in denen eine Fehlverteilung der Chromosomen vorliegt.

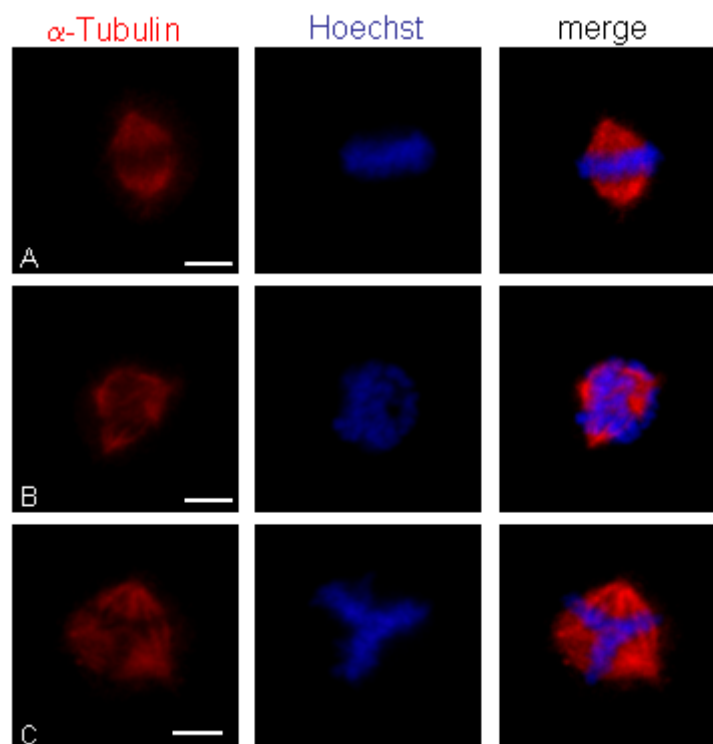


Abbildung 37: Immunfluoreszenzanalyse von TX3868 Zellen. Sowohl in unbehandelten TX3868 Zellen als auch in GAS41 depletierten Zellen treten bipolare (A) und multipolare (B, C) Spindelapparate auf. Vergrößerung mit Olympus 100x Öl-Immersion-Objektiv; Messbalken entspricht 2 μ m.

Um die Häufigkeit der Spindelstörungen erfassen zu können war es auch bei dieser Glioblastozelllinie notwendig die Zellen zu synchronisieren. Aufgrund der niedrigeren Teilungsrate verglichen mit HeLa Zellen, mussten hier die beiden Thymidin Inkubationsintervalle deutlich länger gewählt werden. Dennoch war eine Synchronisation der TX3868 Zellen nicht im gleichen Umfang wie bei HeLa Zellen durchführbar. Aus diesem Grund beschränkte sich die Betrachtung der Spindelapparate auf je 100 Mitosen.

Synchronisierte TX3868 Zellen wurden zum Knockdown von GAS41 mit einer Kombination zweier GAS41 siRNAs (siRNA 1 und siRNA 2) transfiziert und in Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen α -Tubulin und Pericentrin gefärbt. Bei TX3868 Zellen die mit einer Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden, kam es dagegen nicht zu einem Knockdown von GAS41.

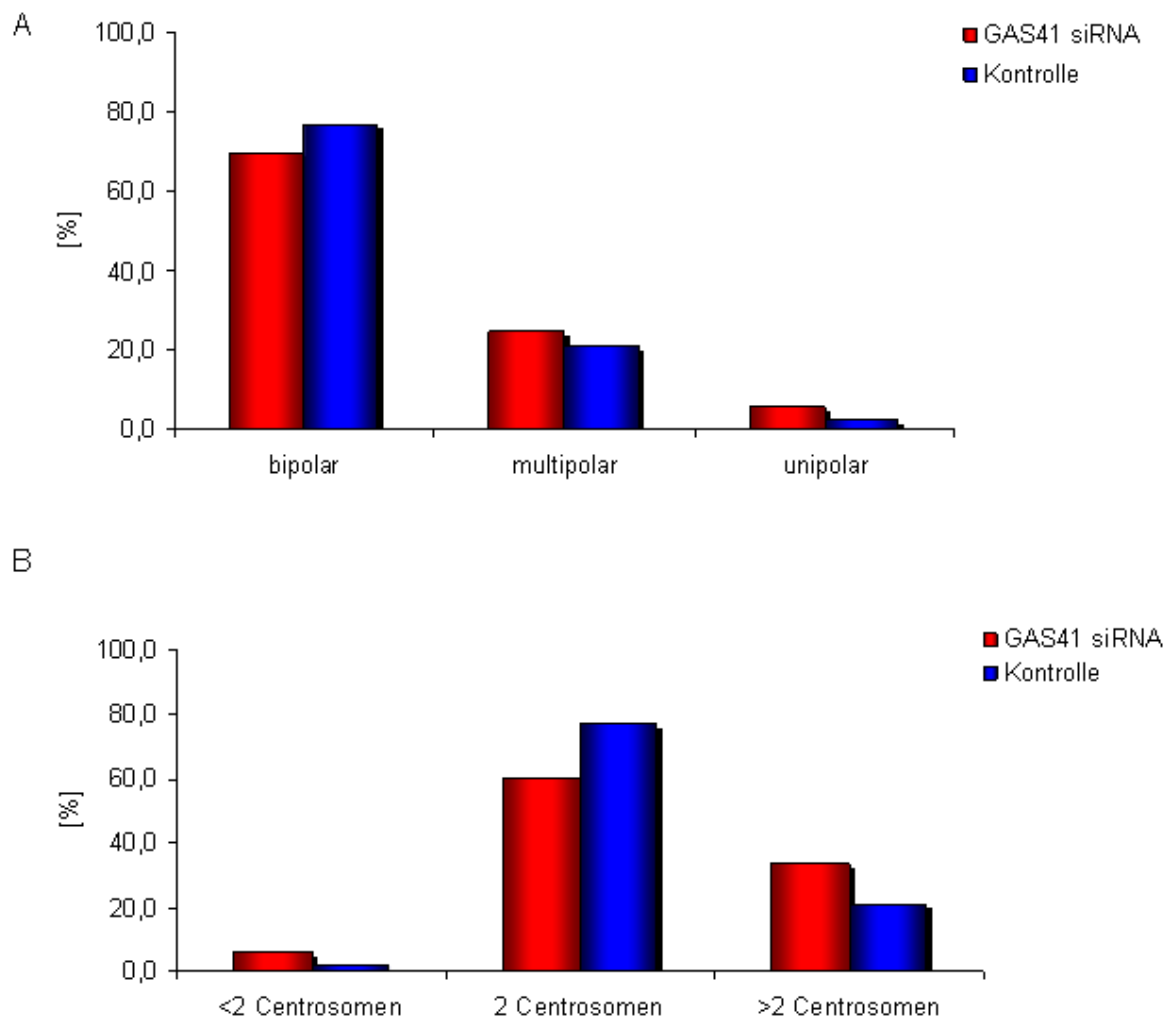


Abbildung 38: Spindelapparat und Centrosomenanzahl in mitotischen TX3868 Zellen. Synchronisierte TX3868 Zellen wurde mit GAS41 siRNA bzw. Negativkontroll-siRNA transfiziert, in der M-Phase fixiert und für die Immunfluoreszenzfärbungen von α -Tubulin, Pericentrin und DNA eingesetzt. Jeweils n=100 Mitosen wurden am Fluoreszenzmikroskop analysiert. (A) In den GAS41 depletierten TX3868 Zellen und den Kontrollen treten etwa gleich häufig sowohl bipolare, monopolare als auch multipolare Spindelapparate auf. (B) In GAS41 depletierten Zellen ist die Anzahl der Centrosomen in 34 % der Mitosen erhöht, bei den GAS41 überexprimierenden Kontrollzellen nur in 21 % der Mitosen.

In den GAS41 depletierten Zellen wurde bei 70 % der Zellen ein bipolarer Spindelapparat beobachtet. Bei 6 % der analysierten Mitosen war der beobachtete Spindelapparat monopolar. Bei den verbleibenden 24 % der Mitosen wurde ein multipolarer

Spindelapparat nachgewiesen. Bei den TX3868 Zellen, die mit Negativkontroll-siRNA transfiziert waren tritt in 77 % der Fälle ein bipolarer Spindelapparat auf. Darüber hinaus beobachtet man bei diesen Zellen in 21 % der Mitosen einen multipolaren und in 2 % der Mitosen einen monopolen Spindelapparat (Abb. 38 A).

Bei der Betrachtung der Anzahl der Centrosomen in einem Spindelapparat ergab sich folgendes Bild. In den GAS41 depletierten Zellen treten nur in 60% der Mitosen die zwei erwarteten Centrosomen auf. In 34 % der Mitosen lagen mindestens drei Centrosomen vor. Dennoch war bei 70 % der Zellen ein bipolarer Spindelapparat zu erkennen (Abb. 38 B). Diese Differenz ist auf das Centrosomenclustering zurückzuführen. Bei den GAS41 überexprimierenden TX3868 Zellen war das Auftreten des Centrosomen-clusterings bei der betrachteten Menge an Mitosen nicht nachweisbar.

6 Diskussion

GAS41 wurde von ULRIKE FISCHER *et al.* als amplifiziertes und überexprimiertes Gen in Gliomen identifiziert. Aufgrund von Sequenzanalysen wurde GAS41 als potentieller Transkriptionsfaktor charakterisiert.^{34,35} In den vergangenen Jahren konnte die Funktion von GAS41 als Transkriptionsfaktor in verschiedenen Studien bestätigt werden.^{38,39,56} Die Identifizierung verschiedener anderer GAS41 Interaktionspartner deutet jedoch auch auf Funktionen außerhalb der Transkriptionsmaschinerie hin. Einige Interaktionspartner, wie TACC1, TACC2, NuMA oder KIAA1009, werden mit Strukturen der Mitosespindel sowie der Regulation der Mitose in Verbindung gebracht.^{31-33,43} Ausgehend von diesen Proteininteraktionen stellte sich die Frage, ob auch GAS41 einen Einfluss auf den Spindelapparat oder den Ablauf der Mitose haben könnte.

6.1 GAS41 spielt eine Rolle bei der Zellteilung

Um die Funktion von GAS41 in der M-Phase aufzuklären, wurde ein RNAi vermittelter Knockdown in den Zelllinien HeLa und TX3868 etabliert. Die Durchführung initialer Genexpressionsanalysen sollte den postulierten Einfluss von GAS41 auf die Mitose nachweisen. Hierzu wurden die Expressionsprofile siRNA behandelter TX3868 Zellen erstellt. Verglichen mit technischen Replikaten ist der Einsatz biologischer Replikate mit einem größeren systematischen Fehler behaftet. Bei der Durchführung voneinander unabhängiger Experimente ergibt sich dieser beispielsweise durch verschiedene Zellpassagen, Varianzen in der Transfektionseffizienz oder in der Effizienz des Knockdowns. Die Durchführung biologischer Replikate ist daher ein essentieller Schritt für die Reproduzierbarkeit der Daten und die Allgemeingültigkeit der sich daraus ergebenden biologischen Aussage.⁵⁹

Zur Genexpressionsanalyse der Glioblastomzellen wurden jeweils drei biologische Replikate erstellt. Diese biologischen Triplikate wurden parallel zur Hybridisierung

der *Whole Genome* Microarrays, HG U133 Plus 2.0, eingesetzt. Die Analyse der Rohdaten ergab eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den GAS41 depletierten Zellen bzw. den Kontrollzellen, wodurch die Reproduzierbarkeit der Knockdownexperimente belegt werden kann. Zur Auswertung der Genexpressionsdaten wurden die Triplikate geclustert. Nachfolgend wurden nur solche Expressionsdaten für die Analyse verwendet, deren Expression in allen drei Replikaten signifikant erhöht bzw. erniedrigt war. Auf diese Weise wurde ein Set von 346 analysierten Sequenzen erstellt, deren Expression durch den Knockdown von GAS41 signifikant ($p < 0,05$) um mindestens den Faktor 1,7 erhöht bzw. erniedrigt wurde.

Mit Hilfe des internet-basierten Programms GeneTrail,⁵⁰ wurden die Datensätzen auf statistisch signifikante Häufungen von Genen der gleichen biologischen Kategorie untersucht. Diese statistische Betrachtung ergab, dass der Knockdown von GAS41 zu einer signifikanten Expressionsänderung von Proteinen mit *coil* Strukturen führt. Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören auch das Centromerprotein CENPE, das centrosomale TACC2, welches mit GAS41 interagiert, und die Tyrosin-Kinase WEE1, die am G₂/M-Checkpoint den Eintritt der Zelle in die Mitosephase reguliert.⁶⁰ Die Analyse der *Gene Ontology* (GO) Kategorien ergab eine statistische signifikante Häufung von deregulierten Genen, die an der Ausbildung der Metaphaseplatte, der Anordnung der Chromosomen und dem Übergang in die Anaphase beteiligt sind. Die Ergebnisse der Mikroarrayanalysen stehen damit im Einklang mit den Ergebnissen der verschiedenen Interaktionsstudien und bestätigen die postulierte Funktion von GAS41 in der Mitose.

6.2 Viabilität und Zellzyklusprogression in GAS41 depletierten Zellen

Der Knockdown von Proteinen, die eine Rolle in einer Phase des Zellzyklus spielen, kann sowohl zu einer Abnahme der Zellviabilität als auch zu einem Zellzyklusarrest führen.

Für den RNAi vermittelten Knockdown von GAS41 wurde in HeLa und in TX3868 Zellen die Zellviabilität mit colorimetrischen Methoden untersucht. Sowohl mit der klassischen Trypanblaufärbung, als auch mit dem WST-1 Assay konnte in keiner der Zelllinien ein Einfluss des Knockdowns auf die Zellviabilität festgestellt werden.

Zur Betrachtung der Zellzyklusphasen in GAS41 depletierten Zellen wurden Propidiumiodidfärbungen an HeLa und TX3868 Zellen durchgeführt. Durch die interkalierenden Eigenschaften dieses Fluoreszenzfarbstoffes ist es möglich eine Zellpopulation am Durchflusszytometer anhand ihres DNA-Gehaltes in verschiedene Subpopulationen zu unterteilen. Die Messung der Fluoreszenzintensität ergibt dabei für beide Zelllinien eine charakteristische Kurve mit zwei Maxima. Das erste Maximum umfasst die Zellen der G₁-Phase mit einem einfachen Chromosomensatz (2n). Das zweite Maximum schließt die Zellen der G₂/M-Phase ein, die einen doppelten Chromosomensatz (4n) aufweisen. Zwischen beiden Maxima befinden sich die Zellen der S-Phase, deren Fluoreszenzintensität mit der semikonservativen Replikation des Genoms zunimmt. Sowohl in GAS41 depletierten Zellen als auch in den Kontrollen der beiden Zelllinien konnte kein Unterschied in der Verteilung der Zellpopulationen nachgewiesen werden. Der Knockdown von GAS41 führt demnach nicht zu einem Arrest in der G₂/M-Phase. Daraus ist zu folgern, dass die GAS41 depletierten Zellen in die M-Phase eintreten können und diese auch erfolgreich durchlaufen. Darüber hinaus wird auch kein Anstieg der G₁-Population verzeichnet, was darauf hindeutet, dass die GAS41 depletierten Zellen nach der erfolgten Zellteilung wieder uneingeschränkt in den Zellzyklus eintreten können.

