

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

Schwerpunkt: Gastroenterologie, Hepatologie,

Infektionskrankheiten

**Überprüfung von Merbromin und Eosin Y als potenzielle
Zellregeneration fördernde Substanzen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Bajwa, geb. Sindhu, Bariya Ahmed

2019

Dekan: **Professor Dr. I. B. Autenrieth**

1. Berichterstatter: **Professor Dr. N.P. Malek**
2. Berichterstatter: **Professor Dr. A. Hartkopf**

Tag der Disputation: **10.07.2019**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Prof. Malek, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, für die vielen Denkanstöße und Ideen, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffneten und für die sowohl wissenschaftliche als auch klinische Unterstützung meiner Laufbahn.

Ferner möchte ich Dr. Przemyslaw Bozko für die Mitbetreuung an meiner Dissertation und für die freundliche Hilfe danken.

Ich danke außerdem Labormitglied Tim Scholta für die stetige Hilfsbereitschaft während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Familie und insbesondere meinem Ehemann, Asad Hameed Bajwa, für seine unglaublich hilfreiche Unterstützung in Form von Motivation, als mir diese gefehlt hat, für seine Geduld, und sein Verständnis bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern, Nasir A. Sindhu und Mahmooda A. Sindhu, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	9
1.1. Grundlagen der Zellteilungskontrolle	9
1.1.1. Eukaryotischer Zellzyklus im Überblick.....	9
1.1.2. Regulationsmechanismen des Zellzyklus	10
1.1.2.1. Cyclin-abhängige Kinasen.....	10
1.1.2.2. Cyclin-Kinase inhibierende Proteine.....	12
1.1.2.3. Kontrollpunkte des Zellzyklus.....	15
1.1.3. Cdk2-Aktivität als wichtiger Zellzyklus-Regulationsmechanismus	20
1.1.4. Das Protein p27 als wichtiger Modulator der Cdk2-Aktivität	20
1.2. Regenerative Substanzen	21
1.2.1. Regenerative Medizin	21
1.2.1.1. Humane Zellen	21
1.2.1.2. Biomatrix	22
1.2.1.3. Signalstoffe.....	23
1.2.2. Cdk2-aktivierende Substanzen	24
1.2.2.1. Merbromin	25
1.2.2.2. Eosin Y.....	27
1.2.3. Vorarbeiten zu Cdk2-aktivierenden Substanzen	27
1.3. Aufgabenstellung.....	28
2. Material und Methoden.....	30
2.1.1. Material	30
2.1.2. Chemikalien	30
2.1.3. Antibiotika	32

2.1.4.	Antikörper.....	32
2.1.5.	Zelllinien.....	33
2.1.6.	Kits.....	33
2.1.7.	shRNA Bibliothek.....	33
2.1.8.	Verbrauchsmaterialien	34
2.1.9.	Lösungen.....	36
2.2.	Methoden	40
2.2.1.	Kultivieren von adhärenenten Zelllinien	40
2.2.2.	Auszählen von NIH3T3 Zellen mittels Neubauer-Zählkammer	40
2.2.3.	Bestimmung der Verdopplungszeit von NIH3T3 Zellen	41
2.2.4.	Untersuchung der Zellvitalität mittels MTT Assay	42
2.2.5.	Untersuchung der Migration mithilfe des Migrations-Assays	42
2.2.6.	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	43
2.2.7.	Proteincharakterisierung mittels Immunodetektion (Western blot).....	44
2.2.7.1.	Herstellung der Zelllysate und Messung des Proteingehaltes	44
2.2.7.2.	Proteinauftrennung durch die SDS Gelelektrophorese.....	45
2.2.7.3.	Western-Blotting-Methode.....	47
2.2.7.4.	Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	47
2.2.8.	BrdU Analyse mittels Durchflusszytometrie	48
2.2.9.	Isolierung genomischer DNA aus einer Zellsuspension.....	49
2.2.10.	shRNA Bibliothek-Screening.....	49
2.2.10.1.	Virusherstellung (Transfektion).....	49
2.2.10.2.	Transduktion des Virus auf die Zielzelllinie.....	50
2.2.10.3.	Durchführung des Cancer 1000 shRNA Screens	50
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Bestimmung der Verdopplungszeit.....	52
3.2.	Zellviabilitätsanalyse mittels MTT-Assay	53
3.3.	Wundverschlussanalyse mittels Migration-Assay	55

3.4.	Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie	59
3.5.	Proteinanalyse mittels Western-Blot.....	64
3.6.	Zellteilungsanalyse mittels BrdU-Staining	68
3.7.	shRNA Screening	73
3.7.1.	Testreihen für den Versuchsablauf	74
3.7.2.	Virus-Transduktion.....	75
3.7.3.	shRNA Screening-Ergebnisse	76
3.7.3.1.	Eosin Y	76
3.7.3.2.	Merbromin	77
4.	Diskussion	82
4.1.	Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen unter Merbromin und Eosin Y Behandlung.....	83
4.2.	Analyse des Zellzyklus unter Behandlung mit Merbromin und Eosin Y	84
4.2.1.	Untersuchung des Zellzyklus anhand der Messung des DNA-Gehalts von Zellen unter Merbromin und Eosin Y Behandlung	84
4.2.2.	Untersuchung der Veränderung von Proteinmarkern des Zellzyklus unter Merbromin-Behandlung	87
4.2.3.	Untersuchung der DNA-Synthese-Fähigkeit von Zellen unter Merbromin-Behandlung	90
4.3.	Untersuchung der behandelten Zellen mittels shRNA-Screening.....	93
4.3.1.	Eosin Y Screen	93
4.3.2.	Merbromin-Screen	95
5.	Zusammenfassung	100
6.	Abbildungsverzeichnis.....	103
7.	Literaturverzeichnis	105
8.	Erklärungen zum Eigenanteil.....	116
9.	Anhang.....	117

Abkürzungsverzeichnis

α -	anti
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	Ataxia telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Cdk	cyclin dependant kinase; Cyclin-abhängige Kinase
Cdk2	cyclin dependant kinase 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N'- tetraessigsäure
FCS	fetal calw serum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	gramm
GFP	green fluorescent protein
G-Phase	Gap-Phase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HTRF	Homogeneous Time Resolved Fluorescence
IC ₅₀	concentration for 50% inhibition
IC ₉₀	concentration for 90% inhibition
KÖF	Körperoberfläche
l	Liter
m	milli

M-Phase	Mitose-Phase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PARP	Poly ADP ribose polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PI	propidium iodid
PK	Proteinase K
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese
shRNA	short hairpin RNA
S-Phase	Synthese-Phase
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
V	Volt

Ein-/Dreibuchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

1.1. Grundlagen der Zellteilungskontrolle

1.1.1. Eukaryotischer Zellzyklus im Überblick

Eine wesentliche Eigenschaft des Lebens und somit der Lebewesen ist die Fähigkeit zur Regeneration. Die kleinste funktionelle Einheit des Lebewesens ist die Zelle. Zellteilung bezeichnet die Fähigkeit eines Gewebes, alte oder geschädigte Zellen durch neue Zellen zu ersetzen. Der zugrunde liegende Mechanismus der Zellteilung wird als Zellzyklus bezeichnet. Um Zellteilung zu verstehen, ist es daher essentiell den Zellzyklus genauer zu betrachten. Ein Zellzyklus umfasst mehrere voneinander unterscheidbare Abschnitte, die als Phasen bezeichnet werden. Diese müssen von einer jeden Zelle durchlaufen werden, bevor die Zelle eine mitotische Teilung in zwei Tochterzellen vornehmen kann. [54]

Der Zellzyklus wird in zwei große Phasen unterteilt. In die Interphase, in der Zellen wachsen und ihr Erbgut verdoppeln und in die anschließende Mitosephase (M-Phase), in der die Zelle sich teilt. Die Interphase ist wiederum in mehrere Teilphasen gegliedert. Eine S-Phase (Synthese-Phase) ist von zwei G-Phasen (*gap*-Phasen) umschlossen. In der G₁-Phase wachsen die Zellen heran, es werden unter anderem Proteine, die für die Mitose von Bedeutung sind produziert. An die G₁-Phase schließt sich die S-Phase an. In der Synthese-Phase (S-Phase) wird das Erbgut, welches auf der DNA in Form von Genen gespeichert ist, im Rahmen der Replikation identisch dupliziert. Die hieran anknüpfende G₂-Phase bereitet die Zellen auf die Mitose vor, indem insbesondere zellteilungsspezifische Proteine hergestellt werden. In der bereits erwähnten Mitose-Phase teilt sich die Zelle in zwei Tochterzellen. [5] [68]

Vor der Zellteilung liegt die Erbinformation üblicherweise als diploider Chromosomensatz vor. Zur Vorbereitung auf die Teilung, wird das Chromatin kondensiert, die Chromosomen werden dadurch sichtbar. Die Kernmembran löst sich auf und die Chromosomen werden in der Äquatorialebene angeordnet. Hier werden sie von dem Spindelapparat der Zelle, welches sich an den Zentriolen ausbildet und aus Mikrotubuli besteht, erfasst. Die Spindelansatzstelle an den Chromosomen wird kurz vor der Teilung ausgebildet und wird als Kinetochor bezeichnet. Die vor der

Teilung miteinander verbundenen Chromosomenteile werden als Schwesterchromatide bezeichnet. Diese werden von dem Spindelapparat jeweils zu den Polen der Zelle gezogen und somit voneinander getrennt. Nachdem das Erbgut gleichmäßig auf beide Pole der Zellen verteilt wurde, kann die Trennung zweier neuer Tochterzellen, die nun beide das komplette Erbgut erhalten haben, stattfinden. Die beiden Tochterzellen bilden nun erneut Kernmembranen um die Ein-Chromatid-Chromosomen herum aus. Es entsteht wieder ein Chromatingerüst. Der Spindelapparat wird anschließend vollständig aufgelöst und um die beiden Tochterzellen bilden sich neue Zellmembranen aus, es erfolgt die Zytokinese. [68]

1.1.2. Regulationsmechanismen des Zellzyklus

1.1.2.1. Cyclin-abhängige Kinasen

Die zentrale Maschinerie, welche die Zellzyklusprogression vorantreibt stellen die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) dar. Diese sind wichtig für das Voranschreiten des Zellzyklus. Sie kontrollieren die Zellteilung und beeinflussen die Transkription. Hierbei werden sie durch intra- sowie extrazelluläre Signale gesteuert. Die Cyclin-abhängigen Kinasen gehören zur Familie der Serin- und Threonin-Kinasen. In der Literatur werden 20 verschiedene humane Cdks beschrieben. Sie können in 3 zellzyklusrelevante Subfamilien und 5 transkriptionsrelevante Subfamilien eingeteilt werden. Zu den 3 zellzyklusrelevanten Subfamilien gehören die Cdk1 (gemeinsam mit Cdk2 und Cdk3), Cdk4 (gemeinsam mit Cdk6) sowie Cdk5 (gemeinsam mit Cdk14 - Cdk18). [1]

Wie der Name bereits vermuten lässt, können die Cyclin-abhängigen Kinasen erst ihre Aktivität entfalten, wenn sogenannte Cycline die monomere Struktur der Cdks verändern. Cycline sind Proteine, deren Bildung und proteolytischer Abbau genauestens reguliert werden. Sie treten im Verlauf des Zellzyklus in einem oszillierenden Muster auf. Für die erwähnten 20 humanen Cdks existieren 29 humane Cycline. Es kann sowohl ein Cyclin mit mehreren Cyclin-abhängigen Kinasen interagieren, sowie eine Cyclin-abhängige Kinase mit mehreren Cyclinen. Um das katalytische Zentrum der Cyclin-abhängigen Kinase für die weiteren Substrate zu aktivieren sind bestimmte Schritte notwendig. Die Cyclin-abhängige Kinase bindet durch eine hochgradig hydrophobe Domäne in ihrer C-Helix (spezifische alpha-Helix Struktur bei Kinasen) an eine spezifische Helixstruktur im

Cyclin, was zu einer Konformationsänderung in der ATP-Bindetasche der Cyclin-abhängigen Kinase führt. Die Aktivitätsdomäne und die C-Helix der Cyclin-abhängigen Kinase werden auseinander gezogen, sodass Threonin durch die Cdk-aktivierende Kinase (CAK, Komplex aus Cdk7/CyclinH) phosphoryliert werden kann und dadurch das katalytische Zentrum für eine enzymatische Aktivität freigegeben werden kann. **[46]**

Cyclin-abhängige Kinasen funktionieren, indem sie durch Phosphorylierung verschiedene Proteine beeinflussen, die für die Zellzyklusprogression bzw. Transkription essentiell sind. Insbesondere führen die zellzyklusrelevanten Subfamilien der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk1, Cdk4, Cdk5) gemeinsam mit ihren korrespondierenden Cyclinen durch ihre Aktivität zum Übergang einer Zellphase in die nächste Zellphase. Die Initiierung des Zellzyklus wird dabei tragend von D-Typ Cyclinen bestimmt. Die Bildung dieser wird durch äußere Wachstumsfaktoren getriggert. Cyclin D formt insbesondere Komplexe mit Cdk4 und Cdk6 und phosphoryliert das Retinoblastom (Rb) Protein. Das Retinoblastom Protein inhibiert im nicht-phosphorylierten Zustand E2F-Transkriptionsfaktoren. Eine Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins durch Cdk4/Cyclin D sowie Cdk6/Cyclin D Komplexe führt unter anderem zur Aktivierung des Cyclin E-Promoters. E-Typ Cycline binden an Cdk2. Cdk2 im Komplex mit Cyclin E hebt komplett die Inhibierung der E2F-Transkriptionsfaktoren durch das Rb- Protein auf. E2F-kontrollierte Gene sind zum Beispiel Gene für die DNA-Polymerase I sowie für die Synthese von dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate). Dies führt zur Überwindung des Restriktionspunktes und die S-Phase kann eingeleitet werden. In der S-Phase wird das Cyclin E durch das Cyclin A ausgetauscht. Cdk2 im Komplex mit Cyclin A führt zum Voranschreiten des Zellzyklus bis zum Ende der G2-Phase. Hier bindet das Cyclin A an Cdk1. Dieser Cdk1/Cyclin A Komplex führt zur Auflösung der Kernmembran als Vorbereitung auf die anstehende Zellteilung. Diese Situation führt zur Degradierung von Cyclin A und Cdk1 bindet an Cyclin B. Cdk1/Cyclin B im Komplex vollführt dann die Auflösung der Kernlamina durch Phosphorylierung von Laminproteinen und dann die endgültige Mitose. **[92] [46]**

Cdk5 kann als die letzte der 3 zellzyklusrelevanten Subfamilien zu den atypischen Cyclin-abhängigen Kinasen gezählt werden. Cdk5 wird nämlich nicht von Cyclin-Proteinen sondern von p35 und p39 aktiviert. Cdk5 wird in diversen Zellen exprimiert,

entfaltet ihre Aktivität wahrscheinlich aber am ehesten in terminal differenzierten Zellen, wie z.B. Neuronen. [18]

Die Regulation der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen wird unter anderem durch die Cyclinkonzentration gesteuert. Eine Induktion der Cyclinkonzentration kann zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren mit entsprechenden Wachstumsfaktorrezeptoren in der Zelle herbeigeführt werden. Diese Rezeptoren lösen eine dazugehörige Signalkaskade aus, die zur Transkription von Cyclin-Genen führt. Der Abbau von Cyclinen wird in der Regel durch Autoregulation hervorgerufen.

Die Regulation von Cyclin-abhängigen Kinasen kann jedoch auch auf andere Arten gesteuert werden. So können sowohl die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Threonin und Tyrosin die Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen beeinflussen, als auch das Binden und Nicht-Binden von kleinen Cdk-inhibierenden Proteinen eine Regulation der Cdks bewirken. [1]

1.1.2.2. Cyclin-Kinase inhibierende Proteine

Cdk-inhibierenden Proteine werden in zwei Proteinfamilien aufgeteilt, einerseits in die INK-Familie und andererseits in die Cip/Kip-Familie. Zu den Cdk-inhibierenden Proteinen aus der INK-Familie zählen zum Beispiel p15, p16, p18, p19 und zu den Cdk-inhibierenden Proteinen aus der Cip/Kip-Familie zählen p21, p27, sowie p57. Die Aufgabe dieser Proteine ist unter anderem die Regulierung des Zellzyklus durch Inhibierung der Cdks. Auf diese Weise wirken sie dem Voranschreiten des Zellzyklus entgegen. Die Proteine aus der INK-Familie inhibieren den CDK4/6 Komplex und sind somit für die Regulierung des Zellzyklus spezifisch in der G₁-Phase verantwortlich. Die Proteine aus der Kip/Cip-Familie, insbesondere das p27 und das p21 greifen an diversen Cyclin-Cdk-Komplexen an und spielen somit in der Gesamtheit des Zellzyklus eine tragende Rolle. Auch können die verschiedenen Cdk-inhibierenden Proteine bei der Tumorentstehung sowie der Seneszens beteiligt sein. Beispielhaft soll das am p16 Protein aufgezeigt werden. Es ist bekannt, dass z.B. p16-Mutationen oder die verringerte Expression von p16 über eine DNA-Methylierung der p16-Gene häufig bei Plattenepithelkarzinomen und Darmkrebs vorkommen können. Außerdem scheint die verringerte p16-Expression auch eine schlechtere Prognose bei der Progression von Brustkrebs zu haben. Diese Tatsachen unterstützen die These, dass p16 als Tumorsuppressor fungiert. [78]

P16 wird ebenfalls als Marker für die Zellseneszenz eingesetzt. Senescente Zellen, sind Zellen, die ausdifferenziert sind und in der G₁/G₀-Phase des Zellzyklus verbleiben. Sie verlieren so ihre Teilungseigenschaft, da sie die S-Phase nicht mehr erreichen können. Das erste Mal wurde der Begriff der zellulären Seneszenz von *Hayflick* 1965 geprägt, als dieser zeigen konnte, dass diploide Zellen eine endliche Lebensspanne *in vitro* haben. Zelluläre Seneszenz beschreibt also den stabilen und langfristigen Verlust der proliferativen Aktivität von Zellen bei gleichzeitig erhaltener Viabilität und metabolischer Aktivität. Zelluläre Seneszenz äußert sich in der Regel durch zwei Arten. Die replikative Seneszenz beschreibt eine endliche Lebensspanne der Zellen aufgrund einer Verkürzung der Chromosomen mit der Zeit. Diese wird über repetitive DNA-Sequenzen an den Enden der linearen Chromosomen, den sogenannten Telomeren, herbeigeführt. Sobald die Chromosomen eine kritische Länge erreicht haben, wird durch die DNA-Reparaturmechanismen mittels p53, durch das Retinoblastom-Protein (Rb) und p16 die Proliferation transient arretiert, bis entweder die Apoptose oder Seneszenz eingeleitet wird. Die andere Art beschreibt eine telomer-unabhängige Seneszenz, die durch zellulären Stress oder onkogen-induziert herbeigeführt werden kann. Das p16 spielt bei der onkogen-induzierten Seneszenz vor allem in humanen Zellen eine wichtige Rolle. [3]

Das Protein p27 inhibiert als Cdk-inhibierendes Protein den Cdk4-Cyclin D-Komplex, sowie den Cdk2-Cyclin E-Komplex, hemmt die Aktivierung dieser Komplexe und kontrolliert somit den Zellzyklus in der G₁-Phase. Eine erhöhte Expression von p27 führt daher auch zum G₁-Phase-Arrest. P27 bindet sowohl an das Cyclin-Protein als auch an das katalytische Zentrum der Cdk und verhindert somit die Umsetzung von ATP. Das p27 selbst kann durch Phosphorylierung reguliert werden. So führt eine Phosphorylierung an Y88 und Y89 zu einer verminderten Affinität an den Cdk-Cyclin-Komplex und so zu einer verminderten Inhibierung. Die Phosphorylierung an T187 führt zum proteolytischen Abbau von p27 und wirkt somit aktivierend auf den Cdk2-Cyclin-Komplex. [27]

Für p27 konnte auch gezeigt werden, dass es viele zusätzliche Funktionen besitzt. So zeigten p27-negative Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Hypophysentumore, was die Funktion von p27 als Tumorsuppressor unterstützt. In anderen Organen konnten keine Tumore nachgewiesen werden, diese zeigten sich aber hyperplastisch verändert. Tatsächlich zeigten sich bisher bei Tumoren im Gegensatz zu p53 und

p16 zwar selten Mutationen im p27-Gen, p27-negative Zellen zeigen jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit für die Induktion von Tumoren über λ -Strahlung und mutagene Stoffe. [45]

Nicht nur die Expression von p27, sondern auch die Lokalisation kann unterschiedliche Funktionen von p27 auslösen. So konnte gezeigt werden, dass eine zytoplasmatische Lokalisation von p27 zu einer Verschlechterung der Prognose bei Brustkrebs und Barrett-Karzinomen führt. Es ist anzunehmen, dass das Ausschleusen von p27 aus dem Zellkern in das Zytoplasma die Inhibitorfunktion von p27 gegenüber den Cyclin/Cdk-Komplexen außer Kraft setzt und so über eine gesteigerte Proliferation die Tumorentstehung fördert. Das multifunktionale Protein p27 spielt auch eine Rolle in der Migration. Das zytoplasmatische p27 scheint RhoA zu inhibieren, indem es die Bindestelle von RhoA zu seinen Bindepartnern (GEF = *guanine nucleotide exchange factor*) blockiert. RhoA beeinflusst maßgebend die Migration, indem es direkt die Aktinpolymerisation durch die Veränderung der monomeren Struktur in ganze Aktinfilamente stimuliert und so das Zytoskelett reguliert. Außerdem ist es durch die zugehörigen *downstream targets*, den sogenannten ROCK-Kinasen an der Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen beteiligt. Zellen ohne p27 zeigten eine verschlechterte Migrationsfähigkeit. [6]

Das Protein p21 ist ebenfalls ein bekannter Zellzyklusinhibitor. Die Inhibition erfolgt einerseits am G₁/S-Übergang des Zellzyklus, sowie am G₂/M-Übergang des Zellzyklus über die Inhibierung der dazu gehörigen Cdk-Cyclin-Komplexe. Abgesehen von seiner Rolle als Zellzyklusarrestprotein spielt es auch eine wichtige Rolle in der Inhibierung von Apoptose und in der Reaktion auf DNA-Schäden durch direkte Interaktionen mit PCNA und dadurch Inhibierung der DNA-Replikation. (siehe 1.1.2.3) [36]

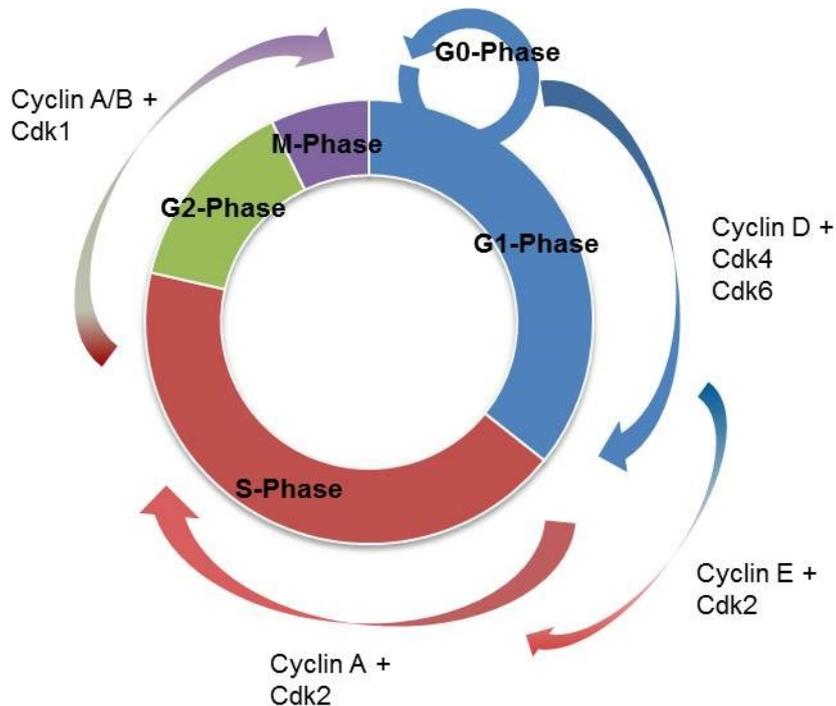


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Zellzyklus. Mit Darstellung der jeweiligen Cyclin-Cdk Komplexe. (Darstellung basierend auf [1])

In Abb. 1.1 ist der schematische Aufbau des Zellzyklus mit den korrespondierenden Cyclin-abhängigen Kinasen und den dazu gehörigen Cyclinen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen dargestellt. Die Pfeile markieren den ungefähren Zeitpunkt des Zellzyklus zu dem die Komplexe aus Cyclin-abhängigen Kinasen und den dazu gehörigen Cyclinen aktiv an dem Voranschreiten des Zellzyklus mitwirken. [1]

1.1.2.3. Kontrollpunkte des Zellzyklus

Der Zellzyklus ist eine Abfolge von vielen komplexen Ereignissen und Interaktionen von verschiedenen Proteinen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es während des Zellzyklus zu Fehlern kommen kann. Diese Fehler führen dazu, dass die Zelle ihre Funktion gegebenenfalls nicht mehr ausüben kann. Um das zu verhindern, benötigt die Zelle eigene Regulationsmechanismen.

Zu den Regulationsmechanismen des Zellzyklus gehören sogenannte Kontrollpunkte, die von einer Zelle zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus überwunden werden müssen, bevor der jeweils nächste Zyklusabschnitt angegangen werden kann. Solche Kontrollpunkte befinden sich sowohl in der Interphase als auch

in der Mitosephase. In der Interphase sind drei wichtige Kontrollpunkte zu nennen. Am Übergang der G₁- zur S-Phase, innerhalb der S-Phase und ein dritter am Übergang der G₂- zur M-Phase.

Relevante Vorgänge, die einen Einfluss auf den G₁-Kontrollpunkt haben und zur Überwindung dessen führen sind sowohl eine ausreichende Zellgröße, genügend Wachstumsfaktoren, das Fehlen antimitogener Signale als auch die Reparatur von DNA-Schäden. Für den G₁-Kontrollpunkt spielt der Transkriptionsfaktor p53 eine essentielle Rolle. Dieser kann durch ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*) und ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) posttranslational reguliert werden. ATR und ATM reagieren als Sensoren auf DNA-Doppelstrangbrüche, bzw. auf DNA-Schäden durch UV-Strahlen. Der Transkriptionsfaktor p53 wird dadurch weniger über Mdm2 abgebaut und stabilisiert. Er führt als Transkriptionsfaktor zur Induktion der Synthese von p21. Das p21 hemmt den CyclinE/Cdk2-Komplex, was den Eintritt in die S-Phase inhibiert. Außerdem wird über den Chk1/2-Signalweg die Phosphatase Cdc25a inhibiert. Eine aktive Cdc25a dephosphoryliert und aktiviert Cdk2 üblicherweise. Durch die Inhibierung von Cdc25a wird die Cdk2 also zusätzlich inaktiviert und somit können die DNA-Schäden vor Beginn der Replikation ausgebessert werden. [1]

Auch spielt die Überwindung des Restriktionspunktes in der G₁-Phase eine entscheidende Rolle als Regulationsmechanismus. Der Restriktionspunkt ist gekennzeichnet als Zeitpunkt, dessen Überwindung dazu führt, dass die Zellteilung eingeleitet wird, ohne dass äußere Faktoren noch Einfluss darauf nehmen können. Lange wurde darüber diskutiert welcher genaue Mechanismus zur irreversiblen Überwindung dieses Punktes führt. Nach der Replikation und anschließenden Teilung entscheidet sich die Zelle entweder erneut in den Zellzyklus einzutreten und sich zu teilen, oder wählt für eine unbestimmte Zeit in der sogenannten G₀-Phase zu ruhen. Ein zellulärer Mechanismus, der zu dieser Entscheidungsfindung beiträgt, ist die Phosphorylierung von Rb-Protein und die damit zusammenhängende Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (E2F). [96]

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Zellen auch in der G₁-Phase arretiert werden können nach bereits stattgefundenener Rb-Phosphorylierung, sodass die Frage aufgeworfen werden muss, welcher Zeitpunkt nach der Rb-Phosphorylierung und vor Eintritt der S-Phase als Restriktionspunkt deklariert werden kann. Einen solchen

Zeitpunkt stellt die Inaktivierung der E3 Ubiquitin Ligase *anaphase-promoting-complex-Cyclosom-Cdh1* (APC^{Cdh1}) dar. Unterstützt wird diese Annahme unter anderem dadurch, dass die Aktivierung von APC^{Cdh1} in der Regel am Ende der Mitose eingeleitet wird und bei sich ruhenden Zellen in der G_0 -Phase aufrecht erhalten bleibt. [19] Außerdem konnte gezeigt werden, dass Cdh1-negative Zellen eine verkürzte G_1 -Phase aufweisen, DNA-Schäden induzieren und dadurch die Apoptose einleiten. [63] APC/C ist eine E3-Ubiquitin Ligase die zusammen mit zwei verschiedenen Adapter-Proteinen verschiedene Substrate markiert und so dem Proteasom zum Abbau zuführt. Vor allem postmitotisch führt die Aktivierung von Cdc20 als APC^{Cdc20} zu einem Abbau von mitotischen Cyclinen. Anschließend wird durch die aktivierende Dephosphorylierung von Cdh1 über Cdc14 die APC^{Cdh1} aktiviert und diese hält Cycline weiterhin supprimiert. Dadurch werden die Aktivierung von Cdks und der Progress des Zellzyklus verhindert. Substrate von APC^{Cdh1} sind unter anderem Skp2, ein Inhibitor von p27, sowie Ets2, ein Aktivator von Cyclin D1. Durch den Abbau beider Substrate wird also die p27-Aktivität stabilisiert und somit die Hemmung seiner Cdk-Cyclin-Komplexe, außerdem werden D-Typ Cycline, welche wichtig für die Aktivierung von Cdk1 sind, indirekt gehemmt. [44]

Einige DNA-Schäden können nur während der S-Phase repariert werden, weshalb der intra-S-Phase Kontrollpunkt eine essentielle Rolle für den Zellzyklus einnimmt. Sowohl interne, als auch externe Faktoren können zu direkten DNA-Schäden führen. Beispiele für interne Faktoren sind oxidativer Stress oder die vermehrte Verwendung/Herstellung von Ribonukleotiden anstelle von Desoxyribonukleotiden. UV-Licht, ionisierende Strahlung oder Substanzen wie z.B. MMS (Methyl-Methan Sulfonat) können die DNA von außen schädigen. Die Zelle reagiert auf diese Schäden meist mit einer Aktivierung der ATR-Kinase. ATM wird eher bei Doppelstrangbrüchen aktiviert. Die durch die Helikase entwundene DNA wird mit RPA (*replication protein A*) beladen. Das *ATR-interacting protein* (ATRIP) bindet an die RPA Proteine, welche mit den DNA-Einzelsträngen interagieren, und rekrutiert ATR, welches dadurch auf die DNA-Schäden reagieren kann. Außerdem wird Rad17 rekrutiert, welches mit dem trimerischen Komplex Rad9-Rad1-Hus1 (9-1-1) interagiert um auch auf die DNA-Schäden reagieren zu können. Anschließend wird durch ATR als auch durch Rad17 im Komplex mit 9-1-1 Chk1 aktiviert. Dieser Vorgang hat einen Einfluss auf einerseits die Replikationsgabel über eine

Regulierung der Replisom-Stabilität, und andererseits auf den Startschuss für die Trennung der Replikationsgabeln (*origin firing*), sowie transkribierende Vorgänge. Die DNA-Schäden können hierdurch während der Kontrolle mittels verschiedener Reparaturmechanismen ausgebessert werden. **[33]**

Der G₂-Kontrollpunkt wird ebenfalls wesentlich über den Chk1/2-Signalweg bestimmt. Dieser wird hauptsächlich über post-replikative DNA-Schäden aktiviert und führt zur Verhinderung der Mitose, bis die DNA-Schäden repariert werden können. Das durch ATR und ATM aktivierte Chk1/2 phosphoryliert und inhibiert so die Phosphatase Cdc25. Cdc25 führt normalerweise zur Aktivierung der Cdk1 durch Dephosphorylierung. Die Cdk1 kann durch die anhaltende Phosphorylierung der Wee1-kinase inhibiert werden. Cdc25 führt über eine Dephosphorylierung von T14 und Y15 der Cdk1 zu einer Aktivierung des Cdk1-Cyclin B Komplexes. Chk1/2 führt zur Aktivierung von 14-3-3 Proteinen, welche die Cdc25 und auch die Cdk1 im Zytoplasma gebunden halten und dadurch die nukleären Funktionen unterbinden. Außerdem wird p53 über eine ATM vermittelte Aufhebung der Inhibition mittels Mdm2 (*E3 ubiquitin ligase*) ebenfalls aktiviert, weil es sich in der Regel bei den postreplikativen DNA-Schäden um DNA-Doppelstrangbrüche handelt, welche durch ATM erkannt werden. Dies führt zur p21 Aktivierung. Das p21 bewirkt eine Hemmung der Phosphorylierung von Cdk1 an T161 durch die CAK (Cdk-aktivierende Kinase) und dadurch zu einer Cdc25 unabhängigen Inaktivierung. Auch wird postuliert, dass p21 eine Translokation von Cyclin B in den Nukleus verhindert und so ebenfalls die aktivierende Dephosphorylierung durch Cdc25 verhindert wird. Erst wenn die Schäden beseitigt werden, kann die Mitose-Phase eingeleitet werden. **[90]**

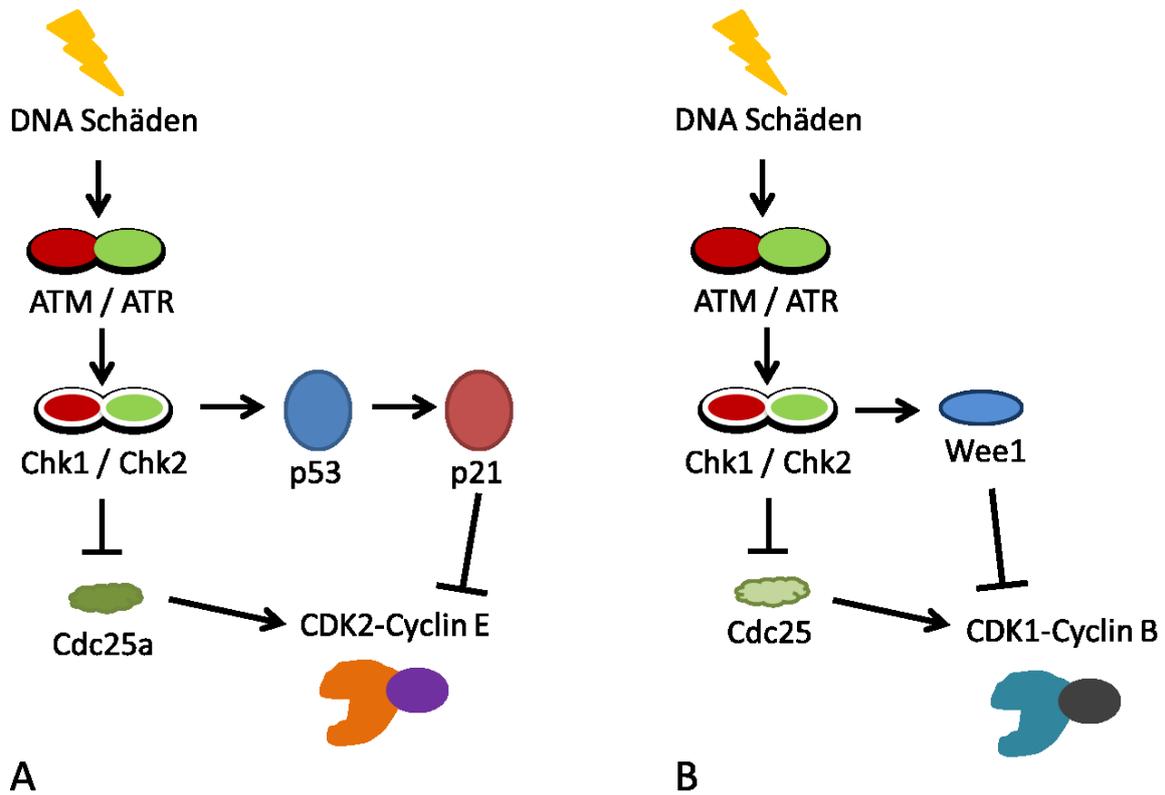


Abb. 1.2 G₁ und G₂ Kontrollpunkte mit korrespondierenden Proteinen. G₁-Kontrollpunkt mit Darstellung der korrespondierenden Proteine (A). G₂-Kontrollpunkt mit Darstellung der korrespondierenden Proteine (B). (Darstellung basierend auf [1][90]) Pfeile sind aktivierend; Striche sind inhibierend.

In der Mitosephase befindet sich ein weiterer Kontrollpunkt, der kontrolliert, ob die Chromosomen richtig angeordnet sind und ob DNA gleichwertig auf beide Tochterzellen nach der Mitose verteilt werden konnte. Um die Metaphase einzuleiten wird die Cyclin B Synthese induziert. Sobald die Metaphase mithilfe des Cdk1-Cyclin B Komplex eingeleitet werden konnte, wird durch einen negativen autoregulatorischen Mechanismus der APC/C-Komplex (*anaphase promoting complex*) durch eine Cdk1-Cyclin B-abhängige Phosphorylierung aktiviert und führt zum Abbau von Cyclin B und damit zur Senkung der Aktivität von Cdk1. Dies hat zur Folge, dass die Anaphase eingeleitet werden kann. [62]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Cdks eine wichtige Rolle bei der Überwindung der Kontrollpunkte spielen. Dies erreichen sie durch die Abfolge von Geschehnissen, die durch Phosphorylierung ausgelöst werden. Einerseits wird die Herstellung von Proteinen, die das Voranschreiten des Zellzyklus bewirken, gefördert, andererseits wird die Degradation von Proteinen gefördert, die das

Voranschreiten des Zellzyklus hemmen, wie beispielsweise die Cdk-inhibierenden Proteine. [68]

1.1.3. Cdk2-Aktivität als wichtiger Zellzyklus-Regulationsmechanismus

Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk) spielen eine wichtige Rolle für die Zellteilung und das Zellwachstum. Die Cyclin-abhängige Kinase 2 (Cdk2) in ihrem Komplex mit Cyclin E ist von großer Bedeutung bei der G₁-S-Transition durch die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Phosphoryliertes Retinoblastom-Protein aktiviert den Transkriptionsfaktor E2F und führt so zur Transkription verschiedener Proteine, die für die Progression der Synthese-Phase benötigt werden. [4]

Gemeinsam im Komplex mit Cyclin A spielt die Cdk2 eine wichtige Rolle für das Voranschreiten der S-Phase und den Übergang in die G₂-Phase. So reguliert sie die Aktivierung des Cdk1-Cyclin B-Komplexes und damit den Eintritt in die Mitose-Phase. Oakes et al., konnten zeigen, dass der Cdk2-Cyclin A-Komplex zu einer Erhöhung der Cdh1 Level führt und somit zu einer Verringerung der Chk1 Aktivität, was wiederum die Mitose-Progression fördert. [58]

Ein *in vivo knockout* von Cdk2 in Mäusen führte nicht zum Tod der Mäuse, sodass der Cdk2 keine essentielle Rolle für die Zellproliferation zugesprochen werden kann. Es ist zu vermuten, dass Cdk1 und Cdk4 kompensatorische Rollen bei Cdk2-defizienten Mäusen in Hinblick auf die Zellproliferation übernehmen. Der *knockout* führte jedoch zur Sterilität der Mäuse durch eine defekte meiotische Zellteilung und die Unfähigkeit zur Produktion von haploiden Gameten. [4]

1.1.4. Das Protein p27 als wichtiger Modulator der Cdk2-Aktivität

Das bereits erwähnte p27 Protein inhibiert sowohl den Cdk2-Cyclin E-Komplex, als auch den Cdk2-Cyclin A-Komplex und ist somit als Inhibitor der Cdk2 anzusehen. Es wird durch mitogene und antimitogene Signale gesteuert. Die Regulierung von p27 erfolgt auf transkriptionaler sowie post-translationaler Ebene durch Veränderung der Lokalisation sowie durch Ubiquitin-abhängige Proteolyse und Modifikation durch Phosphorylierung. [27] [71]

In der G₁-Phase wird die Stabilität von p27 verändert. Das p27 Protein ist in der frühen G₁-Phase ein stabiles Protein und wird nach dem Überschreiten des Restriktionspunktes am G₁/S-Übergang durch das Proteasom abgebaut. Eine Erhöhung der Cdk4/6-Cyclin D-Komplexe führt dazu, dass p27 diese Komplexe vermehrt bindet und weniger p27 für die Cdk2-Cyclin E-Komplex-Bindung zur Verfügung steht. Die Aktivierung des Cdk2-Cyclin E-Komplexes wiederum führt zur Phosphorylierung des p27 an Threonin 187. Dies führt zur Initiierung des Abbaus durch den SCF^{Skp2}-Ubiquitin-Ligase-Komplex. [23]

Ein anderer Regulationsmechanismus ist der nukleäre Export von p27. Dieser führt zur p27-Inaktivierung, da ein zytoplasmatisch exprimiertes p27 keine inhibierende Wirkung mehr auf nukleäre Proteine ausüben kann. Der Export wird durch die Phosphorylierung von p27 an Serin 10 und das nachfolgende Binden des Exporter-Proteins CRM1 initiiert und ist unabhängig von den anderen proteolytischen Regulationsmechanismen. [32]

1.2. Regenerative Substanzen

1.2.1. Regenerative Medizin

Sowohl Organversagen, als auch der Verlust von Gewebe durch Erkrankungen oder Verletzungen sind der Grund für den Bedarf zur Entwicklung von Therapien, die Zellregeneration induzieren können. Regenerative Medizin ist der Überbegriff für diesen Teil der Medizin, der humane Zellen, Gewebe oder gar gesamte Organe ersetzt oder regeneriert um wieder eine normale Funktion und Integrität gewährleisten zu können. Die regenerative Medizin umfasst drei Behandlungsstrategien, welche dieses Ziel erreichen sollen. Es werden zum einen humane Zellen eingesetzt, sowie Biomatrix und auch Signalstoffe.

1.2.1.1. Humane Zellen

Zur Regeneration von Geweben können humane Zellen verwendet werden. Aktuell werden embryonale Stammzellen (ESC): humane pluripotente Stammzellen (hPSC), sowie induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC), adulte Stammzellen und ausdifferenzierte Zellen eingesetzt.

Humane embryonale Stammzellen (hPSC) stellen eine immense Quelle für die regenerative Medizin dar, da diese in jede gewünschte Gewebszelle differenziert werden können. Das Problem bei der sowieso sehr aufwendigen Transplantation sind einerseits die immune Reaktion des Wirts, sowie eine mögliche ausbleibende gewünschte Differenzierung und gegebenenfalls auch Tumorentstehung. In klinischen Studien wurden sie aber bereits zur Behandlung der Makuladegeneration verwendet. [76]

Um das Problem der Immunreaktion bei der Transplantation zu umgehen wurden induzierte Stammzellen über die Expression von Transkriptionsfaktoren entwickelt. Diese können ähnlich den hPSC in viele verschiedene Zellen differenziert werden. Aufgrund der viralen Integration von Onkogenen (z.B. c-myc) die zur Tumorentstehung führen könnten, wurden ebenfalls nicht-integrative Verfahren zur Herstellung entwickelt. Diese zeigten sich jedoch weniger wirksam. Trotz dessen werden auch diese aktuell in klinischen Studien zur Behandlung von Makuladegeneration in Japan untersucht und konnten bereits vielversprechende Resultate erzielen. [47]

Adulte Stammzellen sind Zellen, die sich selbst erneuern können und je nach Organ in dem sie lokalisiert sind, organspezifische Zellen hervorbringen können. Adulte Stammzellen sind bereits in den verschiedensten Geweben beschrieben worden, wie z.B. im Blut, Nervensystem, Leber, Haut, Muskuloskeletal, in der Kornea, sowie im Fett- und Knochengewebe. Diese können zwar nur limitiert genutzt werden, haben aber auch ein geringeres Risiko für die Tumorentstehung und finden bereits in vielen klinischen Studien Anwendung. [65]

Auch ausdifferenzierte Zellen werden z.B. für die Behandlung von Verbrennungen und größer flächigen Ulzerationen eingesetzt. Es gibt zugelassene Behandlungsmethoden, die unter anderem lebende Fibroblasten oder Chondrozyten verwenden.

1.2.1.2. Biomatrix

Die Biomatrix ist ein essentieller Bestandteil des gesamten zellulären Verbundsystems. Sie unterhält verschiedene wichtige Funktionen bei der Verwendung in der regenerativen Medizin, wie z.B. die Grundlage für die zelluläre Integrität und organisatorische Struktur. Sie ist der Nährboden, auf dem die Zellen

sich organisieren können, sowie eine Möglichkeit um bioaktive Faktoren zu integrieren, welche das Überleben der Zellen gewährleisten, oder die Entscheidung zur Differenzierung der Zellen mitbestimmen. Es können drei Arten unterschieden werden: Natürliche Materialien, wie z.B. Kollagen und Hyaluronsäure, synthetische Polymere sowie dezellularisierte Organmatrix. [59]

1.2.1.3. Signalstoffe

Eine andere Behandlungsmethode der Zelltherapie kann es sein, dass adulte Stammzellreservoir zu regenerieren um gewebsspezifische Zellen zu produzieren und damit dem Zellsterben entgegen zu wirken. Heutzutage ist bekannt, dass verschiedene Signalwege eine Rolle bei der Stammzellregulation spielen: *Wnt signaling*, *Sonic hedgehog (SHH) signaling* und *TGF- β signaling*. [55]

In mehreren genetischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Beeinträchtigung der Signalwege, welche wichtig für die Stammzellregulation sind, zu einer Verringerung des Stammzellpools führt. [37]

Daher ist es ersichtlich, dass eine mögliche Aktivierung dieser Signalwegaktivität durch exogene Stimulanzen zu einer verbesserten Stammzellpopulation führen kann und daher ein wertvolles Instrument für die regenerative Medizin darstellt. Die Aktivierung des SHH Signalweges um Haarzellregeneration zu stimulieren konnte bereits erfolgreich angewandt werden. [60]

Die Aktivierung dieser Signalwege wird aber auch mit Tumorentstehung assoziiert, deshalb wird in der Medizin das größere Augenmerk auf die Herstellung von Substanzen gelegt, die diese Signalwege inhibieren können. Es gibt nur wenige Studien über die Erforschung möglicher Agonisten. Grund ist sicher der enorme Bedarf an krebsbekämpfenden Medikamenten und die Angst bei einer endogenen Aktivierung dieser Signalwege zur Tumorentstehung beizutragen. Diesem möglichen Risiko könnte jedoch über eine rein lokale Applikation entgegen gewirkt werden. Es gibt bereits Ansätze, bei denen die Wirkstoffe in eine Gelmatrix oder andere Gewebsstrukturen verpackt und injiziert werden können. [84] Bisher erforschte Substanzen sind unter anderem Tetraethylenepentamine und 16,16-dimethylprostaglandin E2 zur Aktivierung von Zellproliferation in Nabelschnurblutzellen *ex vivo*. Außerdem werden Givinostat (ein Histondeacetylase-Inhibitor) und HT-100/halofuginone bei Patienten mit Muskeldystrophie vom Typ Duchenne eingesetzt um Muskelzellregeneration zu fördern.

1.2.2. Cdk2-aktivierende Substanzen

Das Verständnis der Cdk2 als wichtiger Modulator der Zellzyklus-Progression stellt einen interessanten Angriffspunkt für verschiedene Substanzen dar.

Die Inhibierung der Cdk2 als Zellzyklus-Aktivator kann als möglicher Therapieansatz bei mutierten Krebszellen genutzt werden um die Zellproliferation zu hemmen. Es werden bereits Cdk-Inhibitoren gegen verschiedene Krebsarten eingesetzt. Insbesondere für Patienten mit nachgewiesenen Mutationen in diesen Genen stellen solche personalisierten medizinischen Therapiestrategien eine gute Behandlungsmethode dar. Es werden bereits Cdk4/6-Inhibitoren in Phase-3-Studien geprüft (Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib). Das Palbociclib ist sogar seit 2016 für metastasierten Brustkrebs zugelassen worden. Auch Cdk2-Cyclin-Komplex Inhibitoren finden bereits Anwendung in der Forschung zur möglichen Behandlung von Krebsarten. **[15]**

Analog zu Cdk-Inhibitoren stellt auch der Einsatz von Wirkstoffen, die spezifisch die Cdk2 aktivieren einen interessanten Angriffspunkt dar. Solche regenerativen Substanzen, die zu einer geregelten Progression des Zellzyklus führen, könnten zur Therapie bei diversen Erkrankungen eingesetzt werden, deren Ursache ein rapider Zelluntergang ist oder die Unfähigkeit gesunde Zellen zu teilen. Die Aktivierung der Cdk2 ist ein wichtiger Regulator der Zellzyklusprogression und vor allem bedeutend für die Überwindung des Restriktionspunktes. Ist der Restriktionspunkt erst einmal überwunden, muss sich die Zelle auf die Zellteilung einlassen. Eine wirkstoffbedingte und somit exogene Aktivierung von Cdk2 ist daher ein besonders interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung von regenerativen Substanzen, welche die Zellteilung erleichtern.

Bisher ist nicht viel über exogene Cdk- Aktivatoren bekannt. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen (siehe 1.2.3) , dass Merbromin und Eosin Y als dessen Strukturanalogon Eigenschaften besitzen, die ein zellregenerationsfördernde Wirkung durch eine Cdk2-Aktivierung haben können.

In den weiteren Abschnitten sollen beide Substanzen deshalb anhand ihrer bisher bekannten Eigenschaften charakterisiert werden und anschließend soll erläutert werden, warum die weitere Überprüfung der Substanzen als mögliche Zellregeneration fördernde Substanzen sinnvoll ist.

1.2.2.1. Merbromin

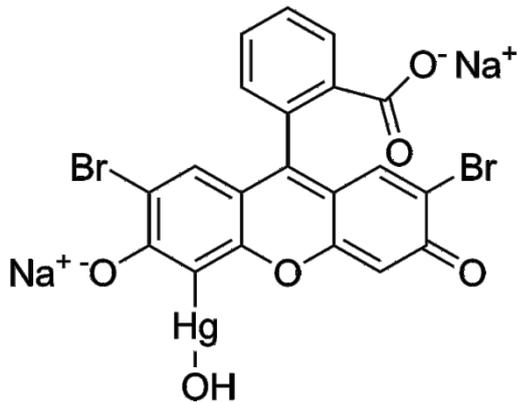


Abb. 1.3 Struktur von Merbromin (Darstellung basierend auf Wikimedia.org/File:Mercuochrome.png)

Das in Abb. 1.2 dargestellte Merbromin ist ein fluoreszierender Triphenylmethan- und Xanthenfarbstoff, der eine rötliche Eigenfarbe und eine grünliche Fluoreszenz besitzt. Es ist ein lipophiles Molekül mit hydrophilem Ende, daher gut löslich in Wasser und außerdem quecksilberhaltig. Letzteres führte dazu, dass das Merbromin, welches jahrelang als Antiseptikum eingesetzt wurde, 1998 von der FDA als „*untested*“ eingestuft wurde und auch 2003 in Deutschland vom Markt genommen wurde, weil eine Quecksilbertoxizität nicht auszuschließen ist.

Die wundheilende Wirkung von Merbromin wurde bisher auf dessen Schorfbildung bei Wunden und dessen bakterizide Wirkung zurückgeführt. In vielen Ländern ist das Merbromin noch erhältlich. So führten Mohite und Bhatnagar eine Studie durch, in der sie 200 Patienten mit Verbrennungen unterschiedlicher Grade und Ausprägung mit Merbromin und dem dort weitreichend verfügbaren und bisher eingesetzten SSD (Silber Sulfadiazin) verglichen. Abgesehen von der Mortalität wurden ebenfalls andere Untersuchungsparameter bestimmt und Merbromin zeigte einen positiven Effekt in sowohl Mortalität, als auch Infektionsrate, Krankenhausaufenthaltsdauer, Schorfbildung, Schmerzempfindungsdauer und Kosten. [52]

Es wurden außerdem Blutuntersuchungen von 5 Patienten durchgeführt, die Verbrennungen von über 50% der KÖF aufwiesen und daher den größten Mengen an topikal Merbrominapplikation ausgesetzt waren. Merbromin wurde bei diesen Patienten über 15 Tage 3-4 Mal am Tag appliziert. Die Serumlevels von Quecksilber zeigten 2 Wochen, 1 Monat, 2 Monate und 6 Monate nach Applikation keine

signifikanten Veränderungen. Außerdem wurden die Patienten regelmäßig auf Intoxikationssymptome untersucht. Es zeigten sich sowohl klinisch als auch laborchemisch keine Hinweise für eine Quecksilber-Intoxikation der Patienten. Im Gegensatz konnte eine gute Effektivität von Merbromin als wundheilendes Reagenz gezeigt werden. [52]

Zu den molekularen Mechanismen von Merbromin ist nicht viel bekannt. 2012 führten Ibanez et al. ein *High-Throughput-Screen* durch, indem Substanzen untersucht werden sollten, die eine Proteinmethyltransferase Inhibitor-Aktivität aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Merbromin ein panaktiver Proteinmethyltransferase Inhibitor ist. In dieser Arbeit konnte das Merbromin mittels SPIA-bead assay identifiziert werden, und mittels filter paper assay als zweites Assay bestätigten sich inhibierende Einflüsse auf SETD2 (IC₅₀ von 2.4 µM), gefolgt von SET8 (4.2 µM), SET7/9 (28 µM), und letztendlich EuHMTase1 (42.9 µM). [31]

Außerdem wurde wie bereits erwähnt von unserer Arbeitsgruppe 2012 ein *High-Throughput-Screen* durchgeführt indem Merbromin auf seine Eigenschaften als Cdk2-Aktivator untersucht worden ist. (siehe 1.2.3)

Zusammenfassend ist Merbromin als wirkungsvolles wundheilendes Reagenz und als möglicher Cdk2-Aktivator und daher mögliche zellregenerationsfördernde Substanz ein interessanter Wirkstoff, der noch weiter auf seine Wirkungsweise überprüft werden sollte. Bisher haben hauptsächlich biochemische Analysen, mittels Protein-Protein-Interaktionen stattgefunden. Weitere biologische Analysen zur Aufschlüsselung der Wirkungsweise sind anzustreben.

1.2.2.2. Eosin Y

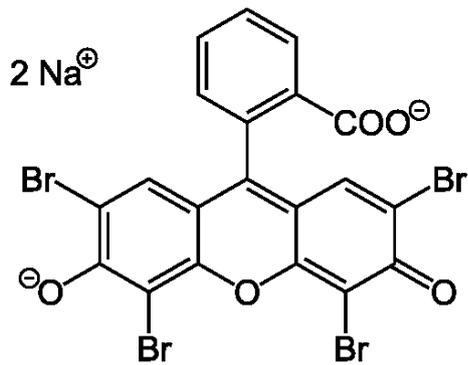


Abb. 1.4 Struktur von Eosin Y. (Darstellung basierend auf [Wikimedia.org/File: Eosin_Y_Structural_Formulae_V.1.svg](https://commons.wikimedia.org/File:Eosin_Y_Structural_Formulae_V.1.svg))

Eosin Y ist ein Strukturanalogon des Merbromin. Der strukturelle Unterschied zwischen beiden Verbindungen besteht hauptsächlich im Fehlen von Quecksilber. Eosin Y fehlt das Quecksilber mit dem hydrophilen Anteil, anstelle dessen enthält Eosin Y ein Brom-Atom. Außerdem enthält es im Vergleich zu Merbromin ein weiteres Brom-Atom. Dies wird durch die beiden Abbildungen Abb. 1.3 Struktur von Merbromin und Abb. 1.4 deutlich. Eosin Y ist ein schon lang bekannter Triphenylmethanfarbstoff, der aus Steinkohle und Teer gewonnen wird. In Kombination mit Hämatoxylin wird es in der Forschung und Medizin häufig für die immunhistochemische Färbung von Geweben verwendet. Eosin Y dient auch als pH-Indikator, es färbt insbesondere basische Strukturen rötlich an, unter anderem Kollagen, Kreatin, und verschiedene Zellplasmaproteine sowie Mitochondrien. [24] Auch wird und wurde Eosin Y in der Dermatologie für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen verwendet. So wird es schon länger bei der Psoriasis eingesetzt. In HaCat Zellen wurde die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen unter Eosin Y Behandlung überprüft. Es konnte eine Verringerung der Expression von IL-6, IL-8 und TNF-alpha gezeigt werden. [97]

1.2.3. Vorarbeiten zu Cdk2-aktivierenden Substanzen

Von unserer Arbeitsgruppe wurde 2012 ein *High-Throughput-Screen* durchgeführt indem diverse Substanzen auf ihre Eigenschaften als Cdk2-Aktivator untersucht worden sind, da bisher nicht viel über exogene Cdk- Aktivatoren bekannt ist. In dem Screen wurden sowohl direkte Cdk2-Aktivatoren als auch Verdränger von p27 aus

dem Cdk2-Cyclin-Komplex und damit indirekte Cdk2- Aktivatoren gesucht. Es konnte gezeigt werden, dass Merbromin und dessen Strukturanalogon Eosin Y solche Eigenschaften besitzen. Mittels FRET-Assay (Förster-Resonanzenergietransfer) und HTRF-Assay (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) wurde Merbromin als Substanz identifiziert die eine mögliche Aufhebung der p27 und Cdk2-Cyclin A-Interaktion veranlasst. In nachfolgenden Kinase-Assays zeigte sich zudem, dass Merbromin in bestimmten Konzentrationen eine bis zu zweifache direkte Cdk2-Aktivierung herbeiführt. Eine vollständige Verdrängung des p27 konnte jedoch nicht bewiesen werden.

Eosin Y als Strukturanalogon von Merbromin wurde ebenfalls auf seine Eigenschaften als potenzieller Cdk2-Aktivator untersucht und konnte als solcher identifiziert werden. Eosin Y zeigte in dem *High-Throughput-Screen* in bestimmter Dosis eine direkte Aktivierung der Cdk2 und es konnte gezeigt werden, dass bereits bestehende Aktivitäten um bis zu 40% durch die Hinzugabe von Eosin Y gesteigert werden können. [92]

1.3. Aufgabenstellung

Wirkstoffe, die gegen Krebs eingesetzt werden, stellen ein stark beforschtes Gebiet dar. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Erkrankungen, die ebenfalls letal enden können und mit der Schädigung von Zellen einhergehen. So stellen Organversagen, durch Intoxikationen oder Infektionen, sowie große Wunden wichtige Krankheitsbilder dar, welche durch eine akute Zellschädigung zu einer rasanten Verschlechterung des Allgemeinzustandes und bis hin zum Tode führen können. Auch chronische Erkrankungen, die durch ununterbrochene Inflammation zu einer Zellschädigung führen, haben erheblichen Einfluss auf das alltägliche Leben von Patienten. Deshalb besteht der Bedarf für den Einsatz von Wirkstoffen, die der Zellschädigung entgegenwirken bzw. diese verlangsamen können, also für zellregenerationsfördernde Substanzen. Zu zellregenerationsfördernden Substanzen zählen Wirkstoffe, die den Zellzyklus geregelt vorantreiben können. Bisher werden solche Wirkstoffe nur in der Forschung angewandt. Hierzu zählen Substanzen, die einen positiven Einfluss auf adulte Stammzellen nehmen können, damit diese sich zu den verlorenen Zellen differenzieren.

Wichtige zelluläre Strukturen für eine Zelltyp-unabhängigen Zellzyklusprogression sind die Cyclin-abhängigen Kinasen. Insbesondere die Cdk2 spielt eine wichtige

Rolle bei der Überwindung des Restriktionspunktes um die Zellteilung voranzutreiben. Es ist anzunehmen, dass eine direkte oder eine indirekte Aktivierung der Cdk2-Aktivierung den Zellzyklus geregelt vorantreiben kann. Der Cdk2-Aktivierung folgen mehrere Kontrollpunkte der Zellteilung, sodass ein unkontrolliertes Wachstum unwahrscheinlich ist.

Um solche Cdk2-Aktivatoren zu identifizieren führte unsere Arbeitsgruppe ein *High-Throughput-Screen* durch, in dem Substanzen bestimmt werden sollten, welche die Interaktion zwischen Cdk2 (in Komplex mit Cyclin A) und p27 beeinflussen. Merbromin und Eosin Y zeigten solche Eigenschaften. Weitere Analysen der beiden Substanzen, die auch Strukturanaloga voneinander sind, zeigten, dass sowohl Merbromin als auch Eosin Y direkt die Aktivität von Cdk2 beeinflussen konnten und so die Zellzyklusprogression fördern. Es zeigte sich aber auch, dass diese Effekte dosisabhängig sind und dass Merbromin und Eosin Y bei bestimmten hohen Konzentrationen zelltoxisch wirken.

Es stellt sich daher die Frage, welche Mechanismen dieser Toxizität zu Grunde liegen und ob vielleicht bestimmte Proteine, die in Regulationsmechanismen der Zelle eingebunden sind, wie z.B. *checkpoint proteins* (Proteine der Kontrollpunkte), eine Rolle für das vorzeitige Sterben der Zellen spielen. Außerdem sind bisher hauptsächlich biochemische Analysen durchgeführt worden, die eine Cdk2-Aktivierung durch Merbromin und Eosin Y in Protein-Protein-Interaktionen zeigen. Weitere sekundäre Assays an Zellen *in vitro* sollten daher durchgeführt werden um die bisher vermuteten Effekte bezüglich der Beschleunigung des Zellzyklus durch diese Substanzen näher charakterisieren zu können. Das Ziel dieser Doktorarbeit besteht deshalb darin, Merbromin und Eosin Y als potenzielle zellregenerationsfördernde Substanzen weiter auf ihren Wirkungsmechanismus *in vitro* zu untersuchen und gegebenenfalls Zellstrukturen oder Proteine zu identifizieren, die diese Mechanismen vorantreiben, oder aber diesen Mechanismen entgegen wirken.

2. Material und Methoden

2.1.1. Material

2.1.2. Chemikalien

Acrylamid-Mix: 30%ig (v/v) Acrylamid, 0,8% (v/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

Agar (AppliChem, Darmstadt)

Agarose (Bioline, Luckenwalde)

Ammoniumpersulfat (APS) (Serva, Heidelberg)

Bradford Reagenz (Biorad, München)

Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)

CaCl₂ (Merck, Darmstadt)

Chloroquin (Sigma-Aldrich)

Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva, Heidelberg)

p-Cumarsäure (Merck, Darmstadt)

Dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

DMEM (Invitrogen, Karlsruhe)

Eosin Y (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Essigsäure (J. T. Baker, Deventer, NE)

Ethanol (J. T. Baker, Deventer, NE)

Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck, Darmstadt)

Ethylenglycol-bis(-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure(EGTA) (Merck, Darmstadt)

GlutaMax (Invitrogen, Karlsruhe)

Glycerin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Glycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Imidazol (BDH Laboratory Supplies, Poole, UK)

Isopropylthiogalactosid (IPTG) (Duchefa)

Isopropanol (2-Propanol) (Merck, Darmstadt)

Kaliumacetat (Merck, Darmstadt)

KCl (Merck, Darmstadt)

KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)

Luminol (Sigma-Aldrich, Schnelldorf)
Magnesiumacetat (Merck, Darmstadt)
Merbromin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol) Sigma-Aldrich, Steinheim)
Methanol J. T. Baker, Deventer, NE $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (Merck, Darmstadt)
 $MgCl_2$ -Lösung, 4,9 mol/l, titriert (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Milchpulver (Roth, Karlsruhe)
 $MnCl_2$ (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)
 Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt)
 Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt)
 $NaCl$ (Merck, Darmstadt)
 NaH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)
 $NaHCO_3$ (Merck, Darmstadt)
Natronlauge (Merck, Darmstadt)
Natriumacetat (Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Merck, Darmstadt)
Pepstatin A (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phosphoenolpyruvat (PEP) (Roche, Mannheim)
Phosphorsäure, 85% (J. T. Baker, Deventer, NE)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Mannheim)
Proteinase K
Propidiumiodid (Sigma-Aldrich)
Polybrene (Sigma-Aldrich)
Saccharose (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Salzsäure, 37 %ig (Roth, Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Merck, Darmstadt)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (Merck, Darmstadt)
Wasserstoffperoxid 30%ige Lösung in H_2O (Sigma-Aldrich, Schnelldorf)

2.1.3. Antibiotika

Ampicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Penicillin (Gibco, Paisley, UK)

Streptomycin (Gibco, Paisley, UK)

Puromycin (Gibco Paisley, UK)

2.1.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Wirt	Verdünnung
Cdk2	Cell signaling	rabbit	1:1000
Cyclin A	Santa Cruz	mouse	1:1000
Cyclin B1	Neo Markers	mouse	1:1000
Cyclin E1	Cell signaling	mouse	1:1000
P21	Santa Cruz	rabbit	1:1000
P27	Cell signaling	rabbit	1:1000
P53	Santa Cruz	mouse	1:1000
PARP	Cell signaling	rabbit	1:1000
α -Actin	Santa Cruz	mouse	1:1000

Tab. 2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
anti-mouse	Amersham: 1,5 mg/ml	1:10000
anti-rabbit	Amersham: 1,5 mg/ml	1:10000

Tab. 2.2 Sekundäre Antikörper

2.1.5. Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaft
NIH 3T3	Zum Teil hypertriploide Fibroblasten der Maus mit der Eigenschaft zur Kontaktinhibierung [88]
Phoenix-ECO Zellen	Aus humanen embryonalen Nierenzellen (293 T) erzeugte ‚second-generation‘ ecotrope Zelllinie zur Produktion von Retrovirus

Tab. 2.3 Zelllinien

2.1.6. Kits

BrdU Kit : BD Pharmingen™ APC-BrdU Flow Kit BD Bioscience, Europe
BioRad Bradford Protein Assay BioRad, München, Deutschland

2.1.7. shRNA Bibliothek

Für den shRNA-Screen wurde die sogenannte Cancer 1000 Bibliothek verwendet. Diese enthält ca. 2250 murine shRNA, die aus der Cancer 1000 Liste der CODEX RNAi Bibliothek entnommen worden sind. Die Cancer 1000 sind Gensets, die aus Microarray-expressions-Daten zusammengetragen worden sind und unter anderem sowohl potentielle Tumorsuppressorgene als auch Onkogene enthält. Diese Cancer 1000 ist miR30 basiert. Die shRNA wurden in einen MLP Vektor (MSCV-basierten Vektor) kloniert, in jeweils Pools von 48 shRNAs. Die *backbone* des Vektors enthält GFP und Puromycin zu Detektions- und Selektionszwecken. [9]

Eine Liste der Cancer1000 Bibliothek ist im Anhang aufgeführt. (siehe 9. Anhang)

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

0,2 ml Multiply-PCR-Gefäße (Sarstedt, Nümbrecht)
1,5 ml Zentrifugiergefäße (Hettich Lab Technology, Tuttingen)
6 well Zellkulturplatte (Sarstedt, Nümbrecht)
96 well Nunc #260836 (Thermo Fisher, Wyman St Waltham, MA, USA)
96 well Zellkulturplatte (Sarstedt, Nümbrecht)
Analysewaage AE 200 (Mettler Toledo, Gießen)
Cary-Eclipse Fluoreszenzspektrometer mit Mikrotiterplatten-Scanner (Varian, Darmstadt)
Chemidoc, Geldokumentationssystem (Biorad, München)
Durchflusszytometer BD LSR2 (BD, Tübingen)
Elektronische Waage (Satorius, Göttingen)
Flex Cycler (Analytik Jena, Jena)
Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher, Wyman St Waltham, MA, USA)
FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg)
HiTrap ResourceQ (Amersham Pharmacia, Freiburg)
Leica DM 5000 B (Leica, Wetzlar)
Leica DMI 6000 B (Leica, Wetzlar)
Magnetrührer (Kern, Bahlingen)
Mikroplatten-Messgerät Synergy HAT (BioTek)
Mikroskop CK 2 (Olympus, Hamburg)
Mikrowelle (Samsung, Schwalbach)
Mini Protean (Biorad, München)
Mini Trans-Blot Cell, Western-Blot-Apparatur (Biorad, München)
Monolith NT Capillaries (NanoTemper Technologies, München)
Nitrocellulose-Membran (Serva, Heidelberg)
NT.015T (NanoTemper Technologies, München)
Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig)
Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA)
Peristaltische Pumpe Minipuls 2 (Gilson, WI, USA)
Petrischale P100 100x20 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Petrischale P60 60x16 mm (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Photometer DU 800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
Pipetten 2-1000µl (Gilson, WI, USA)

Pipettenspitzen (Saarstedt, Nümbrecht)
Polypropylen-Einfrierröhrchen (Cryotube, Nunc, Wiesbaden)
Power-Pac 300, Spannungsquelle (Biorad, München)
Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart)
Sampleloop 7.8 ml (Amersham Pharmacia, Freiburg)
Trans-Blot SD, Western-Blot-Apparatur (Biorad, München)
Viscotek-802-DLS (Malvern Instruments, Westborough, MA, USA)
Vivaspin Konzentratoren (Vivascience AG, Littleton, MA, USA)
Whatman-Filterpapier (Omnilab, Elbingeröder)
WinMDI Software
Zellzählkammer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen)

2.1.9. Lösungen

Kulturmedium

DMEM

10% FCS

1% Glutamax

100 U/ml Penicillin

100 U/ml Streptomycin

Starvation Medium

DMEM

0,1% FCS

1% Glutamax

100 U/ml Penicillin

100 U/ml Streptomycin

Waschlösung (PBS)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

pH: 7,4

Färbelösung mit PI

10 µg/ml Propidiumiodid (PI)

100 µg/ml RNase A

in PBS

5 g/l MTT in PBS

MTT-Lösung

Isopropanol-HCl

0,1 % HCl in Isopropanol

4x Probenauftragspuffer

	<i>Stock</i>	<i>Final</i>	<i>40 ml</i>
Tris-HCl pH 6,8	2M	0,25M	5 ml
SDS		8 %	3,2 g
Glycerol		40 %	16 ml
β-Mercaptoethanol		10 %	4 ml
Bromphenol blue (powder)		0,05 %	0,02g
dH ₂ O			14,7 ml

RIPA-Puffer (WB or IP)

	<i>Stock</i>	<i>Final</i>	<i>100ml</i>
NP40	10%	1%	10ml
DOC	10%	0,5%	5ml
SDS	20%	0,1%	0,5ml

Tris pH 8,0	1M	50mM	5ml
NaCl	5M	80mM	2ml
NaF	0,5M	50mM	5ml
Na ₄ P ₂ O ₇	1M	20mM	0,892g
EDTA	0,5M	1mM	0,2ml
EGTA	0,5M	1mM	0,2ml
H ₂ O			69,1ml

Protease Inhibitoren (für 10ml Puffer)

Name	Inhibitor von	stock	final	Für 10ml Puffer
Vanadat	Tyrosin-phosphatase	100mM	100µM	10 µl
Pepstatin A	Aspartic-protease	2,5µg/ml MeOH	0,5ng/ml	50µl
Leupeptin	Serin- Cystein-protease	2,5µg/ml	2,5ng/ml	10µl
Benzamidin	Trypsin, Thrombin, Plasmin	0,15 M	0,15mM	10µl
Aprotinin (Trasylol)	Trypsin, dif. Chymotrypsine, Kallikrein, Trypsin			20µl
PMSF	Serin-protease	200mM in 10% isopropanol	0,5mM	25µl

Tab. 2.4 Protease Inhibitoren und ihre Herstellungskonzentrationen

Proteinase K (PK-) Puffer

Tris pH 8,5	100 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,2 %
NaCl	200 mM
ddH ₂ O	100 ml

Sammelgel

H ₂ O		3,92 ml
Acryl amide	30 %	1,13 ml
Tris pH 6,8	0,5M	1,75 ml
SDS	10 %	70 µl
APS	10 %	70 µl
TEMED		7 µl

Trenngel

Konz.	7,5%	10%	12%	14%	15%
H ₂ O	4,85 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,7 ml	2,45 ml
Acrylamide	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	4,7 ml	4,95 ml
Tris pH 8,8	1,5M	2,5 ml	} gleich für alle Konzentrationen		
SDS	10 %	100 µl			
APS	10 %	105 µl			
TEMED		15 µl			

10×SDS buffer

Tris	151 g
Glycine	720 g
SDS	50 g
H ₂ O	5 L

10×Transfer buffer

Tris	151,5 g
Glycine	720 g
H ₂ O	5 L

10×TNT-Puffer

	<i>Stock</i>	<i>5000 ml</i>
NaCl	5M	1500 ml
Tris pH7,5	2M	625 ml
Tween 20	10 %	250 ml
H ₂ O		2625 ml

ECL-Lösungen

Lösung 1

H ₂ O		90 ml
Tris pH 8,5	1M	10 ml
Luminol	250mM	1 ml
p-Cumarsäure	90mM	440µl

Lösung 2

H ₂ O		90 ml
Tris pH 8,5	1M	10ml
H ₂ O ₂	30%	61µl

Blockierungslösung 1: 5% skimmed Milch

Skimmed Milch	5g	
1xTNT		100ml

Blockierungslösung 2: 4% BSA

BSA	4g	
1xTNT		100ml

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivieren von adhärennten Zelllinien

Das Kultivieren von Zellen in der Zellkultur ist eine Methode um Zellen außerhalb des jeweiligen Organismus verwenden zu können. Die Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden zeichnen sich dadurch aus, dass sie adhärennt sind. Dies bedeutet, dass sie an der Oberfläche von Kulturgefäßen haften. Unter 2.1.5 wurden die hier verwendeten Zelllinien näher charakterisiert.