Des Weiteren lässt sich aus der Zellzyklusanalyse und den Viabilitätstests der beiden Zelllinien ableiten, dass durch den Knockdown von GAS41 keine apoptotischen Prozesse in HeLa und TX3868 Zellen ausgelöst werden. Aufgrund der DNA-Fragmentierung würde sich der Eintritt der Apoptose in der Propidiumiodidfärbung durch die Ausbildung einer deutlichen Sub-G₁-Population darstellen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Analysen an anderen Zelllinien. In der Hühnerzelllinie DT40 wurde GAS41 als essentielles Gen identifiziert, dessen Knockout die Zellviabilität beeinflusst.⁴⁶ Der RNAi vermittelte Knockdown von GAS41 in der Osteosarkomzelllinie U2OS führte zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase.³⁹ Beide Zelllinien weisen, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien HeLa und TX3868, eine funktionelle wildtypische Expression von p53 auf.⁶¹⁻⁶³ In der Cervixkarzinomzelllinie HeLa dagegen, wird die Expression von p53 durch das E6 Protein des Papillomavirus HPV-18 reprimiert.⁶³⁻⁶⁵ Die Glioblastomzelllinie TX3868 weist ein Amplikon der chromosomalen Region 12q13-15 auf, welches neben GAS41 auch das Gen MDM2 enthält. Beiden Gene sind in dieser Zelllinie nicht nur amplifiziert, sondern auch überexprimiert.³⁴ MDM2 wirkt als inhibitorischer Regulator von p53, indem es die Acetylierung von p53 inhibiert und zu dessen Degradation führt.⁶⁶ Durch die Überexpression von MDM2 in der eingesetzten Glioblastomzelllinie ist davon auszugehen, dass auch hier die Expression von p53 reprimiert ist. Unter normalen Bedingungen wirkt GAS41 als Repressor des p53 Signalweges.³⁹ Der Knockdown von GAS41 führt in diesem Falle zum Zellzyklusarrest bzw. zum Zelltod. In den in dieser Arbeit gewählten Zelllinien, scheint GAS41 diese Repressorfunktion aufgrund der Deregulation des p53 Signalweges nicht erfüllen zu können, weshalb durch den Knockdown weder die Viabilität noch die Zellzyklusprogression beeinflusst würden.

6.3 Centrosomale Lokalisation von GAS41

Die Interaktionen von GAS41 mit den centrosomalen Proteinen NuMA und KIAA1009^{19,28} sowie den Centrosomen- und Spindelproteine TACC1 und TACC2^{32,43} lassen vermuten, dass es sich auch bei GAS41 um ein centrosomales Protein handeln könnte. An Interphasezellen war bisher nur die nukleäre Lokalisation, unter Ausspa-

rung der Nukleoli beschrieben worden.³³ Zum Nachweis dieser zellulären Lokalisation wurden Immunfluoreszenzanalysen mit einem polyklonalen GAS41 Antikörper durchgeführt. Um die Lokalisation von GAS41 an den Centrosomen nachzuweisen, wurde GAS41 als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Immunfluoreszenzanalysen mit Pericentrin Antikörpern konnten zeigen, dass GAS41 nicht nur während der Interphase, sondern auch im Verlauf der Mitose an den Centrosomen bzw. Spindelpolen lokalisiert ist. Die Lokalisation von eigentlich nukleären Proteinen in der pericentriolaren Matrix bzw. an den Centrosomen ist durchaus kein seltenes Ereignis. Durch die Interaktion mit NuMA, TACC1, TACC2 und KIAA1009^{31-33,43} stehen für GAS41 schon vier Interaktionspartner zur Verfügung, die eine centrosomale Lokalisation ermöglichen. Diese Interaktionen fügen sich an eine Reihe bereits bekannter Verbindungen von nukleären und centrosomalen Proteinen. Die TACC Proteine interagieren mit der Histon-Acetyltransferase hGCN5L2,⁶⁷ das Kinesinmotorprotein hEg5 interagiert mit dem NCOR Repressorkomplex und Pericentrin interagiert mit Proteinen des Nucleosome-Remodelling Komplex NuRD und des SWI/SNF Komplexes.⁶⁸ All diese Verbindungen von Kernproteinen und centrosomalen Proteinen deuten darauf hin, dass diese sich gegenseitig beeinflussen können. So sind centrosomale Proteine über die Interaktion mit Chromatin-Remodelling Komplexen an der Genexpression beteiligt, und Kernproteine an der Regulation der Funktionalität der Centrosomen.

Centrosomen sind die Hauptorganisationszentren der Mikrotubuli der Zelle, die als Teil des Cytoskeletts eine Rolle bei der Ausbildung der Zellform und Zellpolarität spielen. Während der Zellteilung sind sie maßgeblich am Aufbau des Spindelapparates beteiligt.^{5,6} Da GAS41 während des gesamten Zellzyklus an den Centrosomen lokalisiert ist, stellt sich die Frage welchen Einfluss der Knockdown auf die Organisation der Mikrotubuli ausübt. Hierzu wurden Immunfluoreszenzanalysen an Interphasezellen durchgeführt, die zeigten, dass der Knockdown keinen Einfluss auf die Morphologie von HeLa und TX3868 Zellen hat. Die Zellen zeigen keinerlei Veränderungen in Form und Größe. An mitotischen Zellen konnte dagegen festgestellt werden, dass der Knockdown des centrosomalen Proteins eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Mitosespindel spielen muss.

6.4 Multipolare Spindelapparate

In HeLa Zellen wird die Ausbildung des Spindelapparates durch den Knockdown von GAS41 stark beeinflusst. Dabei konnten hauptsächlich zwei Mitosephänotypen beobachtet werden. In einem Teil der Zellen kommt es zur Ausbildung bipolarer Spindelapparate, die eine Fehlanordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte aufweisen. Einzelne Chromosomen sind nicht mit Mikrotubuli verbunden und werden nicht zusammen mit den anderen Chromosomen in der Äquatorialebene angeordnet. Diese *unaligned chromosomes* liegen meist frei verteilt in der Nähe der Spindelpole.⁶⁹

Neben der fehlerhaften Chromosomenanordnung tritt in GAS41 depletierten HeLa Zellen ein weiterer Spindelphänotyp auf. Bei diesen Zellen beobachtet man die Ausbildung multipolarer Spindelapparate. Die Chromosomen liegen dabei alle in der Äquatorialebene zwischen den Spindelpolen angeordnet. Ursache für die Entstehung multipolarer Spindelapparate ist die Ausbildung überzähliger Mikrotubuliorganisationszentren (MTOC). Durch den Knockdown des centrosomalen Proteins GAS41 kommt es in diesen Zellen zu einer Amplifikation der Centrosomen.

Die quantitative Analyse dieser Spindelphänotypen ergab, dass der Knockdown von GAS41 in etwa 20 % der Mitosen zur Ausbildung multipolarer Spindelapparate führt. Darüber hinaus tritt in über 10 % der Mitosen eine unvollständige Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene auf. Rund ein Drittel der Mitosen wird also durch die Repression der GAS41 Expression beeinflusst.

Die Spezifität der Ausbildung dieser Mitosephänotypen, als Folge der GAS41 Repression, konnte durch den Knockdown mit einer unabhängigen siRNA nachgewiesen werden. Artificielle Effekte auf die Ausbildung der Spindelapparate können damit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte die Ausbildung multipolarer Spindelapparate in GAS41 depletierten TX3868 verifiziert werden. Hier traten in rund einem Viertel der Mitosen multipolare Spindelapparate auf. In der Glioblastomzelllinie konnte darüber hinaus noch ein weiterer Effekt des GAS41 Knockdown auf die Aus-

bildung des Spindelapparates festgestellt werden. Hier führte die Repression von GAS41 auch zur Ausbildung monopolarer Spindeln.

Da GAS41 in der Glioblastomzelllinie TX3868 amplifiziert und überexprimiert vorliegt, stellt sich hier die Frage, ob auch die Überexpression des Proteins einen Einfluss auf die Ausbildung des Spindelapparates haben kann.

In TX3868 Zellen deren GAS41 Überexpression nicht durch RNAi Effekte verringert wurde, konnten ebenfalls multipolare und monopolare Spindelapparate beobachtet werden. Dabei treten auch hier die multipolaren Spindelapparate in mehr als 20 % der Mitosen auf. Auch in anderen Tumorzelllinien werden multipolare Spindeln bei etwa 20 % der Mitosen beobachtet. Darunter befinden sich beispielsweise die Mundkrebszelllinien UPCI:SCC078 und UPCI:SCC103, die eine Überexpression von NuMA aufweisen, aber auch die Leberkarzinomzelllinie SK-Hep1 oder die Sarkomzelllinie MES-SA.⁷⁰

Der Effekt der GAS41 Überexpression auf die Ausbildung des Spindelapparates konnte in HeLa Zellen verifiziert werden. Durch die Expression eines HA-GAS41 Fusionsproteins wurde eine Überexpression von GAS41 verursacht. Hierdurch konnten die gleichen Mitosephänotypen hervorgerufen werden, die bereits für GAS41 depletierte HeLa Zellen beschrieben wurden. Durch die Überexpression konnte, in nahezu gleichem Maße, die Ausbildung multipolarer Spindelapparate und das Auftreten von *unaligned chromosomes* beobachtet werden.

In beiden Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass GAS41 grundsätzlich entscheidend für die Integrität der Mitosespindel ist. Sowohl die Überexpression als auch die Depletierung des centrosomalen Proteins beeinflussen die Anzahl der Centrosomen in der Zelle.

Ähnliche Effekte konnten bereits für das GAS41 interagierende Protein NuMA nachgewiesen werden. Die Mikroinjektion von NuMA Antikörpern in das Cytoplasma von Interphasezellen führte zur Ausbildung multipolarer Spindelapparate und zur Entstehung von Mikrokernen in den entstehenden Tochterzellen.^{29,71,72} Der RNAi vermittelte Knockdown von NuMA in HeLa Zellen führte dagegen häufig zur Entstehung unreifer Spindelapparate, zu einer erhöhten Anzahl an Prometaphasezellen sowie zum häufigen Auftreten von Anordnungsstörungen der Chromosomen,⁷³ die auch für den Knockdown von GAS41 in HeLa Zellen beobachtet wurde.

Auch die Überexpression von NuMA hat einen Einfluss auf die Integrität des Spindelapparates. In den Mundkrebszelllinien UPCI:SCC078 und UPCI:SCC103 wird NuMA stark überexprimiert. Diese beiden Zelllinien sind gekennzeichnet durch das Auftreten multipolarer Spindeln in etwa 20 % der Mitosen. Eine Reduktion der Überexpression mittels siRNA führt in diesen Zelllinien zu einem Rückgang der multipolaren Spindeln und zur Wiederherstellung des bipolaren Phänotyps.⁷⁰ Die Überexpression von NuMA in diesen Tumorzellen beeinflusst die Ausbildung des Spindelapparates in ähnlichem Maße wie die GAS41 Überexpression in der Glioblastomzelllinie TX3868.

NuMA ist ein essentieller Faktor für die Ausbildung und die Aufrechterhaltung einer funktionellen Mitosespindel. Die Injektion von Antikörpern in der Prophase und Prometaphase des Zellzyklus, führt in HeLa Zellen zu einer Auflösung der Spindeln und zur Ausbildung aberranter Mikrotubulianordnungen.⁷² Die Injektion nach Einsetzen der Anaphase zeigt, dass NuMA in den späteren Stadien der Mitose eher eine un-

tergeordnete Rolle zu spielen scheint. Daraus lässt sich vermuten, dass NuMA einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilisierung der Spindelpole ausübt. Diese Stabilisierung hat zu Beginn der Mitose, bei der Ausbildung der Spindel sowie der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene, einen stärkeren Effekt, als auf die Segregation der Chromosomen in der Anaphase.²⁸ Wie die Lokalisation von NuMA an den Centrosomen nach der Freisetzung aus dem Kern zustande kommt, ist bisher allerdings noch unklar. Man vermutet, dass NuMA eine direkte Affinität zu anderen centrosomalen Proteinen aufweisen könnte, die NuMA nach seiner Freisetzung zu den Spindelpolen hinziehen.^{74,75} An diesem Mechanismus könnte das NuMA interagierende Protein GAS41 beteiligt sein, das in dieser Arbeit als neues centrosomales Protein identifiziert wurde.

6.5 Centrosomenamplifikation und Centrosomenclustering

Die Ausbildung multipolarer Spindelapparate geht mit einer überzähligen Anzahl an Centrosomen einher. Als Ursache für diese Centrosomenamplifikation kommen verschiedene Mechanismen in Betracht. Eine fehlerhafte Centrosomenduplikation (*overduplication*) kann durch mehrere Verdopplungsprozesse innerhalb einer S-Phase zur Entstehung überzähliger Centrosomen führen. Eine weitere Möglichkeit zur Centrosomenduplikation ist das Ausbleiben der Zellteilung infolge einer abgebrochenen Mitose. Die daraus entstehenden Zellen sind tetraploid und enthalten während der G₁-Phase bereits zwei Centrosomen. Ein dritter Mechanismus zur Entstehung überzähliger Centrosomen in einer Zelle ist die Zellfusion. Je nach Zellzyklusstadium der verschmelzenden Zellen, weisen die entstehenden Fusionen ein unterschiedliches Verhältnis von Genom zu Centrosomenzahl auf.⁷⁶ Auch die de novo Synthese stellt einen Mechanismus zur Ausbildung überzähliger Centrosomen dar (Abb. 39).⁷⁷⁻⁷⁹

Die Ausbildung des Spindelapparates kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: dem Centrosomen-abhängigen Weg und dem Chromosomen-abhängigen Weg. Beim Centrosomen-abhängigen Weg erfolgt die Zusammensetzung der Mikrotubuli durch

das Eindringen der Centrosomen in die Kernregion. Die Centrosomen dienen als Ausgangspunkt für die Polymerisation. Der Chromosomen-abhängige Weg ist völlig unabhängig von den Centrosomen. Hier entsteht um die Chromosomen herum ein Konzentrationsgradient der GTPase Ran, die zur Freisetzung verschiedener Faktoren, wie NuMA, oder TPX2 führt. Diese Faktoren führen zum Zusammenbau der Spindel aus einem Pool an Mikrotubuli.^{3,80} Diesen Spindeln fehlen die herkömmlichen Centrosomen an den Polen. Stattdessen weisen sie so genannte Pseudocentrosomen aus verschiedenen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen auf. Diese Proteine lassen sich auch in der pericentriolaren Matrix der Centrosomen nachweisen.³ Dieser Mechanismus ermöglicht in acentrosomalen Zellen, wie Pflanzenzellen oder Oocyten, die Ausbildung einer Mitosespindel.⁸⁰ Er existiert jedoch auch in Zellen die funktionelle Centrosomen enthalten. Nach der Mikrodisektion von Centrosomen aus Säugerzellen kommt es dennoch zur Ausbildung einer funktionellen bipolaren Mitosespindel.^{81,82} Dadurch wird deutlich, dass centrosomentragende Zellen einen Centrosomen-unabhängigen Weg zur Ausbildung einer Mitosespindel besitzen, der ihnen als Backup Mechanismus bei Verlust oder Inaktivierung der Centrosomen zur Verfügung steht.