Das Kultivieren von Zellen beinhaltet mehrere Arbeitsschritte. Hierzu gehört das Inkubieren der Zellen bei 37°C, 90%iger Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in Kulturmedium (DMEM), welches Nährstoffe und Wachstumsfaktoren für die Zellen enthält. Dem Medium wurden zur Verhinderung von Bakterienwachstum 100U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin hinzugefügt. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen (meist 2-3 Tage) bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % gesplittet um sie vor dem Überwachsen zu schützen, da die Zellen sterben, wenn sie keinen Platz mehr zur Teilung auf den Petrischalen haben (Kontaktinhibition). Um die Zellen zu splitten, wurden sie, nachdem das Medium entfernt worden ist, zunächst mit PBS gewaschen, bevor sie mit 10 x Trypsin/EDTA bei 37°C für 5 Minuten inkubiert wurden, um sich vom Boden der Petrischale lösen zu können. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt. Danach wurden die Zellen je nach Zelllinie 1:4 (NIH 3T3) bis 1:7 (Phoenix-ECO Zellen) gesplittet und auf neue Petrischalen ausgesät. Für langfristige Zwecke wurden die Zellen in FCS mit 10% DMSO resuspendiert und jeweils 1ml dieser Suspension wurde bei -80 °C eingefroren. Um die eingefrorenen Zellen wieder verwenden zu können wurden sie bei 37°C in Kulturmedium aufgetaut. [85]

2.2.2. Auszählen von NIH3T3 Zellen mittels Neubauer-Zählkammer

Um die Zellzahl einer Suspension bestimmen zu können, wurden die Zellen lichtmikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Hierzu wurden sie mit Trypanblau versetzt (im Verhältnis 1:1), welches sich in das Zytoplasma von

toten Zellen einlagert und somit diese spezifisch färben kann. So kann beim Zählen zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden.

Die Durchführung beinhaltet das Waschen der Zellen mit PBS, das Ablösen der Zellen von der Platte mittels Trypsin und das Anfertigen einer Suspension in Kulturmedium. Eine kleine Menge (z.B. 30 µl) dieser Suspension wird mit eben derselben Menge an Trypanblau versetzt und dann zwischen die Kammer und ein Deckglas gegeben. Die Suspension verteilt sich mittels Kapillarkräften. Eine gewisse Anzahl von Quadraten wird ausgezählt und daraus wird mithilfe des Kammerfaktors und folgender Formel die Zellzahl bestimmt. **[63]**

$$X * \frac{1}{n} * 2 * \frac{1}{n} = ZZ/ml$$

- X* Anzahl der gezählten Zellen
- n* Anzahl der gezählten Eckquadrate
- 2 aufgrund der Verdünnung mit Trypanblau
- KF* Kammerfaktor *
- ZZ* Zellzahl

* Kammerfaktor = Tiefe der Kammer (hier 0,1 mm) * Fläche eines Eckquadrates (hier 1 mm²)
 = 0,1 mm³ (≈ 0,1 µl ≈ 0,0001 ml) = $\frac{1}{10.000}$ **[63]**

2.2.3. Bestimmung der Verdopplungszeit von NIH3T3 Zellen

Die sogenannte Verdopplungszeit ist die Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen einer Zelle bzw. die Zeit, die für eine Verdopplung der Zellzahl benötigt wird. Sie kann folgendermaßen berechnet werden:

$$\text{Verdopplungszeit} = \log 2 * \text{Kulturdauer [h]} / \log N - \log$$

N = Zellzahl nach Kulturdauer

N₀ = Zahl der Zellen zum Zeitpunkt 0 ist.

Die Zellzahl N₀ wurde, wie oben beschrieben, bestimmt. Die Ermittlung der Zellzahl nach unterschiedlichen Kulturauern erfolgte lichtmikroskopisch mittels der Neubauer-Zählkammer (siehe 2.2.2).

2.2.4. Untersuchung der Zellvitalität mittels MTT Assay

Das MTT-Assay ist ein Verfahren, bei dem durch kolometrische Bestimmung des Umsatzes des Farbstoffes MTT die Zellvitalität einer Zellpopulation bestimmt werden kann. MTT ist ein gelblicher wasserlöslicher Farbstoff (Tetrazoliumsalz), der nur in lebenden Zellen durch ihr mitochondriales Enzym (Dehydrogenase) zu wasserunlöslichem, bläulich violetten Formazan reduziert werden kann. Die Zellvitalität lässt sich nun quantifizieren, in dem man die Absorption des Formazan nach Aufnahme in Isopropanol als organisches Lösungsmittel bestimmt. Dieses Verfahren bietet somit die Möglichkeit zur Überprüfung diverser Substanzen auf ihre Zelltoxizität.

Durchführung

NIH3T3 Zellen wurden in einer 96-Wellplatte mit einer Zellzahl von 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Zwei Wells wurden als Negativkontrolle frei gelassen. Nach 24 Stunden wurde die zu testende Substanz in unterschiedlicher Verdünnung mit Kulturmedium hinzugegeben. Auch hier wurden jeweils zwei Wells nicht mit der Substanz versehen. Der Anteil an Solvens, d.h. hierbei von H₂O wurde für alle Bedingungen konstant gehalten. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 37°C wurden 20 µl des MTT Reagenz hinzugegeben. Nun wurde 4 Stunden abgewartet, in denen die lebenden Zellen die Zeit hatten, dass MTT zu Formazan-Kristallen zu reduzieren. Dann wurde die 96-Well Platte bei 4700 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Formazan Kristalle für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden sie in 100µl pro Well Isopropanol-HCl aufgenommen. Nach dem Lösen der Kristalle durch Vortexten der Platte konnte die Absorption des Formazans bei 460 nm mit dem Mikroplatten-Messgerät Synergy HT (BioTek) bestimmt werden. [56]

2.2.5. Untersuchung der Migration mithilfe des Migrations-Assays

In vitro Migrations-Assays (bzw. Wundheilungs-Assays/*scratch*-Assay) stellen eine weit verbreitete Methode dar, um den Einfluss einer Substanz auf die Zellen bezüglich ihrer Tendenz zur Förderung oder Inhibierung der Migration zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden hierfür NIH 3T3 Zellen in einer 6-well Platte ausgesät und kultiviert bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 %. Dann wurde

starvation Medium (0,1% FCS) für eine Inkubationszeit von 24 Stunden hinzugegeben. Nachdem ein Kratzer in die Mitte der Platte mit einer weißen Pipettenspitze gesetzt wurde, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ein erstes Bild (0 Stunden) gemacht. Hiernach wurden die beiden Substanzen (Merbromin /Eosin Y) in jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen und destilliertes Wasser (Solvens) als Trägersubstanz und Negativkontrolle auf die Wells gegeben. Nach erneuter Hinzugabe von Kulturmedium wurde 24 Stunden später ein zweites Bild mittels Lichtmikroskop aufgenommen. Die Migrationstendenz der Zellen mit und ohne Substanz wurde mithilfe folgender Formel berechnet.

$$\text{Migrationsindex} = \frac{\text{Breite der Wunde zum Zeitpunkt 0 h} - \text{Breite der Wunde zum Zeitpunkt 24 h}}{\text{Breite der Wunde zum Zeitpunkt 0 h}} \times 100$$

Der Migrationsindex beschreibt das prozentuale Ausmaß des Wundverschlusses. Dies bedeutet je höher der Migrationsindex, umso höher die Tendenz der behandelten Zellen zum Wundverschluss. [12]

2.2.6. Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das dazu genutzt werden kann eine Aussage über die Verteilung der Zellzyklusphasen einer Zellpopulation zu treffen. Hierbei können verschiedene, die DNA anfärbende Substanzen verwendet werden um mittels des DNA-Gehalts eine Schlussfolgerung bezüglich des Zellzyklusverhaltens von Zellen in verschiedensten Bedingungen zu ziehen. In dieser Arbeit wurde als Färbesubstanz Propidiumiodid verwendet, welches als sogenannter Nukleinsäureinterkalator fungiert. Die Eigenschaft dieser Substanz, nämlich dass es seine Absorptionsmaxima nach Interkalation in die DNA ändert (von initial 488 nm auf 535 nm) kann ausgenutzt werden um Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt zu erhalten.

Durchführung

Die unbehandelten und behandelten (*starvation* Medium / Eosin Y / Merbromin) NIH 3T3 Zellen wurden trypsinisiert, gewaschen und abzentrifugiert. Das PBS wurde abgesaugt und das vorhandene Pellet mit jeweils 2ml eiskalten Ethanol (70%), welches tröpfchenweise unter kontinuierlichem Schwenken hinzugegeben wurde,

fixiert. Die fixierten Zellen wurden nun wahlweise über Nacht bei -20°C weggefroren oder aber eine Stunde auf Eis gelegt. Um die fixierten Zellen weiter zu verwenden wurden diese zentrifugiert, das Ethanol wurde verworfen und daraufhin wurden sie wieder mit PBS gewaschen, bevor sie erneut zentrifugiert wurden. Währenddessen wurde PBS-Suspension RNase A (1:100) und PI (1:100) enthaltend hergestellt. Die Zellen wurden mit dieser Suspension behandelt und mindestens 30 Minuten bei Lichtausschluss und Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und mit dem Durchflusszytometer gemessen. Es wurde die Menge an Zellen bezogen auf ihren DNA-Gehalt gemessen und anschließend als Graphik dargestellt. Bei jeder Probe wurden 10.000 Ereignisse gemessen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der FlowJo Version 8.7 Software. [34]

2.2.7. Proteincharakterisierung mittels Immunodetektion (Western blot)

Zur Charakterisierung von Proteinen kommt häufig das Western-Blot Verfahren zum Einsatz. Hierbei kann ein Proteingemisch, nachdem es mithilfe verschiedener Verfahren anhand von Molekülgröße, Ladung oder anderer Eigenschaften aufgetrennt wurde (SDS-Gelelektrophorese) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend immunodetektiert werden.

2.2.7.1. Herstellung der Zelllysate und Messung des Proteingehaltes

Die Herstellung der Zelllysate und Proteinproben erfordert die Lösung der Zellen von der Platte. In diesem Fall können die Zellen von der Petrischale abgeschabt werden. Nach einer Zentrifugation der Zell-Medium-Suspension, wird das Pellet mit PBS gewaschen. Das reine Pellet kann dann in RIPA-Puffer versetzt mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen werden. Die hergestellten Proben werden für 15 bis 20 Minuten auf Eis gelegt, bevor sie jeweils für wenige Sekunden im Ultraschallbad behandelt werden. Denn hierdurch soll das Aufbrechen der Zellen erreicht werden. Anschließend werden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit erneut zentrifugiert. Der Überstand, indem die Proteine enthalten sein sollten, kann nun in ein neues Eppendorf-Gefäß gesammelt werden.

Um eine Aussage über das Ergebnis treffen zu können ist es notwendig, dass der Proteingehalt aller aufgetragenen Proben derselbe ist. Dies ermöglicht im Nachhinein

einen besseren Vergleich zwischen den Reaktionen auf die Veränderung bestimmter Bedingungen von Zellpopulationen. Der Proteingehalt von Zelllysaten kann mit Hilfe des Bradford-Assays ermittelt werden. [8]

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 dient hierbei als Indikator für den Proteingehalt, welcher nach Proteinbindung von einem kationischen Zustand über einen neutralen Zustand in einen anionischen Zustand übergeht. Dieser Übergang ist mit einer Verschiebung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von ca. 470 nm nach ca. 595 nm verbunden. Die Absorptionsänderung bei 595 nm ist hierbei zumindest in erster Näherung proportional zum Proteingehalt. Diese Proportionalität kann durch eine Eichgerade mithilfe von Proteinen mit bereits bekannter Konzentrationen ermittelt werden. In der Regel wird hierfür BSA verwendet. Die Durchführung des Bradford-Assays erfolgte im 96-Well-Plattenformat als Dreifachbestimmung unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay Kits gemäß den Angaben des Herstellers Bio-Rad. Die Absorption bei 595 nm wurde mit dem Mikroplatten-Messgerät Synergy HT (BioTek) gemessen.

Es folgte das Vorbereiten der Proben für die SDS-Gelelektrophorese. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben mit RIPA-Puffer auf eine Konzentration von 1µg/µl verdünnt und mit 25 µl Probenauftragspuffer (Sample-Buffer) versetzt. Danach wurden sie für 5 Minuten bei 95°C inkubiert um eine Denaturierung zu ermöglichen.

2.2.7.2. Proteinauftrennung durch die SDS Gelelektrophorese

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist eine Technik um Proteine (im Beisein von SDS) anhand bestimmter Eigenschaften aufzutrennen. Die Proteine wandern durch die Poren einer Polyacrylamidgelmatrix, bei der die treibende Kraft ein elektrisches Feld darstellt. Die Geschwindigkeit der Proteine ist hierbei von der Ladung, der Größe und der Form der jeweiligen Proteine und die Porengröße von der Konzentration des Acrylamids abhängig. Umso größer die Konzentration des Acrylamid, die zwischen 2 % und 30 % variieren kann, umso geringer die Porengröße. Das bei dieser Gelelektrophorese verwendete SDS führt zu einer negativen Ladung aller Proteine und somit dazu, dass die Proteine nur noch in Abhängigkeit von der Molekülgröße und Porengröße wandern. Die Proteine wandern zur Anode hin. [74]

Bei der sogenannten diskontinuierlichen Methode, wie sie in dieser Arbeit Anwendung fand, werden zwei sich in ihrer Zusammensetzung unterscheidende Gele benutzt. Das Proteingemisch wird zunächst auf ein sogenanntes Sammelgel aufgetragen. Dieses Sammelgel enthält im Vergleich zum darunter liegenden Trenngel Chlorid-Ionen, die schneller wandern als das aufgetragene Proteingemisch und es enthält außerdem größere Poren. Im Trenngel befinden sich hingegen Glycin-Ionen, die langsamer wandern als das Proteingemisch. Hieraus ergibt sich ein Stapeleffekt der Proteine, aufgrund der unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Proteine.

Durchführung

Die Zellen wurden vorbereitet und Zelllysate hergestellt. Die Glasplatten wurden dann gründlich gewaschen und mit Ethanol besprüht. Die Platten konnten anschließend mit Klammern in das für sie vorgesehene System eingesetzt werden. Dann wurden Sammel- und Trenngel hergestellt. Im Groben wird bei beiden Gelsystemen Acrylamid mit H₂O auf die gewünschte Konzentration verdünnt und dann SDS und Tris Puffer hinzugegeben. Als Radikalstarter wird kurz vor der Polymerisierung des Gels, d.h. kurz vor der Kammerbeladung das APS hinzugegeben und als Katalysator das TEMED. Zuerst wird das Trenngel in die Kammer eingefüllt. Nachdem das Trenngel eingefüllt wurde, wird Ethanol darauf gegeben, bis das Gel polymerisiert ist. Wenn das Gel fest geworden ist, wird das Ethanol weg geschüttet und das Sammelgel mit TEMED behandelt und darauf gegeben. Ein Kamm wird zeitgleich eingeführt und belassen, bis auch dieses Gel polymerisiert ist. Daraufhin kann der Kamm langsam entfernt werden und die Taschen mit den vorbereiteten Proben befüllt werden. In eine Tasche wird ein Proteinmarker gefüllt um später die Größe der Proteine abschätzen zu können. Für die Proteintrennung und den Lauf, wird die Kammer mit SDS Puffer aufgefüllt und durch das BioRad System mit dem Strom angeschlossen. Für das Sammelgel können die Proben bei einer Spannung von 60-70 V laufen und für das Trenngel bei 90-100 V.

2.2.7.3. Western-Blotting-Methode

Die Western-Blot- oder Immunoblot-Methode ist eine Methode um Proteine, welche zuvor durch eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind, von einem Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen um diese für weitere Verfahren (z.B. für immunologische Nachweisreaktionen) zugänglich zu machen. Hierbei wird das Gel auf eine Membran aufgelegt und sandwichartig von Whatmanpapier und Schwämmen ummantelt. Das Whatmanpapier dient hierbei als Ionenreservoir. Beim Blotten wird eine Spannung senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, die es möglich macht, dass die SDS-Protein-Komplexe vom Gel in Richtung Anode, in diesem Fall in Richtung der Nitrozellulosemembran wandern, welche diese abfängt. Bei der Herstellung ist zu beachten die mit eingebrachten Luftblasen zu entfernen. Dies kann durch das Ausrollen, der in Whatmanpapier eingepackten Membran und Gel, mithilfe eines Falcon-Tube erreicht werden. Die Membran und das Gel sind während des ganzen Vorgangs dabei in Transferpuffer getränkt. Auch die Kammer wird beim Blot-Vorgang mit Transferpuffer aufgefüllt. Es kann anschließend eine Stunde bei 100 Volt und 0,35 Ampère geblottet werden.

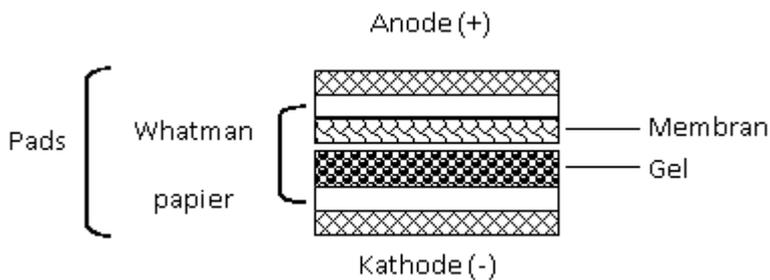


Abb. 2.1 Anordnung des Membran-Gel-Konstruktes in der Blot-Kammer. (Darstellung basierend auf [74])

2.2.7.4. Immunodetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

In der immunologischen Nachweisreaktion wird die Antikörperspezifität gegenüber einem oder mehreren Epitopen ausgenutzt, um gezielt ein bestimmtes Protein zu erkennen. Dies ermöglicht auch die spezifische Erkennung eines bestimmten Proteins in Gegenwart zahlreicher anderer Proteine. Der Antikörper-Antigen-Komplex lässt sich detektieren, indem man wiederum einen sekundären Antikörper spezifisch daran binden lässt, an dem ein Enzym konjugiert ist, das eine Färbungs- oder

Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert. So katalysiert z.B. die Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Bei dieser Oxidation wird Lumineszenz freigesetzt. Cumarsäure verstärkt die Lumineszenz. Unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran sollten vorher z.B. mit Milchpulver abgesättigt werden, da hieran sonst der primäre bzw. sekundäre Antikörper haften bleiben könnte.

Die Membran wurde zunächst eine halbe Stunde in Blockier-Lösung unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde dann in einem ersten Waschschrift mindestens dreimal fünf Minuten mit TNT-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einer Gebrauchsverdünnung des jeweiligen primären Antikörpers (siehe Tab. 2.1) über Nacht unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden in einem weiteren Waschschrift entfernt, um die Membran anschließend mit der Gebrauchsverdünnung des sekundären Antikörpers versetzen zu können (siehe Tab. 2.2). Nach 1 h Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur folgte wiederum ein Waschschrift. Für die Detektion der Chemilumineszenz wurde die Membran mit ECL-Lösung (siehe 2.1.9) bedeckt und abschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert.

2.2.8. BrdU Analyse mittels Durchflusszytometrie

Für diese Analyse wurde das BD Pharmingen™ APC-BrdU Flow Kit verwendet. In dieser Analyse wird BrdU, welches ein Analogon der DNA Base Thymidin ist, in die DNA der Zellen eingebaut. Das Anfärben von immunofluoreszenten Bromodeoxyuridin (BrdU)-Komponenten, und die anschließende Analyse mittels Durchflusszytometrie stellen eine gute Methode dar, um einzelne Zellen auf die Art und Häufigkeit ihrer DNA-Synthese hin zu überprüfen. Bei dieser Methode wird das BrdU in neu synthetisierte DNA von Zellen, die in die S-Phase (Synthese-Phase) des Zellzyklus eintreten, eingebaut. Das eingebaute BrdU wird mit einem spezifischen fluoreszierenden anti-BrdU Antikörper gefärbt. Die Menge an in Zellen eingebauten BrdU kann anschließend durchflusszytometrisch gemessen werden. Hierbei werden die Proben zusätzlich mit dem Farbstoff 7-amino-actinomycin D (7-AAD) gekoppelt, der die komplette DNA bindet. Die Kombination der Analyse aus beiden Färbungen erlaubt die Charakterisierung von Zellen, die sich aktiv in ihrer DNA-Synthese befinden, bezüglich ihrer Zellzyklusposition (d.h. G₀/G₁, S oder G₂/M –Phase).

Eine längere Inkubationszeit von BrdU mit Zellen ermöglicht die Identifizierung und Analyse von Zellen mit einem aktiven Zyklus im Gegensatz zu sich nicht mehr aktiv teilenden Zelltrümmern und das Markieren der Zellen mit BrdU zu mehreren Zeitpunkten erlaubt die Aufschlüsselung der Kinetik des Zellzyklus.

Die Durchführung dieser Methode orientierte sich an den Vorgaben des Herstellers BD Bioscience. [28] [87]

2.2.9. Isolierung genomischer DNA aus einer Zellsuspension

Bei der Isolierung genomischer DNA aus Zellsuspensionen, werden die Zellen in 250-500 μl PK-Puffer aufgenommen. Es werden 20 μl Proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) hinzugegeben und das Gemisch mindestens für 4 Stunden, wahlweise aber auch über Nacht bei 55°C inkubiert. Daraufhin wird das Enzym durch eine 5 minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert und anschließend wird 50 μl 5M Natrium-Chlorid-Lösung zum Aussalzen hinzugefügt. Nach einer erneuten 5-minütigen Inkubation bei 95°C wird das Gemisch zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA durch die Zugabe von zwei Drittel des bisherigen Volumens Isopropanol präzipitiert. 15- 30 Minuten werden die Proben auf Eis gelegt und anschließend wieder für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wird das Pellet mit 80 prozentigem Ethanol gewaschen, für 15 Minuten erneut zentrifugiert und dann getrocknet. Im letzten Schritt wird die DNA in 100 μl (nuclease-freiem) Wasser aufgenommen. Anschließend kann der DNA-Gehalt gemessen werden. [35]

2.2.10. shRNA Bibliothek-Screening

2.2.10.1. Virusherstellung (Transfektion)

Für die Herstellung von retroviralen Vektoren wurden Phoenix-ECO *packaging cells* verwendet. Diese wurden auf p60 Platten ausgesät und vor der Transfektion mit den Plasmiden mit Chloroquin in einer Dosierung von 25 mM behandelt. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Es wurde eine CaPO_4 Präzipitation durchgeführt. Hierfür wurden 10 μg DNA (Cancer 1000 Bibliothek/ shRenilla als Negativkontrolle) mit 2,5 M CaCl_2 versetzt und anschließend wurde nach Mischung der Lösung HEPES Puffer tröpfchenweise hinzugefügt. Das Gemisch wurde anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Platten mit den vorbereiteten Phoenix-Zellen verteilt. 12-16 Stunden später erfolgte

ein Wechsel des Mediums. Ob die Zellen die DNA aufgenommen haben konnte mittels Fluoreszenzmikroskop validiert werden, da der Vektor GFP beinhaltet und die Zellen nach Aufnahme und Integration GFP im Zytoplasma exprimieren. Es zeigten sich lichtmikroskopisch und fluoreszenz-mikroskopisch über 90% der Zellen GFP-positiv, dies bedeutet grün leuchtend. Insgesamt 42 bis 96 Stunden später konnte der Überstand des Mediums mit dem produzierten Virus geerntet werden. [69]

2.2.10.2. Transduktion des Virus auf die Zielzelllinie

Zur Transduktion des hergestellten Virus auf die Zielzelllinie (NIH 3T3 Zellen) werden diese auf p100 Platten ausgesät. Die Zellen werden mit 6µg/ml Polybrene behandelt. Anschließend wird der hergestellte Virus auf die Zellen gegeben. 24 Stunden später erfolgt ein Wechsel des Mediums. Zur Selektion der Zellen wird 6µg/ml Puromycin über 48 Stunden hinzugegeben. Es überleben somit nur Puromycin-resistente Zellen, die das Plasmid enthalten. Eine zusätzliche Ergebnisvalidierung kann durch die Fluoreszenzmikroskopie erfolgen. Ausnahmslos alle Puromycin-resistenten Zellen sollten auch eine GFP-Positivität aufweisen.

2.2.10.3. Durchführung des Cancer 1000 shRNA Screens

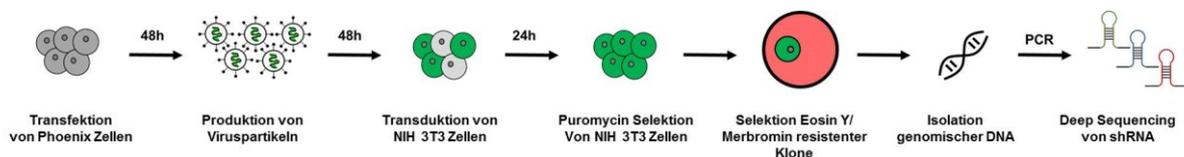


Abb. 2.2 Durchführung des shRNA Cancer 1000 Screen. Zur Transduktion von NIH 3T3 Zellen mit der Cancer 1000 Bibliothek, wurden Verpackungszelllinien zur Herstellung von Virus benutzt. Dieser wurde zur Transduktion von NIH 3T3 Zellen verwendet. Diese Zellen wurden mit Merbromin/Eosin Y mit einer toxischen Konzentration von IC_{90} behandelt. Die hierbei überlebenden Zellklone wurden gepickt und mittels Solexa-PCR amplifiziert. Anschließend wurden diese sequenziert mittels NGS (*new generation sequencing*).

Bestimmte Konzentrationen des Merbromin und des Eosin Y führen zur Induktion von Apoptose bei den Zellen. Um zu untersuchen, welcher molekulare Mechanismus diesem Zellsterben zugrunde liegt, sollte ein shRNA Screen verwendet werden.

Die infizierten NIH 3T3 Zellen wurden über 48 Stunden mit IC_{90} von Merbromin und Eosin Y behandelt. Zum einen wurden die Zellen, die die Cancer 1000 Bibliothek

enthalten mit den beiden Substanzen behandelt (= jeweils 5 p100-Platten), zum anderen wurden als Kontrolle 5 p100 Platten (=10 cm) mit einer Kontroll-shRNA, nämlich shRen (=shRenilla) über 48 Stunden mit der IC_{90} von Merbromin und Eosin Y behandelt.

Die IC_{90} von Merbromin beträgt 40 μM und die IC_{90} von Eosin Y beträgt 200 μM . (siehe 3.2). Eine unbehandelte Platte, welche die Cancer 1000 Bibliothek enthält wurde ohne Behandlung sequenziert und als Kontrolle verwendet.

Nach 48 Stunden sollten sich in den mit shRen behandelten Zellen keine lebenden Zellen mehr zeigen. Die jeweils mit Eosin Y und Merbromin behandelten Zellen mit den shRNA der Cancer 1000 Bibliothek wurden weiter behandelt und kultiviert, bis sich Zellkolonien ausbildeten und eine bestimmte Größe erreichten. Anschließend wurde Die DNA der Zellklone wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben isoliert und für die weitere Sequenzierung verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung der Verdopplungszeit

In der vorliegenden Arbeit sollen Merbromin und Eosin Y als potenzielle zellregenerationsfördernde Substanzen weiter auf ihren Wirkungsmechanismus untersucht werden. Hierzu sollten zunächst die Toxizität und das Migrationsverhalten von Zellen unter Einwirkung von Merbromin und Eosin Y untersucht werden. Wenige Zellen sind zur Migration befähigt, die einen wichtigen Mechanismus der Wundheilung darstellt. Mausfibroblasten (NIH 3T3) gehören zu diesen Zellen und wurden daher in dieser Arbeit verwendet.

Um mit NIH 3T3 verschiedene Versuche durchführen zu können, sollte eine nähere Charakterisierung über das Wachstumsverhalten der Zellen, unter den in dieser Arbeit eingesetzten Bedingungen erfolgen. Zur genaueren Charakterisierung des Wachstumsverhaltens wurde die Bestimmung der Verdopplungszeit durchgeführt. Die Verdopplungszeit von NIH 3T3 Zellen wird vom DSMZ Braunschweig mit ca. 20 Stunden angegeben. Zur Untersuchung welche Verdopplungszeit die Zellen in den von uns verwendeten Bedingungen aufweisen wurden die Zellen auf p60 Platten ausgesät. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Zellzahl, wie in 2.2.2 beschrieben, bestimmt.

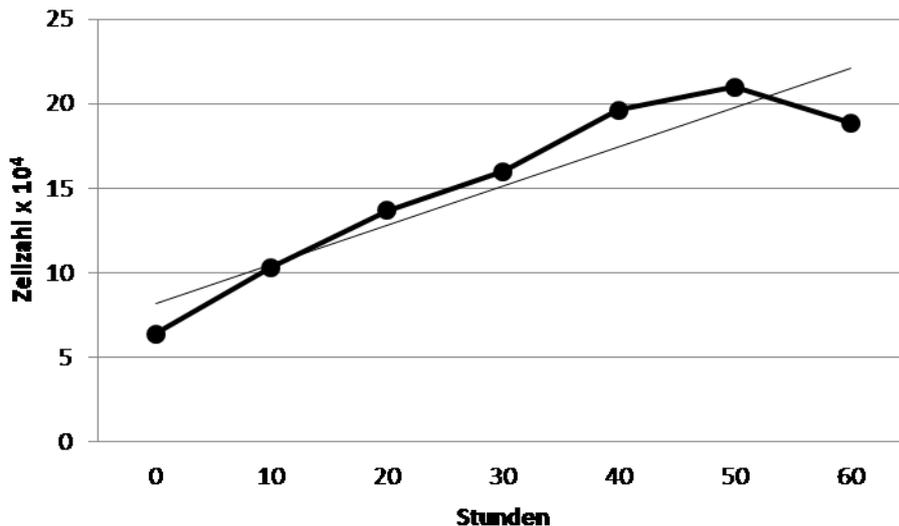


Abb. 3.1 Berechnung der Verdopplungszeit von NIH 3T3 Zellen. NIH 3T3 Zellen wurden unter Standardbedingungen inkubiert. Alle 10 h erfolgte die Messung der Zellzahl. Hieraus wurde die Verdopplungszeit von NIH 3T3 Zellen bestimmt. Diese beläuft sich auf 25,3 h.

In Abb. 3.1 zeigt sich die ermittelte Zellzahl zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Nach ca. 50 h zeigt sich, dass die Zellen nicht mehr wachsen, weil die Konfluenz erreicht ist. Mit Hilfe der in 2.2.3 genannten Formel wurde die Verdopplungszeit berechnet, diese beläuft sich in diesem Experiment auf 25,3 Stunden.

3.2. Zellviabilitätsanalyse mittels MTT-Assay

Beim Arbeiten mit zelltoxischen Substanzen ist es wichtig zu untersuchen, welche Konzentrationen von den verwendeten Zelllinien toleriert werden können. Bevor Versuche mit den Substanzen begonnen werden konnten, musste festgelegt werden, welche Konzentrationen für die nachfolgenden Versuche eingesetzt werden können. Hierzu wurden das MTT-Assay verwendet. Mit einem MTT-Assay kann die Vitalität von Zellen bestimmt werden. Es ist bekannt, dass eine Überwucherung von NIH 3T3 Zellen auf den Zellplatten zum Sterben der Zellen führt (durch Kontaktinhibition), deshalb betrug die Zellzahl zu Beginn 10.000 Zellen pro Well (96 Well Platte). Die Zellen wurden 48 Stunden lang inkubiert.

Es wurde, wie in 2.2.4 beschrieben, eine Konzentrationsreihe (von 1 μM bis 100 μM) von Merbromin und Eosin Y, den beiden verwendeten Substanzen, hergestellt und auf die NIH 3T3 Zellen gegeben. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen bestimmt.

Aus den Vorversuchen von Wenninger, G. ist bekannt, dass die IC_{50} von Merbromin bei MEF-Zellen 23 μM beträgt und bei HeLa-Zellen 116 μM nach 72 stündiger Behandlung. Bei Eosin Y zeigt sich nach 72 stündiger Behandlung eine deutlich geringere Zelltoxizität, hier zeigt sich bei MEF-Zellen eine IC_{50} von 206 μM und bei HeLa-Zellen von 800 μM . Es werden in den Versuchen NIH 3T3 Zellen verwendet, die ebenfalls Mausfibroblasten sind. Daher sind ähnliche Werte bei der Viabilitätsbestimmung in den Experimenten zu erwarten, wie bei den MEF-Zellen. In Abb. 3.2 und Abb. 3.3 sind die Versuche graphisch dargestellt und die Ergebnisse aufgeführt. [92]

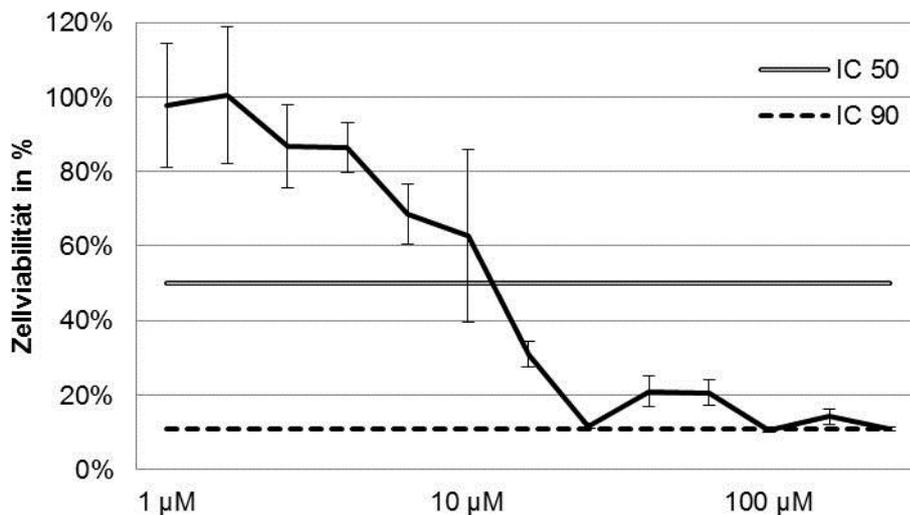


Abb. 3.2 Bestimmung der Toxizität von Merbromin in NIH 3T3 Zellen. Zellviabilitätsbestimmung von NIH 3T3, welche 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Merbromin behandelt wurden. IC_{50} = inhibitorische Konzentration von 50% liegt hier bei 15 μM ; IC_{90} = inhibitorische Konzentration von 90% liegt hier bei 40 μM .

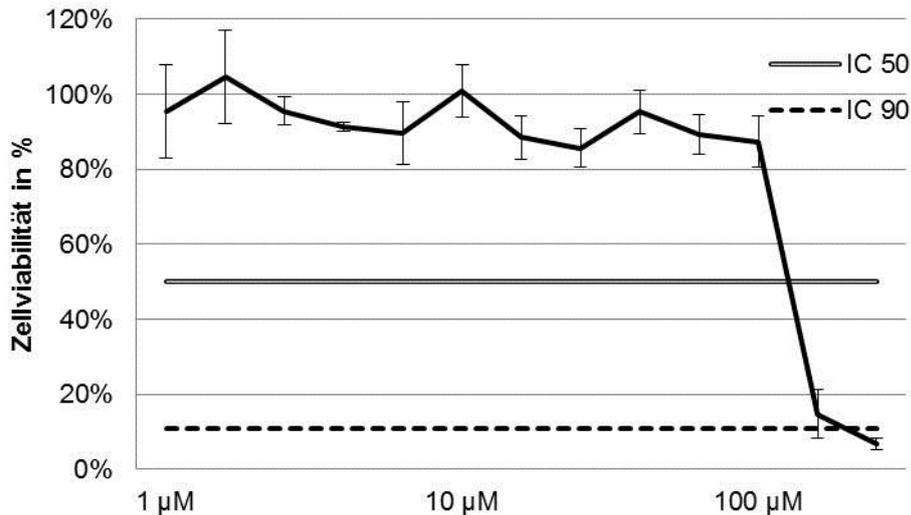


Abb. 3.3 Bestimmung der Toxizität von Eosin Y in NIH 3T3 Zellen. Zellviabilitätsbestimmung von NIH 3T3 Zellen, welche 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Eosin Y behandelt wurden. IC_{50} = inhibitorische Konzentration von 50% liegt hier bei 150µM; IC_{90} = inhibitorische Konzentration von 90% liegt hier bei 200µM.

In der durchgeführten Analyse zeigte sich, dass Zellen, die mit Merbromin für 48 Stunden behandelt werden, bereits bei einer Konzentration von 40 µM eine so hohe Toxizität aufweisen, dass 90 % der Zellen nicht mehr leben. Dies wird als die IC_{90} (inhibitorische Konzentration) beschrieben. Analog dazu liegt die IC_{50} von Merbromin bei ca. 15 µM.

Im Vergleich dazu zeigt Eosin Y, wie erwartet, eine durchaus geringere Toxizität. Erst bei einer Konzentration von 200 µM über 48 h kann Eosin Y 90 % der Zellen abtöten. Die IC_{50} von Eosin Y liegt hier annäherungsweise bei 150 µM (zwischen 100 µM und 200 µM). Diese Ergebnisse decken sich bei unterschiedlichen Behandlungszeiträumen mit den Vorversuchen, die zuvor mit MEF-Zellen über 72 h statt 48 h durchgeführt worden sind. [92]

3.3. Wundverschlussanalyse mittels Migration-Assay

Nachdem Merbromin zuvor als wundheilendes Reagenz verwendet wurde und sich sowohl Merbromin als auch Eosin Y als Cdk2 aktivierende Substanzen in Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden konnten, liegt es nahe diese wundheilenden Eigenschaften weiter zu untersuchen. Bevor der weitere Fokus auf die Proliferation der Zellen und den Zellzyklus gelegt werden soll, sollte ein anderer wichtiger

Mechanismus der Zellregeneration, nämlich die Migration unter Behandlung mit diesen Substanzen überprüft werden.

Durch den sogenannten Migration-Assay kann die Migrationsfähigkeit von Zellen auf eine einfache Art überprüft werden, die im Weiteren näher erläutert wird. Eine Supplementfaktordeprivation inhibiert hierbei die Zellproliferation, sodass der Fokus tatsächlich auf das Migrationsverhalten der Zellen gelegt werden kann. Nicht alle Zellarten sind zur Migration befähigt, aber Fibroblasten besitzen diese Fähigkeit, da diese wichtig für die Wundheilung ist.

In den vorliegenden Versuchen stellt der Migrationsindex das Maß für die Wundheilung dar. Nach der Aussaat von NIH 3T3 Zellen wurde ein Kratzer in die Zellschicht von Fibroblasten (NIH 3T3 Zellen) gesetzt, wie in 2.2.5 beschrieben.

Es wurden Platten mit den Substanzen Merbromin in den Konzentrationen 12,5 μM und 25 μM und Eosin Y in den Konzentrationen 25 μM und 100 μM behandelt, die anderen Platten wurden mit der Trägerlösung der Substanzen (in diesem Fall destilliertes Wasser) behandelt. Der Wundverschluss wurde 24 Stunden nach Setzen der Kratzers mittels Mikroskop festgehalten. Der Maßstab der Bilder liegt hier bei 500 μm .

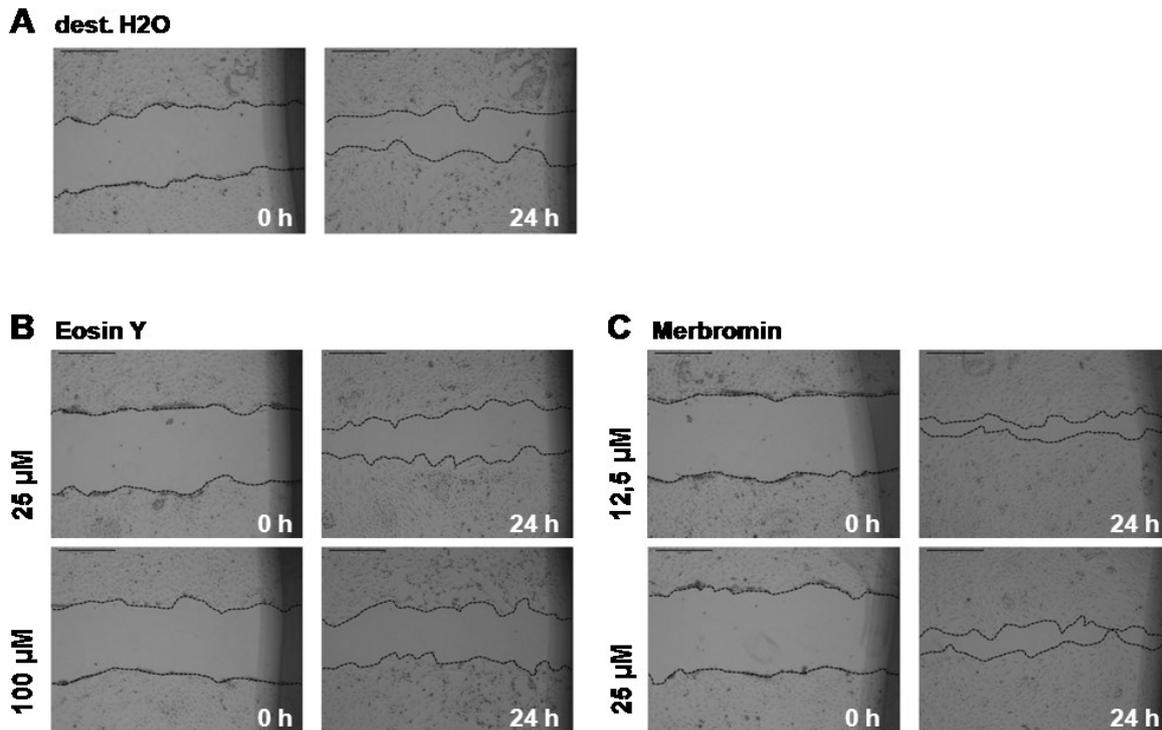


Abb. 3.4 Merbromin induziert den Wundverschluss von NIH 3T3 Zellen. NIH 3T3 Zellen wurden jeweils 24 h in 0,1% FCS-haltigen DMEM Medium (Supplementfaktordeprivation) inkubiert. Inkubation erfolgte mit in (A) destilliertem Wasser, in (B) Eosin Y und in (C) Merbromin. (A) dient als Negativkontrolle, da dest. H₂O die Trägersubstanz darstellt. (B) zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle nur eine leichte Tendenz zur vermehrten Migration. (C) zeigt bei sowohl mit 12,5 µM behandelten, als auch 25 µM behandelten Zellen einen deutlichen Trend zur vermehrten Migration der Zellen. Maßstab der Bilder bei 500 µm.

Die Wunden wurden jeweils an drei verschiedenen Stellen ausgemessen. Der Mittelwert wurde dann mit bereits im Methoden-Teil genannter Formel (siehe 2.2.5) bestimmt und der Migrationsindex berechnet. Je höher der Migrationsindex, umso höher der Wundverschluss. In Abb. 3.4 sind beispielhaft mikroskopische Aufnahmen zum Anfangszeitpunkt und 24 h nach Setzen des Kratzers dargestellt. Es zeigt sich bereits in den Bildern mit bloßem Auge gut erkennbar ein verstärkter Wundverschluss der mit Merbromin behandelten NIH 3T3 Zellen.

In folgendem Diagramm werden die errechneten Migrationsindices von Merbromin in den beiden Konzentrationen 12,5 µM sowie 25 µM (Werte um die IC₅₀ von Merbromin) und von Eosin Y in den Konzentrationen 25 µM sowie 100 µM sowie von der Negativkontrolle (dest. H₂O) miteinander verglichen.

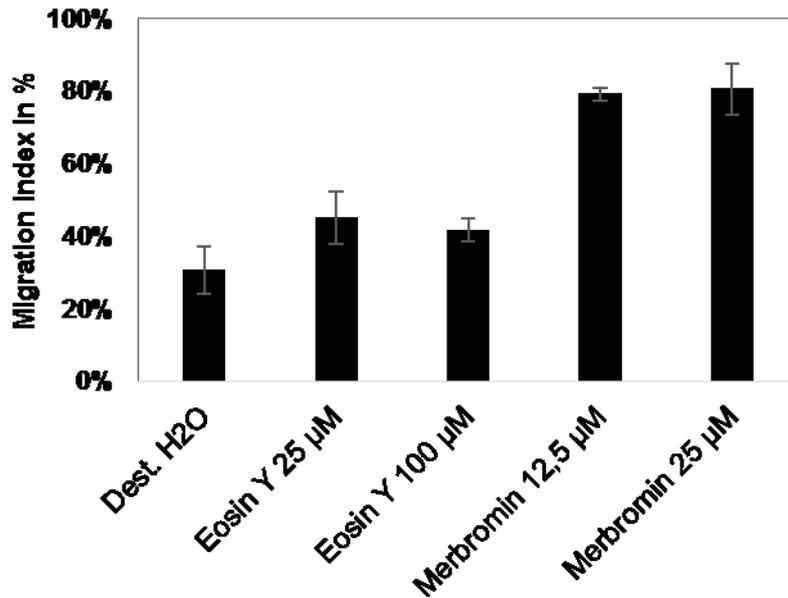


Abb. 3.5 Merbromin induziert einen effektiven Wundverschluss von NIH 3T3 Zellen. NIH 3T3 wurden 24 h lang mit jeweils der Trägersubstanz, Eosin Y und Merbromin in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Zuvor erfolgte wie in Abb. 3.4 zu sehen ein Kratzer in die Zellschicht. Die Annäherung der Wundränder aneinander wird hier mit dem Migrationsindex angegeben. Es zeigt sich sowohl bei Eosin Y als auch bei Merbromin im Vergleich zur Negativkontrolle eine höhere Tendenz zur Migration der Zellen, wobei Merbromin eine deutlich höhere Effektivität aufweist als Eosin Y.

Die Negativkontrolle zeigt einen Migrationsindex von 30%. Es zeigt sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine ca. 15% höhere Tendenz zur Migration der Zellen, die mit 25 µM Eosin Y behandelt wurden. Zellen, die mit 100 µM Eosin Y behandelt wurden zeigen ein ca. 10 % höhere Tendenz. Merbromin zeigt im Vergleich hierzu bei 24 Stunden Inkubationszeit einen durchschnittlichen Migrationsindex von ca. 80 %, und damit einen 50 % höheren Index als bei der Negativkontrolle. Dies ist sowohl bei Zellen die mit 12,5 µM behandelt wurden als auch bei Zellen, die mit 25 µM behandelt wurden der Fall.

3.4. Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie

In dem Migrations-Assay konnte gezeigt werden, dass Merbromin tatsächlich die Wundheilung über eine verbesserte Migration fördern kann. Merbromin wurde über ein *High-Throughput Screening* als Cdk2-aktivierende Substanzen identifiziert. Cdk2-Aktivierung führt in der Regel zur Zellzyklusprogression. Eine Zellzyklusprogression geht mit dem Voranschreiten des Zellzyklus und somit vermehrter Proliferation einher. Inwiefern die Cdk-2-Aktivierung der Substanzen zu einer Veränderung des Zellzyklus führt, sollte über eine Zellzyklusanalyse untersucht werden.

Der Zellzyklus wird in 4 Phasen eingeteilt, welche die Zelle durchläuft und welche Zellwachstum sowie im Endeffekt eine Zellteilung in zwei Tochterzellen umfassen. Der DNA-Gehalt ist relevant für die Bestimmung der Zellzyklusphasen. **[10] [43]**

Im nachfolgenden Versuch wurde der Einfluss von den hier zu überprüfenden Substanzen auf die Zellzyklusphasen überprüft. Es wurde hierfür eine durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus durchgeführt. Die Menge der genomischen DNA kann mithilfe von fluoreszierenden Farbstoffen detektiert werden. Ein solcher Farbstoff ist das Propidiumiodid. Propidiumiodid hat ein Absorptionsmaximum bei 488 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm. Diese Maxima verschieben sich zu 535 nm beziehungsweise 617 nm, wenn Propidiumiodid in DNA interkaliert. Durch die Messung dieser Verschiebung können Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt und somit auf die Zellzyklusphase gezogen werden.

In diesem Experiment wurden die Zellen über eine Supplementfaktordeprivation (*starvation*) in der G₀-Phase synchronisiert, um das Verhalten der synchronisierten Zellen nach Hinzugabe der Substanzen zu beurteilen.

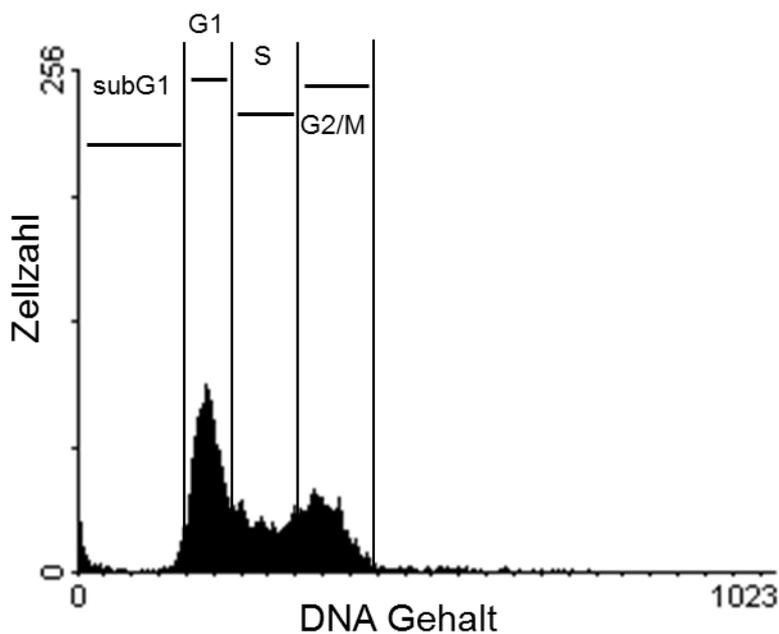


Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Zellzyklusverteilung von NIH 3T3 Zellen unter Standardbedingungen. Durchflusszytometrische Abbildung der Zellzyklusverteilung von NIH 3T3 Zellen unter nicht behandelten Bedingungen (normale Wachstumsbedingungen, wie in 2.2.1 beschrieben) mit Anzeige der Zellzyklusphasen: subG₁-, G₁-, S-, G₂- und M-Phase.

Abb. 3.6 zeigt zum weiteren Verständnis der Versuchsergebnis-Interpretation eine schematische Darstellung (Histogramm) der Zellzyklusphasen-Verteilung von NIH 3T3 Zellen unter Standardbedingungen (Standardbedingungen in 2.2.1 beschrieben). Schwarz dargestellt ist hierbei der Anteil an Zellen, die sich in einer bestimmten Phase befinden und somit einen bestimmten DNA-Gehalt haben. Zellen in der G₁-Phase haben genau einen Chromosomensatz 1N. In der S-Phase erfolgt die Replikation und ein zweiter Chromosomensatz vor geplanter Zellteilung wird hergestellt. In dieser Phase ist der DNA-Gehalt somit zwischen 1N und 2N. Zellen in der G₂-Phase bereiten sich auf die mitotische Teilung vor, sodass am Ende der G₂-Phase im Regelfall ein doppelter Chromosomensatz 2N vorliegt. Damit eine Zelle in der subG₁ Phase erscheint, muss sie aufgrund von Zellfragmentation DNA verloren haben. Zellen in der subG₁ Phase werden daher als apoptotische Zellen angesehen.

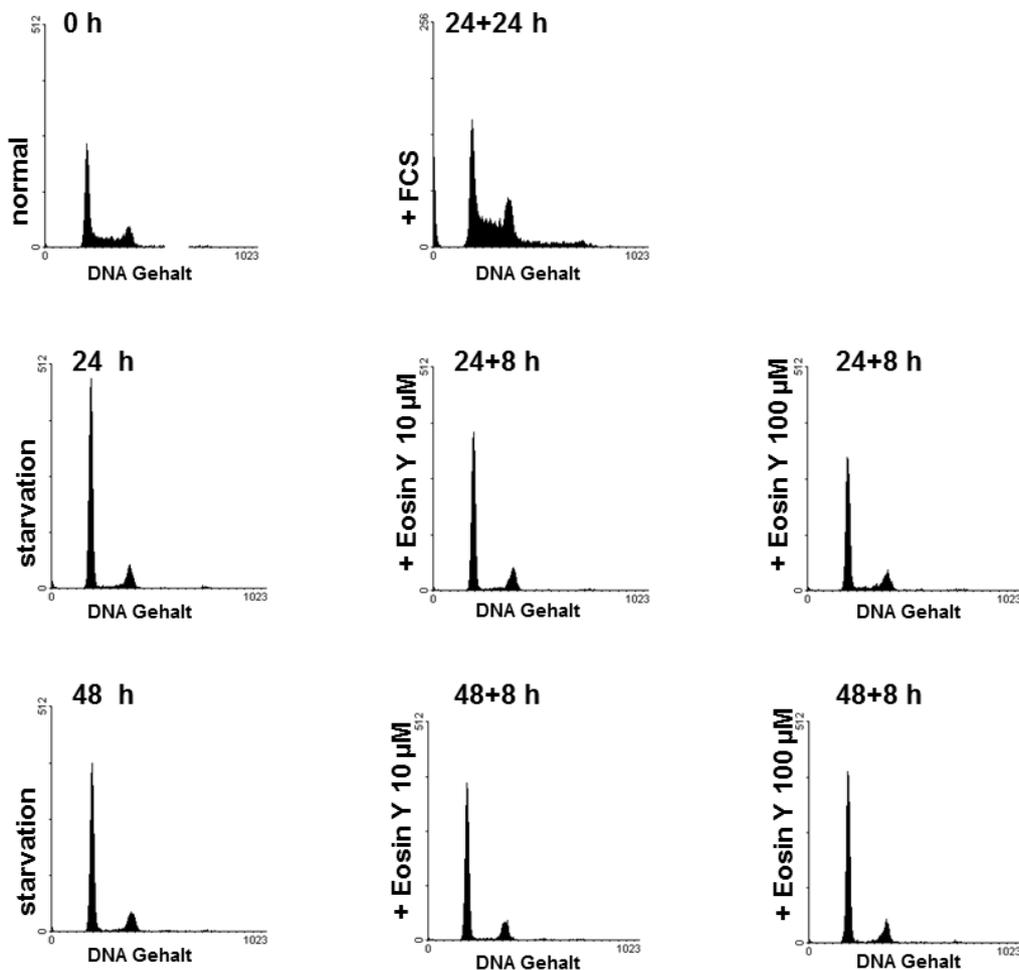


Abb. 3.7 Eosin Y zeigt keinen Effekt bezüglich G_1/S Transition bei NIH 3T3 Zellen. NIH 3T3 Zellen wurden ausgesät. Jeweils für 24 h, bzw. 48 h erfolgte die Behandlung der Zellen in 0,1% FCS haltigen DMEM Medium (Supplementfaktordeprivation), hier als starvation bezeichnet, was zu einer Synchronisation der Zellen in der G_0 -Phase des Zellzyklus führt. Über 8 h wurde Eosin Y in oben genannten Konzentrationen hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurde nach 24 h in 0,1% FCS haltigen Medium (Supplementfaktordeprivation) erneut FCS hinzugegeben in normaler Konzentration von 10%, was die Zellen erneut in die normale Zellverteilung des Zellzyklus treibt. Durch die Hinzugabe von 10 μ M und 100 μ M Eosin Y zeigt sich keine Veränderung der Synchronisation der Zellen in der G_1 -Phase.

NIH 3T3 Zellen wurden mit *starvation* Medium (0,1% FCS) versehen. *Starvation* Medium führt dazu, dass Zellen unter Supplementfaktordeprivation (=starvation) in der G_0 -Phase synchronisieren. Dieser Zustand der Zellen wird ausgenutzt, weil er reversibel und veränderbar ist. So kann die Synchronisation der Zellen durch das wieder Hinzugeben von Supplementfaktoren in Form von FCS aufgelöst werden, da die Zellen beginnen sich wieder zu teilen und sich erneut eine normale Verteilung

des Zellzyklus einstellen kann. Es galt zu zeigen, ob die zusätzliche Gabe von Eosin Y und später auch Merbromin Zellen, welche in der G₀-Phase synchronisiert sind, durch andere mögliche Mechanismen wieder in die Zellteilung treibt und somit die Proliferation von Zellen aktiviert.

Im Bild „normal“ in Abb. 3.7 zeigt sich eine normale Zellverteilung der sich im Zellzyklus befindlichen Zellen unter Standard-Wachstumsbedingungen. Im Bild *starvation* waren die Zellen 24 Stunden lang unter FCS-Deprivation, hierbei zeigt sich eine Abnahme von Zellen in der S-Phase und somit von sich teilenden Zellen. Die Zellen sammeln sich in der G₁-Phase, was durch die Erhöhung des ersten Peaks ersichtlich ist. Um zu untersuchen, ob Eosin Y diesen Effekt verändern kann wurde Eosin Y in Konzentrationen von jeweils 10 µM und 100 µM hinzugegeben („+ Eosin Y 10 µM“ und „+ Eosin Y 100 µM“). Es zeigt sich im Vergleich zu den Zellen unter *starvation* Bedingungen jedoch keine Veränderung im Bereich der S-Phase. Die Zellen sind auch nach 8 Stunden Eosin Y Behandlung weiterhin in der G₀-Phase synchronisiert. Eine 48 stündige Supplementfaktordeprivation anstatt von 24 Stunden zeigte ebenfalls keinen Unterschied nach Behandlung mit Eosin Y.

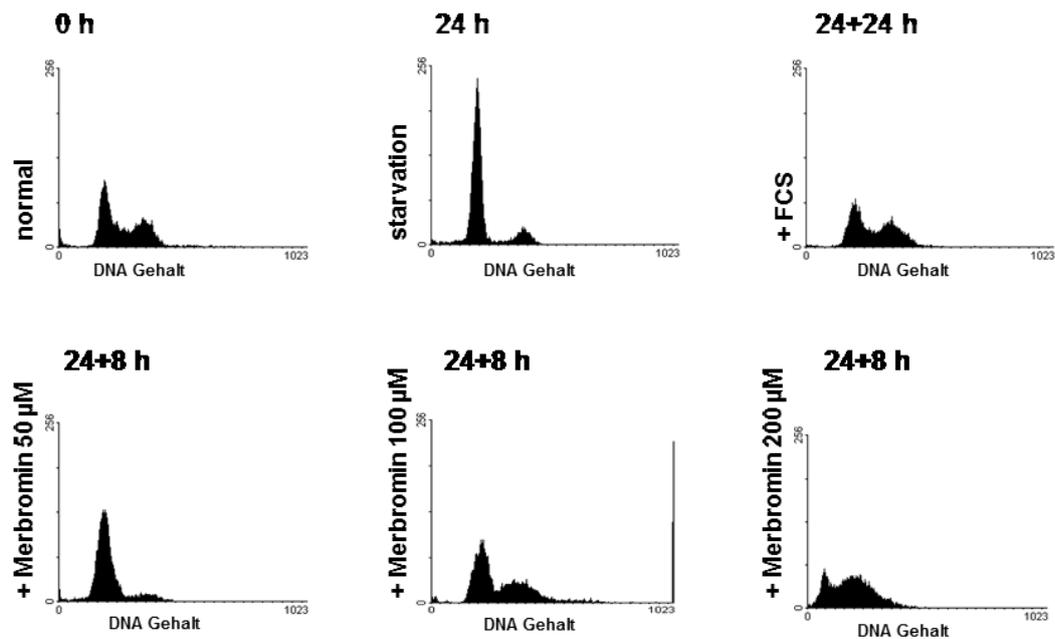


Abb. 3.8 Merbromin induziert die G₁/S Transition von synchronisierten NIH 3T3 Zellen. NIH 3T3 wurden ausgesät. Im (Bild: normal) zeigt sich das normale Verteilungsmuster der Phasen des Zellzyklus. Es erfolgte die Behandlung der Zellen mit 0,1% FCS haltigen DMEM Medium (Supplementfaktordeprivation), was zu einer Synchronisation der Zellen in der G₀-Phase führt (Bild: *starvation*). Wenn den Zellen erneut über 24 h 10% FCS haltiges Medium zugeführt wird, zeigen die Zellen erneut ein normales Verteilungsmuster (Bild: +FCS pos). Nach 24 h Supplementfaktordeprivation wurde den Zellen jeweils für 8 h Merbromin in oben genannten Konzentrationen hinzugefügt. Mit Merbromin behandelte Zellen nähern sich erneut einer normalen Zellverteilung an, somit schafft Merbromin es, dass in bestimmten Konzentrationen synchronisierte Zellen erneut in den Zellzyklus eintreten.

Es wurde ebenfalls eine Zellzyklusanalyse nach Behandlung mit Merbromin durchgeführt. Die IC₅₀ von Merbromin liegt nach 48 h bei 15 µM. Für eine 8 stündige Behandlung wurden daher die Konzentrationen 50 µM, 100 µM und 200 µM zur Überprüfung verwendet. Abb. 3.8 zeigt NIH 3T3 Zellen in normaler Verteilung (Bild „normal“) und nach Supplementfaktordeprivation (0,1 % FCS) (*starvation*). Merbromin wurde nach 24 stündiger Supplementfaktordeprivation der Zellen für 8 h in Konzentrationen von jeweils 50 µM, 100 µM und 200 µM hinzugegeben. Es zeigt sich bereits in der mit 50 µM behandelten Zellpopulation (Bild „+ Merbromin 50 µM“) eine Verbreiterung des ersten Peaks. Zellen, die mit 100 µM Merbromin behandelt wurden (Bild „+ Merbromin 100 µM“) zeigen wieder zwei Peaks, auch in der S-Phase zeigen sich in diesem Fall Zellen. Diese Zellen zeigen erneut ähnliche Charakteristika wie die unbehandelte Zellpopulation, die nicht ausgehungert wurde (Bild „normal“) bzw. wie die Zellen, die nach Supplementfaktordeprivation erneut FCS

erhalten haben (Bild „+FCS“) und danach wieder ein normales Zellverteilungsmuster im Zellzyklus annehmen.

Zellen die mit 200 μM Merbromin behandelt wurden zeigen einen Peak in der subG₁-Phase (Bild „+Merbromin 200 μM “). Ein Großteil der Zellpopulation geht also nach 8 h Behandlung von Merbromin in einer Dosis von 200 μM in die Apoptose, dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem MTT-Assay, bei dem die IC₉₀ nach 48 h bei 40 μg liegt.

3.5. Proteinanalyse mittels Western-Blot

Um den molekularen Mechanismus, der zur Induktion des S-Phase Eintritts in durch Merbromin stimulierten Zellen führt, zu überprüfen, wurden verschiedene an der Zellzykluskontrolle beteiligte Proteine in Zellextrakten mit Hilfe von Western-Blot Analysen detektiert.

Cyclin-abhängige Kinasen können die Zellphasen des Zellzyklus mithilfe von Cyclinen regulieren. Cycline sind Proteine, die an der Einleitung und Aufrechterhaltung bestimmter Zellphasen beteiligt sind und daher spezifisch während dieser Zellphasen exprimiert werden.

In diesem Experiment wurden Cyclin A und Cyclin B gewählt. Cyclin A und Cyclin B werden in der G₂/M-Phase vermehrt exprimiert, teilweise auch in der S-Phase nicht jedoch in der G₁-Phase. [66] Erhöhte Cyclin A und B Expressionen geht also mit einer vermehrten Anzahl von Zellen in den späten Phasen (S-Phase und G₂/M-Phase) einher. PARP als DNA-Reparaturenzym wird bei DNA-Schäden vermehrt exprimiert. Während der Apoptose wird das Protein durch caspase-3 proteolytisch abgebaut. Somit ist der Abbau von PARP ein Marker für den programmierten Zelltod. [7] Es wurde außerdem das p53 Protein als Tumorsuppressor Protein zur Bestimmung ausgewählt. Das p53 wird bei zellulärem Stress angereichert um die Apoptose einzuleiten sowie DNA Reparaturmechanismen zu fördern, damit die Zelle vor einer unbeherrschbaren Teilung geschützt werden kann. [77] Die folgenden Versuche wurden nur mit Merbromin fortgeführt, da Eosin Y in den Migrationsexperimenten nur einen gering erhöhten Index hatte und bei den Experimenten in der Zellzyklusanalyse keine zellteilungsfördernden Eigenschaften zeigte. Da der Effekt bezüglich des Eintritts in die S-Phase bei einer 8 stündigen

Merbromin-Behandlung mit 100 μM zu sehen war, wurden die weiteren Versuche mit 100 μM Merbromin durchgeführt.

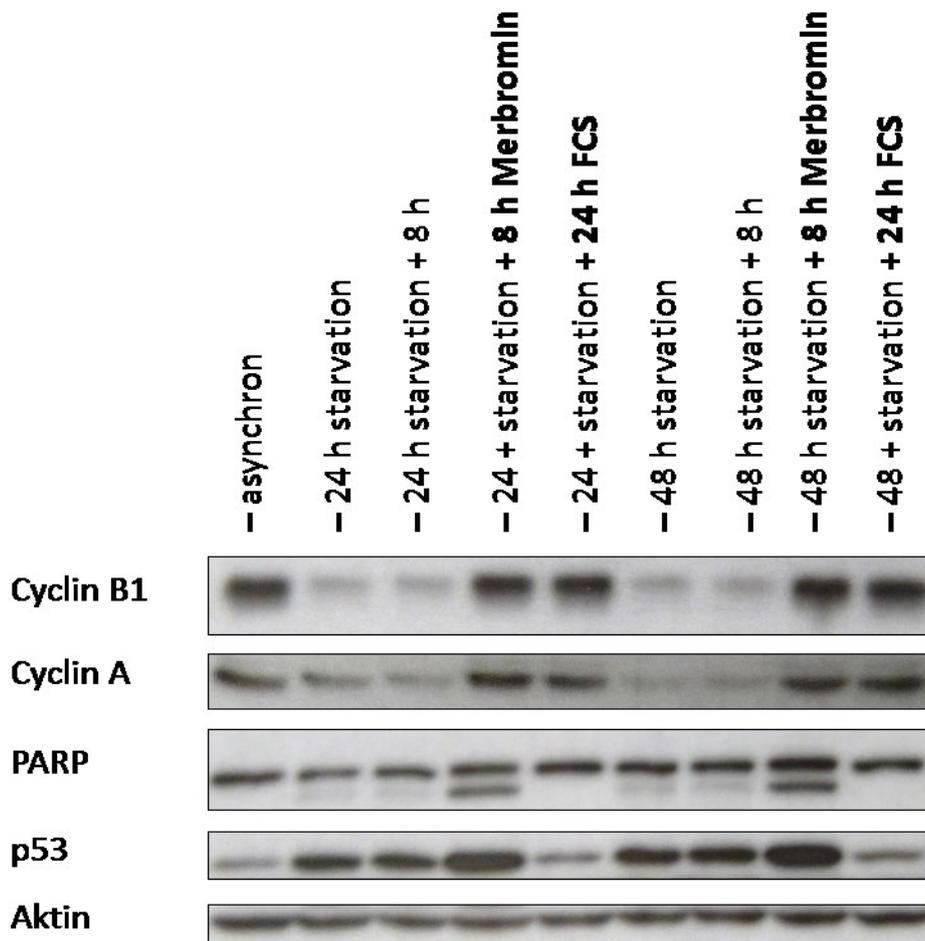


Abb. 3.9 Die durch Merbromin induzierte G₁/S-Transition führt zu Zellsterben. NIH 3T3 Zellen wurden ausgesät und 24 h bzw. 48 h lang mit 0,1% FCS-haltigem Medium behandelt. Zellen unter Supplementdeprivation synchronisieren in der G₀-Phase. Es wurde jeweils Merbromin über 8 h in 100 μM hinzugegeben. Proteine wurden aus den Zellen isoliert. Es erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Bestimmung der oben genannten Proteine.