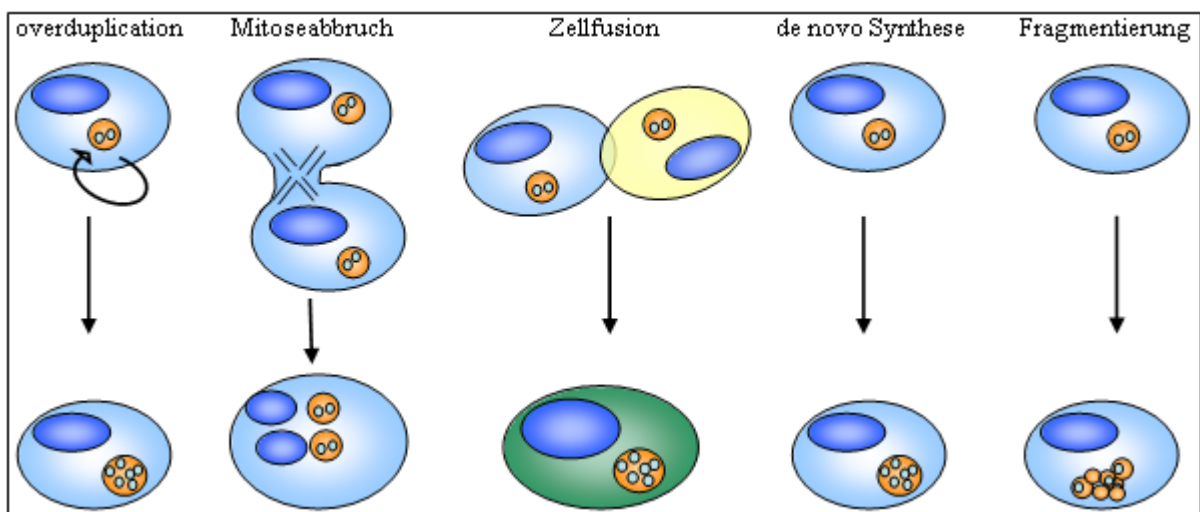


Abbildung 39: Mechanismen zur Centrosomenamplifikation. Die Entstehung überzähliger Centrosomen in einer Zelle kann durch verschiedene Ereignisse hervorgerufen werden. Hierzu zählen die übermäßige Duplikation der Centrosomen in der S-Phase, der unvollständige Ablauf einer Mitose, die Zellfusion, die *de novo* Synthese und die Fragmentierung der vorhandenen Centrosomen.

Die Änderung der GAS41 Expression führt in HeLa und in TX3868 Zellen zur Ausbildung einer multipolaren Spindel. An den Polen dieser Spindeln könnten sich funktionelle Centrosomen befinden, die über einen der beschriebenen Mechanismen zur Centrosomenamplifikation entstanden sind. Zum anderen wäre es möglich, dass die Pole dieser Spindeln lediglich Proteinen der pericentriolaren Matrix enthalten. Als Ursache für die Entstehung solcher Spindelapparate könnte eine, durch die Deregulation der GAS41 Expression verursachte, Fragmentierung der Centrosomen^{83,84} erfolgt sein (Abb. 39).

Um die Entstehung der multipolaren Spindelapparate aufzuklären, ist es notwendig sich den Centrosomzyklus der GAS41 depletierten bzw. überexprimierenden Zellen *in vivo* zu betrachten. Die wahrscheinlichsten Mechanismen, die hier zur Ausbildung multipolarer Spindeln führen, sind die übermäßige Centrosomenduplikation in der S-Phase sowie die Fragmentierung der Centrosomen. In den durchgeführten Lebendzellanalysen konnten nur vereinzelt Zellfusionen oder Mitoseaborte beobachtet werden, weshalb diese Mechanismen als Ursache für Ausbildung der multipolaren Spindeln zunächst vernachlässigt werden können. Die *de novo* Synthese von Centrosomen wurde bisher nur selten beschrieben. Häufiger kommt es zur überzähligen Centrosomenduplikation in der S-Phase. In diesem Fall sollte die Zelle in der Interphase unmittelbar vor Eintritt in die Mitose bereits mehrere vollständige Centrosomen aufweisen. Im Fall der Centrosomenfragmentierung ist die Anzahl der potentiellen Spindelpole jedoch abhängig vom Zeitpunkt, zu dem die Fragmentierung auftritt. Mit der durchgeführten Färbung pericentriolarer Proteine lässt sich hier keine Aussage über die Vollständigkeit der Spindelpole treffen. Für den Mechanismus der Fragmentierung spräche jedoch die Tatsache, dass GAS41 eine *coiled-coil* Domäne enthält und mit vielen anderen centrosomalen *coiled-coil* Proteinen interagiert. Für NuMA, eines der größten bekannten *coiled-coil* Proteine, konnte gezeigt werden, dass die Deregulation der NuMA Expression einen strukturellen Einfluss auf die Centrosomen ausübt. Eine Überexpression führt beispielsweise in Zellen mit überzähligen Centrosomen dazu, dass diese nicht mehr in einem Spindelpol zusammengeführt werden können.⁷⁰ Die *coiled-coil* Proteine der pericentriolaren Matrix bilden ein strukturelles Netzwerk, das

die Rekrutierung weitere Proteine zu den Centrosomen ermöglicht. Die Störung dieses hoch komplexen Netzwerkes durch die Deregulation der Genexpression führt zur Zerstörung der Integrität der Centrosomen und zur Ausbildung anormaler Mitosespindeln.⁸⁵ Sowohl die Überexpression als auch die Depletion von GAS41 könnten die Zusammensetzung der pericentriolaren Matrix so stark beeinflussen, dass sie zur Fragmentierung der Centrosomen führen könnten.

Das Auftreten überzähliger Centrosomen kann von der Zelle, zur Aufrechterhaltung ihrer genetischen Stabilität, durch den Mechanismus des Centrosomenclustering kompensiert werden. Auch in vielen Tumorzellen ist dieser Mechanismus bekannt.^{86,87} Das bekannteste Beispiel hierfür ist die murine Neuroblastomzelllinie N1E-115 in der nahezu 100 % der Zellen überzählige Centrosomen aufweisen. Trotzdem kommt es hier fast ausschließlich zu bipolaren Teilungen, nachdem die zusätzlichen Centrosomen auf zwei Spindelpole verteilt wurden.⁸⁶ Auch in humanen Tumorzelllinien mit Centrosomenamplifikationen in einer großen Zellfraktion, wie der Brustkrebszelllinie MDA-231, konnte das Auftreten des Centrosomenclustering beobachtet werden.⁸⁷ Die Arbeitsgruppe um RENATA BASTO konnte 2008 erstmals das Centrosomenclustering *in vivo* nachweisen.⁸⁸ In einer *Drosophila* Linie, die zusätzliche Centrosomen in ~60 % der somatischen Zellen aufwies, konnte beobachtet werden, dass es in Zellen mit ursprünglich multipolaren Spindelapparaten nach umfangreichen Umlagerungen zur Ausbildung bipolarer Spindeln kam.⁸⁸ Der molekulare Mechanismus, der dem Centrosomenclustering zu Grunde liegt, ist bisher noch weitestgehend ungeklärt. In ersten Arbeiten wurde vermutet, dass die MT-assoziierten Proteine Dynein und NuMA an diesem Mechanismus beteiligt sein könnten.^{70,89} SUSANA GODINHO und MIJUNG KWON konnten in einem genomweiten RNAi Screening in der *Drosophila* Zelllinie S2 einen großen Beitrag zur Aufklärung dieses Mechanismus leisten.⁸⁷ Insgesamt konnten über hundert Proteine identifiziert werden, die zum Gelingen des Clustering beitragen. Ein Teil der identifizierten Proteine spielt eine Rolle beim *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC). Durch eine Verzögerung des Anaphaseintritts wird so der Zelle genug Zeit gegeben die notwendigen Umstrukturierungen zu bewerkstelligen. Das Clustering an sich erfolgt unter Beteiligung der Spindelmikrotubuli und des Aktinske-

letts des Zellkortex. Die Identifizierung von Proteinen des Aktin-Cytoskeletts deutet darauf hin, dass für den Ablauf des Centrosomenclustering auch die Zelladhäsion einen Einfluss haben kann. Für Tumorzellen bedeutet dies, dass die Mikroumgebung der Tumorzellen die Ausbildung einer bipolaren Spindel in Zellen mit zusätzlichen Centrosomen beeinflussen könnte.^{87,90}

Das Centrosomenclustering konnte in HeLa und TX3868 Zellen in Folge einer deregulierten GAS41 Expression beobachtet werden. Ob GAS41 an diesem Mechanismus durch direkte Einwirkung beteiligt ist, oder der Effekt durch einen involvierten Interaktionspartner, wie NuMA, vermittelt wird, konnte im Rahmen dieser Studien nicht aufgeklärt werden.

6.6 Anormale Spindeln und Mitosedauer

Chromosomen, deren Kinetochore nicht mit Mikrotubuli verknüpft sind, generieren ein Signal, welches das Voranschreiten der Mitose verhindert. Eine Vielzahl an Spindel-Checkpoint Proteinen, wie MAD/BUB, ist für diese Verzögerung verantwortlich. Deren Aktivierung führt zur Hemmung des Anaphase-Promoting-Komplexes. Erst wenn alle Schwesterchromatiden mit dem Spindelapparat verbunden sind, wird das *wait-anaphase* Signal aufgehoben und die Zelle kann in die Anaphase übergehen. Hierzu muss zunächst der Anaphase-Promoting-Komplex aktiviert werden. Dies hat zur Folge, dass Securin in einer ubiquitin-abhängigen Degradation abgebaut wird und die aktive Protease Separin aus dem Securin-Separin-Komplex freigesetzt wird. Separin katalysiert die Spaltung der Cohesin-Komplexe, welche die Schwesterchromatiden zusammenhalten. Die nun getrennten Schwesterchromatiden können entlang der Spindelachsen zu den Polen gezogen werden.¹⁴ Dieser *Spindel-Assembly-Checkpoint* (SAC) wird durch das *MT-Attachment*, woran Motorproteine und MT-assoziierte Proteine beteiligt sind, sowie durch die entstehende Zugspannung an den Centromeren, kontrolliert.¹⁴ Die Existenz dieses Spindel-Checkpoints ist essentiell für den Ablauf der Zellteilung.

Der *Spindel-Assembly-Checkpoint* (SAC) verzögert die Mitose solange, bis alle Kinetochore stabil mit MT verknüpft sind. Der SAC kann hierbei bis zu mehreren Stunden andauern und ist essentiell in höheren Eukaryonten.⁹¹ Die Anknüpfung der Mikrotubuli an die Kinetochore erfolgt nach dem „*search and capture*“ Mechanismus, sobald die MT nach dem Zusammenbruch der Kernhülle in die Kernregion eindringen.⁹² Ausgehend von diesem Mechanismus wurde vermutet, dass der Spindelaufbau durch das Vorkommen überzähliger Chromosomen bzw. Kinetochore verzögert wird. Für das Auftreten zusätzlicher Centrosomen wurde dagegen ein beschleunigter Spindelaufbau vermutet.⁹³

Obwohl die Aufklärung der Mechanismen, die zur Ausbildung multipolarer Spindeln führen, in den letzten Jahren stark vorangetrieben wurde, ist bislang noch wenig darüber bekannt, wie sich die Zunahme der Chromosomen- und/ oder Centrosomenzahl auf die Dauer der Mitose auswirkt. Die wenigen bisher publizierten Studien kamen bisher zu dem Ergebnis, dass weder die Chromosomenzahl^{94,95} noch die Anzahl der Centromere⁹⁶ die Mitose stark verlängern. Die Arbeitsgruppe um COLY RIEDER konnte im vergangenen Jahr, in der ersten systematischen Untersuchung zur Mitosedauer zeigen, dass beide Ereignisse die Mitose durch eine verzögerte Passage des SAC verlängern können.⁹³ An Telomerase-immortalisierten Retina-Pigmentepithel Zellen (RPE-1), die durch eine Inhibierung der Cytokinese einen doppelten Chromosomen- und Centrosomensatz enthielten, konnte gezeigt werden, dass sich die Dauer der multipolaren Mitose, im Vergleich zu RPE-1 Zellen mit normaler Chromosomen- und Centrosomenanzahl, mehr als verdoppelte. Der Vergleich der Mitosedauer dieser diploiden Zelllinie gegenüber HeLa Zellen, deren Chromosomensatz mit 80-85 Chromosomen pro Zelle als hypertriploid bezeichnet wird, bestätigt die Annahme, dass eine erhöhte Chromosomenzahl die Dauer der Mitose grundsätzlich verlängern kann. Darüber hinaus konnten RIEDER *et al.* zeigen, dass auch die Zunahme der Centrosomenzahl zu einer verzögerten Mitose führen kann. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den 1997 von RIEDER veröffentlichten Studien, wonach die Mitose weder in Seeigelzygoten, noch in der Vertebratenzelllinie PtK1 durch die Ausbildung multipolarer Spindeln maßgeblich verzögert wird.⁹⁶ Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz

könnte in der Komplexität der Reorganisationen liegen, die in der jeweiligen Zelllinie erforderlich sind, um eine multipolare oder bipolare Teilung zu ermöglichen.⁹¹

Nach dem Knockdown von GAS41 in Hela H2B-GFP Zellen, konnten mit Hilfe der Lebendzellmikroskopie die beiden induzierten Phänotypen, multipolare Spindelapparate und *unaligned chromosomes*, unter Berücksichtigung der Dauer analysiert werden. In allen Zellen kam es zur Ausbildung eines funktionellen Spindelapparates.