In der ersten Spalte der Analyse sind die abgebildeten Proteine von asynchronen Zellen zu sehen. Die Zellen wurden erneut mit *starvation* Medium behandelt. Zellen, die weniger Supplementfaktoren zugeführt bekommen, synchronisieren in der G₀-Phase. Dies führt wie in der Abbildung 3.9 ersichtlich zu einer geringeren Zellteilungsrate und daher auch zu erniedrigten Expressionen von Cyclin A und Cyclin B, welche wie bereits erwähnt in den späten Phasen des Zellzyklus vermehrt exprimiert werden. Diese verringerte Expression verändert sich über einen Zeitraum von 8 h üblicherweise nicht, wie in der dritten Spalte ersichtlich ist. Die Zugabe von

Merbromin in 100 μM über einen Inkubationszeitraum von 8 h zeigte jedoch erneut hohe Level von Cyclin A und Cyclin B. Ebenso führt die Zugabe der zuvor entfernten Supplementfaktoren wieder zur vermehrten Expression von Cyclin A und Cyclin B (Positivkontrolle mit FCS).

Die Spaltung von PARP stellt einen Indikator für Apoptose dar. Die Spaltung kann durch das Nachweisen von zwei Banden detektiert werden. Eine wichtige Rolle bei der Spaltung von PARP spielt die Caspase 3, welche PARP während eines Apoptose-Prozesses proteolytisch abbaut. Unter nicht-apoptotischen Zellbedingungen ist eine solche PARP Spaltung nicht zu sehen. [7] Die synchronisierten Zellen zeigen eine schwache zweite Bande und damit eine leicht erhöhte Apoptose-Frequenz der Zellen. Zellen, die mit Merbromin behandelt wurden, zeigen deutlich eine zweite Bande in der PARP Spalte, sowohl bei Zellen, die 24 Stunden lang *starvation* Medium ausgesetzt waren als auch 48 Stunden lang. Das p53 verhält sich in dieser Analyse äquivalent zu PARP. Eine erhöhte p53 Expression kann vermehrt bei den Zellen unter Supplementfaktordeprivation beobachtet werden, wobei die Expression von p53 bei diesen Zellen nach der Zugabe von Merbromin deutlich höher ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Merbromin zu einer Veränderung der Cyclin Expression führt. Unter Merbromin-Behandlung konnte eine vermehrte Cyclin A und Cyclin B Expression bei Zellen beobachtet werden, die zuvor in der G_0 -Phase synchronisiert waren und somit eine nur minimale Expression von Cyclin A und Cyclin B aufwiesen. In der Regel kann dies nur durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren erreicht werden (siehe Positivkontrolle). Merbromin schafft dies aber Wachstumsfaktor-unabhängig. Es zeigt sich ebenfalls eine höhere Tendenz von Zellsterben unter Merbromin-Behandlung, indiziert durch eine erhöhte PARP Spaltung und erhöhte p53 Expression.

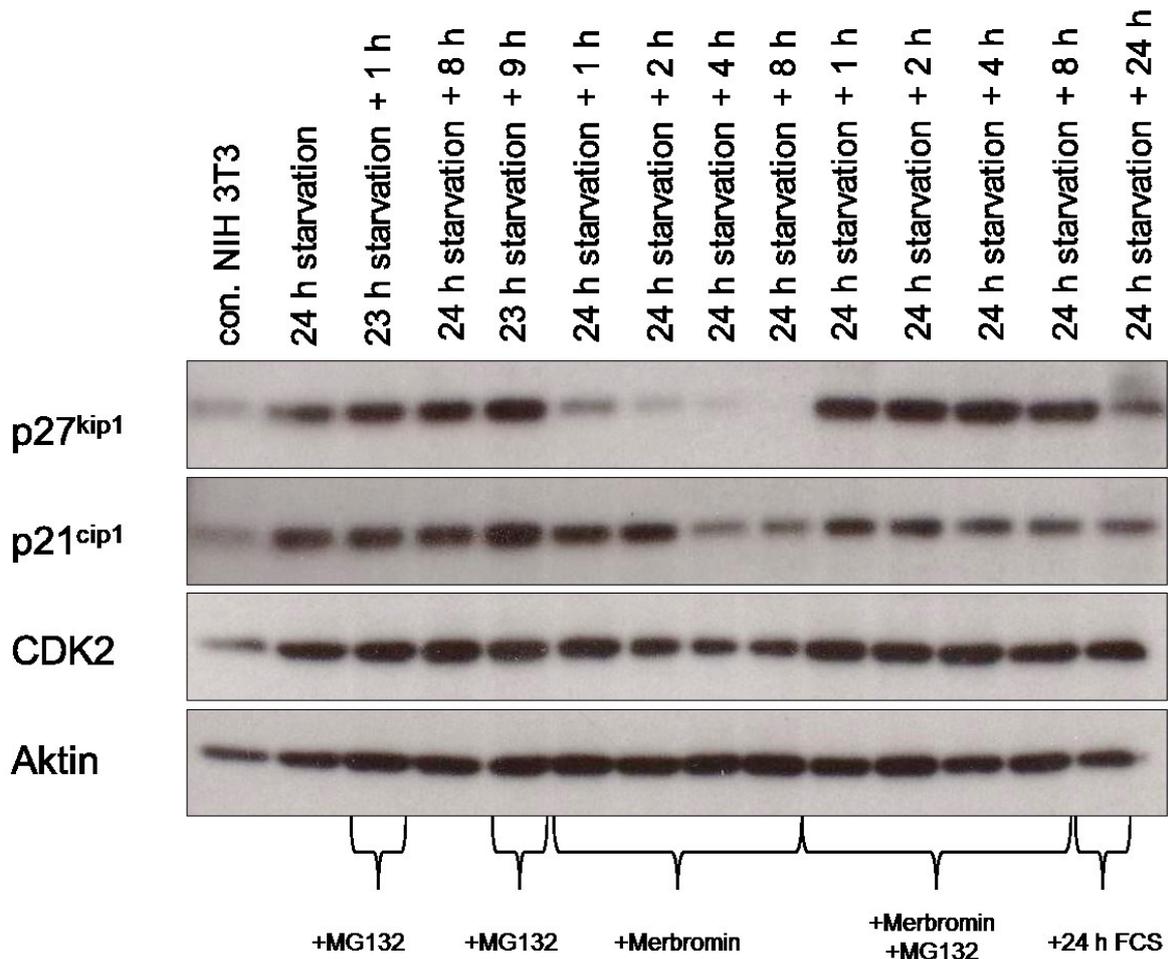


Abb. 3.10 Merbromin führt zum proteolytischen Abbau von p27 und verzögerten p21 Abbau bei gleichbleibenden CDk2 Leveln. NIH 3T3 Zellen wurden ausgesät und 24 h lang mit 0,1% FCS-haltigem Medium behandelt. Zellen unter Supplementdeprivation synchronisieren in der G₀-Phase. Es wurde jeweils Merbromin über 1, 2, 4 und 8 h in 100 µM hinzugegeben. Dann wurde Merbromin zusammen mit dem Proteasominhibitor MG132 zu denselben Zeitpunkten hinzugegeben. Proteine wurden aus den Zellen isoliert. Es erfolgte eine Western-Blot Analyse mit Bestimmung der oben genannten Proteine.

Im Weiteren wurde die Cdk2, sowie die Expression der beiden Cdk-inhibierenden Proteine p27 und p21 unter Merbromin-Behandlung untersucht. Diesmal wurde Merbromin über 1 h, 2 h, 4 h und 8 h hinzugegeben um den zeitlichen Ablauf genauer beurteilen zu können. Bei dieser Analyse wurde zusätzlich MG132 als Proteasominhibitor zu Merbromin hinzugegeben. Sollte das Merbromin zu einer Veränderung der Level von Cdk2 oder p27/p21 führen galt es zu untersuchen, ob

diese Veränderung der Proteinlevel über einen proteolytischen Abbau stattgefunden hat.

Die Expressionslevel von Cdk2 zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der Darstellung mit oder ohne Merbromin-Behandlung. Das p27 zeigt sich in Zellen unter Supplementfaktordeprivation deutlich stärker exprimiert, ebenso verhält es sich mit p21. Unter Behandlung mit Merbromin zeigen sich bereits nach einer einstündigen Behandlung erniedrigte p27 Expressionslevel. Nach zweistündiger Behandlung ist p27 kaum noch nachzuweisen. Das p21 zeigt nach 4 stündiger Merbromin-Behandlung eine schwächere Expression. Nach Hinzugabe des Proteasominhibitors MG132 zeigt sich eine Stabilisierung der Expression auch unter Merbromin-Behandlung, sodass von einem proteolytischen Abbau von p27 und p21 bei den nur mit Merbromin behandelten Zellen auszugehen ist. Das p27 wird üblicherweise beim Übergang von der G₁-Phase zur S-Phase physiologisch abgebaut. Auch verhält es sich so mit p21, wobei p21 insgesamt länger und mit höheren Leveln exprimiert wird. [27]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Merbromin-Behandlung der Zellen p27 Level und p21 Level verringert werden können. Anhand der Abb. 3.10 ist davon auszugehen, dass diese Korrelation durch einen proteolytischen Abbau von p27 und p21 verursacht worden ist. Das p21 wird zeitlich später abgebaut als das p27. Bezüglich der Cdk2 Level zeigt sich keine Veränderung während der Behandlung mit Merbromin.

3.6. Zellteilungsanalyse mittels BrdU-Staining

Um zu verifizieren, dass die Zellen unter Merbromin-Behandlung vermehrt in die DANN-Synthese-Phase (S-Phase) übergehen, wurde eine Zellteilungsanalyse mit BrdU durchgeführt. BrdU ist ein Thymidinanalogon, welches sich bei der Replikation als DNA-Bestandteil in die DNA der Zellen einbaut. Das BrdU wird anschließend mit einem fluoreszierenden anti-BrdU Antikörper gebunden und kann anschließend durchflusszytometrisch gemessen werden. Dies erlaubt die quantitative Bestimmung der BrdU aufnehmenden und somit sich replizierenden Zellen. [53]

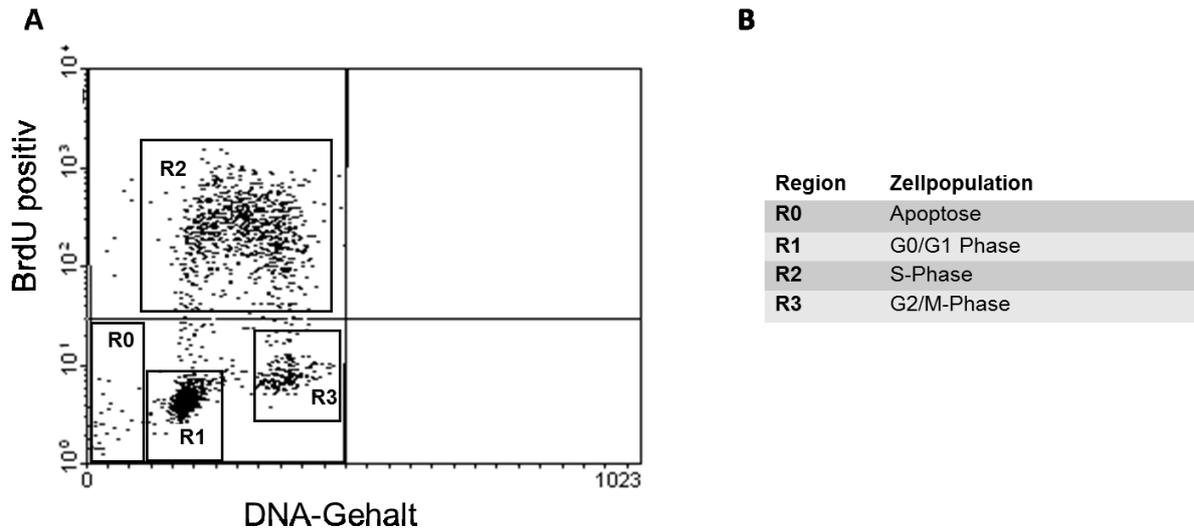


Abb. 3.11 Schematische Darstellung des BrdU-Verteilungsmuster von NIH 3T3 Zellen unter Standardbedingungen. Bild (A) zeigt die quantitative BrdU-Zellzyklusanalyse von NIH 3T3 Zellen, gefärbt mit BrdU auf der Y-Achse und gefärbt mit 7-ADD (DNA-Gehalt) auf der X-Achse. Regionen wurden mit R0 – R3 markiert. Die Bildbezeichnungen (=unterschiedliche Phasen des Zellzyklus) sind auf dem Bild (B) ersichtlich.

Zum Verständnis der nachfolgenden BrdU-Versuche, ist in Abb. 3.11 (A) schematisch ein BrdU-Verteilungsmuster von Zellen unter Standardbedingungen dargestellt. Zur Bestimmung der Zellzyklusphase wird hier die DNA analog zu den Zellzyklusversuchen detektiert (mit 7-ADD) und der DNA-Gehalt als Anhaltspunkt für die Zyklusphase verwendet. Die jeweiligen korrespondierenden Zellzyklusphasen wurden auf dem Bild mit Regionen 0-3 markiert und in Abb. 3.11 (B) namentlich aufgelistet. So stellt die erste punktförmige Population mit der Regionsbezeichnung R1 Zellen in der G₀/G₁-Phase dar. Die zweite punktförmige Zellpopulation (R2-Region) entspricht der G₂/M-Phase. Die Zellen dazwischen sind üblicherweise in der Replikation und in dieser Graphik BrdU-positiv und sind deshalb im oberen Bereich des Bildes zu finden.

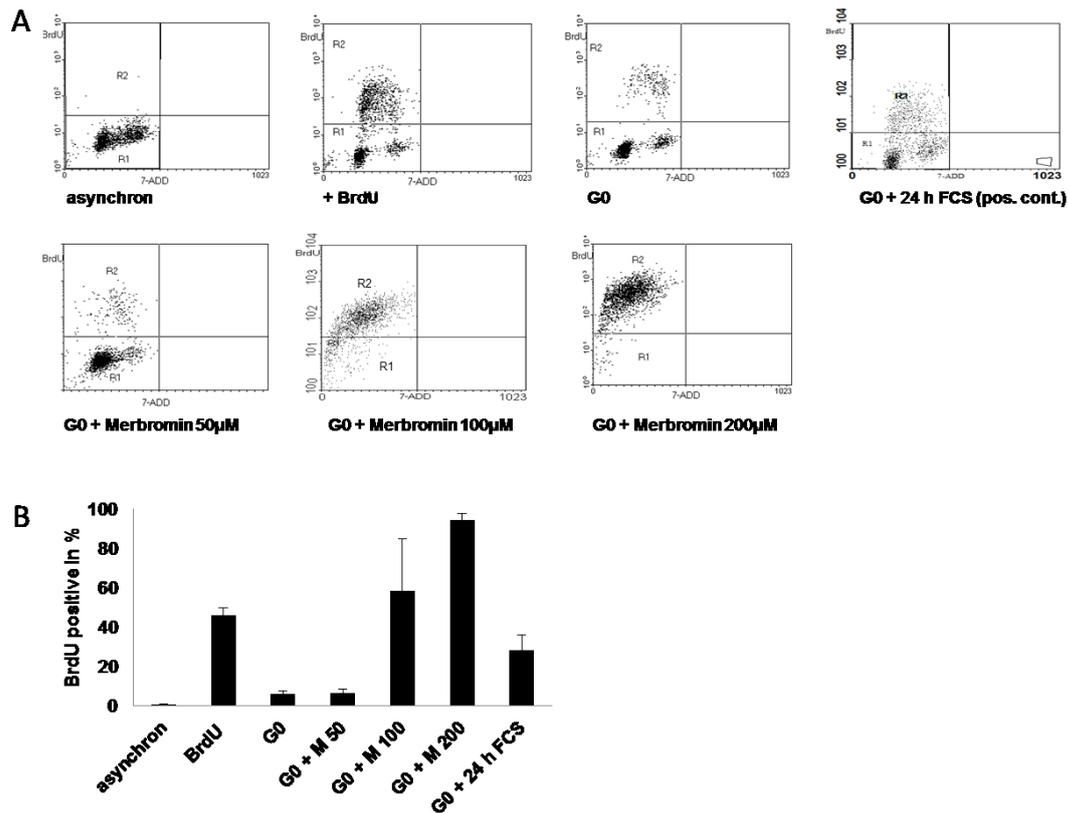


Abb. 3.12 Merbromin induziert die Replikation synchronisierter NIH 3T3 Zellen. NIH 3T3 Zellen wurden zur quantitativen Analyse der Zellzyklusphasen mit 200 µM BrdU behandelt. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Bestimmung der BrdU positiven Zellen in Abhängigkeit von dem DNA-Gehalt. Wie bereits in Abb. 3.11 beschrieben, können die unterschiedlichen Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen analysiert werden. Es zeigen sich in der Negativkontrolle keine BrdU positiven Zellen. Die *starvation* Probe (G₀) zeigt eine deutliche Verringerung der BrdU positiven Zellen in der R2 Region. Nach Hinzugabe von Merbromin über 8 h zeigt sich abhängig von der Konzentration eine Zunahme der Zellen in der S-Phase. Mit zunehmender Konzentration ist jedoch keine R3 Region mehr abgrenzbar und somit keine G₂/M Phase. Die Experimente wurden dreimal wiederholt, die Mittelwerte sind in (B) aufgelistet.

In der hier dargestellten Analyse zeigt sich in Abb. 3.12 (A) im Bild „asynchron“ eine Negativkontrolle ohne die Zugabe von BrdU zu den Proben. Man sieht daher in der Y-Achse keine Anreicherung von BrdU positiven Zellen, diese Probe dient zur Markierung und Festlegung der Schwelle, ab welcher Messung von BrdU-Positivität gesprochen werden kann. Im Bild „+ BrdU“ zeigen sich mit BrdU behandelte Zellen unter Standardbedingungen (siehe hierzu 2.2.1). In der R1-Region der Abbildung sind Zellen in der G₁-Phase, die einen einfachen DNA-Gehalt haben (x-Achse 7-ADD) und sich nicht akut in der S-Phase befinden. Zellen die in die S-Phase gehen bauen BrdU ein, können von den fluoreszierenden anti-BrdU Antikörpern gebunden

werden und sind somit BrdU-positiv. Die R3-Region entspricht Zellen mit doppeltem Chromosomensatz und somit Zellen im Übergang der G₂/M-Phase. In Bild „G0“ wurden Zellen erneut in *starvation* Bedingungen (Supplementfaktordeprivation) kultiviert. Hierbei zeigen sich analog zu den Zellzyklusexperimenten eine Verringerung der Zellen in der S-Phase, sowie eine Verringerung von Zellen in der G₂/M-Phase und eine Synchronisation (Zunahme) der Zellen, die sich in der G₁-Phase befinden. Nach Zugabe von Merbromin über 8 h zeigt sich eine signifikant erhöhte (100 µM + 200 µM) Aufnahme der Zellen mit BrdU. Die Zellen treten nach Merbromin-Behandlung also in die S-Phase ein. Der Effekt nach Merbromin-Behandlung ist sogar höher, als nach Zugabe von FCS. Es sind auch Zellen in der R0 Region (siehe Abb. 3.11) nachweisbar, also gehen Zellen unter Merbromin-Behandlung auch vermehrt in die Apoptose.

Es zeigt sich, dass diese Zellpopulation unter den hier angewendeten Bedingungen im Normalzustand ca. 40 % BrdU positive Zellen aufweist und somit ca. 40 % Zellen, die sich in der S-Phase befinden. Unter *starvation* Bedingungen verringert sich die Anzahl von BrdU positiven Zellen auf im Schnitt 6 %. Nach Zugabe von Merbromin in 50 µM auf Zellen in *starvation* Bedingungen ergibt sich kaum ein Unterschied, die BrdU Aufnahme steigt auf lediglich 6,2 %. Nach Zugabe von Merbromin in 100 µM steigt die BrdU Aufnahme auf durchschnittlich ca. 58% an und nach Zugabe von 200 µM Merbromin auf ca. 66%. Nach erneuter Zugabe von FCS als Supplementfaktor zu Zellen in *starvation* Bedingungen treibt es wieder knapp 30 % der Zellen in die Synthese-Phase.

In einem nachfolgenden Experiment sollte der zeitliche Verlauf der BrdU Aufnahme demonstriert werden.

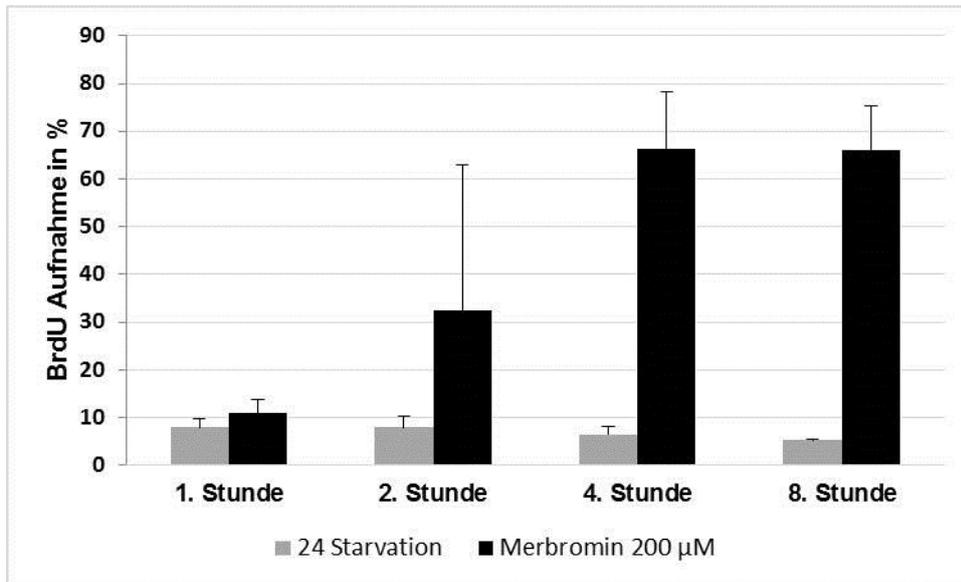


Abb. 3.13 Kinetische Analyse der BrdU-aufnehmenden NIH 3T3 Zellen, die mit Merbromin behandelt wurden. NIH 3T3 Zellen, jeweils unter Supplementfaktordeprivation (*starvation*= 0,1 % FCS-haltiges Medium) und unter Supplementfaktordeprivation mit nachfolgender Merbromin-Behandlung über 1, 2, 4 und 8 Stunden (200µM), welche in der ersten, zweiten, vierten und achten Stunde mit BrdU behandelt wurden.

Erneut wurden Zellen 24 Stunden unter Supplementfaktordeprivation kultiviert und anschließend mit Merbromin behandelt. Es wurde jeweils die BrdU Aufnahme von diesen Zellen in der ersten, der zweiten, der vierten und der achten Stunde gemessen. Nach acht Stunden zeigt sich passend zu dem zuvor beschriebenen Experiment eine mittlere BrdU-Aufnahme von Zellen unter Supplementfaktordeprivation von 5,3%. Nach einer Stunde zeigen die Zellen eine Aufnahme von 7,9%. Diese hält sich in der zweiten Stunde und nimmt in der vierten Stunde auf 6,5% ab. Die Zellen die mit 200 µM Merbromin behandelt wurden zeigen in der ersten Stunde eine mittlere BrdU Aufnahme von 10,9 %. In der zweiten Stunde werden 32,3% aufgenommen, in der vierten 66,4% und in der achten Stunde hält sich die BrdU Aufnahme konstant bei 66,1%. Hieraus ist abzuleiten, dass nach ca. 4 Stunden die maximale BrdU Aufnahme stattfindet.

3.7. shRNA Screening

Es konnte bisher gezeigt werden, dass Merbromin in den Zellen eine G₁/S-Transition induziert, da in der G₀-Phase synchronisierte Zellen durch die Zugabe von Merbromin in die S-Phase übergehen. Dieser Effekt war vor allem ab 100 µM Merbromin über 8 h sichtbar. Allerdings zeigte sich auch anhand der bisher durchgeführten Experimente, dass Zellen unter Merbromin-Behandlung, bei bereits 100 µM Merbromin über 8 h vermehrt in die Apoptose getrieben werden. Um mögliche Ansatzpunkte für eine Therapie zu identifizieren, die zwar den Zellzykluseintritt aber nicht die Apoptose fördern, wurde ein shRNA Screen durchgeführt.

Für den Screen wurde eine Cancer 1000 Bibliothek verwendet (siehe 2.1.7), die aus ca. 2250 murinen shRNA besteht, welche gegen wichtige potentielle Tumorsuppressorgene und Onkogene gerichtet und somit für den Zellzyklus relevant sind.

Für den Screen wurden NIH 3T3 Zellen mit der shRNA Bibliothek (siehe 2.2.10) infiziert und mit einer toxischen Konzentration (IC₉₀) von jeweils Eosin Y und Merbromin behandelt. Als Negativkontrolle dienten hierbei Zellen, die mit einem Kontroll-shRNA (short hairpin Renilla) Konstrukt infiziert wurden. Die toxischen Konzentrationen führten bei diesen Kontroll-Zellen (=shRen) zum Zelltod der gesamten Zellpopulation in den Zellplatten. Zellen, die mit der Cancer 1000 Bibliothek infiziert worden waren, formten einzelne Zellkolonien. Es galt zu zeigen, welche Zellklone überleben und durch welchen Gen-knockdown (shRNA) dieser Überlebensvorteil begründet ist. Die Transduktionseffizienz vor der Selektion lag bei ca. 30 %. 40 µM Merbromin führt zum Zelltod von über 90% der NIH 3T3 Zellen und 200µM Eosin Y führt zum Zelltod von über 90% der NIH 3T3 nach 48 h (siehe 3.2). Die Zellkolonien wurden von den Platten geerntet und die DNA isoliert. Nach der Durchführung einer Solexa PCR konnte die Sequenzierung durchgeführt werden.

3.7.1. Testreihen für den Versuchsablauf

Für eine verbesserte Transduktionseffizienz des Virus, wird den Zielzellen Polybrene hinzugegeben, denn Polybrene verhindert durch Neutralisation die Abstoßung des Virus von der Sialinsäurehaltigen Zelloberfläche. Polybrene kann aber auch toxisch für die Zellen sein, sodass für die NIH 3T3 Zellen die Konzentration ermittelt wurde, welche noch tolerabel ist. [17]

Polybrene Toxizitäts-Testung: bis zur einer Konzentration von 6 µg/ml Polybrene über 24 h zeigte sich kein Einfluss auf NIH 3T3 Zellen, ab einer Konzentration von 8 µg/ml zeigten sich bereits beginnend tote Zellen. Eine Konzentration von 10µg/ml wurde von den Zellen auch noch bis zu 48 h toleriert, jedoch zeigte sich hierbei bereits ein zunehmendes Absterben der Zellen. Deshalb wurde **6 µg/ml Polybrene** für den Versuch verwendet.

Puromycin als Antibiotikum wurde für Selektionszwecke verwendet. Es galt zu überprüfen welche Konzentration für die NIH 3T3 Zellen verwendet werden kann.

Puromycin Toxizitäts-Testung: ab einer Konzentration von 6 µg/ml Puromycin über 48 h zeigen sich NIH 3T3 Zellen lichtmikroskopisch vollständig von der Platte abgelöst und somit tot. Daher wurde diese Konzentration von **6 µg/ml Puromycin** für die Selektionszwecke verwendet.

3.7.2. Virus-Transduktion

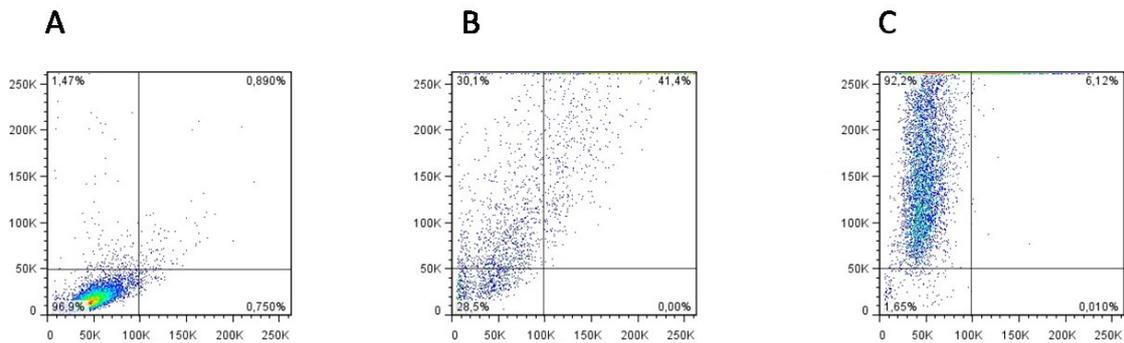


Abb. 3.14 Transduktionseffizienz bei dem shRNA Screen mit der Cancer 1000 Bibliothek. (A) zeigt nicht transduzierte NIH 3T3 Zellen. (B) zeigt mit Cancer 1000 Bibliothek transduzierte NIH 3T3 Zellen vor der Puromycin-Selektion. Hier zeigt sich eine Effizienz von ca. 30 %.(C) zeigt NIH 3T3 Zellen, die mit der Cancer 1000 Bibliothek transduziert wurden nach der Selektion mit Puromycin. Hierbei zeigt sich eine 92 % GFP-Positivität und somit Transduktionseffizienz.

In Abb. 3.14 wurde die Transduktionseffizienz von den NIH3T3 Zellen, über eine FACS-Analyse dargestellt. Diese wurden mit der Cancer 1000 Bibliothek transduziert. Vor der Selektion mit Puromycin zeigen sich ca. 30 % der Zellen GFP-positiv (B). Nach der Selektion mit Puromycin zeigen sich 92 % der Zellen GFP-Positiv (C).

3.7.3. shRNA Screening-Ergebnisse

3.7.3.1. Eosin Y

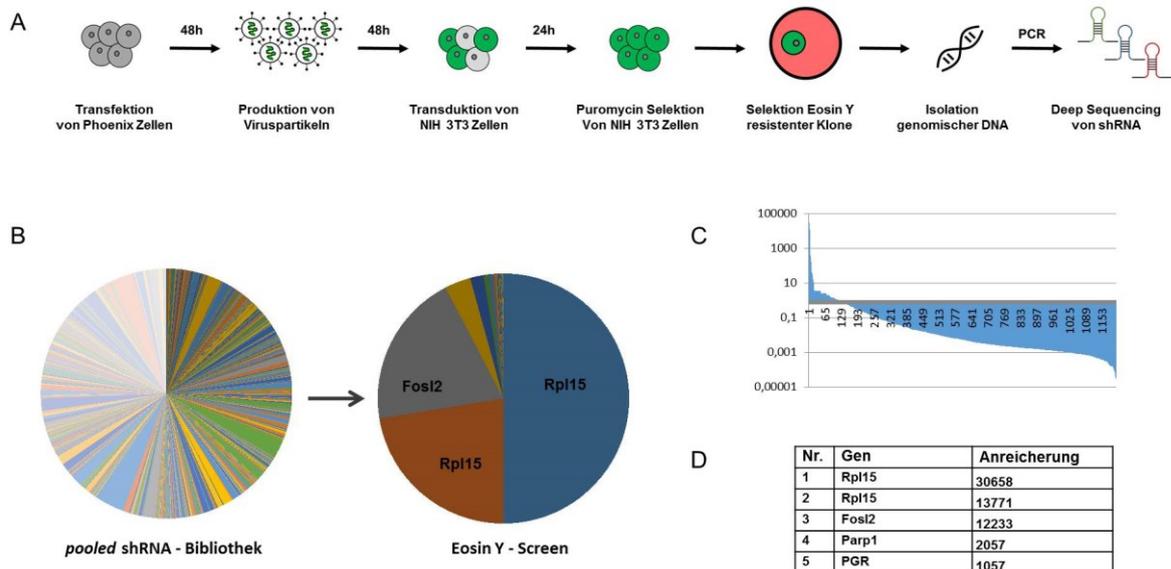


Abb. 3.15 Ergebnisse des shRNA Screens mit Eosin Y auf NIH 3T3 Zellen.

Mit der Cancer 1000 Bibliothek transduzierte NIH3T3 Zellen wurden mit einer toxischen Konzentration (IC_{90}) von Eosin Y behandelt. Anschließend wurde über NGS die shRNA Anreicherung / Depletion analysiert. (Bild A). Die 5 häufigsten shRNA die angereichert worden sind bzw. ihre korrespondierenden Gene wurden in (D) in absteigender Reihenfolge dargestellt. In (C) graphisch dargestellt die Anreicherung und Deprivation der shRNA. In (B) ist links die Verteilung der shRNA von der Cancer 1000 Bibliothek zu sehen, die in der Positiv-Kontrolle (NIH 3T3 infizierte Zellen ohne Behandlung mit Eosin Y) angereichert worden sind. Es zeigt sich ein relativ gleichmäßiges Verteilungsmuster. Rechts davon zeigen sich die angereicherten shRNA Klone und ihre Verteilung.

In Abb. 3.15 (A) ist der schematische Ablauf des Screens bildlich dargestellt. In (B) zeigt sich links die homogene Verteilung der shRNA aus der Positivkontrolle, welche den shRNA-Pool der Cancer 1000 Bibliothek enthält. Rechts davon zeigen sich die angereicherten shRNA unter Eosin Y Behandlung. Die drei am häufigsten angereicherten shRNA beeinflussen die Gene Rpl15 und Fosl2. Diese umfassen über 85% der Gesamtanreicherung. Aus den mit Eosin Y behandelten Proben wurde der jeweilige Prozentsatz der einzelnen Reads der unterschiedlichen shRNA im Vergleich zur Gesamtheit der Reads mit dem prozentualen Anteil der jeweiligen shRNA in der Positivkontrolle verrechnet. Diese Berechnung erlaubt die Bestimmung der vielfachen Anreicherung der shRNA. Die 5 shRNA die am häufigsten angereichert worden sind, wurden in (D) aufgelistet. Auffällig bei den Ergebnissen des Eosin Y Screens ist die Anreicherung gegen das Rpl15 Gen.