Im Falle der bipolaren Mitosen konnte eine mittlere Mitosedauer von 63 ± 16 min ermittelt werden. Beim Auftreten von *unaligned chromosomes* würde man eine verzögerte Mitosedauer erwarten, da die Passage des SAC erst nach der MT-Verknüpfung aller Kinetochore erfolgt. Wie vermutet konnte für diesen Phänotyp eine verlängerte Mitosedauer von 89 ± 13 min ermittelt werden. Der Eintritt in die Anaphase durch die Aktivierung des Anaphase-Promoting-Komplexes erfolgt hier erst, wenn alle Chromosomen in der Äquatorialebene angeordnet sind.

Im Falle der multipolaren Spindelapparate ließ sich zunächst feststellen, dass der Knockdown von GAS41 überwiegend zur Bildung tripolarer Metaphaseplatten führte. Hierbei kam es auch zum Centrosomenclustering, wodurch die Anzahl der möglichen Spindelpole reduziert wurde. Auch in anderen Zelllinien, die durch ihren hohen Anteil multipolarer Mitosespindeln charakterisiert sind, wurde bereits festgestellt, dass die Mehrzahl der multipolaren Zellteilungen tri- oder tetrapolar ist.⁹⁷ In fast allen betrachteten Fällen tripolarer Mitosen erfolgte die Zellteilung unter Ausbildung von drei Tochterzellen. Hierfür konnte eine mittlere Mitosedauer von 75 ± 8 min ermittelt werden. Verglichen mit der Dauer einer bipolaren Zellteilung handelt es sich hier lediglich um einen leichten Anstieg. Dieses Ergebnis steht eher mit RIEDERS 1997 veröffentlichtem Ergebnis im Einklang, dass die Zahl der Centrosomen keinen Einfluss auf den Spindelcheckpoint hat bzw. dass es keinen weiteren Checkpoint gibt, der die Architektur der Spindel berücksichtigt.⁹⁶ Im Falle der durch den GAS41 Knockdown induzierten multipolaren Spindeln, ist die Anordnung der Kinetochore innerhalb der entstehenden Metaphaseplatte ähnlich wie bei einer bipolaren Spindel, wodurch die MT-

Verknüpfung erleichtert wird. Darüber hinaus ist die Anordnung der Spindelachsen in der Mehrzahl der Fälle nahezu symmetrisch, was die Segregation der Chromosomen und die Zellteilung scheinbar vereinfacht. Durch den symmetrischen Aufbau müssen keine umfangreichen Reorganisationen erfolgen, die zu einer Mitoseverzögerung führen könnten.

Dennoch kommt es bei der Verteilung der Chromosomen dieser hypotriploiden Zellen vermutlich nicht zu einer euploiden Segregation, d.h. die homologen Chromosomen werden nicht gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. DAVID GISSELSSON konnte mit Hilfe eines Multiphotonenlasers eine Fluoreszenz-quantifizierung zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der Tochterzellen durchführen und kam zu dem Ergebnis, dass die Verteilung der Chromosomen eine hohe Variabilität aufweist (18-46 % bei tripolaren Mitosen).⁹⁷ An einer durch GAS41 Depletion induzierten tripolaren Mitose wurde exemplarisch die Fluoreszenzintensität der drei Tochterzellen ermittelt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte eine ähnliche Variabilität von 26-41 % beobachtet werden.

Häufig waren in den GAS41 depletierten Zellen mehr als drei Centrosomen sichtbar. Zur Ausbildung einer tripolaren Spindel kam es hier meist vor dem Eindringen der Mikrotubuli in die Kernregion zum Centrosomenclustering, so dass die Ausbildung der Metaphaseplatte ohne umfassende Reorganisation möglich war. Vereinzelt konnte jedoch beobachtet werden, dass es in der Prometaphase zu einem Switch der Spindelpolarität kam. Durch Centrosomenclustering entstand so beispielsweise eine tripolare Spindel aus einer ehemals tetrapolaren. Mit Hilfe der Life Cell Mikroskopie konnte die vollständige Teilung einer Zelle beobachtet werden, deren tripolarer Spindelapparat während der Prometaphase zu einer normalen bipolaren Spindel umgewandelt wurde. Zu Beginn der Mitose waren hier die Spindelachsen nicht symmetrisch verteilt, was dazu führte, dass die Centrosomen zweier näher beieinander liegender Spindelpole geclustert wurden. Die nachfolgenden Umordnungen der Mikrotubuli sowie die bipolare Verknüpfung der Chromosomen führten dazu, dass die Dauer der Mi-

tose mehr als verdoppelt wurde. Dieses Beispiel untermauert die Vermutung, dass eine Verzögerung der Mitosedauer unabhängig von der Centrosomenzahl ist, sondern von der Komplexität der notwendigen Reorganisationen abhängt.

6.7 Spindeldefekte und Tumorgenese

Die Theorie, dass das Auftreten überzähliger Centrosomen zur Tumorgenese führen kann, wurde 1902 bereits von THEODOR BOVERI aufgestellt.⁹⁸ Das Auftreten überzähliger Centrosomen korreliert mit der Ausbildung multipolarer Spindelapparate. In Tumorzellen, in denen die Centrosomenamplifikation ein häufiges Phänomen ist, tritt dagegen oftmals eine bipolare Zellteilung ein. Ursache für dieses Paradoxon ist die Entwicklung eines Mechanismus zum Centrosomenclustering.^{17,99} Zusätzliche Centrosomen können einen entscheidenden Beitrag zur Tumorgenese leisten, indem sie die genetische Instabilität durch multipolare oder asymmetrische Zellteilungen erhöhen.^{76,98-100} Dies wird deutlich durch die starke Korrelation zwischen Centrosomenamplifikation, Aneuploidie und Malignität der Tumore bzw. der Tumorzelllinien.^{99,100} Darüber hinaus konnte kürzlich *in vivo* gezeigt werden, dass das Auftreten von zusätzlichen Centrosomen *per se* zur Tumorgenese führen kann.⁸⁸

GAS41 wurde ursprünglich mittels Mikrodiskktion aus der Glioblastomzelllinie TX3868 isoliert. Es zeigt eine starke Amplifikation in Glioblastomen und ist darüber hinaus auch in niedergradigen Gliomen amplifiziert.^{34,35} Ein charakteristisches Merkmal der hochmalignen Glioblastome ist die ausgeprägte chromosomale Instabilität (CIN), die sich beispielsweise in einem Gewinn des Chromosoms #7 oder Verlust von Chromosom #10 bemerkbar macht.^{34,101-104} Das Auftreten dieser chromosomalen Instabilität ist die Folge von Missegregationen, deren Ursache in der asymmetrischen oder multipolaren Zellteilung liegen kann. Diese könnte durch die Amplifikation von Centrosomen ermöglicht werden.

Über das Auftreten überzähliger Centrosomen in Gliomen ist bisher erst wenig bekannt. KATSETOS *et al.* konnten kürzlich die Überexpression von γ -Tubulin in höhergradigen Gliomen zeigen. In immunhistochemischen Analysen konnte sie teilweise eine Co-Lokalisation mit Pericentrin nachweisen.¹⁰⁵ In dem postulierten Modell gehen sie davon aus, dass es in Gliomen der WHO Grade III und IV nicht nur zur Amplifikation strukturell intakter Centrosomen kommen könnte, sondern dass darüber hinaus auch acentrosomale Mikrotubuliorganisationszentren entstehen könnten.¹⁰⁵ Auch für die etablierte Glioblastomzelllinie U251¹⁰⁶ und die Primärzelllinie T5913¹⁰⁷ konnten Centrosomenamplifikationen und daraus resultierende multipolare Spindeln beschrieben werden. In der in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinie, TX3868, konnten neben dem Auftreten überzähliger Centrosomen auch die Ausbildung von multipolaren Spindeln sowie die Funktionalität des Centrosomenclustering in einer Glioblastomzelllinie gezeigt werden. Der Nachweis des Clusteringmechanismus liefert auch eine mögliche Erklärung dafür, dass sich trotz höherer Passagenzahl keine wesentlichen Veränderungen im Karyotyp vollzogen haben.

6.8 Numerische Aberrationen und Tumorgenese

Die Amplifikationseinheit 12q13-15, aus der GAS41 ursprünglich identifiziert wurde, tritt nicht nur in Gliomen auf, sondern wurde auch im Zusammenhang mit Weichgewebetumoren, Osteosarkomen, Melanomen und Liposarkomen beschrieben.¹⁰⁸⁻¹¹¹

Auch das Gen für das NuMA Protein, das an der Ausbildung der Mitosespindel beteiligt ist, ist in einer chromosomalen Region lokalisiert, die in Tumoren häufig amplifiziert vorliegt. Gewinne von 11q13 konnten beispielsweise in Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals, Brusttumoren und Ovarialkarzinomen beschrieben werden.¹¹²⁻¹¹⁴ Amplifikationen von 11q und 12q13-15 wurden auch in Rhabdomyosarkomen nachgewiesen.¹¹⁵

Sowohl die endogene Überexpression von NuMA,⁷⁰ als auch die endogene Überexpression von GAS41 führen zur Ausbildung überzähliger Centrosomen und multipolarer Spindeln. Die für NuMA beschriebenen und die, in dieser Arbeit, für GAS41 beobachteten Effekte lassen vermuten, dass bestimmte genetische Veränderungen einen Einfluss auf die Spindelpolbildung in Tumorzellen haben können. Der Einfluss von genetischen Veränderungen konnten für NuMA von ALAIN SILK *et al.* gezeigt werden.¹¹⁶ In Mauszellen mit einer *loss-of-function* Mutation konnten Spindelpoldefekte und Anordnungsstörungen von Metaphasechromosomen beobachtet werden.¹¹⁶ Ähnliche Beobachtungen konnten auch in den GAS41 depletierten Glioblastomzellen gemacht werden.

Genetische Veränderungen als Ursache für die deregulierte Expression von Proteinen, die in die Ausbildung der Mitosespindel involviert sind, sind von großer Bedeutung für das Verständnis der Tumorgenese. Der Erwerb verschiedener Mutationen und die Zunahme der chromosomalen Instabilität durch numerische Chromosomenaberrationen sind Kennzeichen maligner Tumorzellen. Darüber hinaus treten in Tumorzellen häufig überzählige Centrosomen auf. Diese überzähligen Centrosomen wurden bereits in einer Vielzahl von Tumoren, z.B. Brust-, Prostata-, Lungen- oder Hirntumoren, beschrieben.¹¹⁷ Seit dem THEODOR BOVERI seine Hypothese über die direkte Verbindung von Centrosomenzahl, Aneuploidie und Tumorgenese aufstellte, ist es nicht gelungen die Frage aufzuklären, wie die das Auftreten überzähliger Centrosomen zur chromosomalen Instabilität beiträgt. GAS41 könnte als integraler Centrosomenbestandteil einen Beitrag zum Verständnis der Korrelation von numerischen Centrosomen- und Chromosomenaberrationen leisten.

6.9 Physiologische Funktion von GAS41

Im Rahmen dieser Arbeit konnte GAS41 in allen Zellzyklusphasen als integraler Bestandteil der Centrosomen identifiziert werden. Dabei unterscheidet sich GAS41 pericentriolaren Matrixproteinen, deren Lokalisation sich in Abhängigkeit der Zellzyklusphase ändert. Das Spindelprotein NuMA beispielsweise, ist während der Interphase im Zellkern lokalisiert. Erst zu Beginn der Mitose erfolgt dann die centrosomale Lokalisation.²⁸ Der Mechanismus, der es diesem Protein ermöglicht seine Lokalisation zu verändern, ist jedoch noch nicht bekannt. Vermutlich führt die Affinität von NuMA zu anderen Spindelpolproteinen dazu, dass NuMA über Protein-Protein-Wechselwirkungen an die Centrosomen gezogen wird.^{74,75} Sowohl NuMA als auch GAS41 verfügen über eine coiled-coil Domäne,^{33,70} die charakteristisch für PCM Proteine ist.⁸⁵ Die Domäne ist hochkonservierte und ermöglicht die Ausbildung stabiler Proteininteraktionen. Diese Häufung von coiled-coil Proteinen in der PCM führen zur Bildung eines hochaffinen gerüstähnlichen Netzwerks.⁸⁵ Als ständiger Bestandteil der Centrosomen könnte GAS41 dazu beitragen, dass der Transport des Interaktionspartners NuMA zu den Spindelpolen erfolgen kann. Ähnlich verhält es sich mit dem GAS41 Interaktionspartner TACC1. Auch dieses Protein weist, wie NuMA, nur während der Mitose eine centrosomale Lokalisation auf.²² Auch hier könnte GAS41 als Teil des gerüstähnlichen Netzwerks dazu beitragen, dass TACC1 zu den Centrosomen gelangt.

Die Rolle von GAS41 als Strukturprotein in der pericentriolaren Matrix wird durch die beobachteten Spindelanomalien bekräftigt. Sowohl die Eliminierung als auch die Überproduktion centrosomaler Strukturproteine kann, durch Zerfall des PCM Netzwerks oder durch übermäßige Ansammlungen von PCM Proteinen, zur Zerstörung der Centrosomen und zur Ausbildung verschiedener Spindelanomalien führen.

6.10 Ausblick

GAS41 konnte als centrosomales Protein charakterisiert werden, dessen Deregulation in verschiedenen Zelllinien zur Ausbildung multipolarer Mitosespindeln führt. Auf welchem Mechanismus die Entstehung der zusätzlichen Spindelpole erfolgt ist bislang noch unklar. Als mögliche Wege wurden die Centrosomenduplikation und die Centrosomenfragmentierung diskutiert. Um diesen Mechanismus aufklären zu können, ist es notwendig sich die Spindelpole näher zu betrachten. Mit Hilfe der Centriolenmarker γ -Tubulin und Centrin müsste hierzu die Zusammensetzung der Spindelpole untersucht werden. Auch der Einsatz weiterer PCM Marker, wie NuMA oder TACC1/2, würde Aufschluss darüber geben, ob die betrachteten Spindelpole Centriolen enthalten oder lediglich aus Matrixproteinen bestehen. Beim Nachweis von Centriolen wäre es darüber hinaus sinnvoll eine Unterscheidung von reifen und unreifen Centriolen zu treffen. Der Nachweis des Markerproteins Cep170, das als Anhang an der reifen Centriole lokalisiert ist,¹¹⁸ könnte Aufschluss darüber geben, ob die überzähligen Centrosomen das Ergebnis einer Überduplikation in der S-Phase oder von Mitoseaborten sind.^{99,118}

Im Falle der Centrosomenfragmentierung als Ursache für das Auftreten überzähliger Spindelpole, wäre es notwendig die Zusammensetzung der Pole zu analysieren. Dies würde es ermöglichen zu untersuchen, ob es zu einer Trennung der beiden Centriolen kommt,¹¹⁹ oder ob die Lokalisation der GAS41 Interaktionspartner durch dessen Deregulation verändert wird. Darüber hinaus wäre zu analysieren, ob die Fragmentierung unter Beteiligung der Mikrotubuli erfolgt.¹²⁰

Auch die Beteiligung des Kinesins Eg5, das normalerweise in die Ausbildung der bipolaren Spindel involviert ist, könnte an der Ausbildung multipolarer Spindeln in GAS41 depletierten Zellen beteiligt sein. In diesem Fall müsste die reversible Hemmung von Eg5 mit dem zellpermeablen, niedermolekularen Inhibitor Monastrol zur Ausbildung monopolarer Spindeln führen, die sich nach dem Auswaschen des Inhibitors wieder zu multipolaren Spindeln zurück formen.