3.7.3.2. Merbromin

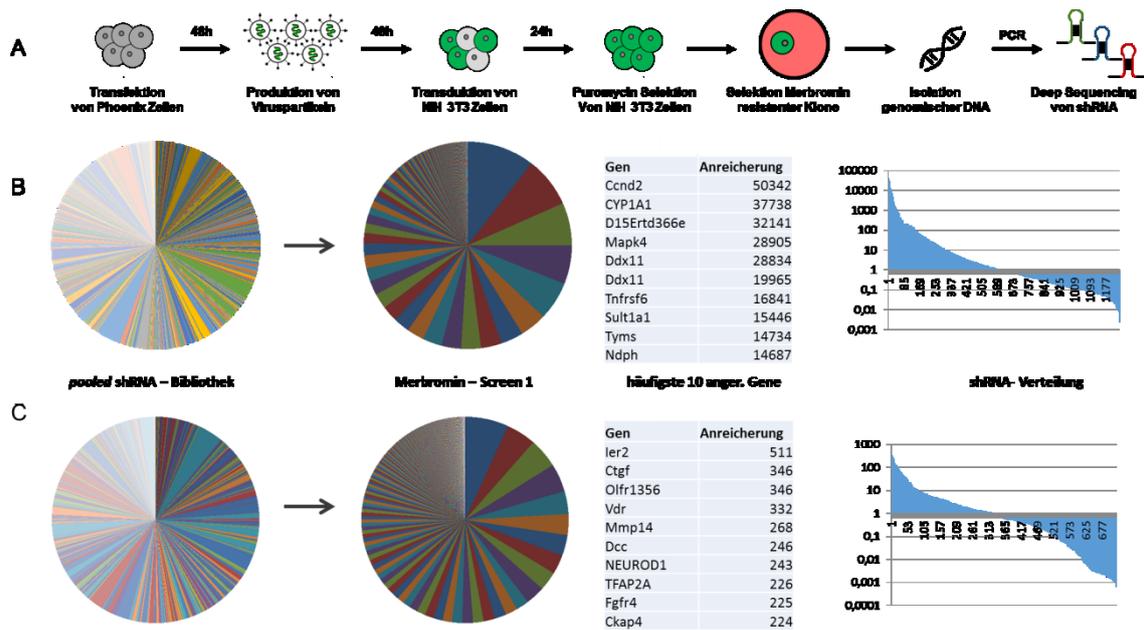
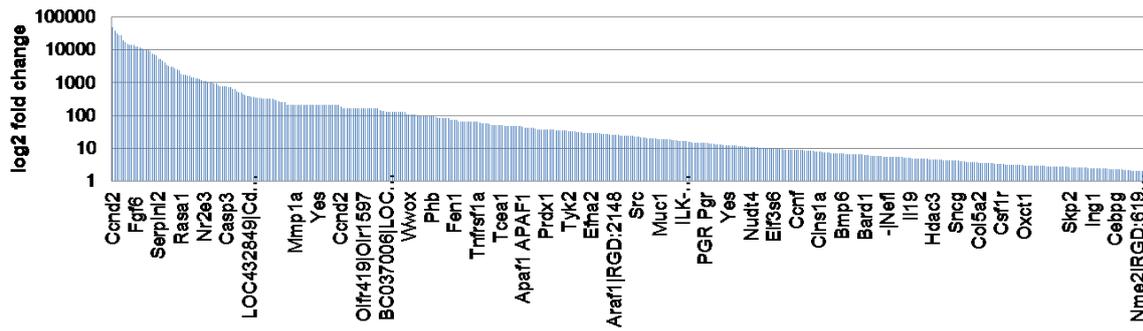


Abb. 3.16 Ergebnisse des shRNA Screens mit Merbromin auf NIH 3T3 Zellen in zwei Versuchen.

Mit der Cancer 1000 Bibliothek transduzierte NIH3T3 Zellen wurden mit einer toxischen Konzentration (IC_{90}) von Merbromin behandelt. Anschließend wurde über NGS die shRNA Anreicherung / Deprivation analysiert. (Bild A). In Bild (B) ist der erste Screen zu sehen, in Bild (C) der zweite Screen. Hier jeweils dargestellt links die Verteilung der shRNA von der Cancer 1000 Bibliothek ohne Behandlung mit Merbromin, rechts davon dem Pfeil folgend die angereicherten shRNA Klone, die unter Merbromin-Behandlung überlebt haben und ihre Verteilung. Anschließend folgen noch die 10 häufigsten Gene tabellarisch aufgelistet, sowie eine graphische Darstellung der Anreicherung und Deprivation der shRNA.

Bei den analogen Versuchen mit Merbromin zeigen sich im Vergleich zu Eosin Y weniger deutlich angereicherte shRNA. In den zwei unabhängig voneinander durchgeführten Screens, zeigt sich bei den 10 am häufigsten angereicherten shRNA keine Übereinstimmung. Ersichtlich in der Abb. 3.16 (B) und (C) mit der Bezeichnung shRNA-Verteilung ist die homogenere Verteilung der shRNA Anreicherung im Vergleich zu den Eosin Y Proben, bei denen sich deutlich bestimmte shRNA vermehrt angereichert abzeichnen. Da sich keine Übereinstimmung bei den 10 häufigsten shRNA in den zwei Merbromin Screens zeigten, wurden weitere shRNA miteinander verglichen, die sowohl im Screen 1 als auch im Screen 2 angereichert worden waren, selbst wenn nicht in hohem Maße.

Merbromin Screen 1 - cut off "2"



Merbromin Screen 2 - korrespondierend

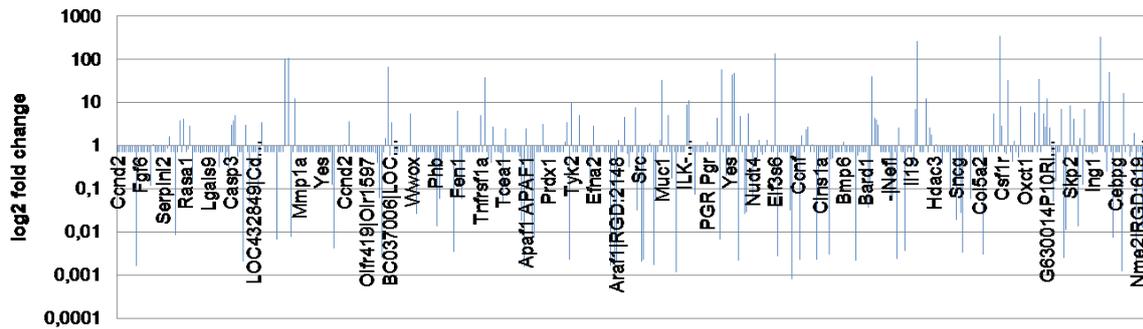
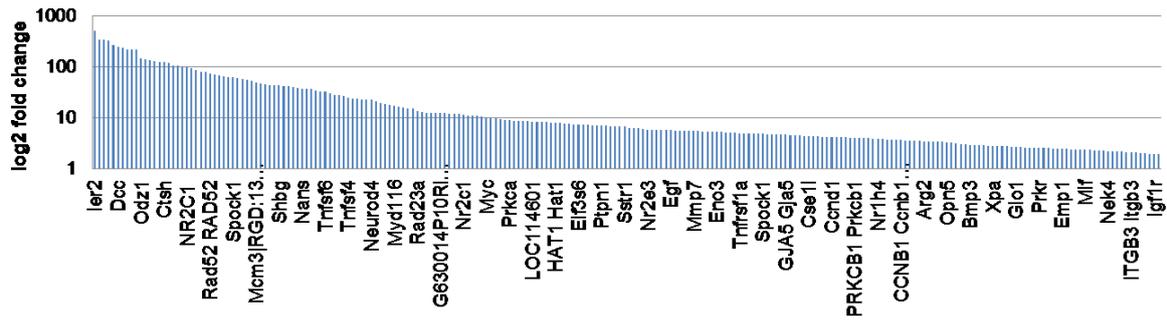


Abb. 3.17 Auflistung der gefundenen Gene zu den shRNA des Merbromin Screen 1 mit einer mehr als zweifachen Anreicherung und die Anreicherung der korrespondierenden Gene zu den shRNA im Merbromin Screen 2.

Merbromin Screen 2 - cut off "2"



Merbromin Screen 1 - korrespondierend

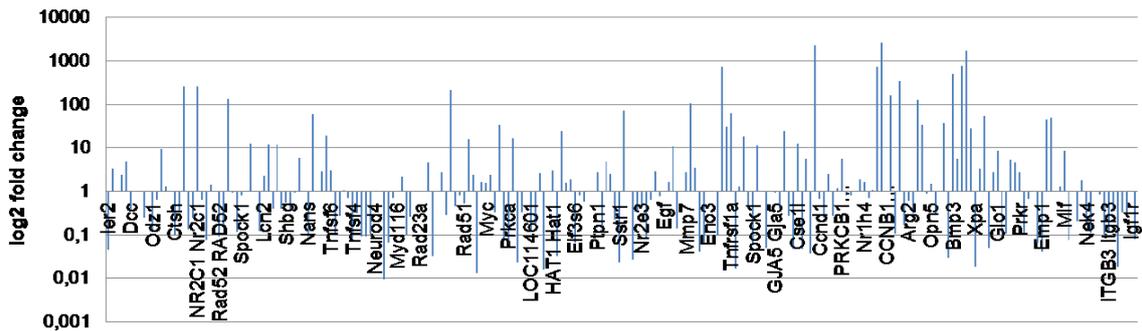


Abb. 3.18 Auflistung der gefundenen Gene zu den shRNA des Merbromin Screen 2 mit einer mehr als zweifachen Anreicherung und die Anreicherung der korrespondierenden Gene zu den shRNA im Merbromin Screen 1.

In Abb. 3.17 und Abb. 3.18 sind jeweils die beiden Merbromin Screens mit den Genen aufgelistet, welche mindestens um das zweifache angereichert worden sind und in den jeweils darunter als „korrespondierend“ bezeichneten Grafiken zeigen sich die jeweils zur oberen Grafik korrespondierenden Gene.

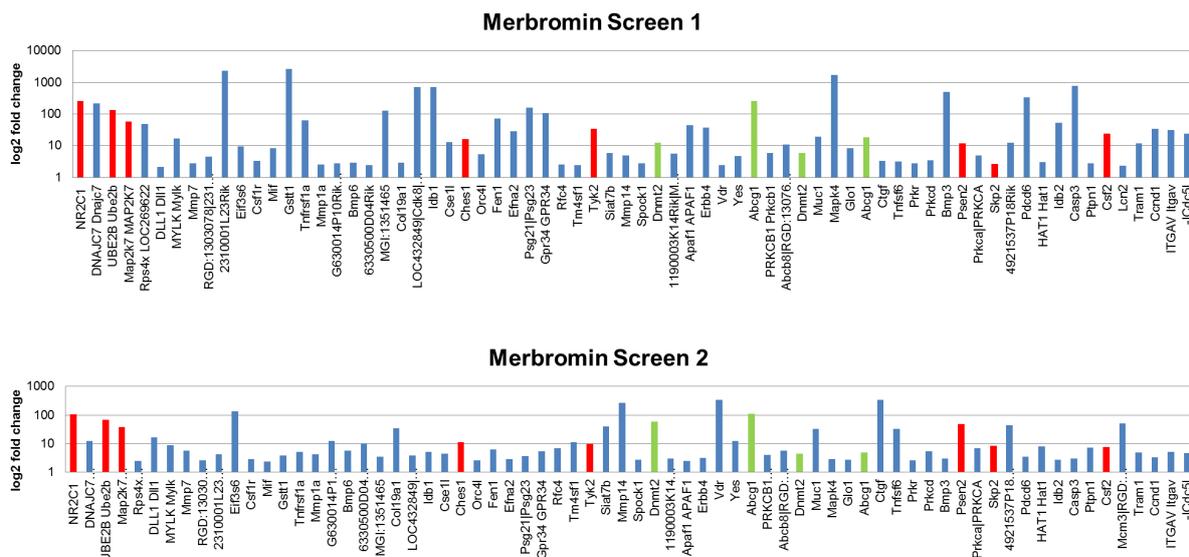


Abb. 3.19 Vergleich von Merbromin Screen 1 und Merbromin Screen 2. Es wurde zweifach ein Screen mit Merbromin, bei dem NIH 3T3 Zellen mit der Cancer 1000 Bibliothek infiziert und dann mit toxischen Konzentrationen von Merbromin behandelt wurden, durchgeführt. Die überlebenden Zellen wurden auf ihre Anreicherung der shRNA miteinander verglichen. In dieser Grafik werden alle Gene verglichen, die eine Anreicherung von shRNA um mindestens das zweifache in beiden Screens aufwiesen. Insgesamt zeigen sich hierbei 70 Gene. Grün markiert, multipel auftretende shRNA. Rot markiert eine Auswahl von Genen, die anhand ihrer Häufigkeit oder Relevanz für den Zellzyklus ausgewählt wurden.

Gen-Name	Anreicherung von shRNA M1-Screen	Anreicherung von shRNA M2-Screen
Abcg1	255,6	109,1
Ches1 (=FOXN3)	16,2	11,4
Csf2	24,1	7,8
Dnmt2 (=TRDMT1)	12,7	59,8
Map2k7	58,9	38,1
Nr2c1	261,6	103,4
Psen2	12,0	48,2
Skp2	2,6	8,5
Tyk2	33,6	9,6
Ube2b	136,5	67,8

Tab. 3.1 Gentreffer aus beiden Merbromin Screens

In den beiden Abbildungen 3. 17 und 3. 18 ist ersichtlich, dass nicht alle shRNA, die in einem Screen angereichert sind, auch in dem anderen Screen angereichert wurden. Deshalb liegt es nahe nur die Gene der shRNA miteinander zu vergleichen, welche sowohl in Merbromin-Screen 1 als auch in Merbromin-Screen 2 angereichert wurden. Ebendies wurden in Abb. 3.19 durchgeführt. In dieser Abbildung sind alle Gene von beiden Screens korrespondierend untereinander aufgelistet, bei denen sich sowohl in Merbromin Screen 1 als auch in Merbromin Screen 2 eine Anreicherung der shRNA von mehr als zwei zeigte.

Die Abbildung zeigt Gene, die in beiden Screens eine Anreicherung der shRNA zeigten, jeweils rot markiert. Bei zwei Genen konnte die Anreicherung von multipel angreifenden shRNA gefunden werden, diese shRNA wurden grün markiert. Eine Auflistung der interessanten Gene mit der jeweiligen shRNA Anreicherung im Merbromin Screen 1 und Merbromin Screen 2 ist in Tab. 3.1 dargestellt.

4. Diskussion

Die Zellregeneration ist ein wichtiger Prozess des Lebens, der bei verschiedenen Organismen und Erkrankungen pathologisch verändert sein kann. Eine fehlgeschaltete Regenerationsfähigkeit der Zellen führt in der Regel dazu, dass Zellen in den programmierten Zelltod übergehen und sterben.

Über zellregenerationsfördernde Substanzen ist nicht viel bekannt. Im Allgemeinen herrscht die Meinung, dass Wirkstoffe, die den Zellzyklus vorantreiben und somit zellregenerationsfördernd sind, kanzerogene Eigenschaften besitzen könnten. Das Erforschen von zellregenerationsfördernden Substanzen, die den Zellzyklus zu Beginn beschleunigen und nachfolgende Kontrollereignisse des Zellzyklus zur Vermeidung vor unkontrolliertem Wachstum zulassen, ist daher essentiell. In dieser Arbeit sollte der Fokus auf das Untersuchen von Substanzen gelegt werden, die in frühe Phasen des Zellzyklus eingreifen und diesen vorantreiben können. Die Cyclin-abhängige Kinase 2 (Cdk2) stellt ein bedeutsames Protein für die Zellzyklusprogression dar. Sie spielt speziell zu Beginn des Zellzyklus eine wichtige Rolle (siehe 1.1.3) und stellt daher einen wichtigen Angriffspunkt für zellregenerationsfördernde Substanzen dar.

Mit einem zuvor durchgeführten *High-Throughput-Screen* (siehe 1.2.3) ist nach Substanzen gesucht worden, die die Cdk2-Aktivität erhöhen, oder die Inhibierung des Cdk2-Cyclin-Komplexes durch Cdk-inhibierende Proteine teilweise aufzulösen vermögen. Als Resultat aus diesem [92] ergaben sich zwei interessante Substanzen, welche Strukturanaloga voneinander sind und in biochemischen Modellen die Cdk2-Aktivität zu steigern vermochten: Merbromin und Eosin Y. Eosin Y ist ein bekannter Farbstoff, der unter anderem auch zur Behandlung von dermatologischen Erkrankungen eingesetzt wird. Merbromin ist lange als Medikament zur Wundbehandlung eingesetzt worden. Zur Untersuchung der Zellregenerationsfähigkeit unter Behandlung mit diesen beiden Substanzen wurden zwei wichtige Mechanismen der Wundheilung überprüft. Das Migrationsverhalten einerseits und das Zellzyklusverhalten andererseits. Es wurden daher zunächst Migrationsuntersuchungen und Zellzyklusanalysen durchgeführt, und anschließend das Verhalten verschiedener Proteine des Zellzyklus untersucht. In nachfolgenden Abschnitten sollen die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und eingeordnet werden und ein Ausblick auf mögliche Untersuchungen gegeben werden, die einen weiteren Beitrag für wichtige Erkenntnisse liefern können.

4.1. Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen unter Merbromin und Eosin Y Behandlung

Merbromin wurde lange als Mittel zur Wunddesinfektion eingesetzt. Ein wichtiger Bestandteil der Wundheilung stellt die Migration dar. Die Migration von Zellen hängt von mehreren Faktoren ab. Es spielen hierbei die ECM (extrazelluläre Matrix) sowie auch intrazelluläre Vorgänge eine Rolle. [70]

Die Methode des Wundverschluss Assay ist im Vergleich zu anderen *in vitro* Methoden eine gute Methode zur Analyse der Zellmigration, da sie die Interaktion der migrierenden Zellen aufzeigt. Mit einem Wundverschluss Assay kann zudem das Migrationsverhalten von Zellen, die unterschiedlich behandelt werden mit einfachen Mitteln überprüft werden. Nicht alle Zellen besitzen die Fähigkeit zur Migration. Fibroblasten haben einerseits diese Fähigkeit und stellen andererseits ein realitätsnahes Zellsystem für die Wundheilung dar. Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden daher mit Mausfibroblasten (NIH 3T3 Zellen) durchgeführt. Andere Zellen mit der Fähigkeit zur Migration sind z.B. Immunzellen und embryonale Zellen. In dem durchgeführten Wundverschluss-Assay zeigte sich, dass der Migrationsindex von Zellen, welche mit Merbromin behandelt wurden um 50 % höher ist, als von Zellen, die mit der Trägersubstanz behandelt wurden. Eosin Y zeigte nur einen 15% höheren Migrationsindex im Vergleich zur Negativkontrolle.

Eine höhere Migrationsfähigkeit von Zellen kann durch die Ausbildung von Aktinfilamenten oder durch die verbesserte Bindung der Zellen an die ECM (extrazelluläre Matrix) verursacht werden.

Ein wichtiges Protein zur verbesserten Ausbildung von Aktinfasern stellt das RhoA Protein da. RhoA ist ein kleines GTPase Protein aus der Rho Familie, welches vor allem Funktionen in der Regulation und Koordination des Zytoskeletts übernimmt. Diese Veränderungen sind wichtige Bestandteile für die Migration. RhoA stimuliert direkt die Aktinpolymerisation durch die Veränderung der monomeren Struktur in ganze Aktinfilamente. Die *downstream targets* von RhoA, die sogenannten ROCK-Kinasen sorgen dann für die Kontraktion über Aktin und Myosin, außerdem führen sie durch die Phosphorylierung weiterer Proteine zur Regulation von Myosin und anderen Aktin bindenden Proteinen. Die Ausbildung von *stress fibers* und fokalen Adhäsionen durch eine Steigerung der RhoA-Aktivität führt zu einer Veränderung der Migrationsfähigkeit von Zellen. [79]

Wie in den vorrausgehenden Arbeiten gezeigt werden konnte, führt Merbromin zu einer Veränderung der p27 Level [92].

Besson et al. konnten zeigen, dass p27 die Migration über eine Interaktion mit RhoA beeinflusst. Das zytoplasmatische p27 scheint RhoA zu inhibieren, indem es die Bindestelle von RhoA zu seinen Bindepartnern den GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) blockiert. Zellen ohne p27 zeigten demnach eine Verschlechterung der Migrationsfähigkeit. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass unterschiedliche Zelltypen verschieden auf die Veränderung der p27 Level bezüglich ihrer Migration reagieren. [6]

Daher kann angenommen werden, dass die Veränderung der p27 Level, die durch eine Behandlung mit Merbromin oder Eosin Y verursacht wird, ebenfalls auf den RhoA *pathway* Einfluss nimmt und ggfs. hierüber eine Veränderung der Migrationsfähigkeit von Fibroblasten verursacht. Merbromin hat einen höheren Einfluss auf die p27 Veränderung demnach auch eine bessere Migrationsfähigkeit als Eosin Y. Um diese Annahmen zu verifizieren könnte der Einfluss der beiden Substanzen auf die RhoA Aktivität gemessen werden.

4.2. Analyse des Zellzyklus unter Behandlung mit Merbromin und Eosin Y

4.2.1. Untersuchung des Zellzyklus anhand der Messung des DNA-Gehalts von Zellen unter Merbromin und Eosin Y Behandlung

In vorangegangenen Experimenten aus unserer Arbeitsgruppe (Wenninger, G.; unpubliziert) hatte sich gezeigt, dass die Cdk2-Aktivität, sowohl direkt als auch indirekt über eine Verdrängung von p27, durch die Zugabe von Merbromin und Eosin Y beeinflusst werden kann (siehe 1.2.3). Mittels FRET-Assay (Försterresonanzenergietransfer) und HTRF-Assay (*Homogeneous Time Resolved Fluorescence*) wurde Merbromin als Substanz identifiziert, die eine mögliche Aufhebung der p27 und Cyclin A/Cdk2 Interaktion veranlasst. Es konnte in nachfolgenden Kinase-Assays gezeigt werden, dass Merbromin in bestimmten Konzentrationen bis zu einer zweifachen direkten Cdk2-Aktivierung führt. Eine vollständige Verdrängung des p27 konnte jedoch nicht bewiesen werden. Eosin Y zeigte im *High-Throughput-Screen* in bestimmter Dosis eine direkte Aktivierung der

Cdk2. So konnte gezeigt werden, dass bereits bestehende Aktivitäten um bis zu 40% durch die Hinzugabe von Eosin Y gesteigert werden können. [92]

Nach Überprüfung der Migrationsfähigkeit der Zellen unter Behandlung mit den Substanzen wurde im nächsten Schritt deshalb der Einfluss von Merbromin und Eosin Y *in vitro* auf den Zellzyklus mithilfe durchflusszytometrischer Analysen überprüft. Die NIH 3T3 Mausfibroblasten wurden in diesem Versuch durch Supplementfaktordeprivation in der G₀-Phase des Zellzyklus synchronisiert. Durch die Zugabe von FCS (Serum) ist diese Synchronisation reversibel. Es galt zu überprüfen, welchen Einfluss die Zugabe von den beiden Substanzen auf die synchronisierten Zellen hat. Eosin Y konnte in dieser Analyse keinen Einfluss auf den Zellzyklus zeigen, da sich der Zellzyklus der synchronisierten Zellen unter Behandlung mit Eosin Y nicht veränderte. Merbromin hingegen bewirkte bei Zellen, die durch Supplementfaktordeprivation in der G₀-Phase synchronisiert waren eine Transition der Zellen in die Synthese-Phase des Zellzyklus. Damit besitzt Merbromin die Fähigkeit, Zellen in die Replikation zu treiben. Bestimmte Dosierungen von Merbromin führen jedoch auch dazu, dass Zellen vermehrt in die Apoptose getrieben werden, was sich durch die vermehrte subG₁-Population in den mit 200 µM Merbromin behandelten Zellen in Abb. 3.8 abgrenzen lässt. Diese erhöhte Zellsterblichkeit ist kein typisches Merkmal für Zellen, die zuvor in der G₀-Phase synchronisiert worden sind, denn nach Zugabe von FCS treten die Zellen erneut eine normale Zellzyklusverteilung an. Eine subG₁-Population findet sich nur bei den Zellen die über 8 h mit 200 µM Merbromin behandelt wurden. Es zeigt sich also, dass Merbromin eine gewisse Zelltoxizität in hohen Konzentrationen aufweist, wie bereits in den Zellviabilitätsassays dargestellt worden ist.

Um in die Synthese-Phase des Zellzyklus einzutreten – so wie die Zellen unter Merbrominbehandlung – muss der erste Kontrollpunkt (G₁-Kontrollpunkt) des Zellzyklus überwunden werden. Um die Replikation vollends durchzuführen muss der intra-S-Phase Kontrollpunkt überwunden werden. Die Zellen treten in die S-Phase ein. Es zeigt sich jedoch keine vergrößerte G₂-Phase, daher ist anzunehmen, dass der G₂-Kontrollpunkt nicht überwunden wird. Über den intra-S-Phase Kontrollpunkt kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage getroffen werden. Es ist anzunehmen, dass Merbromin abgesehen von seiner Wirkung als Cdk2-Aktivator auch auf andere Proteine Einfluss nimmt, die gegebenenfalls eine wichtige Rolle in der Überwindung von Zellschäden, und in der Überwindung der Kontrollpunkte spielen. ATM und ATR

sind Kinasen, welche auf DNA-Schäden reagieren. [33] Ein inhibierender Einfluss von Merbromin auf ATM oder ATR oder deren *downstream targets* könnte zu einer Fehlfunktion der DNA-Reparatur und als Folge dessen zur Apoptose der Zellen führen. Apoptose könnte aber auch aufgrund des unphysiologischen Übergangs von der G₀-Phase in die S-Phase durch diverse andere Proteinen ausgelöst werden.

Ähnliche Auswirkungen auf die Zellzyklusprogression wie von Merbromin sind z.B. durch eine Überexpression von c-myc bekannt. So führt die Überexpression von c-myc zu einer Veränderung der Aktivität von diversen Cdk-Cyclin-Komplexen, insbesondere von Cdk4 und Cdk6 und somit zur Progression des Zellzyklus. Außerdem wird durch c-myc eine Vielzahl anderer Proteine die für die Zellzyklus-Progression mit verantwortlich sind reguliert, z.B. E2F, p27, p21, Cdc25, Cdk7. [48]

Auch spielt Cyclin E eine wichtige Rolle in der Promotion des Zellzyklus. Viele Tumore zeigen eine Überexpression von Cyclin E. Cyclin E gemeinsam im Komplex mit Cdk2 führt bekanntermaßen über dessen Kinase-Aktivität zu einer Aufhebung der Inhibierung der E2F-Komplexe und so zur Einleitung der S-Phase. Eine intakte S-Phase ist durch die einmalige Replikation der Gesamt-DNA gekennzeichnet. Dies benötigt das Aufwinden und das Trennen der DNA-Doppelstränge und anschließend den Einbau von neuen Nukleotiden um die DNA vor der Zellteilung zu duplizieren. Cyclin E *knockout* Zellen (MEF-Zellen) zeigen eine erhaltene Proliferationsfähigkeit in sich teilenden Zellen, sind aber nicht in der Lage aus der G₀-Phase in die S-Phase einzutreten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kinase-unabhängige Funktion von Cyclin E dafür verantwortlich ist. In den *knockout* Zellen zeigte sich eine Verschlechterung der Beladung des Chromatins mit MCM (*minichromosome maintenance*) Proteinen. MCM Proteine sind essentiell für das Einleiten und Aufrechterhalten der DNA-Replikation. MCM2-7 formieren eine DNA-Helikase, die gemeinsam mit anderen Faktoren für das Aufwinden der DNA verantwortlich ist, außerdem spielen sie auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Replikation. Cyclin E hat also eine Schlüsselrolle im Übergang von der G₀-Phase in die S-Phase durch dessen Einfluss auf die Initiierung der DNA-Replikation mittels MCM Proteinen.

[49][50]

Um genauere Aussagen über die Funktion von Merbromin in den Zellen treffen zu können, sollten daher analog zu den Erkenntnissen der Cyclin E und c-myc Funktionen die Expressionen und Interaktionen von Proteinen untersucht werden, welche hier oben erwähnt worden sind.

4.2.2. Untersuchung der Veränderung von Proteinmarkern des Zellzyklus unter Merbromin-Behandlung

Viele verschiedene Faktoren nehmen Einfluss auf den Zellzyklus. Die Cdk2 als wichtiges Protein für die Regulation des Zellzyklus, sowie Proteine, die diese Cdk beeinflussen, als auch die Substrate der Cyclin-abhängigen Kinasen, die Cycline. [66] Zur weiteren Analyse der Vorgänge während des Zellzyklus unter Merbromin-Behandlung wurde die Expression unterschiedlicher Proteine unter denselben Bedingungen wie bei der Zellzyklusanalyse untersucht. Hierzu wurden die Proteinlevel der Cdk2, sowie der Cdk-inhibierenden Proteine p27 und p21, sowie Cyclin A und Cyclin B zur Bestimmung der Zellzyklusphasen analysiert. Eine sowohl begrenzte Verbesserung der Migration der Zellen, sowie kein Einfluss auf den Zellzyklus bei bereits vorher synchronisierten Zellen in der G_0 -Phase von Eosin Y führte dazu, dass weitere Experimente lediglich mit Merbromin fortgeführt wurden.

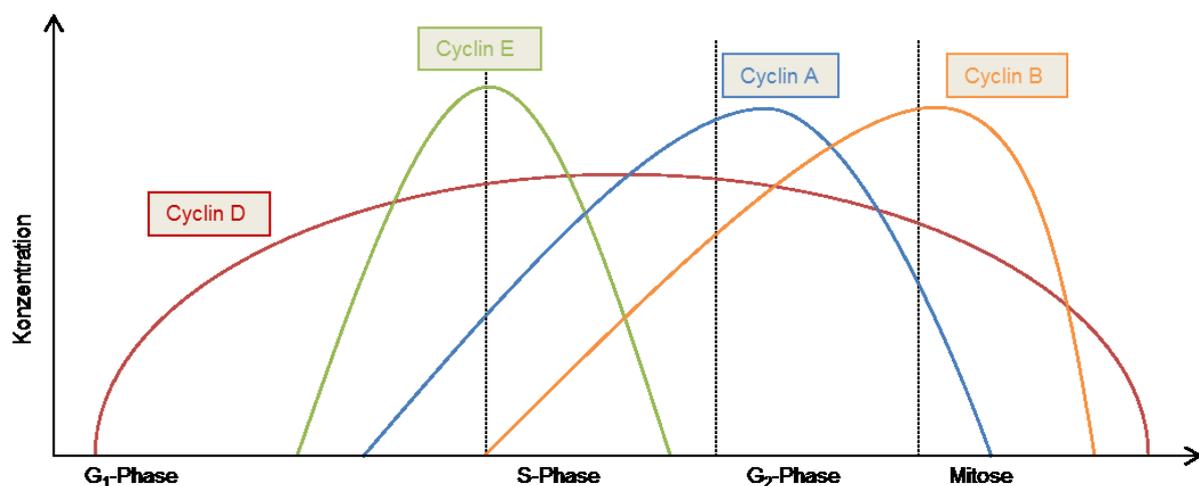


Abb. 4.1 Darstellung des phasenspezifischen Vorkommens der Cycline in ihrer oszillierenden Form. (Darstellung basierend auf [66])

Cycline weisen während des Zellzyklus ein oszillierendes Expressionsmuster auf. Die Expression kann daher zur Einordnung in die Zellzyklusphasen dienen, denn die Expression und Degradation der Cycline ist phasenspezifisch. (siehe Abb. 4.1) Cyclin A und Cyclin B sind wichtig für die Regulation des Zellzyklus, indem sie zusammen mit Cyclin-abhängigen Kinasen den Zellzyklus vorantreiben und die mitotische Teilung beeinflussen. Cyclin A und Cyclin B werden vermehrt in der späten G_2 /M-Phase exprimiert und weisen eine verringerte Expression in der G_1 / G_0 -Phase auf.

[66]

Die Cyclin B Expression beginnt in der S-Phase, steigt in der gesamten G₂-Phase an, erreicht ihr Maximum kurz nach der Mitose-Phase und wird anschließend wieder geringer. Cyclin B wird während der Mitose-Phase abgebaut und es befindet sich nahezu kein Cyclin B mehr in der Zelle während der G₁-Phase. Zellen beginnen am Ende der G₁-Phase Cyclin A zu exprimieren. Das Maximum wird in der G₂-Phase erreicht, die Degradation beginnt ebenfalls in der G₂-Phase und wird in der Mitose-Phase fortgeführt. (siehe Abb. 4.1) [18]

In der durchgeführten Western-Blot Analyse zeigt sich daher, dass in der G₀-Phase synchronisierte Zellen verringerte Cyclin A und Cyclin B Level aufweisen im Vergleich zu Zellen unter Normbedingungen. Dies sollte in dieser Analyse als Ausgangspunkt vor Behandlung mit den Substanzen dienen. Nach Behandlung mit Merbromin steigen die Cyclin A und Cyclin B Level wieder an. Dies deutet darauf hin, dass Zellen vermehrt in die G₂- und M-Phase übergehen. In dieser Analyse überwinden die Zellen die G₀-Phase, in welcher sie synchronisiert sind.

Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Zellen unter Behandlung mit Merbromin in die Apoptose gehen, was sich in der vermehrten subG₁-Population widerspiegelt. Um dies auch auf Proteinebene zu verifizieren wurden ebenfalls PARP als auch p53 zur Analyse bestimmt. Der proteolytische Abbau von PARP durch Caspase-3 ist ein Mechanismus, der eine entscheidende Rolle in der Apoptosemaschinerie spielt. [7]

Zellen, die mit Merbromin behandelt werden, zeigen eine deutlich abgrenzbare zweite Bande und somit ein apoptotisches Verhalten. Das p53 ist ein Protein, welches bei erhöhten Stressbedingungen in der Zelle oder DNA-Schäden angereichert wird und die Apoptose sowie DNA Reparaturmechanismen in den Gang setzt um die Zelle vor einer unbeherrschbaren Teilung zu schützen. [77] Äquivalent zu PARP zeigt es sich daher bei den synchronisierten Zellen bereits erhöht, bei Zellen unter Merbromin-Behandlung jedoch deutlich höher.

In der Proteinanalyse zeigt sich also, dass Zellen unter Merbromin-Behandlung aus der G₁/G₀-Phase in die S-Phase übergehen, anschließend jedoch apoptotisch sterben. Welcher molekulare Mechanismus dazu führt, ist unklar.