In weiteren Lebendzellstudien könnten darüber hinaus der zeitliche Verlauf der Entstehung der zusätzlichen Spindelpole sowie das Centrosomenclustering weiter untersucht werden.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Sequenzen eingesetzter siRNAs	20
Tabelle 2	Primärantikörper und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzanalysen	23
Tabelle 3	Primärantikörper und Sekundärantikörper für Western Blot Analysen	36
Tabelle 4	Anzahl der durch GAS41 Knockdown differentiell exprimierten Gene	48
Tabelle 5	Aufstellung der 161 signifikant reprimierten Transkripte. Darunter befinden sich 131 verschiedene GenBank annotierte Gene mit einer <i>fold change</i> $\geq 1,7$ und einem p-Wert $< 0,05$.	128
Tabelle 6	Aufstellung der 143 signifikant aktivierten Transkripte. Darunter befinden sich 107 verschiedene GenBank annotierte Gene mit einer <i>fold change</i> $\geq 1,7$ und einem p-Wert $< 0,05$.	134
Tabelle 7	Zusammenfassung der <i>Gene Ontology</i> Analyse	50

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Zeichnerische Darstellung der Mitose aus W. Flemmings Buch „Zellsubstanz, Kern und Zellteilung“.	1
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Zellzyklus.	2
Abbildung 3	Schematische Darstellung des Centrosomzyklus.	6
Abbildung 4	Schematische Darstellung einer Neubauer <i>improved</i> Zählkammer.	18
Abbildung 5	Auswahl der effektivsten siRNA Kombination zum Knockdown von GAS41.	40
Abbildung 6	Northern Blot Analyse des GAS41 Knockdowns.	41
Abbildung 7	Western Blot Analyse des GAS41 Knockdowns.	42
Abbildung 8	Northern Blot Analyse des β -Aktin Knockdowns.	43
Abbildung 9	Schematische Darstellung der Funktionsweise von Affymetrix HG U-133 Plus 2.0 Microarrays.	45
Abbildung 10	Volcano Plot zur Ermittlung aller differentiell exprimierten Sequenzen mit einer <i>fold change</i> $\geq 1,7$ und einem p-Wert $< 0,05$.	46
Abbildung 11	Venn-Diagramm zur Ermittlung der Anzahl der Transkripte mit signifikant veränderter Expression beim Vergleich von GAS41 depletierten Zellen und Negativkontrollen.	47
Abbildung 12	Immunfluoreszenzanalyse an MCF-7 Interphasezellen.	52
Abbildung 13	Centrosomale Lokalisation von GFP-GAS41 in mitotischen Zellen.	53
Abbildung 14	Trypanblaufärbung zur Bestimmung des Einflusses des GAS41 Knockdowns auf die Zellviabilität.	54

Abbildung 15	WST-1 Assay zur Bestimmung der Zellviabilität GAS41 depletierter HeLa Zellen.	56
Abbildung 16	WST-1 Assay zur Messung der Zellviabilität GAS41 depletierter TX3868 Zellen.	57
Abbildung 17	Einfluss des GAS41 Knockdowns auf die Zellviabilität	58
Abbildung 18	Zellzyklusanalysen von TX3868 Zellen mittels Propidiumiodidfärbung.	59
Abbildung 19	Zellzyklusanalysen von HeLa Zellen mittels Propidiumiodidfärbung.	61
Abbildung 20	Immunfluoreszenzanalyse von Interphase-Zellen.	62
Abbildung 21	Immunfluoreszenzanalyse mitotischer HeLa Zellen.	64
Abbildung 22	Synchronisation von HeLa Zellen mittels Doppel-Thymidinblock.	65
Abbildung 23	Immunfluoreszenzanalyse synchronisierter GAS41 depletierter HeLa Zellen.	66
Abbildung 24	Immunfluoreszenzanalyse synchronisierter HeLa Zellen.	67
Abbildung 25	Häufigkeitsverteilung der durch den GAS41 Knockdown ausgelösten Spindelphänotypen in HeLa Zellen.	68
Abbildung 26	Immunfluoreszenzanalysen GAS41 depletierter HeLa Zellen.	69
Abbildung 27	Verifizierung der Spindelphänotypen mit einer dritten GAS41 siRNA.	70
Abbildung 28	Immunfluoreszenzanalyse GAS41 überexprimierender HeLa Zellen.	72
Abbildung 29	Häufigkeitsverteilung der durch die GAS41 Überexpression ausgelösten Spindelphänotypen in HeLa Zellen.	73
Abbildung 30	Immunfluoreszenzanalysen des GAS41 Knockdowns in	75

	HeLa H2B-GFP.	
Abbildung 31	Bipolare Zellteilung einer HeLa H2B-GFP Zelle.	77
Abbildung 32	Zellteilung einer HeLa H2B-GFP Zelle mit tripolarem Spindelapparat	78
Abbildung 33	Centrosomenclustering in der M-Phase einer GAS41 depletierten Zelle.	79
Abbildung 34	<i>Unaligned chromosomes</i> in einer GAS41 depletierten Zelle.	81
Abbildung 35	Dauer der Mitose in GAS41 depletierten HeLa Zellen	82
Abbildung 36	Konfokalmikroskopische Darstellung des Spindelapparates von HeLa H2B-GFP Zellen.	83
Abbildung 37	Immunfluoreszenzanalyse von TX3868 Zellen.	85
Abbildung 38	Spindelapparat und Centrosomenanzahl in mitotischen TX3868 Zellen	87
Abbildung 39	Mechanismen zur Centrosomenamplifikation	98

9 Literaturverzeichnis

1. Rieder, C. L. & Khodjakov, A. Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells. *Science* **300**, 91-6 (2003).
2. Lukas, J., Lukas, C. & Bartek, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* **3**, 997-1007 (2004).
3. Scholey, J. M., Brust-Mascher, I. & Mogilner, A. Cell division. *Nature* **422**, 746-52 (2003).
4. Wiese, C. & Zheng, Y. Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J Cell Sci* **119**, 4143-53 (2006).
5. Bornens, M. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 25-34 (2002).
6. Doxsey, S., McCollum, D. & Theurkauf, W. Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 411-34 (2005).
7. Heald, R., Tournebize, R., Habermann, A., Karsenti, E. & Hyman, A. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol* **138**, 615-28 (1997).
8. Brinkley, B. R. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol* **11**, 18-21 (2001).
9. Chan, G. K., Liu, S. T. & Yen, T. J. Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol* **15**, 589-98 (2005).
10. Brinkley, B. R. & Stubblefield, E. The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma* **19**, 28-43 (1966).
11. Cooke, C. A., Schaar, B., Yen, T. J. & Earnshaw, W. C. Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma* **106**, 446-55 (1997).
12. Jablonski, S. A., Chan, G. K., Cooke, C. A., Earnshaw, W. C. & Yen, T. J. The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* **107**, 386-96 (1998).
13. Warburton, P. E. et al. Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* **7**, 901-4 (1997).
14. Musacchio, A. & Hardwick, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 731-41 (2002).
15. Marshall, W. F. Centriole assembly: the origin of nine-ness. *Curr Biol* **17**, R1057-9 (2007).
16. Andersen, J. S. et al. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-4 (2003).
17. Nigg, E. A. Origins and consequences of centrosome aberrations in human cancers. *Int J Cancer* **119**, 2717-23 (2006).

18. Tillement, V. et al. Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus. *Biol Cell* **101**, 1-11 (2009).
19. Leon, A., Omri, B., Gely, A., Klein, C. & Crisanti, P. QN1/KIAA1009: a new essential protein for chromosome segregation and mitotic spindle assembly. *Oncogene* **25**, 1887-95 (2006).
20. Raff, J. W. Centrosomes and cancer: lessons from a TACC. *Trends Cell Biol* **12**, 222-5 (2002).
21. Gergely, F. et al. The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14352-7 (2000).
22. Delaval, B. et al. Aurora B -TACC1 protein complex in cytokinesis. *Oncogene* **23**, 4516-22 (2004).
23. Dou, Z. et al. TTK kinase is essential for the centrosomal localization of TACC2. *FEBS Lett* **572**, 51-6 (2004).
24. Still, I. H., Hamilton, M., Vince, P., Wolfman, A. & Cowell, J. K. Cloning of TACC1, an embryonically expressed, potentially transforming coiled coil containing gene, from the 8p11 breast cancer amplicon. *Oncogene* **18**, 4032-8 (1999).
25. Still, I. H., Vince, P. & Cowell, J. K. The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines. *Genomics* **58**, 165-70 (1999).
26. Lauffart, B. et al. Aberrations of TACC1 and TACC3 are associated with ovarian cancer. *BMC Womens Health* **5**, 8 (2005).
27. Chen, H. M. et al. AZU-1: a candidate breast tumor suppressor and biomarker for tumor progression. *Mol Biol Cell* **11**, 1357-67 (2000).
28. Zeng, C. NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function. *Microsc Res Tech* **49**, 467-77 (2000).
29. Kallajoki, M., Weber, K. & Osborn, M. A 210 kDa nuclear matrix protein is a functional part of the mitotic spindle; a microinjection study using SPN monoclonal antibodies. *EMBO J* **10**, 3351-62 (1991).
30. Malik, R., Nigg, E. A. & Korner, R. Comparative conservation analysis of the human mitotic phosphoproteome. *Bioinformatics* **24**, 1426-32 (2008).
31. Harborth, J., Weber, K. & Osborn, M. GAS41, a highly conserved protein in eukaryotic nuclei, binds to NuMA. *J Biol Chem* **275**, 31979-85 (2000).
32. Lauffart, B., Howell, S. J., Tasch, J. E., Cowell, J. K. & Still, I. H. Interaction of the transforming acidic coiled-coil 1 (TACC1) protein with ch-TOG and GAS41/NuBI1 suggests multiple TACC1-containing protein complexes in human cells. *Biochem J* **363**, 195-200 (2002).
33. Munnia, A. et al. Expression, cellular distribution and protein binding of the glioma amplified sequence (GAS41), a highly conserved putative transcription factor. *Oncogene* **20**, 4853-63 (2001).
34. Fischer, U., Meltzer, P. & Meese, E. Twelve amplified and expressed genes localized in a single domain in glioma. *Hum Genet* **98**, 625-8 (1996).

35. Fischer, U. et al. Cloning of a novel transcription factor-like gene amplified in human glioma including astrocytoma grade I. *Hum Mol Genet* **6**, 1817-22 (1997).
36. Schulze, J. M., Wang, A. Y. & Kobor, M. S. YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochem Cell Biol* **87**, 65-75 (2009).
37. Mitchell, P. J. & Tjian, R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-8 (1989).
38. Ding, X. et al. GAS41 interacts with transcription factor AP-2beta and stimulates AP-2beta-mediated transactivation. *Nucleic Acids Res* **34**, 2570-8 (2006).
39. Park, J. H. & Roeder, R. G. GAS41 is required for repression of the p53 tumor suppressor pathway during normal cellular proliferation. *Mol Cell Biol* **26**, 4006-16 (2006).
40. Kabani, M., Michot, K., Boschiero, C. & Werner, M. Anc1 interacts with the catalytic subunits of the general transcription factors TFIID and TFIIF, the chromatin remodeling complexes RSC and INO80, and the histone acetyltransferase complex NuA3. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 398-403 (2005).
41. Cairns, B. R., Henry, N. L. & Kornberg, R. D. TFG/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9. *Mol Cell Biol* **16**, 3308-16 (1996).
42. Debernardi, S. et al. The MLL fusion partner AF10 binds GAS41, a protein that interacts with the human SWI/SNF complex. *Blood* **99**, 275-81 (2002).
43. Lauffart, B., Gangisetty, O. & Still, I. H. Molecular cloning, genomic structure and interactions of the putative breast tumor suppressor TACC2. *Genomics* **81**, 192-201 (2003).
44. Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S. & Cote, J. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* **24**, 1884-96 (2004).
45. Cai, Y. et al. The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem* **280**, 13665-70 (2005).
46. Zimmermann, K. et al. Targeted disruption of the GAS41 gene encoding a putative transcription factor indicates that GAS41 is essential for cell viability. *J Biol Chem* **277**, 18626-31 (2002).
47. Vainberg, I. E. et al. Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin. *Cell* **93**, 863-73 (1998).
48. Fischer, U. et al. KUB3 amplification and overexpression in human gliomas. *Glia* **36**, 1-10 (2001).
49. Fischer, U., Radermacher, J., Mayer, J., Mehraein, Y. & Meese, E. Tumor hypoxia: Impact on gene amplification in glioblastoma. *Int J Oncol* **33**, 509-15 (2008).
50. Keller, A. et al. GeneTrailExpress: a web-based pipeline for the statistical evaluation of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* **9**, 552 (2008).
51. Hochberg, Y. & Benjamini, Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* **9**, 811-8 (1990).