Zur weiteren Analyse der Beeinflussung des Zellzyklus durch Merbromin erfolgte die Bestimmung von Cdk2, p27 und p21. Die Zellen wurden mit Merbromin zur zeitlichen Analyse mit unterschiedlicher Inkubationsdauer von 1 Stunde, 2 Stunden, 4 Stunden und 8 Stunden inkubiert. Durch die Merbromin-Behandlung konnte keine

Veränderung der Cdk2-Level gezeigt werden. Der Cdk2-Inhibitor p27 hingegen, zeigte bereits nach einstündiger Behandlung mit Merbromin geringere Level, nach zweistündiger Behandlung war p27 kaum noch zu detektieren. Das p21, ebenfalls ein Cdk-Inhibitor-Protein, zeigte eine Degradation nach ca. 4 h Behandlung.

MG132 ist ein Proteasominhibitor. Die Inhibierung des Gesamt-Proteasom der Zelle führt in der Regel dazu, dass Proteine nicht mehr proteolytisch abgebaut werden können. Durch die Zugabe von MG132 sollte festgehalten werden, ob der Abbau von p27 und p21 in diesem Experiment auf proteolytische Ereignisse zurückzuführen ist.

In den Experimenten, welche zur Identifizierung von Merbromin als Cdk2-Aktivator geführt haben, konnte in *steady-state* ATPase Assays gezeigt werden, dass Merbromin das durch p27 inhibierte Cdk2-Protein partiell reaktiviert. Diese Reaktivierung führt dazu, dass das gebundene p27 an Inhibitorpotential bezogen auf die Cdk verliert. **[92]** Es ist bekannt, dass sobald ein Schwellenwert der Cdk2-Aktivität erreicht ist, das p27 durch die Cdk2 an T187 phosphoryliert werden kann. Diese Phosphorylierung führt dann über eine SCF^{Skp2} (*E3 ubiquitin ligase complex*) vermittelte Ubiquitinierung zum p27 Abbau. Über diesen Mechanismus könnte also der Abfall der p27 Level unter Merbromin-Behandlung erklärt werden. **[23]**

Auch p21 zeigt den höchsten Level üblicherweise in der G₁-Phase und nimmt kontinuierlich über die S-Phase bis hin zur G₂-Phase ab. Erst nach der Mitose steigen die p21-Expressionslevel in der Regel wieder an. Es fungiert als Inhibitor verschiedener Cdk-Cyclin Komplexe und spielt eine besondere Rolle im Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase. Insbesondere ist p21 bei ruhenden Zellen in der G₀-Phase erhöht. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Western-Blot Analyse bei der die Supplementfaktordeprivation zu einer Erhöhung der p21 Level führt. Das p21 wird ebenfalls SCF^{Skp2} vermittelt abgebaut. Dieser Abbau wird ebenfalls über eine Cdk2-Aktivitätssteigerung induziert und führt dazu, dass Zellen aus der G₀-Phase erneut in den Zellzyklus eintreten können. **[2]**

Ein Abbau von p21 könnte hier als sekundäre Folge der p27-Verdrängung mit anschließendem p27-Abbau und dem damit vermittelten Eintritt in die S-Phase erklärt werden. Das p21 wird physiologischerweise am Übergang von der G₁-Phase zur S-Phase abgebaut. Beim Auftreten von DNA-Schäden wird die Transkription von p21 jedoch durch p53 induziert und damit die Expressionslevel aufrechterhalten. Das p53

wird bei zellulärem Stress oder DNA-Schäden angereichert. Eine erhöhte p53 Expression zeigt sich bei Zellen die mit Merbromin behandelt wurden. Die p53 vermittelte p21 Stabilisierung kann dann zum Zellzyklusarrest führen, bis die Schäden ausgebessert wurden. Es ist möglich, dass dieser Effekt zu einem verspäteten Abbau von p21 im Vergleich zu p27 führt. [33]

Die sinkenden p27 und p21 Level unter Merbromin-Behandlung indizieren zudem, dass Merbromin die Zellen aus der G₀-Phase in die S-Phase bringt.

4.2.3. Untersuchung der DNA-Synthese-Fähigkeit von Zellen unter Merbromin-Behandlung

Zur Bestätigung, dass Merbromin die Zellen vermehrt in die Replikation treibt wurden Experimente durchgeführt, in denen die DNA mit BrdU markiert wurde um anschließend quantitativ eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Zellzyklusveränderungen mit erhöhten Leveln von Cyclin A und Cyclin B sowie proteolytischen Abbau von p27 und p21 auch wirklich mit einer erhöhten Teilungsfrequenz einhergehen. BrdU ist ein Thymidinanalogon und baut sich als DNA-Bestandteil in die sich teilende DNA ein. Damit soll nachgewiesen werden, ob Zellen DNA-Synthese betreiben oder nicht. Mithilfe eines BrdU-Antikörpers kann die Menge des eingebauten BrdU durchflusszytometrisch gemessen werden. [53]

Die BrdU Experimente wurden analog zu den Zellzyklus und Western-Blot Experimenten durchgeführt. Mittels BrdU kann die Synthese der Zellen gemessen werden, 7-ADD dient als Maß für den DNA-Gehalt. Es konnte in den Experimenten beobachtet werden, dass eine Synchronisation in der G₀-Phase der Zellen durch Supplementfaktordeprivation dazu führt, dass mehr Zellen mit einem DNA-Gehalt von 1N vorliegen und damit weniger Zellen in der G₂/M-Phase sind und mehr Zellen in der G₁/G₀-Phase. Die Merbromin-Behandlung führt zur vermehrten BrdU Aufnahme, was bedeutet, dass die Zellen in die Replikation und somit die Synthese-Phase eintreten. Über 60 % der Zellen nehmen im Verlauf durch die Merbromin-Behandlung BrdU auf. Jedoch schließen sich an die Progression in die S-Phase keine Zellen in der G₂-Phase mit einem doppelten DNA-Gehalt an. Es kann also angenommen werden, dass Merbromin den Zellen vermehrt über den G₁-Kontrollpunkt verhilft und die Zellen unter Merbromin-Behandlung auch in die Synthese-Phase eintreten und somit den Restriktionspunkt überwinden. Dies kann durch die BrdU Aufnahme bewiesen werden. In den Zellzyklusexperimenten zeigte

sich jedoch, dass die Zellen nach Eintritt in der S-Phase in dieser arretieren und anschließend in die Apoptose gehen. Also besitzt Merbromin die zellregenerationsfördernde Eigenschaft, dass es die Zellen zu Beginn des Zellzyklus über den Restriktionspunkt bringt, jedoch nach Eintreten der Zellen in die Synthesephase zur Apoptose führt. Dass die Zellen die S-Phase nicht überwinden, könnte darauf hindeuten, dass der intra-S-Phase Kontrollpunkt nicht überwunden werden kann. Der intra-S-Phase Kontrollpunkt wird bei DNA-Schäden aktiviert um diese vor einem Voranschreiten des Zellzyklus ausbessern zu können. DNA-Schäden von replizierenden DNA-Einzelsträngen führen zur Aktivierung von ATR und zur Aktivierung des 9-1-1 Komplexes. Die Proteine Rad9-Rad1-Hus1 werden vom Loader-Protein Rad17-RFC als trimerischer Ring auf die Stelle der DNA-Schäden geladen. Dort führen sie ebenso wie ATR zur Aktivierung von Chk1 und hierüber zu einer Verlangsamung der Replikationsprozesse und zu einer geringeren Initiierung der Replikation. **[33]** Ob DNA-Schäden während der S-Phase durch die Merbromin-Behandlung auftreten kann mithilfe der bisher durchgeführten Experimente nicht belegt werden. Es zeigt sich lediglich eine Erhöhung der p53 Expression unter Merbromin-Behandlung. Das p53 wird jedoch in der Regel durch DNA-Doppelstrangbrüche und nicht durch DNA-Einzelstrangbrüche aktiviert, sodass ein Zusammenhang zum intra-S-Phase Kontrollpunkt nicht anzunehmen ist und ein Zusammenhang zwischen Merbromin-Behandlung und DNA-Schäden während der S-Phase nicht zu beweisen ist.

Es stellt sich also die Frage, ob Merbromin zusätzlich zu seiner Funktion als Cdk2-Aktivator, ggfs. auch zu DNA-Schäden führt, welche nicht durch Kontrollpunkte repariert werden können und deshalb die Zellen apoptotisch sterben.

Spurenelemente wie Metallionen spielen häufig als Kofaktoren in verschiedenen Proteinen und Enzymen, sowie bei der Transkription eine wichtige Rolle, können aber durch ihre redoxierenden Eigenschaften auch toxische Wirkungen auf zelluläre Prozesse haben. **[25]**

Tatsächlich ist bekannt, dass anorganisches Quecksilber toxische Auswirkungen auf Nieren, Leber, Gehirn und Immunsystem hat. Welcher genaue Mechanismus dahinter stecken könnte, wurde 2017 von Yung et al. publiziert. Hier wird postuliert, dass Verbindungen mit anorganischem Quecksilber zu einer Verschlechterung der DNA-Reparaturmechanismen führen. Speziell der NER (*nucleotide excision repair*)

Reparaturmechanismus würde durch anorganisches Quecksilber verschlechtert werden. [12]

Merbromin als anorganische Quecksilber-Verbindung könnte also die Zellen in die Synthese-Phase über eine Cdk2-Aktivierung treiben, durch verschlechterte Reparaturmechanismen der DNA und eine dadurch erhöhte DNA-Schaden-Last ist es jedoch möglich, dass aufgrund von Kontrollereignissen keine Progression der S-Phase bis hin zu G₂-Phase stattfindet und daher die Zellen in die Apoptose getrieben werden. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass Merbromin über einen bisher unbekanntem Mechanismus direkten Einfluss auf bestimmte Proteine, die eine Rolle für die Kontrollereignisse spielen, hat. Es stellt sich also die Frage, welche weiteren molekularen Mechanismus das Merbromin beeinflusst und ob ggfs. das Quecksilber eine tragende Rolle spielt. Da Eosin Y ebenfalls geringe zellregenerationsfördernde Effekte hat, diese jedoch denen des Merbromin deutlich unterlegen sind, stellt sich ebenfalls die Frage, ob ein Austausch des Metalls mit einem anderen Metall eine ähnlich aktive, aber vielleicht weniger toxische Substanz zur Folge hätte.

Ob Merbromin selbst DNA-Schäden verursacht, oder einen Einfluss auf Proteinstrukturen hat, welche wichtig für die Kontrollpunkte des Zellzyklus sind, oder ob es unabhängig von den Kontrollpunkten zu einer Veränderung anderer Signale führt, die zu einer Apoptose führen, sollte weiter untersucht werden.

Zur Identifikation von Faktoren, die der zellregenerationsfördernden Eigenschaft von Merbromin entgegen wirken wurde ein Screen durchgeführt, bei dem die Expression verschiedenster Proteinstrukturen (shRNA-vermittelt) unterbunden wurde. Es sollte überprüft werden ob durch eine mögliche Inhibition bestimmter Strukturen, die Merbromin induzierte Apoptose umgangen werden kann. Der Fokus dieser Arbeit liegt darin, Merbromin als mögliche zellregenerationsfördernde Substanz zu untersuchen. Daher ist es wichtig, die Zell- oder Proteinstrukturen zu identifizieren, welche dieser Eigenschaft entgegen wirken. Die Identifikation solcher Faktoren ist wichtig, weil dadurch möglicherweise ein Kombinationspräparat etabliert werden kann, dass den gewünschten Effekt, nämlich einen S-Phase Übertritt, ermöglicht. Dadurch könnte die Toxizität verringert und der zellregenerationsfördernde Effekt von Merbromin verbessert werden.

4.3. Untersuchung der behandelten Zellen mittels shRNA-Screening

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Merbromin die Zellen vermehrt in die Synthese-Phase treibt, dass die Zellen in dieser Phase aber arretieren und Apoptose induzieren. Daher sollte überprüft werden, ob weitere mögliche Angriffspunkte der beiden Substanzen, Merbromin und Eosin Y abgesehen von der Cdk2-Aktivierung existieren, die verantwortlich für die Zelltoxizität und den S-Phase-Arrest sind. Daher wurde untersucht, welche Proteine durch ihren *knockdown* einen Überlebensvorteil für Zellen bieten, die mit toxischen Konzentrationen behandelt wurden. Um dies zu untersuchen wurde ein Screen mittels shRNA Bibliothek durchgeführt.

Eine mir30-basierte shRNA Bibliothek, welche rund 2250 shRNA enthält, wurde für die nachfolgenden Experimente verwendet. (siehe 2.1.7) Sollte der molekulare Angriffspunkt, der für oben genannte Veränderungen verantwortlich ist, durch diesen Screen gefunden werden, kann überlegt werden, ob entweder ein Austausch des Metalls oder die Hinzunahme eines möglichen Protein-Inhibitors als Kombinationstherapie zur Überwindung des S-Phase-Arrests eingesetzt werden können um Merbromin als zellregenerationsförderndes Medikament gegen diverse Erkrankungen zu verwenden, bei denen die Zellregeneration gestört ist.

4.3.1. Eosin Y Screen

Nachdem Klone des mit Eosin Y durchgeführten Screens sequenziert wurden, konnte eine Anreicherung zu ca. 67% von shRNA die das Rpl15 Gen beeinflussen bei dem Screen gezeigt werden im Vergleich zu 1% der im Pool befindlichen Rpl15 beeinflussenden shRNA. Es zeigte sich auch eine 18%ige Anreicherung der shRNA, die das FOSL2 Gen beeinflusst. So scheint die Inhibierung von insbesondere Rpl15, aber in kleinerem Maße auch von FOSL2 zu einem Überlebensvorteil der behandelten (IC₉₀ von Eosin Y) NIH 3T3 Zellen zu führen.

Das Rpl15 Gen befindet sich auf dem Chromosom 3 und besteht aus 204 Aminosäuren. Es kodiert für ein ribosomales Protein L15, das an der 60S Untereinheit der Ribosomen bindet. Dieses Protein ist im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. Es wird vermutet, dass über 80 eukaryotische ribosomale Proteine

sowohl der großen 60S, als auch der kleinen 40S Untereinheit der Ribosomen existieren. Ribosomen haben bekanntermaßen eine wichtige Rolle in der Proteinsynthese. Obwohl den ribosomalen Proteinen hauptsächlich ein Effekt in der Proteinsynthese zugesprochen wird, konnte in unterschiedlichen Arbeiten gezeigt werden, dass ribosomale Proteine auch an regulatorischen Prozessen der Zelle mitwirken und unter anderem eine Überexpression bestimmter Gene von ribosomalen Proteinen bei einigen Tumoren zu beobachten ist. **[91]** So zum Beispiel bei Speiseröhren- und Magenkrebs, als auch Darmkrebs und Bauchspeicheldrüsentumoren. **[29] [95]** Eine verringerte Rpl-15 Expression führte bei Bauchspeicheldrüsentumoren zur Tumorprogression sowie erhöhter Invasivität der Tumore. **[95]** Wenn eine verringerte Rpl15 Expression zu einer verstärkten Proliferation führen kann, so kann angenommen werden, dass ein Rpl15 knockdown in unserem Screen möglicherweise zum Überlebensvorteil der Zellen führte.

Die shRNA, die gegen das FOSL2 Gen gerichtet ist, war in dem Eosin Y-Screen zu 18 % angereichert. Die FOS- Genfamilie besteht aus vier Genen: FOS, FOSB, FOSL1 und FOSL2. Diese Gene kodieren für Leucin-Zipper-Proteine. Leucin-Zipper Proteine stellen ein strukturelles Motiv von Proteinen dar, welches durch das repetitive Auftreten von Leucin-haltigen Sequenzen charakterisiert ist. Leucin-Zipper dienen als Transkriptionsfaktoren in dimerer Form. Die einzelnen Monomere bestehen jeweils aus einer Leucin-Zipper Sequenz, welche für die Dimerisierung verantwortlich ist und einer Sequenz, welche die DNA mit hoher Affinität erkennt und bindet und somit für Expression von bestimmten Zielgenen verantwortlich ist. **[14]**

Das Fosl2 (Fos-related antigen 2) gehört zu der AP-1 Familie (activator protein-1) der Transkriptionsfaktoren und ist für die Regulierung verschiedener Gene und Prozesse verantwortlich, wie z.B. Tumore, pulmonale Fibrose und die Knochenentwicklung. **[67] [16]** Auch konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte FOSL2 Expression mit erhöhter Invasivität von Brustkrebs zusammenhängt. **[75]** Initial wurde es als kanzerogenes Gen für Hühnerfibroblasten (CEF-Zellen) identifiziert. **[57]** In einer aktuellen Arbeit wird die zum FOSL2-Gen korrespondierende mRNA als target der mir-597 (microRNA) postuliert, deren Überexpression sowohl die Migration, Proliferation als auch Invasion von Brustkrebszellen hemmt. **[26]**

Aufgrund der hohen Anreicherung der shRNA gegen sowohl Rpl15 als auch FOSL2, ist zu untersuchen, ob diese beiden Gene wichtige weitere Angriffspunkte für Zellen, die mit Eosin Y und auch mit dem Struktur analogon Merbromin behandelt werden, sein könnten.

4.3.2. Merbromin-Screen

Es wurden zwei Screens mit Merbromin durchgeführt. Da Merbromin toxischer ist als Eosin Y, zeigten sich hierbei weniger überlebende Zellen und somit weniger Klone. Insgesamt zeigt sich bei den Ergebnissen der Merbromin-Screens eine homogenere Verteilung der shRNAs, die in den Klonen gefunden werden konnten. Im direkten Vergleich beider Screens waren bei den jeweils 10 häufigsten shRNA jedoch keine Übereinstimmungen zu finden, sodass weitere Analysen der Ergebnisse durchgeführt wurden und die Ergebnisse beider Screens miteinander verglichen wurden. Hierbei fanden sich insgesamt 70 shRNA, die gegen verschiedene Gene gerichtet sind. (siehe Abb. 3.19).

Bei genauerer Betrachtung dieser shRNA, wurden 10 Gene aufgrund der Höhe ihrer shRNA Anreicherung, ihres doppelten Vorkommens oder ihrer korrespondierenden Proteinaufgabe ausgesucht. Diese shRNA, waren mindestens um das zweifache in beiden Merbromin-Screens angereichert und wurden in Tab. 3.1 aufgelistet. Im nachfolgenden erfolgt eine kurze Charakterisierung der genannten Gentreffer mit einer anschließenden Diskussion über die mögliche Relevanz.

Abcg1-Gen: Das Gen ABCG1 kodiert für ein Protein aus der Familie der ABC-Transporter. Abcg1 steht in diesem Fall für „ATP-binding cassette aus der *subfamily G member 1*“. ABC-Transporter transportieren verschiedene Moleküle nach intra- und extrazellulär. Dieses Protein ist unter anderem für den Transport von Makrophagen, Cholesterin und Phospholipiden verantwortlich. [72]

Ches1(=FOXN3)-Gen: Das FOXN3-Gen kodiert für das Forkhead box protein N3. Die Expression des checkpoint suppressor 1 (CHES1, auch bekannt als FOXN3) ist in vielen unterschiedlichen Tumoren reduziert. Er führt unter anderem zur Reduktion von Proteinsynthese in Tumorzellen. [30] Es wurde publiziert, dass FOXN3 die

Zellproliferation über die Verringerung der Expression von E2F5 in Leberkrebs inhibiert. **[82]**

Csf2-Gen: Das Csf2-Gen assoziierte Colony stimulating factor 2-Protein auch bekannt als GM-CSF Protein ist für die Proliferation und Differenzierung von verschiedenen Granulozyten und Monozyten insbesondere Makrophagen und Eosinophile verantwortlich. Das Zytokin arbeitet über die Transkriptionsfaktoren STAT3/ STAT5. **[42]**

Dnmt2-Gen: Dieses Gen kodiert für eine tRNA-Methyltransferase, die speziell für die Methylierung von Cytosin in tRNA verbunden mit Aspartat, Valin und Glycin: tRNAAsp(GTC), tRNAVal(AAC) and tRNAGly(GCC) verantwortlich ist. **[22]**

Map2k7-Gen: Die MKK7 (=Proteinprodukt des Map2k7-Gens), welche für eine mitogen-aktivierte kinase kinase 7 steht, fungiert zusammen mit der MKK4 als *upstream* Signal der JNK-Familie und ist auf diese Weise in verschiedene Prozesse, wie z.B. Proliferation, Differentiation, Apoptose und Tumorentstehung beteiligt. **[39]**

Nr2c1-Gen: Der *testicular receptor 2* (TR2) ist das Protein, für welches das Nr2c1-Gen kodiert. Er ist Teil der Nuklearrezeptoren und fungiert als Transkriptionsfaktor. Dieser interagiert bekannter Weise mit Klasse I und Klasse II Histon-Deacytelasen. **[21]**

Psen2-Gen: Dieses Gen kodiert für das sogenannte Presenelin 2 Protein, welches ein Bestandteil von Gamma-Sekretasen ist. Bei Patienten mit Alzheimer sind häufig Mutationen in Presenelin und APP-Proteinen beschrieben. Gamma-Sekretasen sind integrale Membranproteine, die innerhalb der Transmembrandomäne ihre Proteasewirkung entfalten. Es wird auch beschrieben, dass Gamma-Sekretasen an der Abspaltung von Notch-Rezeptoren verantwortlich sind. **[94]**

Skp2-Gen: Das Skp2-Gen kodiert für das S-Phase-Kinase associated protein 2. Skp2 ist die Substrat-rekrutierende Komponente, des SCFSkp2-Komplexes. Das Ubiquitin-Proteasom erkennt und baut Proteine ab, die zuvor durch die Aktivität von drei Enzymen markiert wurden. E1 (ubiquitin aktivierendes Enzym), E2 (ubiquitin konjugierendes Enzym) und E3 (ubiquitin Ligase). Die Ligase interagiert mit dem Zielsubstrat. Skp2 erkennt p27 und p21 und baut diese über den SCF-Ubiquitin-Ligase Komplex ab. Skp2 fungiert als Onkogen. So kann eine Überexpression in vielen verschiedenen Tumorarten beobachtet werden. **[86]**

Tyk2-Gen: Das Tyk2-Gen kodiert für eine Anzahl an Tyrosinkinase, den sogenannten Januskinase. Diese sind in der Phosphorylierung von IFN-alpha und IFN-beta Rezeptoren involviert und beeinflussen somit den IFN-gamma signaling pathway. **[80]**

Ube2b-Gen: Das Ube2b-Gen (auch HR6B) kodiert für eine Anzahl von Proteinen aus den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen E2 und ist für die postreplikative Reparatur von DNA-Schaden verantwortlich. **[51]**

Anhand dieser Genprofile kann festgehalten werden, dass all diese Gene in wichtige Prozesse für den Zellzyklus, z.B. Proteintranslation, Proteolyse, Differenzierung sowie Zellzyklusprogression involviert sind. Ein besonderes Interesse gilt hierbei folgenden Genen:

Das Skp2-Gen kodiert für das Skp2 in der E3 SCF^{Skp2}-Ubiquitin-Ligase, was einen wichtigen Abbaukomplex von p27 und p21 darstellt. Wenn p21 und p27 nicht mehr abgebaut werden können, hätte dies eigentlich zur Folge, dass der Zellzyklus arretiert und sich dadurch weniger Zellen teilen. In diesem Fall führte die Erhöhung der p27 und p21 Level jedoch zu einem Überlebensvorteil. Merbromin führte abgesehen von seiner Wirkung als direkter Cdk2-Aktivator auch zur teilweisen Aufhebung der Inhibierung von Cdk2 durch p27. Wenn Merbromin p27 aus der Cdk2 Bindung herausdrängt, wird das freie p27 für den Abbau durch die E3 SCF^{Skp2}-Ubiquitin-Ligase erleichtert zugänglich. Das Verhindern dieses Abbaus scheint die Apoptose der Zellen zu verhindern. Welche Rolle spielt das freie p27 in der Zelle?

Das p27 muss in der Regel initial an Tyrosin 88 (Y88) phosphoryliert werden, hierdurch verliert es seine Bindefähigkeit und Inhibitorfähigkeit zu Cdk2 und kann von Cdk2 an Threonin 187 phosphoryliert werden um von der SCF^{Skp2}-Ubiquitin-Ligase erkannt und abgebaut zu werden. Erst wenn die Cdks nach der Mitose inaktiviert werden, kann p27 in der Regel wieder akkumulieren. **[23]** Eine Phosphorylierung von p27 an Threonin 157 und 198 durch PKB/Akt Kinasen führt dazu, dass p27 eine Komplexbildung von Cyclin D mit Cdk4 und Cdk6 fördern kann, denn im Gegensatz zu anderen Cyclin/Cdk Paaren bindet das Cyclin D nicht spontan an seine zugehörigen Cdks. **[83]** Bekanntermaßen führt eine p27 Stabilisierung zur einer Verzögerung der Zellzyklusprogression. **[81]** Führen erhöhte p27 Level vielleicht zu einer Verlängerung der G₁-Phase? Wirkt diese Verlängerung sich gegebenenfalls positiv auf mögliche nicht physiologische Veränderungen aus, die durch die zusätzliche Zeit in der G_{1/0}-Phase angegangen werden können? Kann hierdurch die Apoptose verhindert werden? Diese Möglichkeit könnte leicht durch Experimente untersucht werden, durch die die Länge der einzelnen Zellphasen unter Merbromin-Behandlung gemessen werden kann. Zu erreichen ist dies durch fluoreszierende Biomarker, die sich Zellphasenspezifisch verändern während einer zeitlichen mikroskopischen Aufnahme (*time lapse-imaging*).

Es besteht auch die Möglichkeit, dass Merbromin den nukleären Export von p27 fördert. Durch eine Phosphorylierung an Serin 10 kann das p27 von CRM1 in das Zytosol abtransportiert werden, wo es keine nukleären Wirkungen mehr haben kann. **[32]** Ein verminderter Abbau durch die Inhibierung von SCF^{Skp2} führt dann dazu, dass aufgrund eines p27 Überangebots wieder mehr p27 im Nukleus vorliegt, und daher die Zellzyklusmaschinerie weiter funktionieren kann. Genannte Überlegungen könnten verifiziert werden, indem die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände von p27 unter Merbromin-Einfluss untersucht werden.

Das HR6B Protein (Ube2b-Gen) spielt eine wichtige Rolle in der postreplikativen Reparatur von DNA-Schäden. Ein S-Phase-Arrest, so wie Merbromin ihn bei den behandelten Zellen bewirkt, wird durch einen unreparierten DNA-Schaden hervorgerufen und üblicherweise durch die postreplikativen Reparaturmechanismen überwunden. HR6B ist ein homologes Gen beim Säugetier zum Rad6-Gen. Das HR6B akzeptiert das Ubiquitin vom E1-Komplex und katalysiert die Bindung an diverse Proteine. Zusammen mit der E3-Ligase BRE1 spielt es eine wichtige Rolle in

der Regulation der Transkription durch eine Monoubiquitinierung von Histon H2B. Mit der E3-Ligase Rad18 bildet es einen Komplex, der das PCNA Protein ubiquitiniert. **[51]** Das PCNA Protein ist bekanntermaßen ein Protein, das während der DNA-Replikation die DNA wie einen Ring umschließt und die schnelle und ungestörte DNA-Replikation fördert, indem die DNA-Polymerasen daran binden können. Wird das PCNA abgebaut, erfolgt ein sofortiger Replikationsstopp. So stellt das Protein zum HR6B Gen einen wichtigen Kontrollpunkt während der DNA-Replikation dar. Es scheint einleuchtend, dass ein Ausfall dieses Proteins den S-Phase-Arrest, den Merbromin verursacht, wieder aufzuheben vermag. Nachfolgend an diese Arbeit sollte daher der Einfluss von Merbromin auf das HR6B Protein untersucht werden.

Wie bereits erwähnt, konnte ein *High-Throughput-Screen* von Ibanez et al. **[31]** zeigen, dass Merbromin ebenfalls als Pan-Inhibitor von verschiedenen Protein-Methyltransferasen wirksam ist. Das Dnmt2-Gen kodiert für eine tRNA-Methyltransferase. Inwiefern der knockdown von Dnmt2 zu einem Überlebensvorteil für durch Merbromin sterbende Zellen führen kann, sollte weiter untersucht werden.

Forkhead-Box Proteine sind Proteine, die sich an bestimmte Stellen der DNA heften und so die Transkription verschiedener Gene beeinflussen. Es ist bekannt, dass CHES1 (FOXN3) in vielen Tumorzellen verringert exprimiert wird. Als Transkriptionsfaktor fungiert es hauptsächlich als Gen-Inhibitor. Es konnte gezeigt werden, dass das Tumorstadium durch das CHES1-Gen inhibiert werden konnte. **[30]** Das FOXN3 Protein wurde ebenfalls als CHES1 (checkpoint suppressor 1) bezeichnet, da ihm eine Funktion als Regulator des G₂-Kontrollpunktes nachgesagt wird. Es bewirkte eine Rekonstitution des G₂-Kontrollpunktes durch seine Expression. **[61]** Es ist daher verständlich, dass durch den *knockdown* von CHES1, die mit Merbromin behandelten Zellen einen Überlebensvorteil aufweisen könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Effekt von Merbromin als zellregenerationsfördernde Substanz dahingehend gezeigt werden konnte, als das Merbromin zu einer Promotion der G₁/S-Transition *in vitro* führt. Allerdings zeigt Merbromin ein zelltoxisches Verhalten mit einem S-Phase-Arrest. Dieser Screen liefert mögliche Angriffspunkte an Genen und korrespondierenden Proteinen, die dieser Toxizität zugrunde liegen könnten. Die hier aufgeführten Gene sollten weiter

untersucht werden. Mögliche weitere Versuche, die an die bisherige Arbeit angrenzend Aufschluss über die Gentreffer geben können habe ich im Folgenden erläutert.

Zu allererst sollten die Treffer verifiziert werden, indem z.B. die Zellen erneut mit den einzelnen shRNA infiziert werden. Nach der Selektion von Zellen, die die shRNA aufgenommen haben, sollte über eine Proteinanalyse (z.B: western-blot Methode) der *knockdown* des betroffenen Proteins detektiert werden. Sollten die Zellen durch ihren shRNA-*knockdown* wirklich ihre korrespondierende Proteinexpression verlieren, sollten mit den einzelnen hergestellten Zelllinien die Versuche wiederholt werden, die bisher in Mausfibroblasten zu einer Promotion der G₁-S-Transition geführt haben. So sollten erneut Zellzyklusanalysen und die Quantifizierung der DNA-Synthese durch BrdU untersucht werden. Wenn die BrdU Analyse dieser Zelllinien (mit einzelnen shRNA infiziert) zu keinem Arrest des BrdU Signals in der S-Phase führen, kann davon ausgegangen werden, dass der gesuchte Angriffspunkt gefunden werden konnte. Da Eosin Y und Merbromin Strukturanalogon voneinander sind, sollten auch die Gentreffer aus den Eosin Y-Screen weiter verifiziert und untersucht werden. Anschließend kann durch eine Kombinationstherapie aus möglichen Protein-Inhibitoren gemeinsam mit Merbromin getestet werden, ob verschiedene Erkrankungen, bei denen die Zellregeneration gestört ist von einer Therapie *in vivo* profitieren könnten.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit galt es Merbromin und Eosin Y als potenzielle zellregenerationsfördernde Substanzen zu überprüfen. In einem zuvor durchgeführten *High-Throughput-Screen* konnten Eosin Y und Merbromin als Cdk2-Aktivatoren identifiziert werden. Merbromin und Eosin Y sind Strukturanalogon voneinander und unterscheiden sich nur darin, dass Merbromin quecksilberhaltig ist. Cdk2 spielt eine wichtige Rolle für das Voranschreiten des Zellzyklus und somit für die Zellteilung. Es ist also anzunehmen, dass Cdk2-Aktivatoren einen positiven Einfluss auf die Zellregeneration haben. Um diese Annahme zu überprüfen wurden *in vitro* Versuche durchgeführt. In Wundverschluss-Assays wurde das Verhalten bezüglich der Migration von Zellen unter Einfluss von Merbromin und Eosin Y

untersucht. Im Vergleich zur Trägersubstanz zeigte sich bei Merbromin ein effektiver Wundverschluss durch sich schneller annähernde Wundränder. Eosin Y zeigte keinen signifikanten Unterschied. Um zeigen zu können, ob durch die Cdk2-Aktivierung die Zellen tatsächlich einen beschleunigten Zellzyklus haben, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Die Zellen wurden in der G_0 -Phase synchronisiert und dann wurde Merbromin bzw. Eosin Y appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass synchronisierte Zellen allein durch die Hinzugabe von Merbromin erneut in den Zellzyklus eintreten konnten. Dies zeigte sich in Form von Zellen die vermehrt in die S-Phase des Zellzyklus übergangen. Bei Eosin Y konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Um dieses Experiment mit Merbromin zu bestätigen und weiter quantitativ zu analysieren wurden BrdU-Assays durchgeführt. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und wird bei sich teilenden Zellen in die DNA eingebaut, sodass durch die Detektion von BrdU quantitativ die Synthese der Zellen dargestellt werden kann. Aus Abb. 3.12 ist ersichtlich, dass nur 6% der Zellen die 24 Stunden unter Supplementfaktordeprivation stehen und in der G_0 -Phase synchronisiert sind BrdU aufnehmen. Wohingegen eine 8-stündige Hinzugabe von Merbromin dazu führt, dass im Durchschnitt 58% der Zellen das BrdU aufnehmen. Durch Merbromin kann also die Synthese-Rate von ruhenden Zellen auf das zehnfache gesteigert werden. Nach der Behandlung mit Merbromin gehen die Zellen zwar in die S-Phase über, es zeigt sich jedoch, dass hier der Zellzyklus arretiert und die Zellen sterben. Um einen Aufschluss über weitere Mechanismen des Zellzyklus zu erhalten, wurden Proteinexpressionsanalysen mittels Western-Blotting durchgeführt. Hierbei wurden bei synchronisierten Zellen mit und ohne Merbrominzugabe verschiedene Zellzyklus-Proteine untersucht. Cycline weisen ein phasenspezifisches Auftreten auf, sodass anhand ihrer Expression Veränderungen der Zellzyklus-Phasen aufgezeigt werden können. So zeigten sich nach Hinzugabe von Merbromin die bei synchronisierten Zellen in der G_0 -Phase erniedrigten Cyclin A und Cyclin B1-Level wieder erhöht, was auf einen Phasenwechsel hindeutet. Aus Abb. 4.1 ist ersichtlich, dass Cyclin B und Cyclin A erst in späteren Phasen (S-Phase, G_2 -Phase) vorkommen. Zellen unter Merbromin-Behandlung betreiben aber auch Apoptose, zu erkennen an dem PARP Abbau (zweite Bande) und den erhöhten p53-Leveln. Die Cdk-Inhibitor-Proteine p27 und p21 wurden ebenfalls analysiert. Durch die Hinzugabe von Merbromin zeigt sich ein proteolytischer Abbau von p27 und p21.

Der proteolytische Abbau von p21 tritt jedoch zu einem späteren Zeitpunkt ein. Auch die Abnahme von p21 und p27 bei synchronisierten Zellen nach Hinzugabe von Merbromin bei gleichbleibenden Cdk2 Leveln deuten auf Zellprozesse hin, die dazu führen, dass die Zellen in die S-Phase übergehen.