52. Elbashir, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**, 494-8 (2001).
53. Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**, 188-200 (2001).
54. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-6 (2000).
55. Gracia, E. et al. Isolation of genes amplified in human cancers by microdissection mediated cDNA capture. *Hum Mol Genet* **5**, 595-600 (1996).
56. Llanos, S., Efeyan, A., Monsech, J., Dominguez, O. & Serrano, M. A high-throughput loss-of-function screening identifies novel p53 regulators. *Cell Cycle* **5**, 1880-5 (2006).
57. Wong, R. W., Blobel, G. & Coutavas, E. Rae1 interaction with NuMA is required for bipolar spindle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19783-7 (2006).
58. Kanda, T., Sullivan, K. F. & Wahl, G. M. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* **8**, 377-85 (1998).
59. Benes, V. & Muckenthaler, M. Standardization of protocols in cDNA microarray analysis. *Trends Biochem Sci* **28**, 244-9 (2003).
60. Smith, A., Simanski, S., Fallahi, M. & Ayad, N. G. Redundant ubiquitin ligase activities regulate wee1 degradation and mitotic entry. *Cell Cycle* **6**, 2795-9 (2007).
61. Tanikawa, J. et al. p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* **275**, 15578-85 (2000).
62. Winding, P. & Berchtold, M. W. The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J Immunol Methods* **249**, 1-16 (2001).
63. Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N. J., Scheffner, M. & zur Hausen, H. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* **72**, 9470-8 (1998).
64. Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-36 (1990).
65. Schwarz, E. et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-4 (1985).
66. Wang, C. et al. MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J* **24**, 3279-90 (2005).
67. Gangisetty, O., Lauffart, B., Sondarva, G. V., Chelsea, D. M. & Still, I. H. The transforming acidic coiled coil proteins interact with nuclear histone acetyltransferases. *Oncogene* **23**, 2559-63 (2004).
68. Sillibourne, J. E., Delaval, B., Redick, S., Sinha, M. & Doxsey, S. J. Chromatin remodeling proteins interact with pericentrin to regulate centrosome integrity. *Mol Biol Cell* **18**, 3667-80 (2007).

69. Tanudji, M. et al. Gene silencing of CENP-E by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Mol Biol Cell* **15**, 3771-81 (2004).
70. Quintyne, N. J., Reing, J. E., Hoffelder, D. R., Gollin, S. M. & Saunders, W. S. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science* **307**, 127-9 (2005).
71. Kallajoki, M., Harborth, J., Weber, K. & Osborn, M. Microinjection of a monoclonal antibody against SPN antigen, now identified by peptide sequences as the NuMA protein, induces micronuclei in PtK2 cells. *J Cell Sci* **104 (Pt 1)**, 139-50 (1993).
72. Yang, C. H. & Snyder, M. The nuclear-mitotic apparatus protein is important in the establishment and maintenance of the bipolar mitotic spindle apparatus. *Mol Biol Cell* **3**, 1259-67 (1992).
73. Haren, L., Gnadt, N., Wright, M. & Merdes, A. NuMA is required for proper spindle assembly and chromosome alignment in prometaphase. *BMC Res Notes* **2**, 64 (2009).
74. Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J. D. & Cleveland, D. W. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* **87**, 447-58 (1996).
75. Sparks, C. A., Fey, E. G., Vidair, C. A. & Doxsey, S. J. Phosphorylation of NUMA occurs during nuclear breakdown and not mitotic spindle assembly. *J Cell Sci* **108 (Pt 11)**, 3389-96 (1995).
76. Nigg, E. A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* **2**, 815-25 (2002).
77. Delattre, M. & Gonczy, P. The arithmetic of centrosome biogenesis. *J Cell Sci* **117**, 1619-30 (2004).
78. Khodjakov, A. et al. De novo formation of centrosomes in vertebrate cells arrested during S phase. *J Cell Biol* **158**, 1171-81 (2002).
79. La Terra, S. et al. The de novo centriole assembly pathway in HeLa cells: cell cycle progression and centriole assembly/maturation. *J Cell Biol* **168**, 713-22 (2005).
80. Wadsworth, P. & Khodjakov, A. E pluribus unum: towards a universal mechanism for spindle assembly. *Trends Cell Biol* **14**, 413-9 (2004).
81. Khodjakov, A., Cole, R. W., Oakley, B. R. & Rieder, C. L. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol* **10**, 59-67 (2000).
82. Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A. & Sluder, G. Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* **291**, 1547-50 (2001).
83. Hut, H. M. et al. Centrosomes split in the presence of impaired DNA integrity during mitosis. *Mol Biol Cell* **14**, 1993-2004 (2003).
84. Abal, M., Keryer, G. & Bornens, M. Centrioles resist forces applied on centrosomes during G2/M transition. *Biol Cell* **97**, 425-34 (2005).
85. Salisbury, J. L. Centrosomes: coiled-coils organize the cell center. *Curr Biol* **13**, R88-90 (2003).

86. Ring, D., Hubble, R. & Kirschner, M. Mitosis in a cell with multiple centrioles. *J Cell Biol* **94**, 549-56 (1982).
87. Kwon, M. et al. Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* **22**, 2189-203 (2008).
88. Basto, R. et al. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* **133**, 1032-42 (2008).
89. Saunders, W. Centrosomal amplification and spindle multipolarity in cancer cells. *Semin Cancer Biol* **15**, 25-32 (2005).
90. Gergely, F. & Basto, R. Multiple centrosomes: together they stand, divided they fall. *Genes Dev* **22**, 2291-6 (2008).
91. Rieder, C. L., Schultz, A., Cole, R. & Sluder, G. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol* **127**, 1301-10 (1994).
92. Kirschner, M. & Mitchison, T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**, 329-42 (1986).
93. Yang, Z., Loncarek, J., Khodjakov, A. & Rieder, C. L. Extra centrosomes and/or chromosomes prolong mitosis in human cells. *Nat Cell Biol* **10**, 748-51 (2008).
94. Siskin, J. E., Bonner, S. V. & Grash, S. D. The prolongation of mitotic stages in SV40-transformed vs nontransformed human fibroblast cells. *J Cell Physiol* **113**, 219-23 (1982).
95. Siskin, J. E., Bonner, S. V., Grash, S. D., Powell, D. E. & Donaldson, E. S. Alterations in metaphase durations in cells derived from human tumours. *Cell Tissue Kinet* **18**, 137-46 (1985).
96. Sluder, G., Thompson, E. A., Miller, F. J., Hayes, J. & Rieder, C. L. The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry. *J Cell Sci* **110** (Pt 4), 421-9 (1997).
97. Gisselsson, D. et al. When the genome plays dice: circumvention of the spindle assembly checkpoint and near-random chromosome segregation in multipolar cancer cell mitoses. *PLoS ONE* **3**, e1871 (2008).
98. Boveri, T. *Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris* (2008).
99. Godinho, S. A., Kwon, M. & Pellman, D. Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 85-98 (2009).
100. Lingle, W. L., Lutz, W. H., Ingle, J. N., Maihle, N. J. & Salisbury, J. L. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2950-5 (1998).
101. Bigner, S. H. et al. Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* **48**, 405-11 (1988).
102. Magnani, I. et al. Increasing complexity of the karyotype in 50 human gliomas. Progressive evolution and de novo occurrence of cytogenetic alterations. *Cancer Genet Cytogenet* **75**, 77-89 (1994).

103. Fults, D., Tippets, R. H., Thomas, G. A., Nakamura, Y. & White, R. Loss of heterozygosity for loci on chromosome 17p in human malignant astrocytoma. *Cancer Res* **49**, 6572-7 (1989).
104. Fujimoto, M. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 in human glioblastoma multiforme. *Genomics* **4**, 210-4 (1989).
105. Katsetos, C. D. et al. Altered cellular distribution and subcellular sorting of gamma-tubulin in diffuse astrocytic gliomas and human glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* **65**, 465-77 (2006).
106. Zhang, Z. et al. Localization of NGF and TrkA at mitotic apparatus in human glioma cell line U251. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 68-74 (2005).
107. Klein, A., Zang, K. D., Steudel, W. I. & Urbschat, S. Different mechanisms of mitotic instability in cancer cell lines. *Int J Oncol* **29**, 1389-96 (2006).
108. Nilbert, M., Rydholm, A., Mitelman, F., Meltzer, P. S. & Mandahl, N. Characterization of the 12q13-15 amplicon in soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* **83**, 32-6 (1995).
109. Wunder, J. S. et al. Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. *Oncogene* **18**, 783-8 (1999).
110. Muthusamy, V. et al. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* **45**, 447-54 (2006).
111. Italiano, A. et al. HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon. *Int J Cancer* **122**, 2233-41 (2008).
112. Gollin, S. M. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* **23**, 238-53 (2001).
113. Kwek, S. S. et al. Co-amplified genes at 8p12 and 11q13 in breast tumors cooperate with two major pathways in oncogenesis. *Oncogene* **28**, 1892-903 (2009).
114. Brown, L. A. et al. Amplification of 11q13 in ovarian carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 481-9 (2008).
115. Bridge, J. A. et al. Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes. *Genes Chromosomes Cancer* **33**, 310-21 (2002).
116. Silk, A. D., Holland, A. J. & Cleveland, D. W. Requirements for NuMA in maintenance and establishment of mammalian spindle poles. *J Cell Biol* **184**, 677-90 (2009).
117. Pihan, G. A. et al. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* **58**, 3974-85 (1998).
118. Guarguaglini, G. et al. The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell* **16**, 1095-107 (2005).
119. Muto, Y. et al. An evolutionarily conserved leucine-rich repeat protein CLERC is a centrosomal protein required for spindle pole integrity. *Cell Cycle* **7**, 2738-48 (2008).

-
120. Garrett, S., Auer, K., Compton, D. A. & Kapoor, T. M. hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division. *Curr Biol* **12**, 2055-9 (2002).

10 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
aa	Aminosäure
Abb	Abbildung
ACTB	beta Aktin
AF-9	acute lymphoblastic leukemia 1 fused gene from chromosome 9
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
c	Konzentration
CCD	Charge-coupled Device
CREST	limitierte systemische Sklerodermie
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
d	Schichtdicke
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT40	Hühner B-Zelllinie
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion/ optische Dichte

ε	molarer Extinktionskoeffizient
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENL	eleven-nineteen leukemia gene
<i>et al</i>	et alii (lat. und andere)
FBS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNBP1	formin binding protein 1
g	Gramm
g -TuRC	g -Tubulin Ringkomplex
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS41	glioma amplified sequence 41
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GO	Gene Ontology
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HeLa	humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIPK3	Homeodomain interacting protein kinase 3
I	Intensität
IgG	Immunglobulin G
INI1	integrase inhibitor 1
IVT	<i>in vitro</i> Transkription

kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
l	Liter
M	Molar
MCF-7	humane Epithelzelllinie eines Adenokarzinoms der Brust
MDM2	murine double minute 2
MES-SA	humane Sarkomzelllinie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisationszentrum
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	nuclear envelope breakdown
nm	Nanometer
NP40	Nonylphenylpolyethylenglycol, nicht-ionisches Detergenz

NuMA	nuclear mitotic apparatus protein
ORF	offener Leserahmen, open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCM	pericentriolare Matrix
PFDN1	prefoldin subunit 1
PI4K2B	Phosphatidylinositol-4-kinase Typ 2 beta
PVDF	Polyvinylidenfluorid
%	Prozent
RBJ	Ras-associated protein Rap1
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPE-1	Telomerase-immortalisierte Retina-Pigmentepithel Zellen
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SAS5	something about silencing 5
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SK-Hep1	humane leberkarzinomzelllinie
SSC	Saline Sodium Citrat
TACC	Transforming acidic coiled-coil Protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris-buffered saline

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFIID	allgemeiner Transkriptionsfaktor II D
TFIIF	allgemeiner Transkriptionsfaktor II F
TX3868	Xenograft der primären Glioblastomzelllinie T3868
ü.N.	über Nacht
V	Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST-1	wasserlösliches Tetrazoliumsalz
YEATS4	YEATS Domain containing 4

11 Anhang

Tabelle 5: Aufstellung der 161 signifikant reprimierten Transkripte. Darunter befinden sich 131 verschiedene GenBank annotierte Gene mit einer *fold change* $\geq 1,7$ und einem p-Wert $< 0,05$.

fold change	p-Wert	Genbank	Symbol	Name
5,62	0,0104	AI862887	PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta
4,46	0,0192	NM_006530	GAS41	glioma amplified sequence 41
3,86	0,0318	NM_004696	SLC16A4	solute carrier family 16, member 4
3,73	0,00178	AI452512	TMEM20	Transmembrane protein 20
3,72	0,00742	X86401	GATM	glycine amidinotransferase
3,41	0,00582	NM_002915	RFC3	replication factor C 3
3,36	0,000321	NM_001482	GATM	glycine amidinotransferase
3,26	0,0147	AI972496	IGF1	insulin-like growth factor 1
3,15	0,0116	NM_018268	WDR41	WD repeat domain 41
3,11	0,00388	AU144912	IGF1	insulin-like growth factor 1
3,05	0,0399	AF294326	CBFB	core-binding factor, beta subunit
2,90	0,00675	AI241945	PPM1A	Protein phosphatase 1A
2,90	0,026	AA524005	EFCBP1	EF-hand calcium binding protein 1
2,89	0,00878	BF977231	LOC283464	hypothetical protein LOC283464
2,87	0,00468	AA147884	WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
2,86	0,0471	NM_018569	C4orf16	chromosome 4 open reading frame 16
2,79	0,0409	L12387	SRI	sorcin
2,76	0,0221	AI808345	MAPK9	Mitogen-activated protein kinase 9
2,75	0,00471	AW014788	MTMR9	myotubularin related protein 9
2,75	1,97E-05	AK001419	FLVCR	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor
2,74	0,0178	BE881219	ATPAF1	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1
2,68	0,00252	NM_024081	PRRG4	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4

2,63	0,0015	AK001934	MED4	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 4 homolog
2,57	0,00248	AV752215	SRI	sorcin
2,55	0,0443	NM_030621	DICER1	Dicer1, Dcr-1 homolog
2,53	0,0301	AL571942	VAPA	VAMP-associated protein A
2,48	0,00394	BE958291	MTAP	methylthioadenosine phosphorylase
2,48	0,00136	AU157109	KIAA1598	KIAA1598
2,44	0,0241	AV690866	SGK3	serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3
2,43	0,000881	BF905445	PRRG4	Proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4
2,42	0,0381	NM_017945	SLC35A5	solute carrier family 35, member A5
2,41	0,0357	AA888858	PDE3B	Phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
2,41	0,0439	NM_030761	WNT4	wingless-type MMTV integration site family, member 4
2,39	0,0346	AW168942	ARSB	arylsulfatase B
2,37	0,000352	NM_015387	PREI3	preimplantation protein 3
2,36	0,00253	AK026653	C14orf168	chromosome 14 open reading frame 168
2,35	0,00524	AI204981	IREB2	iron-responsive element binding protein 2
2,34	0,00405	BC000149	RFC3	replication factor C 3
2,32	0,000451	AI692428	ABHD5	abhydrolase domain containing 5
2,28	0,0222	AK026026	BID	BH3 interacting domain death agonist
2,27	0,0478	AI131537	ADCY7	Adenylate cyclase 7
2,27	0,0257	U09716	LMAN1	lectin, mannose-binding, 1
2,26	0,0155	AU149503	G3BP2	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2
2,24	0,0307	AU135154	ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10
2,24	0,00358	NM_001813	CENPE	centromere protein E
2,19	0,0379	BE048514	SDC2	syndecan 2
2,19	0,0107	NM_030755	TXNDC	thioredoxin domain containing
2,18	0,00329	NM_019847	ANKH	ankylosis, progressive homolog
2,15	0,00424	AA832073	DKFZp58611420	Hypothetical protein DKFZp58611420