Zusammenfassen konnte also gezeigt werden, dass Merbromin als Cdk2-Aktivator dazu führt, dass Mausfibroblasten unter Merbromin-Behandlung vermehrt eine G₁-S-Promotion vollziehen, dann aber in der S-Phase arretieren und sterben. Bei Eosin Y konnte dieser Effekt *in vitro* nicht gezeigt werden.

Um zu untersuchen welche molekularen Mechanismen eine Rolle für die Toxizität bzw. den S-Phase-Arrest spielen wurde ein shRNA-Screen durchgeführt, bei dem nach denjenigen shRNA gesucht wurde, die durch den entsprechenden *knockdown* des Proteinprodukts zu einem Überlebensvorteil der Zellen führen. Dieser Screen wurde ebenfalls mit Eosin Y durchgeführt.

Die Ergebnisse des Screens umfassen Gene, die für die Proliferation und Differenzierung von Zellen verantwortlich sind, sowie Gene welche die Ubiquitinierung betreffen, als auch Gene die für die Kontrollpunkte des Zellzyklus wichtig sind. Weitere Analysen bezogen auf diese Ergebnisse sollten in Zukunft durchgeführt werden. Auch sollte nach weiteren weniger toxischen metallhaltigen Strukturanaloga gesucht werden, die ähnliche zelluläre Effekte aufweisen, denn in Zukunft könnten zellregenerationsfördernde Substanzen Ansatzpunkte für die klinische Anwendung bei verschiedensten Erkrankungen sein, die durch eine gestörte Zellregeneration hervorgerufen werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Zellzyklus. Mit Darstellung der jeweiligen Cyclin-Cdk Komplexe..	15
Abb. 1.2 G ₁ und G ₂ Kontrollpunkte mit korrespondierenden Proteinen...	19
Abb. 1.3 Struktur von Merbromin.....	25
Abb. 1.4 Struktur von Eosin Y.....	27
Abb. 2.1 Anordnung des Membran-Gel-Konstruktes in der Blot-Kammer.	47
Abb. 2.2 Durchführung des shRNA Cancer 1000 Screen.....	50
Abb. 3.1 Berechnung der Verdopplungszeit von NIH 3T3 Zellen..	53
Abb. 3.2 Bestimmung der Toxizität von Merbromin in NIH 3T3 Zellen..	54
Abb. 3.3 Bestimmung der Toxizität von Eosin Y in NIH 3T3 Zellen..	55
Abb. 3.4 Merbromin induziert den Wundverschluss von NIH 3T3 Zellen.....	57
Abb. 3.5 Merbromin induziert einen effektiven Wundverschluss von NIH 3T3 Zellen.	58
Abb. 3.6 Schematische Darstellung der Zellzyklusverteilung von NIH 3T3 Zellen unter Standardbedingungen.	60
Abb. 3.7 Eosin Y zeigt keinen Effekt bezüglich G ₁ /S Transition bei NIH 3T3 Zellen..61	
Abb. 3.8 Merbromin induziert die G ₁ /S Transition von synchronisierten NIH 3T3 Zellen.....	63
Abb. 3.9 Die durch Merbromin induzierte G ₁ /S-Transition führt zu Zellsterben.	65
Abb. 3.10 Merbromin führt zum proteolytischen Abbau von p27 und verzögerten p21 Abbau bei gleichbleibenden CDk2 Leveln..	67

Abb. 3.11 Schematische Darstellung des BrdU-Verteilungsmuster von NIH 3T3 Zellen unter Standardbedingungen..	69
Abb. 3.12 Merbromin induziert die Replikation synchronisierter NIH 3T3 Zellen.	70
Abb. 3.13 Kinetische Analyse der BrdU-aufnehmenden NIH 3T3 Zellen, die mit Merbromin behandelt wurden..	72
Abb. 3.14 Transduktionseffizienz bei dem shRNA Screen mit der Cancer 1000 Bibliothek.....	75
Abb. 3.15 Ergebnisse des shRNA Screens mit Eosin Y auf NIH 3T3 Zellen.	76
Abb. 3.16 Ergebnisse des shRNA Screens mit Merbromin auf NIH 3T3 Zellen in zwei Versuchen..	77
Abb. 3.17 Auflistung der gefundenen Gene zu den shRNA des Merbromin Screen 1 mit einer mehr als zweifachen Anreicherung und die Anreicherung der korrespondierenden Gene zu den shRNA im Merbromin Screen 2.....	78
Abb. 3.18 Auflistung der gefundenen Gene zu den shRNA des Merbromin Screen 2 mit einer mehr als zweifachen Anreicherung und die Anreicherung der korrespondierenden Gene zu den shRNA im Merbromin Screen 1.....	79
Abb. 3.19 Vergleich von Merbromin Screen 1 und Merbromin Screen 2.....	80
Abb. 4.1 Darstellung des phasenspezifischen Vorkommens der Cycline in ihrer oszillierenden Form.	87

7. Literaturverzeichnis

1. **[Barnum & O'Connell, 2016]** Barnum KJ¹, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Molecular Biology*. 2014; Seite 29-40.
2. **[Barr et al., 2017]** Barr, Alexis R.; Cooper, Samuel; Heldt, Frank S.; Butera, Francesca; Stoy, Henriette; Mansfeld, Jörg; Novák, Béla; Bakal, Chris. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nature Communications*, 2017.
3. **[Ben-Porath I et al. 2005]** Ben-Porath I Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 961–976. 2005.
4. **[Berthet C et al., 2003]** Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2- knockout mice are viable. *Current Biology*, October 2003.
5. **[Bertoli C et al., 2013]** Bertoli C¹, Skotheim JM, de Bruin RA. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Aug.
6. **[Besson A et al., 2004]** Arnaud Besson,¹ Mark Gurian-West,¹ Anja Schmidt,² Alan Hall,² and James M. Roberts^{1,3}. p27^{Kip1} modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*, April 2004.
7. **[Boulares, Yakovlev et al., 1999]** A. Boulares, A. Yakovlev, V. Ivanova. Role of PARP cleavage in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, Aug 1999.
8. **[Bradford, 1976]** M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, vol. 72, pages 248–254, May 1976.
9. **[Bric A. et al., 2009]** Anka Bric,^{1,*} Cornelius Miething,^{1,*} Carl Uli Bialucha,^{1,*} Claudio Scoppo,^{1,4} Lars Zender,¹ Alexander Krasnitz,¹ Zhenyu Xuan,¹ Johannes Zuber,¹ Michael Wigler,¹ James Hicks,¹ Richard W. McCombie,¹ Michael T. Hemann,³ Gregory J. Hannon,^{1,2} Scott Powers,¹ and Scott W. Lowe^{1,2,5} Functional Identification of Tumor Suppressor Genes Through an *in vivo* RNA Interference Screen in a Mouse Lymphoma Model. *Cancer Cell*, 2009.

10. **[Brockhoff et al., 2007]** Brockhoff G. DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel, Karger, 2007; 604-646
11. **[Carrano et al., 1999]** Carrano AC¹, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biology*, 1999.
12. **[Chang Y et al., 2017]** Chang Y¹, Lee WY¹, Lin YJ¹, Hsu T². Mercury (II) impairs nucleotide excision repair (NER) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos by targeting primarily at the stage of DNA incision.
13. **[Chun-Chi L et al., 2007]** Chun-Chi Liang¹, Ann Y Park¹ & Jun-Lin Guan¹. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2, 2007.
14. **[Cukier RI, 2014]** Cukier RI. Simulations of potentials of mean force for separating a leucine zipper dimer and the basic region of a basic region leucine zipper dimer. *J Phys Chem B*. 2014 Sep.
15. **[Dai L et al., 2013]** Dai L¹, Liu Y, Liu J, Wen X, Xu Z, Wang Z, Sun H, Tang S, Maguire AR, Quan J, Zhang H, Ye T. A novel cyclinE/cyclinA-CDK inhibitor targets p27(Kip1) degradation, cell cycle progression and cell survival: implications in cancer therapy. *Cancer Lett*. Jun. 2013.
16. **[Davies JS et al., 2011]** Davies JS¹, Klein DC, Carter DA. Selective genomic targeting by FRA-2/FOSL2 transcription factor: regulation of the Rgs4 gene is mediated by a variant activator protein 1 (AP-1) promoter sequence/CREB-binding protein (CBP) mechanism. *J. Biol. Chem*. 2011.
17. **[Davis HE et al., 2004]** Davis HE¹, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys. Journal*, Feb, 2004.
18. **[Demetrick DJ et al, 1994]** Demetrick DJ. Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenet. Cell Genet*. 1994

19. **[Eguren M et al., 2011]** M. Eguren, E. Manchado, M. Malumbres Non-mitotic functions of the Anaphase-Promoting Complex. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 22 (2011)
20. **[Evans et al., 1983]** T. Evans, E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, vol. 33, no. 2, pages 389–396, Jun 1983.
21. **[Franco PJ, 2001]** Franco PJ, Farooqui M, Seto E, Wei LN (Aug 2001). "The orphan nuclear receptor TR2 interacts directly with both class I and class II histone deacetylases". *Molecular Endocrinology* 2001.
22. **[Goll MG et al., 2006]** Goll MG¹, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 2006, Jan.
23. **[Grimmler M et al., 2007]** Grimmler M¹, Wang Y, Mund T, Cilensek Z, Keidel EM, Waddell MB, Jäkel H, Kullmann M, Kriwacki RW, Hengst L. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell* 2007.
24. **[Hari DP & König B, 2014]** Hari DP¹, König B. Synthetic applications of **eosin Y** in photoredox catalysis. *Chem Commun (Camb)*. 2014 Jun.
25. **[Hartwig A., 2013]** Hartwig A. Metal interaction with redox regulation: an integrating concept in metal carcinogenesis? *Free Radic Biol Med*. 2013, Feb.
26. **[He J et al., 2017]** He J¹, Mai J², Li Y³, Chen L⁴, Xu H⁴, Zhu X¹, Pan Q². miR-597 inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion through FOSL2. *Oncol. Rep*. May 2017.
27. **[Hint SS et al., 2015]** Hint SS¹, Xie C¹, Yao M², Holst J³, Bensoussan A⁴, De Souza P⁵, Li Z⁶, Dong Q⁷. p27(Kip1) signaling: Transcriptional and post-translational regulation.
28. **[Houck DW et al., 1985]** Houck DW, Loken MR. Simultaneous analysis of cell surface antigens, bromodeoxyuridine incorporation and DNA content. *Cytometry*. 1985;6:531-538.

29. **[Hsu et al., 2011]** Hsu YA, Lin HJ, Sheu JJ, Shieh FK, Chen SY, Lai CH, Tsai FJ, Wan L, Chen BH. A novel interaction between interferon-inducible protein p56 and ribosomal protein L15 in gastric cancer cells. *DNA Cell Biol.* 2011.
30. **[Huot G et al., 2014]** Geneviève Huot,* Mathieu Vernier,* Véronique Bourdeau, Laurent Doucet, Emmanuelle Saint-Germain, Marie-France Gaumont-Leclerc, Alejandro Moro, and Gerardo Ferbeyre¹ CHES1/FOXN3 regulates cell proliferation by repressing PIM2 and protein biosynthesis. *Mol. Biology Cell.* Mar 2014.
31. **[Ibáñez et al., 2012]** Glorymar Ibáñez, David Shum, Gil Blum, Bhavneet Bhinder, Constantin, Radu, Christophe Antczak, Minkui Luo and Hakim Djaballah. A High Throughput Scintillation Proximity Imaging Assay for Protein Methyltransferases. *Comb Chem High Throughput Screen*, Jan 2012.
32. **[Ishida N et al., 2002]** Ishida N, Hara T, Kamura T, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI (April 2002). "Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export". *J. Biol. Chem.* April 2002.
33. **[Iyer et Rhind, 2017]** Divya Ramalingam Iyer* and Nicholas Rhind. The Intra-S Checkpoint Responses to DNA Damage. *Genes (Basel)*, Feb 2017.
34. **[Jagan M et al., 2004]** Jagan Muppidi¹, Melissa Porter¹, Richard M. Siegel¹ Measurement of Apoptosis and Other Forms of Cell Death. *Current Protocols in Immunology*, May 2004.
35. **[John R et al., 2001]** John R. Gilbert¹, Jeffrey M. Vance¹ Isolation of Genomic DNA from Mammalian Cells. *Current Protocols in Human Genetics*, May 2001.
36. **[Karimian A et al., 2016]** Karimian A¹, Ahmadi Y², Yousefi B³ Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst.)* 2016.
37. **[Korinek V et al., 1998]** V. Korinek, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* 1998.

38. **[Kossatz U et al., 2004]** Kossatz U¹, Vervoorts J, Nickeleit I, Sundberg HA, Arthur JS, Manns MP, Malek NP. C-terminal phosphorylation controls the stability and function of p27kip1. *EMBO J.* 2006 Nov.
39. **[Kragelj J et al., 2015]** Kragelj J¹, Palencia A², Nanao MH², Maurin D¹, Bouvignies G¹, Blackledge M³, Jensen MR³. Structure and dynamics of the MKK7-JNK signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar.
40. **[Lakhanpal S. et al., 1987]** Lakhanpal S, Gonchoroff NJ, Katzmann JA, Handwerger BS. A flow cytofluorometric double staining technique for simultaneous determination of human mononuclear cell surface phenotype and cell cycle phase. *J Immunol Meth.* 1987;96:35-40.
41. **[Le Cam, L. et al., 1999]** L. Le Cam et al. Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex. *The EMBO Journal.* Vol.18 No.7, 1878-1890. 1999.
42. **[Lee YY et al., 2016]** Lee YY¹, Wu WJ², Huang CN³, Li CC², Li WM³, Yeh BW³, Liang PI⁴, Wu TF⁵, Li CF⁶. CSF2 Overexpression Is Associated with STAT5 Phosphorylation and Poor Prognosis in Patients with Urothelial Carcinoma. *J Cancer* 2016, Mar.
43. **[Lenz et al., 2007]** Lenz D, Mittag A, Bocsi J: Probenvorbereitung für die Bildzytometrie. Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.* Basel, Karger 2007;139-156
44. **[Li M, Zhang P, 2009]** Li Min, Zhang Pumin. The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. *Cell Div.* 2009.
45. **[Malek, NP et al., 2001]** Malek, NP, Sundberg H, McGrew S, Nakayama K, Kyriakides TR, Roberts JM. A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*, Sept 2001.
46. **[Malumbres M, 2014]** Malumbres M. Cyclin-dependent kinase. *Abstract. Genome Biology*, Jun 2014.

47. **[Mandai M et al., 2017]** Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiram Y. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. NEJM, 2017 March.
48. **[Mateyak K et. al., 1999]** Maria K. Mateyak, Alvaro J. Obaya, and John M. Sedivy*. c-Myc Regulates Cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 Activity but Affects Cell Cycle Progression at Multiple Independent Points. Mol. Cell. Biology, Jul 1999.
49. **[Minella, Loeb, 2008]** Minella AC, Loeb KR, Knecht A, et al. Cyclin E phosphorylation regulates cell proliferation in hematopoietic and epithelial lineages in vivo. Genes Dev. 2008, 22: 1677-1689
50. **[Minella A et. Al., 2012]** Minella AC, Siu KT, Rosner MR. An integrated view of Cyclin E function and regulation. Cell Cycle. Jan 2012.
51. **[Miura T et al., 1999]** Miura T¹, Klaus W, Gsell B, Miyamoto C, Senn H. Characterization of the binding interface between ubiquitin and class I human ubiquitin-conjugating enzyme 2b by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy in solution. J Mol. Bio. 1999, Jul.
52. **[Mohite & Bhatnagar, 2009]** Prashant N. Mohite and Ashok M. Bhatnagar. Mercurochrome 1% as an antiseptic for burns: Economical - but is it efficacious and safe? The Internet Journal of Surgery, vol. 21, 2009.
53. **[Moran R. et al., 1985]** Moran R, Darzynkiewicz Z, Staiano-Coico L, Melamed MR. Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step. J Histochem Cytochem. 1985.
54. **[Morgan, 2007]** D.O. Morgan. The cell cycle: Principles of control. New Science Press Ltd, 2007.
55. **[Morrison SJ et al., 2008]** S.J. Morrison, A.C. Spradling. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life Cell, 2008.
56. **[Mosmann, 1983]** T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, vol. 65, no. 1-2, pages 55–63, Dec 1983.

57. **[Nishina H et al., 1990]** Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M and Iba H: Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. Proc Natl Acad Sci USA. 87:3619–3623. 1990.
58. **[Oakes V et al., 2014]** Oakes V¹, Wang W, Harrington B, Lee WJ, Beamish H, Chia KM, Pinder A, Goto H, Inagaki M, Pavey S, Gabrielli B. Cyclin A/Cdk2 regulates Cdh1 and claspin during late S/G2 phase of the cell cycle. Cell cycle 2014.
59. **[Ott HC et al., 2008]** Ott H.C., Matthiesen T., Goh SK. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. Nature Medicine, 2008.
60. **[Paladini RD et al., 2005]** R.D. Paladini, et al. Modulation of hair growth with small molecule agonists of the hedgehog signaling pathway J. Invest. Dermatol. 2005.
61. **[Pati D, 1997]** Pati D, Keller C, Groudine M, Plon SE. Reconstitution of a MEC1-independent checkpoint in yeast by expression of a novel human fork head cDNA. Mol Cell. Biol., June 1997
62. **[Peters JM, 1998]** Peters JM. SCF and APC. The Yin and Yang of the cell cycle regulated proteolysis. Current Opin Cell Biology, Dec 1998.
63. **[Peters JM, 2006]** J.M. Peters. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7 (2006)
64. **[Phelan & Lawler, 2001]** Mary C. Phelan¹, Gretchen Lawler². Cell counting. Current Protocols in Cytometry, May 2001.
65. **[Ra JC et al., 2011]** J.C. Ra, *et al.* Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. Stem Cells Dev., 2011.
66. **[Radzio-Andzelm et al., 1995]** E. Radzio-Andzelm, J. Lew and S. Taylor. Bound to activate: conformational consequences of cyclin binding to CDK2. Structure, vol. 3, no. 11, pages 1135–1141, Nov 1995.
67. **[Reich N et al., 2010]** Reich N¹, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, Palumbo K, Zwerina J, Nevskaya T, Gay S, Distler O, Schett G, Distler

JH. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010.

68. **[Rieder CL, 2011]** Rieder, CL. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Res.* 2011 Apr
69. **[Robert E et al., 2001]** Robert E. Kingston¹, Claudia A. Chen², Hiroto Okayama³. Calcium Phosphate Transfection. *Current Protocols in Immunology*, May 2001.
70. **[Rodriguez et al., 2005]** Luis G. Rodriguez, Xiaoyang Wu, Jun-Lin Guan. Wound-Healing Assay Methods in *Molecular Biology™* Volume 294 pp 23-29.2005.
71. **[Roy & Banerjee, 2014]** Roy A, Banerjee S. p27 and Leukemia: Cell Cycle and Beyond. *Journal of Cellular Physiology*, Nov. 2014.
72. **[Sag D et al., 2015]** Sag D¹, Cekic C², Wu R¹, Linden J³, Hedrick CC¹. The cholesterol transporter ABCG1 links cholesterol homeostasis and tumour immunity. *Nat Commun.* 2015 Feb.
73. **[Sasaki K et al., 1988]** Sasaki K, Adachi S, Yamamoto T, Murakami T, Tanaka K, Takahashi M. Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry.* 1988.
74. **[Schrimpf, 2002]** Gangolf Schrimpf. *Gentechnische Methoden- Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Spektrum Akademischer Verlag, 2002 Seite 39-51.
75. **[Schröder et al., 2010]** Schröder C, Schumacher U, Müller V, Wirtz RM, Streichert T, Richter U, Wicklein D and Milde-Langosch K: The transcription factor Fra-2 promotes mammary tumour progression by changing the adhesive properties of breast cancer cells. *Eur J Cancer.* 2010.
76. **[Schwarz SD et al., 2012]** S.D. Schwartz. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*, 379 (2012)
77. **[Shaw P.H., 1996]** Phillip H. Shaw. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathology, Research and Practice*, Volume 192, Issue 7, Pages 669-675, 1996.

78. **[Sridhar J et al., 2006]** Sridhar J¹, Akula N, Pattabiraman N. Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. *AAPS Journal*, 2006 Mar.
79. **[Strutt DI, 1997]** Strutt DI, Weber U, Mlodzik M (1997). "The role of RhoA in tissue polarity and Frizzled signalling". *Nature*. **387** (6630): 292–5. 1997.
80. **[Sue JS et al., 2013]** Sue J. Sohn,^{*} Kathy Barrett,[†] Anne Van Abbema,[†] Christine Chang,[†] Pawan Bir Kohli,[†] Hidenobu Kanda,^{*‡} Janice Smith,[†] Yingjie Lai,[§] Aihe Zhou,[§] Birong Zhang,[§] Wenqian Yang,[¶] Karen Williams,^{||} Calum Macleod,^{||} Christopher A. Hurley,^{||} Janusz J. Kulagowski,^{||} Nicholas Lewin-Koh,[#] Hart S. Dengler,^{*} Adam R. Johnson,[†] Nico Ghilardi,^{*‡} Mark Zak,[§] Jun Liang,[§] Wade S. Blair,^{†,1} Steven Magnuson,[§] and Lawren C. Wu^{*} A Restricted Role for TYK2 Catalytic Activity in Human Cytokine Responses Revealed by Novel TYK2-Selective Inhibitors. *J Immunol*. 2013, Sept.
81. **[Sun C et al., 2016]** Chuang Sun, Gaohang Wang, Katharine H Wrighton, Han Lin, Zhou Songyang, Xin-Hua Feng, and Xia Lin. Regulation of p27^{Kip1} phosphorylation and G1 cell cycle progression by protein phosphatase PPM1G. *AM J Cancer Re.*, Oct 2016.
82. **[Sun J et al., 2016]** Sun J^{1,2}, Li H², Huo Q², Cui M², Ge C², Zhao F², Tian H², Chen T³, Yao M², Li J². The transcription factor FOXN3 inhibits cell proliferation by downregulating E2F5 expression in hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, Jul. 2016.
83. **[Stendahl M, 2010]** Maria Stendahl, Sofie Nilsson, Caroline Wigerup, Karin Jirstrom, Per Ebbe Jonsson, Olle Stål, Göran Landberg. p27^{Kip1} is a predictive factor for tamoxifen treatment response but not a prognostic marker in premenopausal breast cancer patients.
84. **[Sternberg K et al., 2013]** K. Sternberg et al. Implant-associated local drug delivery systems based on biodegradable polymers: customized designs for different medical applications. *Biomed. Tech*. 2013.
85. **[Takashima Akira, 2001]** Akira Takashima, Establishment of Fibroblast Cultures. *Current Protocols in Cell Biology*, May 2001.

86. **[Timmerbeul I. et al., 2006]** Inke Timmerbeul,^{a,b,c} Carrie M. Garrett-Engele,^{c,d} Uta Kossatz,^b Ludwig Wilkens,^g Ulrich Lehmann,^h Stefan Kubicka,^a Michael P. Manns,^a Peggy L. Porter,^j James M. Roberts,^{d,e,k} and Nisar P. Malek^{a,b,l} Testing the Importance of P27 Degradation by the SCF^{skp2} Pathway in Murine Models of Lung and Colon Cancer, *Cell Biology* Sept 2006.
87. **[Toba K et al., 1992]** Toba K, Winton EF, Bray RA. Improved staining method for the simultaneous flow cytometric analysis of DNA content, S-phase fraction, and surface phenotype using single laser instrumentation. *Cytometry*. 1992.
88. **[Todaro & Green, 1963]** Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17: 299-313, 1963.
89. **[Tom et al., 1999]**, M. Tom, M.R. Waterman, D. Bocking, C. Dauphin-Villemant, Cloning and characterization of the L15 ribosomal protein gene homologue from the crayfish *orconectes limosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999.
90. **[Vera J et al., 2015]** Vera J¹, Raatz Y², Wolkenhauer O³, Kottek T², Bhattacharya A², Simon JC², Kunz M². Chk1 and Wee1 control genotoxic-stress induced G2-M arrest in melanoma cells. *Cell Signaling*, May 2015.
91. **[Wang Q et al., 2001]** Wang Q¹, Yang C, Zhou J, Wang X, Wu M, Liu Z. Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. *Gene* 2001 Jan 24.
92. **[Wenninger G., 2012]** Wenninger, Gunnar. Identifizierung und Charakterisierung potentieller Wirkstoffe, welche die Inhibierung von Cdk2 durch p27Kip1 aufzuheben vermögen. *Dissertation*. Hannover, 2012.
93. **[Wool et al., 1995]** Wool IG, Chan YL, Glück A. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem Cell Biol.* 1995.
94. **[Yan C et al., 2015]** Yan Cai,¹ Seong Soo A An,¹ and SangYun Kim² Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders *Clin Interv Aging*. 2015.

95. **[Yan et al., 2015]** Yan TT, Fu XL, Li J, Bian YN, Liu DJ, Hua R, Ren LL, Li CT, Sun YW, Chen HY, Fang JY, Hong J. Downregulation of RPL15 may predict poor survival and associate with tumor progression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015 Nov.
96. **[Yao et al., 2008]** G. Yao, T.J. Lee, S. Mori, J.R. Nevins, L. You. A bistable Rb-E2F switch underlies the restriction point *Nat. Cell Biol.*, 10 (2008)
97. **[Zampetti et al., 2009]** Zampetti A¹, Mastrofrancesco A, Flori E, Maresca V, Picardo M, Amerio P, Feliciani C. Proinflammatory Cytokine Production in HaCat Cells Treated by Eosin: Implications for the Topical Treatment of Psoriasis, *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009.

8. Erklärungen zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität in Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Nisar P. Malek im Zeitraum von 2014 bis 2019 angefertigt.

Die Konzeption der Versuche und der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Przemyslaw Bozko, Laborleiter der Arbeitsgruppe Prof. Malek.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Przemyslaw Michal Bozko von mir eigenständig durchgeführt.

Das Sequenzieren der Proben aus dem shRNA Screening Versuch wurde durch das Institut für Medizinische Genetik in Tübingen durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 30.01.2019

Bariya Bajwa

9. Anhang

Gene enthalten in der Cancer 1000 Bibliothek

Gene 1 – 100

Abcb11	Alb1	Bard1	Cart	Cdc45l
Abcb1a	Amph	BC037006	Casp2	Cdc5l
Abcb4	Anxa1	BC051665	Casp3	Cdc6
Abcb7	Ap1s2	Bcar3	Cast	Cdc7
Abcb8	Apaf1	Bcas2	Cat	Cdh1
Abcb9	Apbb3	Bcl2l2	Catnb	Cdh10
Abcc3	Apc	Bcl3	Ccl20	Cdh15
Abcg1	Apoa1	Biklk	Ccm1	Cdh2
Abcg2	Apod	Bmi1	Ccna2	Cdh7
Acas2	App	Bmp1 TLL2	Ccnb2	Cdh8
Actr8	Appbp2	Bmp10	Ccnd1	Cdk10
Adprt1	Araf1	Bmp15	Ccnd2	Cdk5
AI839562	Areg	Bmp3	Ccne2	Cdk6
Aif1	Arg2	Bmp5	Ccnf	Cdk8
Akr1b7	Arpc1a	Bmp6	Cd44	Cdkn1b
Akr1b8	Atm	Brca1	Cdc25a	Cdkn2b
Akr1c12	Atr	Brca2	Cdc25c	Cdkn2d
Akr1c13	AW551984	Bre	Cdc2a	Cebpg
Akt2	Bag1	Btf3	Cdc42	Ches1
Akt3	Bak1	Bub1b	Cdc42ep3	Ckap4

Gene 101 – 200

Ckn1	Csf1r	Cyp24a1	Dpyd	Eno2
Clca5	Csf2	Cyp27a1	DRIM	Ep300
Cldn1	Csrp1	Cyp2c44	Dtx1	Ephb1
Cldn11	Cst6	Cyp2g1	E2f3	Eps8
Cldn4	Ctgf	Cyp2s1	E2f4	ErbB2
Clns1a	Ctsb	Cyr61	E2f6	ErbB3
Col11a1	Ctsc	Cyt1	Ecgf1	ErbB4

Col12a1	Ctsd	D15Ert366e	Edg1	Ercc1
Col17a1	Ctse	Dcc	Edg2	Ercc3
Col19a1	Ctsg	Dck	Edg5	Ercc4
Col4a4	Ctsh	Dcn	Efna2	Ercc5
Col5a1	Ctsk	Dctd	Efna5	Ercc6
Col5a2	Ctso	Ddr2	Egfr	Erf
Col6a3	Cxcl5	Ddx11	Egr2	Ets2
Col9a1	Cycs	Dll1	Eif3s3	Etv6
Col9a3	Cyct	Dnajc3	Eif3s6	Ewsr1
Crkl	Cyp17a1	Dnm1	Eif4e	Exo1
Crsp3	Cyp19a1	Dnmt2	Elk3	F2r
Cse1l	Cyp1a1	Dnmt3b	Emp1	F3
Csf1	Cyp1b1	Dpf2	Eno1	F8

Gene 201 – 300

Fabp7	Fkbp5	Gm1841	Hif1a	Il19
Fap	Fos	Gpr34	Hgf	Il6
Fhit	Gm1960	Hmmr	Il1b	Il7
Fkbp4	Gpnmb	Hrg	Il20	Il13
Fasn	Fosl1	Gpx2	lbsp	Ilk
Fbl	Fosl2	Grb10	ldb2	Ilk-2
Fgf10	Frk	Grb7	ler2	Ing1
Fgf14	Fxyd2	Gstm1	lfna2	Ins1
Fgf15	Fyn	Gstm2	lfna5	Ins2
Fgf16	Fzd7	Gstm4	lfna9	Insl5
Fgf17	G3bp	Gstm5	lfna12	Insl6
Fgf23	Gadd45a	Gstp1	lfna13	Insr
Fgf3	Gadd45g	Gstt2	lfng	Irf1
Fgf4	Gata3	Guk1	lgf1	Irs1
Fgf5	Gja1	Hat1	lgf1r	Irs4
Fgf6	Gja5	Hbs1l	lgf2r	Itga3
Fgf7	Gli2	Hck	lgfbp1	Itgav
Fgfr2	Gli3	Hdac1	lgfbp3	Itgb3

Fgfr4	Glo1	Hdac2	Igfbp5	Itgb4
Fgr	Glul	Hdac3	Igfbp7	Ivns1abp

Gene 301 – 400

Jag1	Loh11cr2a	Mc3r	Mre11a	Nme1
Jag2	Lyn	Mcm10	Mrps30	Nme2
Jun	Mad	Mcm3	Mst1r	Nol3
Jup	Mafg	Mcm6	Muc1	Notch4
Kai1	Mafk	Mdm2	Mug2	Nr0b1
Klk10	Map2k1	Met	Mx2	Nr0b2
Klk11	Map2k2	Mfge8	Myb	Nr1h3
Klk5	Map2k3	MGI:1351330	Myc	Nr1h4
Kntc2	Map2k4	MGI:1351465	MYC Myc	Nr1i3
Krt1-10	Map2k5	MGI:2447303	MYLK	Nr2c1
Krt1-13	Map2k6	Mif	Nans	Nr2c2
Krt1-18	Map2k7	Mmp11	Nbl1	Nr2e1
Krtcap1	Mapk1	Mmp13	Ncoa2	Nr2e1
Lasp1	Mapk10	Mmp14	Ncoa3	Nr2e3
Lcn2	Mapk12	Mmp17	Ncor2	Nr2f1
Lep	Mapk3	Mmp19	Ndph	Nr3c1
Lgals4	Mapk4	Mmp1a	Ndufa6	Nr3c2
Lgals6	Mapk8	Mmp7	Nek4	Nr4a1
Lgals9	Mapk9	Mmp9	Nefl	Nr4a2
Lif	Max	Mpl	Neurod1	Nr5a2

Gene 401 – 500

Nr6a1	Olfr1366	Parp1	Plat	Prkcn
Nras	Olfr295	Pcaf	Polr2b	Prkcq
Nrg1	Olfr301	Pcna	Plaur	Prkdc
Ntsr1	Olfr307	Pdcd1	Plg	Prkr
Nudt1	Olfr313	Pdcd10	Polb	Prl
Nudt4	Olfr419	Pdcd2	Pole3	Prlr
Nudt5	Olfr531	Pdcd4	Ppap2b	Prss18

Numb	Olfr95	Pdcd4	Pparg	Psen2
Odz1	Opn4	Pdcd4	Ppid	Psg17
Ofd1	Opn5	Pdcd5	Ppp2r2b	Psip1
Olfr113	Orc1l	Pdcd6	Ppp2r4	Psemb8
Olfr114	Orc2l	Pdgfb	Prdx1	Psmid9
Olfr116	Orc3l	Pea15	Prdx2	Pstpip2
Olfr125	Orc4l	Pecam1	Prdx3	Ptch1
Olfr126	Orc5l	Pfn1	Prkca	Ptgfr
Olfr127	Osm	Pglyrp1	Prkcb1	Ptk2b
Olfr1705	Oxct1	Pglyrp4	Prkcd	Ptk9
Olfr1707	Oxtr	Pgr	Prkce	Ptpn1
Olfr1709	Pam	Pip	Prkci	Ptpf
Olfr1350	Pap	Pip5k2b	Prkcm	Rab35

Gene 501 - 600

Rab9	Serpib2	Sox4	Syt1	Tm4sf1
Rac2	Serpib5	Sox5	Tacstd2	Tnc
Rhag	Serpini2	Sox8	Taz	Trp73
Rhoa	Sfrp1	Sparc	Tcea1	Tsg101
Rhoe	Sfrp5	Spock1	Tceb2	Tnfaip2
Rhoh	Sgk SGK	Src	Tcf21	Tnfrsf10b
Ripk1	Sh2d3c	Sstr1	Tcf4	Tnfrsf18
Rpl10a	Shbg	Sstr2	Tcfap2a	Tnfrsf1a
Rpl15	Siat7b	Sstr3	Terf1	Tnfrsf4
RPL7A	Sirt5	Stat1	Tert	Tnfrsf8
Rps4x	Skp2	Stc2	Tcfap2a	Tnfrsf9
Rraga	Sln	Stk17b	Tff1	Tnfsf10
Rras2	Smad4	Strap	Tfrc	Tnfsf4
Ruvbl1	Smarca2	Stx18	Tgfb3	Tnfsf6
Ruvbl2	Smarca3	Stx5a	Tgfbr2	Tob2
S100a10	Smarca3	Stx5a	Thbs2	Top2a
S100a3	Sncg	Sult1b1	Thra	Tpd52
S100a4	Sox13	Sult1e1	Tieg1	Tpm4

S100a8	Sox15	Sult2a1	Timp4	Tram1
Scgb1a1	Sox30	Syk	Tk2	Trfr2

Gene 601- 700

Trim31	Zfp217			
Trp53	Zfp3611			
Tsg101				
Ttc4				
Txn2				
Tyk2				
Tyms				
Ubadc1				
Ube2b				
Uhrf1				
Usp5				
Vdr				
Wasf2				
Wnt1				
Wnt10b				
Wnt11				
Wnt2				
Wnt5a				
Wnt7a				
Wnt8b				