2,14	0,0061	AI344311	PLDN	pallidin homolog
2,13	0,0367	BG109746	DICER1	Dicer1, Dcr-1 homolog
2,13	0,0226	AI799061	FEM1B	fem-1 homolog b
2,12	0,0219	AA149745	TRIM2	tripartite motif-containing 2
2,11	0,0106	NM_001450	FHL2	four and a half LIM domains 2
2,11	0,0318	NM_018352	FLJ11184	hypothetical protein FLJ11184
2,09	0,00409	NM_004661	CDC23	CDC23
2,09	0,0124	BF438417	IREB2	Iron-responsive element binding protein 2
2,07	0,0406	AW182934	LOC283012	hypothetical protein LOC283012
2,07	0,0144	AL136681	HDHD2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2
2,06	0,000164	AA161140	HIP2	Huntingtin interacting protein 2
2,05	0,00769	NM_012145	DTYMK	deoxythymidylate kinase
2,03	0,0302	NM_014547	TMOD3	tropomodulin 3
2,01	0,0281	AK021751	NAP1L1	60S ribosomal protein L6
2,01	0,0219	AL833029	SMC2L1	SMC2 structural maintenance of chromosomes 2-like 1
2,01	0,000365	AI963460	LUC7L2	LUC7-like 2
2,00	0,00722	AI820101	USP12	ubiquitin specific peptidase 12
2,00	0,00248	N32557	PPP1R14C	protein phosphatase 1, regulatory subunit 14C
2,00	0,0195	BE550332	PLEKHA3	pleckstrin homology domain containing, family A member 3
1,99	0,00156	AI659020	GFM1	G elongation factor, mitochondrial 1
1,99	0,00197	AI743993	FNBP3	Formin binding protein 3
1,99	0,0441	NM_019049	FLJ20054	hypothetical protein FLJ20054
1,99	0,018	AU153746	UGCGL1	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1
1,98	0,0163	AW080932	HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
1,97	0,00208	NM_021151	CROT	carnitine O-octanoyltransferase
1,97	0,024	NM_000753	PDE3B	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited

1,97	0,0103	AI220472	FLJ12973	WD repeat domain 76
1,97	0,00925	BC004819	PLDN	pallidin homolog
1,96	0,0179	NM_016440	VRK3	vaccinia related kinase 3
1,96	0,0488	AF124489	ARFIP1	ADP-ribosylation factor interacting protein 1
1,96	0,0177	AK025637	ARFGEF1	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1
1,96	0,035	AI743744	CDA08	T-cell immunomodulatory protein
1,95	0,0204	BC003584	DHFR	dihydrofolate reductase
1,95	0,00704	NM_012080	HDHD1A	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A
1,95	0,0032	NM_001755	CBFB	core-binding factor, beta subunit
1,95	0,00491	AF363068	C18orf50	chromosome 18 open reading frame 50
1,94	7,27E-06	D87682	KIAA0241	KIAA0241 protein
1,94	3,00E-05	AU152993	LSM11	LSM11, U7 small nuclear RNA associated
1,94	0,00282	AW139179	FEM1B	fem-1 homolog b
1,93	0,0237	BG035985	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1
1,92	0,0282	BF432857	DKFZp434H2226	LMBR1 domain containing 2
1,92	0,039	AA020784	UCHL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5
1,92	0,0396	AL049748	RBM9	RNA binding motif protein 9
1,91	0,00488	AI935255	LANCL1	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1
1,91	0,00108	NM_002413	MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2
1,91	0,000935	AV706343	RBJ	Ras-associated protein Rap1
1,91	0,0263	BC005016	TRIM2	tripartite motif-containing 2
1,91	0,000364	NM_024945	C9orf76	chromosome 9 open reading frame 76
1,90	0,000404	AK025562	LOC158563	hypothetical protein LOC158563
1,90	0,0424	BE873351	KLHL23	kelch-like 23
1,90	0,039	NM_005857	ZMPSTE24	zinc metallopeptidase (STE24 homolog, yeast)
1,89	0,0246	AK000780	GFM1	G elongation factor, mitochondrial 1

1,89	0,00131	AB002330	SR140	U2-associated SR140 protein
1,89	0,0118	NM_006410	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2
1,88	0,0449	AW439817	C2orf3	Chromosome 2 open reading frame 3
1,88	0,0082	N57510	RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family
1,87	0,022	AL138384	HSPA14	heat shock 70kDa protein 14
1,87	0,00281	BG149487	KLHL15	kelch-like 15
1,87	0,000896	AA527502	HNRPA3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
1,86	0,00109	AF005422	CLNS1A	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A
1,86	0,00856	AF007132	ABHD5	abhydrolase domain containing 5
1,85	0,046	NM_001110	ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10
1,85	0,00715	BF438056	CREBL2	cAMP responsive element binding protein-like 2
1,85	0,0184	BF105980	LOC144874	hypothetical protein LOC144874
1,85	0,000865	AI745136	CHIC1	Cysteine-rich hydrophobic domain 1
1,84	0,00114	BE856598	FGF7	Fibroblast growth factor
1,84	0,0188	BC013916	PCNP	PEST-containing nuclear protein
1,84	0,00413	N36160	CROP	Cisplatin resistance-associated overexpressed protein
1,84	0,012	AF258562	DTYMK	deoxythymidylate kinase
1,83	0,014	BC002439	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2
1,83	0,0446	N51413	FLJ30594	hypothetical locus FLJ30594
1,82	0,0228	NM_013325	ATG4B	ATG4 autophagy related 4 homolog B
1,82	0,0292	BC005359	GMFB	glia maturation factor, beta
1,81	0,00853	BC014029	UBE3C	ubiquitin protein ligase E3C
1,81	0,000322	NM_024884	L2HGDH	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase
1,81	0,0263	NM_016227	C1orf9	chromosome 1 open reading frame 9
1,81	0,0379	AI824034	ARSD	arylsulfatase D
1,81	0,00274	R56794	YAF2	YY1 associated factor 2
1,80	0,00913	BF978647	GFM1	G elongation factor, mitochondrial 1
1,79	0,00713	AU153477	LSM5	LSM5 homolog, U6 small nuclear RNA

				associated
1,79	0,0125	AL136782	KBTBD7	kelch repeat and BTB domain containing 7
1,78	0,026	NM_001338	CXADR	coxsackie virus and adenovirus receptor
1,78	0,0448	AI694451	PWP1	PWP1 homolog
1,78	7,66E-06	NM_001310	CREBL2	cAMP responsive element binding protein-like 2
1,78	0,00408	AW269818	FAM38B	family with sequence similarity 38, member B
1,78	0,0177	AF035824	VTI1B	vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1B
1,78	0,00197	BF590131	DICER1	Dicer1, Dcr-1 homolog
1,77	0,0251	BF062886	VRK3	vaccinia related kinase 3
1,76	0,0157	AF080569	DNAJB6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B 6
1,75	0,0444	BF435123	MSI2	musashi homolog 2
1,75	0,00311	AF084520	ARFGEF1	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1
1,75	0,0343	NM_015271	TRIM2	tripartite motif-containing 2
1,75	0,00491	AA043552	LUC7L2	LUC7-like 2
1,75	0,0122	AI978754	MSI2	Musashi homolog 2
1,75	0,0479	U81380	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1
1,74	0,0192	BE672557	MSI2	Musashi homolog 2
1,74	0,016	AJ277546	WEE1	WEE1 homolog
1,74	0,033	NM_000901	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
1,73	0,00824	BE782754	STX16	syntaxin 16
1,73	0,048	AL578336	CIRH1A	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin)
1,73	0,0226	NM_003590	CUL3	cullin 3
1,73	0,0296	BF982548	TRUB1	TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 1
1,72	0,0122	AI885466	LOC440145	similar to RIKEN cDNA 2410129H14
1,72	0,0161	NM_020353	PLSCR4	phospholipid scramblase 4
1,71	0,0216	AI458417	LOC162073	hypothetical protein LOC162073

1,71	0,0295	AB020684	DPY19L1	dpy-19-like 1
1,71	0,00682	AL080080	TXNDC	thioredoxin domain containing
1,70	0,00145	BC002848	RAVER1	RAVER1
1,70	0,0287	AF113128	SRD5A1	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1
1,70	0,00039	NM_004663	RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family
1,70	0,0088	AF131807	SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1
1,70	0,0335	AL117490	RBJ	Ras-associated protein Rap1

Tabelle 6: Aufstellung der 143 signifikant aktivierten Transkripte. Darunter befinden sich 107 verschiedene GenBank annotierte Gene mit einer *fold change* $\geq 1,7$ und einem p-Wert $< 0,05$.

fold change	p-Wert	GenBank	Symbol	Name
4,33	0,00116	AV693403	HIPK3	Homeodomain interacting protein kinase 3
3,69	0,00256	NM_016103	SAR1B	SAR1 gene homolog B
3,62	0,00724	BF475862	ATP11C	ATPase, Class VI, type 11C
3,37	0,00167	BC002847	SAR1B	SAR1 gene homolog B
3,34	0,0215	NM_006997	TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
3,28	0,00468	AK026815	KIAA1102	KIAA1102 protein
3,11	0,0133	AW138767	ELOVL7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids
2,97	0,000565	AW439816	SLC41A1	solute carrier family 41, member 1
2,94	0,00296	NM_006289	TLN1	talin 1
2,89	0,00863	BE856242	SARA2	SAR1a gene homolog 2
2,87	8,89E-05	AA156721	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
2,83	0,00068	BG054966	FAM61A	family with sequence similarity 61, member A
2,80	0,00481	AB029025	KIAA1102	KIAA1102 protein
2,66	0,00165	NM_014961	RIPX	rap2 interacting protein x

2,60	0,0111	AL049265	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer
2,57	0,00142	AW025455	ANAPC10	anaphase promoting complex subunit 10
2,57	0,0137	AV699657	TncRNA	trophoblast-derived noncoding RNA
2,54	0,000649	AB046813	HERC4	hect domain and RLD 4
2,50	0,00268	NM_003405	YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
2,48	0,00819	NM_004516	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
2,46	0,0304	NM_018075	TMEM16K	transmembrane protein 16K
2,46	0,0248	AW242916	IL6ST	Interleukin 6 signal transducer
2,46	0,00581	AF084462	RIT1	Ras-like without CAAX 1
2,45	0,00564	CA418310	P4HA2	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II
2,44	0,00951	AI889373	DKFZp547E052	hypothetical protein DKFZp547E052
2,44	0,00374	NM_018119	POLR3E	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E
2,44	0,000398	NM_021643	TRIB2	tribbles homolog 2
2,44	0,000158	AW592604	TOP1MT	topoisomerase (DNA) I, mitochondrial
2,39	9,43E-05	AL162081	RAB14	RAB14, member RAS oncogene family
2,38	0,0352	AU151239	ARG99	ARG99 protein
2,38	0,00382	AK023160	POLR3E	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E
2,37	0,000643	AF141870	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
2,35	0,0137	BE895437	TK2	thymidine kinase 2, mitochondrial
2,34	0,00117	BG252325	RY1	putative nucleic acid binding protein RY-1
2,31	0,00401	AW593859	FAM61A	family with sequence similarity 61, member A
2,30	0,0383	BF242905	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
2,29	0,000264	NM_018283	NUDT15	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15

2,29	0,0195	AW269686	RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family
2,29	0,014	X76302	RY1	putative nucleic acid binding protein RY-1
2,27	0,00219	AI655057	RIT1	Ras-like without CAAX 1
2,26	0,00625	NM_022908	FLJ12442	hypothetical protein FLJ12442
2,26	0,0207	BC001196	HS6ST1	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
2,25	0,000639	NM_022373	FLJ22313	hypothetical protein FLJ22313
2,24	0,00375	NM_024594	PANK3	pantothenate kinase 3
2,23	0,00188	NM_002074	GNB1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
2,20	0,00939	NM_018370	FLJ11259	hypothetical protein FLJ11259
2,20	0,00509	AL355685	TMEM50B	transmembrane protein 50B
2,19	0,000741	AL137751	RDX	radixin
2,18	0,0293	BE644935	TMEM41A	Transmembrane protein 41A
2,17	0,0245	NM_012280	FTSJ1	FtsJ homolog 1
2,16	0,00339	NM_016230	CYB5R4	cytochrome b5 reductase 4
2,16	0,0352	AW271409	GOPC	golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing
2,16	0,00732	AI613483	EIF2C2	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 2
2,16	0,00403	AA523537	SEMA4F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig) 4F
2,15	0,00165	AA536012	FLJ22313	hypothetical protein FLJ22313
2,14	0,000146	NM_024612	DHX40	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40
2,13	0,00162	AI114716	QKI	quaking homolog, KH domain RNA binding
2,12	0,00977	BE786164	ATF2	activating transcription factor 2
2,12	0,00148	AI813489	EIF2C2	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 2
2,10	0,00335	AA843242	BNC2	basonuclin 2
2,09	0,0123	AL353944	RUNX2	runt-related transcription factor 2
2,06	0,00867	NM_017637	BNC2	basonuclin 2
2,05	0,000638	AA743462	EIF2C2	Eukaryotic translation initiation factor 2C,

				2
2,05	0,0021	AB014593	SS18L1	synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1
2,04	0,0258	NM_017872	ICF45	interphase cytoplasmic foci protein 45
2,04	0,000345	NM_005433	YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1
2,04	0,0164	BG249221	ZDHHC20	zinc finger, DHHC-type containing 20
2,03	0,00265	AW971415	EIF2C2	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 2
2,03	8,96E-06	NM_005433	YES1	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1
2,03	0,0216	AV723177	FTSJ1	FtsJ homolog 1
2,03	0,0305	BE708432	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1
1,99	0,0355	BF223464	EIF2C2	Eukaryotic translation initiation factor 2C, 2
1,97	0,0259	AF070603	GNB1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
1,97	0,000869	NM_002078	GOLGA4	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4
1,97	0,00268	BF940043	NID1	nidogen 1
1,96	0,000581	BG249246	FLJ22313	hypothetical protein FLJ22313
1,96	0,00283	AI335267	MAP2K1IP1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1 interacting protein 1
1,95	0,00026	AL117499	FAM61A	family with sequence similarity 61, member A
1,94	0,00134	BC001282	HMGN4	high mobility group nucleosomal binding domain 4
1,93	0,000323	U18321	DAP3	death associated protein 3
1,93	0,0275	AW192795	MUC5AC	mucin 5, subtypes A and C, tracheobronchial/gastric
1,92	0,0443	BC002804	GCS1	glucosidase I
1,91	0,0136	AW341649	TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
1,91	0,0161	BC002637	TRIB2	tribbles homolog 2

1,90	0,00816	BC001903	IL10RB	interleukin 10 receptor, beta
1,90	0,0487	AK027231	KIAA1102	KIAA1102 protein
1,89	0,0127	BF431360	DHX40	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40
1,89	0,00107	H97386	BNC2	Basonuclin 2
1,89	0,00999	BE888885	FOXO3A	forkhead box O3A
1,88	0,00143	AK024967	MLSTD2	male sterility domain containing 2
1,87	0,0384	AF112203	PX19	px19-like protein
1,86	0,0138	AK024256	CACHD1	cache domain containing 1
1,86	0,00723	AV725666	FOXO3A	forkhead box O3A
1,85	0,0189	AL049223	SCAMP1	Secretory carrier membrane protein 1
1,85	0,0056	BC001120	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble
1,85	0,000805	AF153604	USP15	ubiquitin specific peptidase 15
1,85	0,014	AK001696	IPO11	importin 11
1,84	0,00123	AB020657	IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding protein
1,83	0,00504	AA834560	CNIH4	cornichon homolog 4 (Drosophila)
1,83	0,00999	NM_004849	ATG5	ATG5 autophagy related 5 homolog
1,83	0,00442	AB011087	KIAA0515	KIAA0515
1,83	0,000277	AI146450	HDHD4	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 4
1,82	0,0437	U80918	NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
1,82	0,0257	AF022654	SHOX2	short stature homeobox 2
1,82	0,00828	AF077954	PIAS2	protein inhibitor of activated STAT, 2
1,82	0,0338	AU147785	SARS	Seryl-tRNA synthetase
1,81	0,0212	N25732	FOXO3A	forkhead box O3A
1,81	0,0457	NM_002133	HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1
1,81	0,0461	NM_003138	SRPK2	SFRS protein kinase 2
1,81	0,00889	BF446180	PDCD2	programmed cell death 2
1,80	0,00852	AI377043	BNC2	Basonuclin 2
1,80	0,0176	AL136552	SEMA4F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig)

				4F
1,79	0,0379	NM_020960	GPR107	G protein-coupled receptor 107
1,78	0,0047	BF674052	MIRN21	microRNA 21
1,78	0,00307	AA705182	GLIS2	GLIS family zinc finger 2
1,78	0,00152	BC001282	HMGN4	high mobility group nucleosomal binding domain 4
1,78	0,00284	AL044007	HRPT2	Cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog
1,78	0,00141	AF205218	IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding protein
1,78	0,0102	AA046241	SRPK2	SFRS protein kinase 2
1,77	0,00102	AV745949	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1
1,77	0,0478	AA371513	TMEM41A	transmembrane protein 41A
1,77	0,0442	N57499	BCAP29	B-cell receptor-associated protein 29
1,76	0,0396	M94363	LMNB2	lamin B2
1,76	0,0321	BF438173	FST	follistatin
1,76	0,0124	AL031781	QKI	quaking homolog, KH domain RNA binding
1,75	0,0219	N95430	HKR1	GLI-Kruppel family member HKR1
1,75	0,00629	BF446961	SOCS4	suppressor of cytokine signaling 4
1,75	0,0423	NM_007214	SEC63	SEC63-like
1,74	0,00867	NM_013261	PPARGC1A	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha
1,74	0,014	AW151617	SMAD2	SMAD, mothers against DPP homolog 2
1,73	0,00824	NM_024536	CHPF	chondroitin polymerizing factor
1,73	0,0297	BC006204	BTRC	beta-transducin repeat containing
1,72	0,00478	AF151073	TBC1D7	TBC1 domain family, member 7
1,72	0,0179	BF056303	ZNFN1A5	zinc finger protein, subfamily 1A, 5
1,71	0,0146	NM_001191	BCL2L1	BCL2-like 1
1,71	0,0104	AA133311	FLJ20160	FLJ20160 protein
1,71	0,00614	NM_001455	FOXO3A	forkhead box O3A
1,71	0,0277	AL555227	MRPS6	mitochondrial ribosomal protein S6
1,71	0,00194	D50911	VGLL4	vestigial like 4

1,71	0,0335	BE547542	GOPC	golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing
1,71	0,0108	NM_002346	LY6E	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
1,71	0,0115	U38654	RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family
1,70	0,0464	AU145053	FNBP1	formin binding protein 1

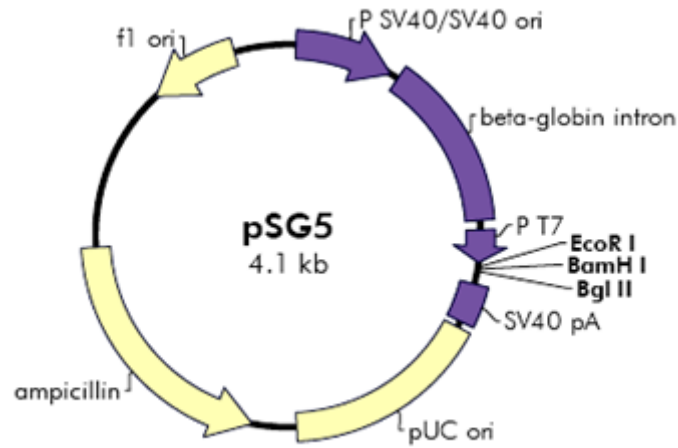


Abbildung Anhang-1: Vektorkarte des pSG5 Vektors der Firma Stratagene.

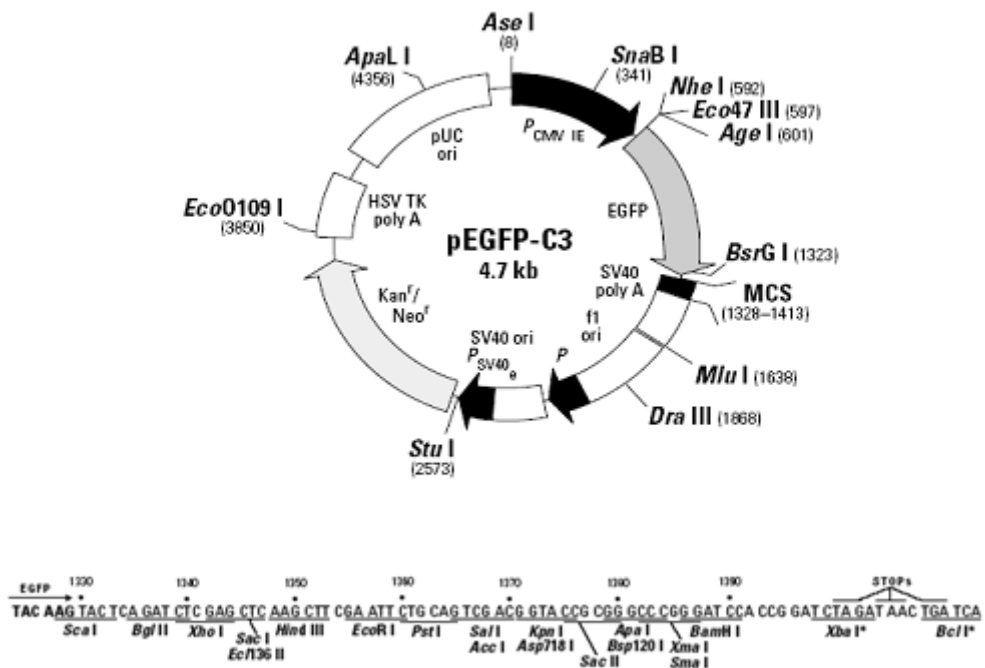


Abbildung Anhang-2: Vektorkarte des pEGFP-C3 Vektors der Firma BD Clontech.

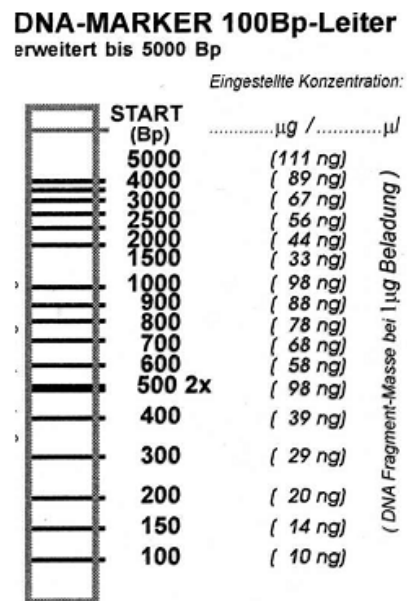


Abbildung Anhang-3: DNA-Längenstandard 100 bp extended der Firma Invitrogen.

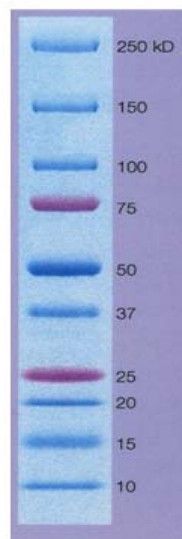


Abbildung Anhang-4: Protein Längenstandard Precision Plus Protein Standard Dual Color der Firma Bio-Rad.

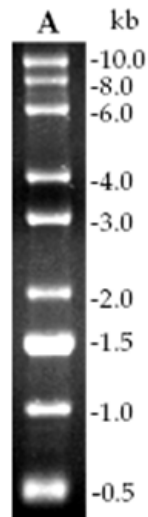


Abbildung Anhang-5: RNA-Längenstandard 0.5-10 Kb RNA Leiter der Firma Invitrogen.

Danksagungen

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. ECKART MEESE für die interessante und spannende Themenstellung, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, seine Unterstützung und die Freiheiten, die er mir bei der Bearbeitung meines Themas gewährt hat.

Herrn Prof. Dr. UWE WALLDORF möchte ich für sein Interesse an meiner Arbeit danken und dafür, dass er sich bereit erklärt hat die Aufgabe des Zweitgutachters zu übernehmen.

Dr. VLADIMIR BENES und TOMI BÄHR-IVACEVIC vom EMBL Genomics Core Facility in Heidelberg möchte ich für ihre Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Genexpressionsanalysen danken.

Prof. Dr. THOMAS CREMER und HILMAR STRICKFADEN danke ich für die Überlassung der HeLa H2B-GFP Zellen sowie für das Interesse an meiner Arbeit und die Unterstützung bei der Live Cell Mikroskopie und Konfokalmikroskopie. Bei HILMAR möchte ich mich besonders für die Nachtschichten mit musikalischer Untermalung bedanken (tribute to BELAFARINROD).

Besonderer Dank gilt Frau Dr. ALESSIA RUGGIERI für stete Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft, für Nachtschichten und Durchhalteparolen.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft. PETRA LEIDINGER, STEFANIE RHEINHEIMER, ALINE FLOCKERZI, JENS RADERMACHER, EVA BRUNNER und ULRIKE FISCHER danke ich für die zahlreichen Anregungen und Ratschläge im Laufe meiner Arbeit.

Bei meiner Familie bedanke ich mich herzlich dafür, dass sie mich während meines Studiums und der Promotion stets unterstützt haben. THOMAS STÖHR danke ich für den liebevollen Beistand, seinen Rückhalt und für seine Motivationskünste.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Sabrina Margarethe Heisel

Anschrift Am Rebenberg 23
66130 Saarbrücken

Geburtsdatum 17.08.1981

Geburtsort Neunkirchen/Saar

Familienstand ledig

Schulische Ausbildung

[1991-2000] Von-der-Leyen-Gymnasium in Blieskastel,
Abschluss: Abitur

Studium

[10/2000 – 09/2005] Universität des Saarlandes
Diplom-Biologie mit Schwerpunkt Human- &
Molekularbiologie
Humangenetik

Hauptfach Immunologie/ Virologie

Nebenfächer Biochemie

Abschluss: Diplom mit Auszeichnung

*[01/2005 –
09/2005]* Diplomarbeit im Fach Humangenetik, durchgeführt am
Insitut für Humangenetik in der Arbeitsgruppe von Prof.
Dr. Eckart Meese, Universität des Saarlandes
Thema: „Untersuchung der Auswirkungen einer GAS41
Überexpression auf die Zelle mittels Microarray
Analysen.“

[ab 10/2005] Promotion am Institut für Humangenetik in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eckart Meese, Universität
des Saarlandes
Thema: „Funktionelle Charakterisierung der Gliom-
amplifizierten Sequenz GAS41 während der Mitose.“

Im Rahmen meiner Promotion am Institut für Humangenetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. ECKART MEESE sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Journalbeiträge

Fischer U, Keller A, Leidinger P, Deutscher S, Heisel S, Urbschat S, Lenhof HP, Meese E. A different view on DNA amplifications indicates frequent, highly complex, and stable amplicons on 12q13-21 in glioma. *Mol Cancer Res.* **2008** Apr;6(4):576-84.

Heisel SM, Ketter R, Keller A, Klein V, Pallasch CP, Lenhof HP, Meese E. Increased seroreactivity to glioma-expressed antigen 2 in brain tumor patients under radiation. *PLoS One.* **2008** May 14;3(5):e2164.

Leidinger P, Keller A, Heisel S, Ludwig N, Rheinheimer S, Klein V, Andres C, Hamacher J, Huwer H, Stephan B, Stehle I, Lenhof HP, Meese E. Novel autoantigens immunogenic in COPD patients. *Respir Res.* **2009** Mar 12;10:20.

K. Melchior, A. Tholey, S. Heisel, A. Keller, HP. Lenhof, E. Meese & C. Huber. Comprehensive proteomic study of human glioblastoma multiforme tissue employing complementary two-dimensional liquid chromatography- mass spectrometry-based approaches. **2009**, eingereicht bei Journal of Proteome Research.

Heisel S., Strickfaden H., Cremer T. Ruggieri A. and Meese E. The novel centrosome protein GAS41 provides new insights into spindle pole formation. **2009**, Manuskript in Vorbereitung

Tagungsbeiträge (Poster)

S. Heisel und E. Meese. Glioma-amplified sequence 41: Target gene identification by siRNA-mediated knockdown and cDNA Microarray analysis in a Glioblastoma multiforme cell line. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, **2008**, Hannover.

S. Heisel und E. Meese. siRNA-mediated knockdown of GAS41 leads to multipolar spindle pole formation and chromosomes. 1st EMBO Conference on Centrosomes and spindle pole bodies, **2008**, Heidelberg.

Heisel S.M., Leidinger P., Ludwig N., Keller A., Werth A., Jung, V., Wullich B., Lenhof H-P., Meese E. Immunogene Antigene als Biomarker für die Diagnose des Prostatakarzinoms. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, **2008**, Stuttgart.

S. Heisel und E. Meese. Glioma amplified sequence 41 is involved in cell division. akzeptiert für The EMBO Meeting, **2009**, Amsterdam